



Structural and Functional Evaluation of Humic Acids in Interaction with Toxic Metals in a Cultivar of Agricultural Interest

Avaliação estrutural e funcional dos ácidos húmicos na interação com metais tóxicos em um cultivar de interesse agrícola

PhD. Liane Portuondo-Farías^I, PhD. Dariellys Martínez-Balmori^I, PhD. Fernando Guridi-Izquierdo^I,
PhD. Andrés Calderín-García^{II}, PhD. João Paulo Machado-Torres^{III}

^I Universidad Agraria de La Habana, Facultad de Agronomía, Departamento de Química, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

^{II} Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Laboratório de Solos, Rio de Janeiro, Brasil.

^{III} Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Laboratório de Radioisótopos. IBCCF-CCS, Rio de Janeiro, Brasil.

ABSTRACT. There are plants with the capacity to tolerate stress conditions due to toxic metals by developing mechanisms that allow them to maintain homeostasis. The purpose of this paper was to verify, after the addition of humic acids, as possible stimulators of these mechanisms, the activity of phenylalanine-ammonium-lyase and nitrate reductase enzymes, content of total nitrate, proline, (as components both of the antioxidant system of bean) as well as nitrogen, in plants subjected to stress by Pb^{2+} . Bean seeds were planted in a typical red Ferralitic soil, artificially contaminated with 100 mg kg^{-1} of Pb^{2+} . Fifteen days after germination, the plants were treated with humic acid solutions at concentrations of 20, 40 and 60 mg L^{-1} through foliar spraying, on the first and first trifoliolate leaves. Every fifteen days enzyme activities were analyzed. Results showed a decrease of biochemical-physiological effects caused by Pb^{2+} in the enzymatic systems of plants treated with humic acids, stating categorically that they may mitigate the stress provoked by metals in the phenological stages evaluated in bean crop, being 40 mg L^{-1} the most prominent dosage.

Keywords: humic substance, oxidative stress, defense mechanism

RESUMO. Existem plantas que tem a capacidade de tolerar condições de estresse por metais tóxicos, desenvolvendo mecanismos que permitem manter a homeostase. Objetivou-se com o presente trabalho verificar a partir da adição de ácidos húmicos - como possíveis estimuladores destes mecanismos - a atividade das enzimas fenilalanina-amonio-liase, nitrato reductase, conteúdo de nitratos totais e prolina, como componentes tanto do sistema de defesa antioxidante de plantas de feijão como do nitrogênio, submetidas a estresse por Pb^{2+} . Sementes de feijão foram semeadas num solo Ferralítico vermelho típico contaminado artificialmente com 100 mg kg^{-1} de Pb^{2+} . Após 15 dias de germinadas, as plantas foram tratadas com soluções de ácidos húmicos nas concentrações de 20, 40 e 60 mg L^{-1} mediante aspersão foliar na folha primária e na primeira folha trifoliolada e a cada 15 dias foram analisadas a atividade das enzimas. Os resultados evidenciaram uma atenuação dos efeitos bioquímico-fisiológicos causados pelo Pb^{2+} nos sistemas enzimáticos das plantas tratadas com ácidos húmicos, concluindo que os mesmos podem amenizar o estresse provocado pelo metal nas fases fenológicas avaliadas no cultivo do feijão, sendo a dose de 40 mg L^{-1} a mais promissória.

Palavras chave: substâncias húmicas, estresse oxidativo, mecanismos de defesa.

INTRODUCTION

Soil contamination by xenobiotics requires the application of technologies to their recovery often inaccessible.

INTRODUÇÃO

A contaminação dos solos por xenobióticos exige a aplicação de tecnologias muitas vezes inacessíveis para sua recuperação, e a

Plants with potential for phytoextraction can, in many cases, act as phytoremediation agents. One of the main environmental sources of metals such as Pb^{2+} has been gasoline, and exposure to it, in professional environment, occurs mainly in mining and manufacturing of inks, tiles and ceramics. In the case of plants, the cation can cause: (i) disturbances in mitosis; (ii) induction of micronuclei; (iii) alteration in membrane permeability and (iv) variation in enzymatic activity in response to oxidative stress generated in the cellular interior by the metal (Corpas & Barroso, 2016).

Current research highlights the use of plants or microorganisms in the rehabilitation of degraded areas, once few forms of life survive in these conditions. It has been shown that some legume species have potential for phytoextraction of the metal reaching up to 400 mg kg^{-1} of Pb^{2+} in the roots (Almeida *et al.*, 2008), indicating that there are mechanisms not studied yet, that allow tolerance of these plants to the contaminated environment. Recently, the beneficial effects of humic acids (HA) as constituents of soil organic matter have been demonstrated. These effects include the stimulation of different biochemical-physiological processes such as: (i) emergence and proliferation of lateral roots from sites of mitosis; (ii) modifications in the activity of various enzymes and intracellular metabolite content; (iii) variation in the synthesis of pigments and; (iv) hormone-like activity (García *et al.*, 2016). For this reason the objective of this work is to evaluate the potential of HA in the modification of the defense mechanisms of bean plants subjected to stress by Pb^{2+} , trying to elucidate the intermolecular interaction that binds the humic components to the metal to establish a more precise relationship in a plant - humic acid - metal system.

METHODOLOGY

The work was developed in greenhouse. Plant material was obtained from the germination of bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L. var. CC-25-9-N) certified by the National Institute of Agricultural Sciences of Cuba. The HA were extracted from vermicompost of bovine manure with three months of maturation and from them the chemical, physical and spectroscopic characterization was performed. The values obtained from H/C, O/C, C/N and total acidity showed similarities to those reported by the International Humic Substances Society (IHSS).

Treatments – Seeds were sown in two plant beds of $0,50 \text{ m} \times 2,30 \text{ m}$ on a typical Red Ferrallitic soil according to Cuban classification (Hernández, 1999), type Ferrasols according to world reference databases (IUSS, 2007). One of them was previously contaminated with Pb^{2+} (100 mg kg^{-1}) and the other one was not contaminated. Each plant bed was divided into four parts, three treatments and one control (4×2), resulting in eight treatments, each with 30 plants. After germination, the plants were treated with foliar applications of HA in the concentrations of 20, 40 and 60 mg L^{-1} and water as control. Applications were made in the mornings from the emission of the primary leaves and the first trifoliate leaf (FTL). Enzymatic activities were determined with the emission of the FTL and the third trifoliate leaf (TTL).

utilização de plantas, especificamente aquelas com potencial para a fitoextração, podem em muitos casos atuar como agentes de fitorremediação. Uma das principais fontes ambientais de alguns metais como o Pb^{2+} tem sido a gasolina, e a exposição ao mesmo no meio profissional é produzida fundamentalmente em atividades de mineração e fabricação de tintas, louças e cerâmicas. No caso das plantas esse cátion pode provocar: (i) distúrbios na mitose; (ii) indução de micronúcleos; (iii) alteração da permeabilidade da membrana e; (iv) variação na atividade de enzimas, em resposta ao estresse oxidativo gerado no interior celular pelo metal (Corpas y Barroso, 2016).

Várias pesquisas destacam o uso de plantas ou microrganismos na reabilitação de áreas degradadas, uma vez que poucas formas de vida sobrevivem nestas condições. Tem-se demonstrado que algumas espécies de leguminosas possuem potencial para a fitoextração do metal atingindo até 400 mg kg^{-1} de Pb^{2+} nas raízes (Almeida *et al.*, 2008), o que indica que existem mecanismos ainda não estudados que permitem a tolerância destas plantas ao meio contaminado. Recentemente têm se mostrado os efeitos benéficos dos ácidos húmicos (AH) como constituintes da matéria orgânica do solo. Estes efeitos incluem à estimulação de diferentes processos bioquímico-fisiológicos como: (i) emergência e proliferação de raízes laterais a partir de sítios específicos de mitose; (ii) modificações nas atividades de diversas enzimas e conteúdo de metabolitos intracelulares; (iii) variação na síntese de pigmentos e; (iv) atividade tipo hormonal (García *et al.*, 2016). Por esta razão objetivou-se com o presente trabalho avaliar as potencialidades dos AH na modificação dos mecanismos de defesa de plantas de feijão que estejam submetidas ao estresse por Pb^{2+} , tentando também elucidar a interação intermolecular que liga os componentes húmicos ao metal para estabelecer uma relação mais precisa num sistema planta - ácido húmico - metal.

METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação. O material vegetal foi obtido a partir da germinação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. var. CC-25-9-N) certificadas pelo Instituto Nacional de Ciências Agrícolas de Cuba. Os AH foram extraídos a partir de vermicomposto de esterco bovino com três meses de maturidade e deles foi feita a caracterização química, física e espectroscópica. Os valores obtidos das relações H/C, O/C, C/N e acidez total mostraram semelhança aos informados pela International Humic Substances Society (IHSS).

Tratamentos – As sementes foram semeadas em dois canteiros de $0,50 \text{ m} \times 2,30 \text{ m}$ de longitude em um solo Ferralítico vermelho típico segundo a classificação cubana (Hernández *et al.*, 1999), tipo Ferrasols segundo bases de dados de referência mundial (IUSS Working Group WRB, 2007), sendo um dos canteiros previamente contaminado com Pb^{2+} (100 mg kg^{-1}) e outro não contaminado. Cada canteiro foi dividido em quatro partes, três tratamentos e um controle (4×2), resultando em oito tratamentos, cada um com 30 plantas. Após a germinação, as plantas foram tratadas com aplicações foliares de AH nas concentrações de 20, 40 e 60 mg L^{-1} e água como controle. As aplicações foram realizadas nas manhãs a partir da emissão da folha primária e da primeira folha trifoliolada (PFT). As atividades enzimáticas foram determinadas com a emissão da PFT e da terceira folha trifoliolada (TFT).

Enzymatic analyses – Phenylalanine-ammonium-lyase enzyme (PAL) quantification was performed from an enzymatic extract and subsequent incubation at 40 °C for 30 minutes. Absorbance was read at 290 nm (Zhang *et al.*, 2000). For proline the plant material was homogenized with 3 % sulfosalicylic acid and absorbance at 520 nm was read using toluene as “blank” (Bates *et al.*, 1973). Nitrate reductase (NR) and total nitrate content were determined according to Harper (1981) and the absorbance was read at 540 and 410 nm, respectively, in a spectrophotometer (RayLihght UV-2100). All reagents used were of the highest purity purchased from Merck and Sigma-Aldrich.

Determination of Pb²⁺ – Analytical determinations of Pb²⁺ were performed in a Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometer VARIAN - AA240FS in the Radioisotope Laboratory of the IBCCF of UFRJ. The plants were subjected to digestion with HNO₃ until total solution and for pseudototal Pb²⁺ of the soil a digestion with aqua regia (HCl + HNO₃ - 3:1) was used through the microwave digestion system (CEM - model MDS-2000) with the extract recovered in 50 mL (Nieuwenhuize *et al.*, 1991). Results concerning Pb²⁺ determination were performed taking into consideration certified reference materials (NIST SRM 2709 for soil and NIST SRM 1573^a for the case of plants).

Statistical analysis – Information obtained was processed through analysis of variance (ANOVA) using the statistical package Statgraphic v. 5.1 plus and $p < 0,05$ (Tukey) for the means comparison test.

RESULTS AND DISCUSSION

Components of antioxidant metabolism and of nitrogen

– In vegetative phase of the bean under stress conditions; it was found that the biosynthesis of phenolic compounds is favored, given the high activity of the PAL in the different treatments (Figure 1).

Análise enzimática – A quantificação da enzima Fenilalanina-amônio-liase (PAL) foi feita a partir de um extrato enzimático e posterior incubação a 40 °C durante 30 minutos sendo lida à absorbância de 290 nm (Zhang *et al.*, 2000). Para o caso da prolina o material vegetal foi homogeneizado com ácido sulfosalicílico 3 % sendo a absorbância lida a 520 nm utilizando tolueno como branco (Bates *et al.*, 1973). A determinação da Nitrate reductase (NR) e do conteúdo de Nitratos totais foram feitos segundo Harper (1981), sendo lida à absorbância de 540 e 410 nm respectivamente num espectrofotômetro (RayLihght UV-2100). Todos os reagentes utilizados foram da mais alta pureza adquiridos da Merck e da Sigma-Aldrich.

Determinação de Pb²⁺ – As determinações analíticas do Pb²⁺ foram feitas num Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometer VARIAN – AA240FS no Laboratório de Radioisótopos do IBCCF da UFRJ. As plantas foram submetidas a digestão com HNO₃ até dissolução total e para o Pb²⁺ pseudototal no solo foi utilizada a digestão com água-régia (HCl + HNO₃ - 3:1) através de sistema de digestão em forno de micro-ondas (CEM - modelo MDS-2000) sendo o extrato recuperado em 50 mL (Nieuwenhuize *et al.*, 1991). Os resultados relativos à determinação do Pb²⁺ foram feitos tendo em consideração materiais certificados de referência (NIST SRM 2709 para solo e NIST SRM 1573^a para o caso das plantas).

Análise estatística - A informação obtida foi processada através de uma análise de variância (ANOVA) usando o pacote estatístico Statgraphic v. 5.1 plus e $p < 0,05$ (Tukey) para a prova de comparação de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Componentes do metabolismo antioxidante e do nitrogênio

- Na fase vegetativa do feijão em condições de estresse, se encontrou que a biossíntese de compostos fenólicos é favorecida, dada pela elevada atividade da PAL nos diferentes tratamentos (Figura 1).

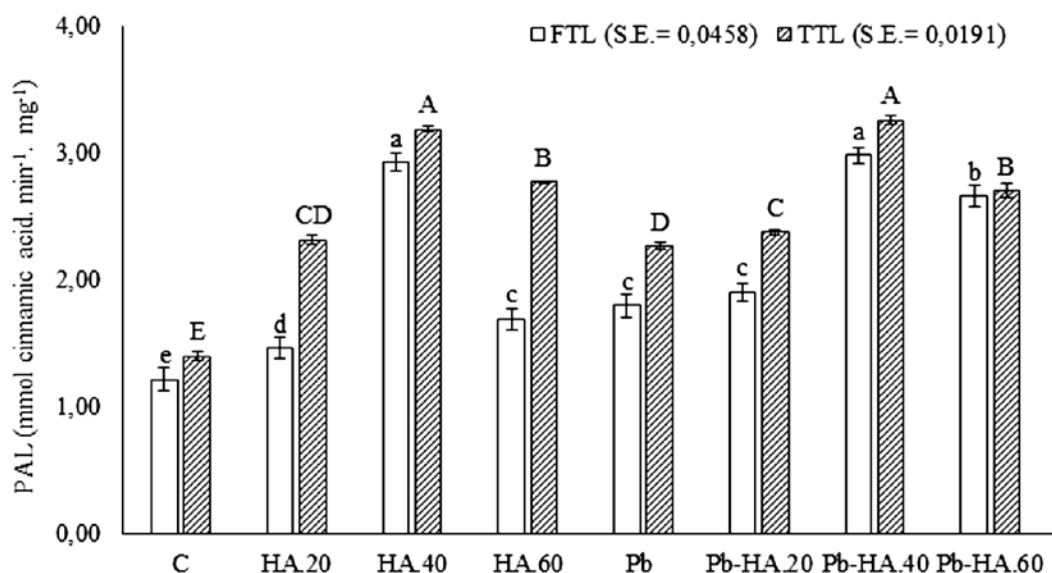


FIGURE 1. Phenylalanine-ammonia-lyase activity in bean plant leaves

FIGURA 1. Atividade da Fenilalanina-amônio-liase nas folhas das plantas de feijão.

Different letters indicate significant differences. Tukey's mean comparison test was used $p < 0,05$.

The activity of the enzyme increased over time in the two evaluations performed, probably as a plant defense mechanism of preparation for next phenological phase, because the synthesis of PAL is associated to the resistance system in the metabolism of the Phenylpropanoids (Zhang & Liu, 2015). The treatment of HA-40 mg L⁻¹ was the one that showed the highest expression, which would correspond to the greater synthesis of phenolic compounds with capacity to disrupt radical formation chains, demonstrating antioxidant properties (Barros *et al.*, 2016). These experimental evidences would explain the fact that plants with the addition of HA did not present any pathogen attack symptoms, as opposed to control treatment.

Proline concentrations in leaves (Figure 2) are considered as a response to O₂ Reactive Species (ROS) formed by the metal presence. The main role of this amino acid synthesis is osmoregulation, stabilization of subcellular structures and elimination of free radicals; processes that generally occur in response to drought conditions, salinity or pathogen infections (Wu *et al.*, 2017). In the treatment with the presence of the metal only, proline synthesis reached values in the two evaluation moments, up to twice the value of the control treatment, which could indicate a possible transport of the metal to the leaves, inducing this response mechanism. The fact that the HA treatments showed lower or similar proline content values indicates that the concentration of this metabolite in the leaf cells was due to the metal presence and not to the addition of HA.

A atividade da enzima aumentou ao longo do tempo nas duas avaliações realizadas, provavelmente como um mecanismo de defesa de preparação da planta para a próxima fase fenológica, pois a síntese da PAL está interligada ao sistema de resistência do metabolismo dos fenilpropanoides (Zhang y Liu, 2015). O tratamento de AH-40 mg L⁻¹ foi aquele que mostrou a maior expressão, o que se corresponderia com a maior síntese de compostos fenólicos com capacidade de quebra de cadeias de formação de radicais, demonstrando propriedades antioxidantes (Barros *et al.*, 2016). Estas evidências experimentais explicariam o fato de que as plantas com a adição dos AH não apresentaram nenhum sintoma de ataque de patógenos, ao contrário do tratamento controle.

As concentrações de prolina que apresentaram as folhas (Figura 2) são consideradas como uma resposta as Espécies Reativas do O₂ (EROs) formadas pela presença do metal. O principal rol da síntese deste aminoácido é a osmoregulação, estabilização de estruturas subcelulares e eliminação de radicais livres; processos que geralmente ocorrem como resposta às condições de seca, salinidade ou infecções por patógenos (Wu *et al.*, 2017). No tratamento com a presença somente do metal, a síntese de prolina alcançou valores nos dois momentos de avaliação, de até duas vezes o valor do tratamento controle, o que poderia indicar um possível transporte do metal até as folhas, induzindo este mecanismo de resposta. O fato de que os tratamentos com AH apresentassem valores de conteúdo de prolina menores ou semelhantes ao controle, indica que a concentração deste metabolito nas células das folhas foi devido à presença do metal e não pela adição de AH.

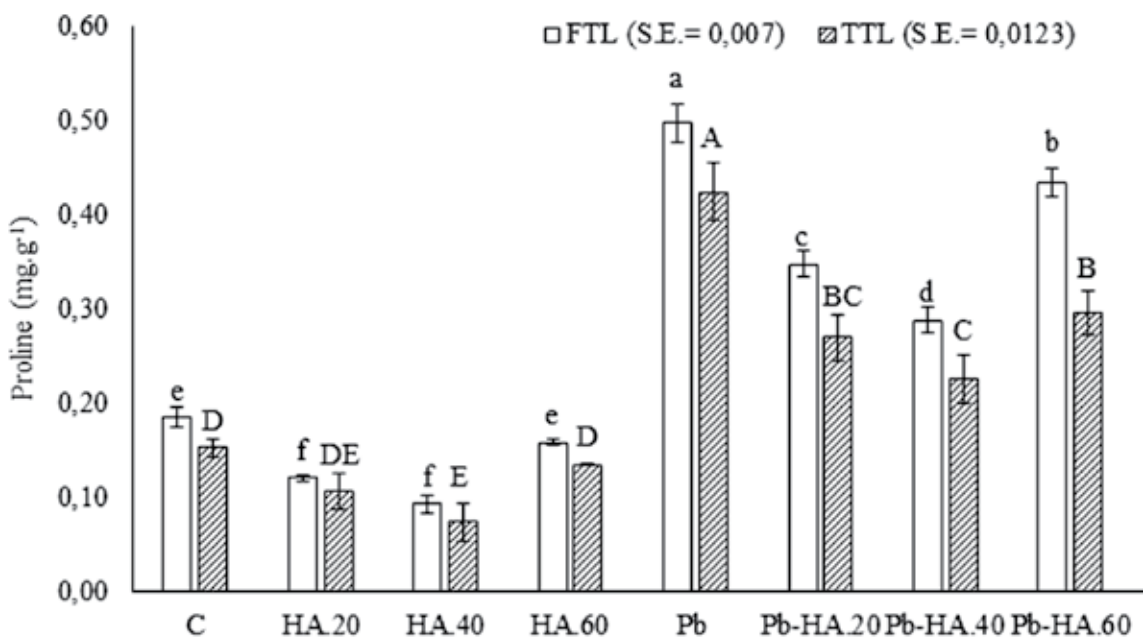


FIGURE 2. Proline content in leaves of bean plants
 FIGURA 2. Conteúdo de prolina nas folhas das plantas de feijão.
 Different letters indicate significant differences. Tukey's mean comparison test was used $p < 0,05$.

The decrease of proline content in the treatments with Pb²⁺-HA compared to the treatment that only contained the Pb²⁺, is possibly due to a mechanism of chelation of the HA with the metal, turning it into a non-reactive species in the cellular interior. Research related to this amino acid (Howla-

A diminuição do conteúdo de prolina nos tratamentos com Pb²⁺-AH comparado ao tratamento que somente continha o Pb²⁺, possivelmente se deve a um mecanismo de quelatação dos AH com o metal, convertendo-o em uma espécie não reativa no interior celular. Pesquisas relacionadas com este aminoácido (Howladar,

dar, 2014) showed that proline content increased significantly in response to stress induction by NaCl and CdCl₂ in bean plants. Most studies refer to proline synthesized primarily in the root, but in this work, it was found that it can also be synthesized in leaves, and that concentrations may vary depending on the magnitude of stress.

NR activity (Figure 3) showed an increase above control treatment levels in all treatments corresponding to the addition of HAs, including those containing Pb²⁺, which were higher than the one containing only the metal. The foliar addition of HA may be related to an increase of enzyme synthesis in leaves and ammonium production in roots, which results in a greater availability of reduction equivalents and glutamate, respectively, necessary compounds for phytochelatin synthesis, which are peptides that are part of the plant defense mechanism (Li *et al.*, 2016).

2014) mostraram que o conteúdo de prolina aumentou significativamente em resposta à indução de estresse por NaCl e CdCl₂ em plantas de feijão. A maioria dos estudos referem-se à prolina como sintetizada fundamentalmente na raiz, mas no nosso trabalho foi encontrado que também pode ser sintetizada nas folhas, e que as concentrações podem variar dependendo da magnitude do estresse.

A atividade da NR (Figura 3) mostrou um aumento por cima dos níveis do tratamento controle em todos os tratamentos correspondentes a adição dos AH, incluindo aqueles que tinham o Pb²⁺, que foram superiores ao que somente tinha o metal. A adição foliar dos AH poderia estar relacionada com um aumento da síntese da enzima nas folhas e da produção de amônio nas raízes, o que se traduz em uma maior disponibilidade de equivalentes de redução e de glutamato respectivamente, compostos necessários para a síntese de fitoquelatinas, que são peptídeos que formam parte do mecanismo de defesa das plantas (Li *et al.*, 2016).

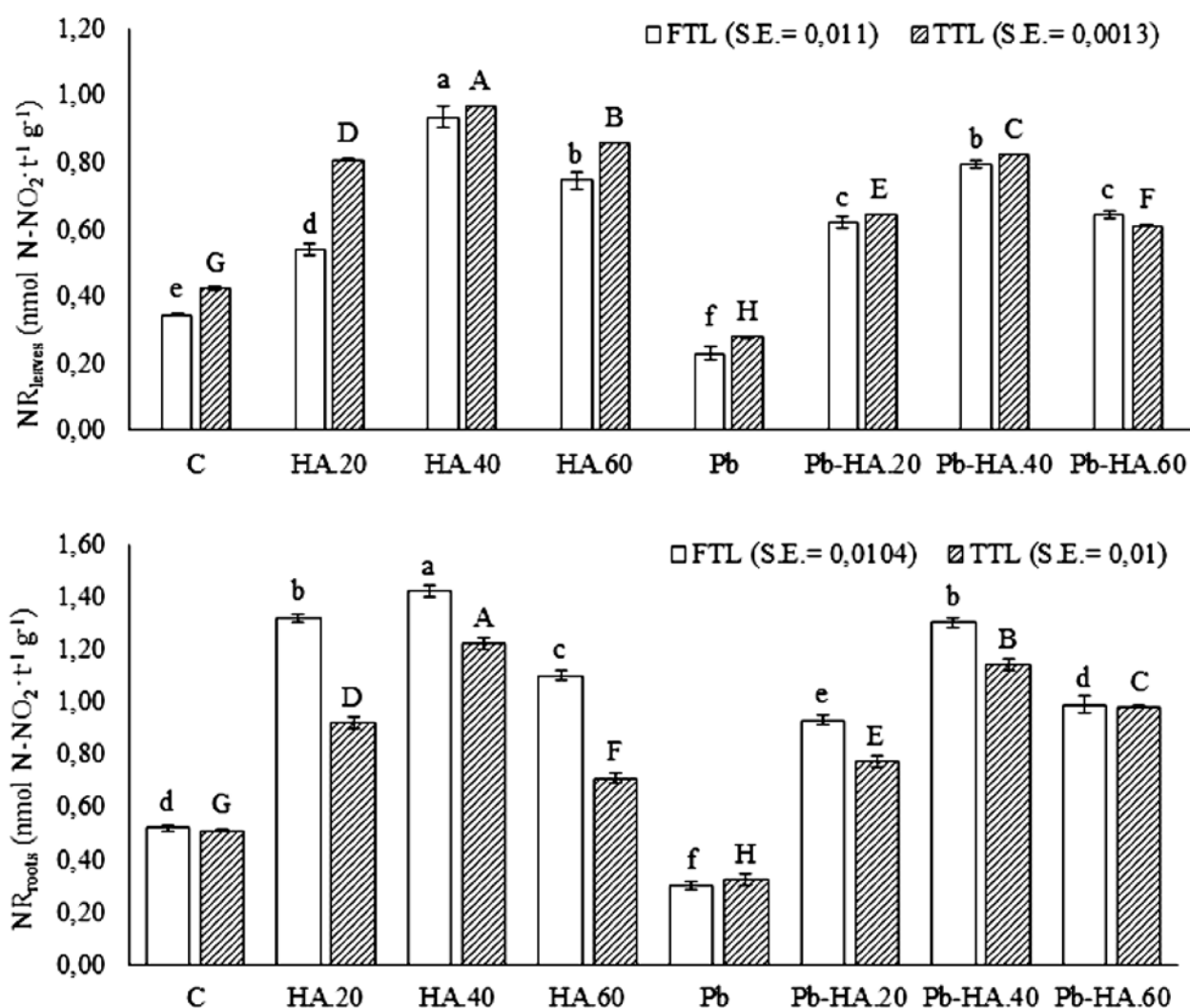


FIGURE 3. NR activity in leaves and roots of bean plants
 FIGURA 3. Atividade da NR em folhas e raízes das plantas de feijão.
 Different letters indicate significant differences. Tukey's mean comparison test was used $p < 0,05$.

Total nitrate content (Table 1) was higher in leaves than in roots, increasing with the time in the two evaluated organs. These values are interesting in leaves since it is well known that NO₃⁻ absorption requires energy, and the transport of

O conteúdo total de nitratos (Tabela 1), foi mais elevado nas folhas que na raiz, aumentando no tempo nos dois órgãos avaliados. Estes valores nas folhas são de grande importância já que é bem conhecido que a absorção de NO₃⁻ requer energia, e o transporte

this anion inside the cell occurs symport via of protons 2 H⁺: NO₃⁻ (Taiz & Zeiger, 2013) which can be generated by ATPase-like enzymes. In this sense, HA isolates of bovine manure vermicompost stimulate nitrate uptake, inducing plasma membrane H⁺-ATPase activity, presumably by an auxin-like effect (Martínez-Balmori *et al.*, 2014).

deste ânion dentro da célula acontece via simporte de prótons 2 H⁺: NO₃⁻ (Taiz y Zeiger, 2013) os quais podem ser gerados por enzimas tipo ATPasas. Neste sentido foi demonstrado que AH isolados de vermicomposto de esterco bovino estimulam a absorção de nitratos, induzindo a atividade da H⁺-ATPasa de membrana plasmática, presumivelmente por um efeito tipo auxina (Martínez-Balmori *et al.*, 2014).

TABLE 1. Total nitrate content (mg NO₃⁺ × kg⁻¹).
TABELA 1. Conteúdo de nitratos totais (mg NO₃⁺ × kg⁻¹)

Treatments	FTL (Leaves)	TTL (Leaves)	FTL (Roots)	TTL (Roots)
C	0,19 ± 0,0023 c	0,21 ± 0,0150 E	0,02 ± 0,0051 f	0,03 ± 0,0053 E
HA.20	0,21 ± 0,0123 c	0,25 ± 0,0230 DE	0,06 ± 0,0070 d	0,08 ± 0,0070 BC
HA.40	0,42 ± 0,0323 a	0,50 ± 0,0178 A	0,13 ± 0,0021 b	0,09 ± 0,0073 B
HA.60	0,38 ± 0,0245 a	0,35 ± 0,0177 C	0,15 ± 0,0023 a	0,03 ± 0,0045 E
Pb	0,01 ± 0,0036 d	0,06 ± 0,0033 F	0,01 ± 0,0018 g	0,04 ± 0,0025 E
Pb-HA.20	0,23 ± 0,0129 bc	0,26 ± 0,0211 DE	0,08 ± 0,0068 c	0,06 ± 0,0043 D
Pb-HA.40	0,38 ± 0,0156 a	0,42 ± 0,0278 B	0,12 ± 0,0023 b	0,15 ± 0,0075 A
Pb-HA.60	0,28 ± 0,0112 b	0,29 ± 0,0120 D	0,04 ± 0,0015 e	0,07 ± 0,0023 CD
S.E.	0,0097	0,011	0,0024	0,0031

In each physiological phase evaluated, a nodule count was carried out in the roots, which increased with the time. The number of nodules was higher in the treatment corresponding to 40 mg L⁻¹ of HA, both with the addition of HA only and with the interaction Pb²⁺-HA, which corresponds also to the total nitrate content and enzyme activity NR at the root (Figure 3). Root studies of plants cultivated in soil with the presence of Pb²⁺ showed a nodule formation with reduced mycorrhizal colonization (Schneider *et al.*, 2016). Results in this work showed that bean is able to develop nodulation in presence of 100 mg kg⁻¹ of Pb²⁺, however, future studies of isolation and identification of root microorganisms under these conditions will have to be performed.

Pb content – Soil artificially contaminated with Pb²⁺ had a pseudo-metal value of approximately 129,2 mg kg⁻¹ before sowing (Table 2) and 12,023 mg kg⁻¹ after completion of the study. This means that bean crop was able to extract approximately 117 mg kg⁻¹ of Pb²⁺ from the soil.

Em cada fase fisiológica avaliada foi feita uma contagem dos nódulos formados nas raízes, o qual aumentou no tempo. O número de nódulos foi maior no tratamento correspondente a 40 mg L⁻¹ de AH, tanto na adição somente do AH quando na interação Pb²⁺-AH, o que se corresponde também com o conteúdo de nitratos totais e atividade da enzima NR na raiz (Figura 3). Estudos a partir de raízes de plantas cultivadas em solo com presença de Pb²⁺ mostraram formação de nódulos com redução da colonização micorrízica (Schneider *et al.*, 2016). Os resultados demonstram que o feijão é capaz de desenvolver a nodulação na presença de 100 mg kg⁻¹ de Pb²⁺, porém, estudos futuros de isolamento e identificação dos microrganismos das raízes nestas condições terão que ser feitos.

Conteúdo de Pb - O solo contaminado artificialmente com Pb²⁺ apresentou teor pseudototal do metal de aproximadamente 129,2 mg kg⁻¹ antes da plantação (Tabela 2) e de 12,023 mg kg⁻¹ depois de culminado o estudo. Isto significa que o cultivar de feijão foi capaz de extrair do solo aproximadamente 117 mg kg⁻¹ de Pb²⁺.

TABLE 2. Values (mg kg⁻¹) of pseudototal and bioavailable Pb²⁺ in the soil
TABELA 2. Teores (mg kg⁻¹) pseudototais e biodisponíveis de Pb²⁺ no solo

	Soil before sowing		Rhizosphere soil / FTL		Rhizosphere soil / TTL		Soil after completion of the crop cycle	
	B	PST	B	PST	B	PST	B	PST
C	0,268	32,168	4,285	28,989	4,185	26,374	0,003	0,021
C-HA.20			4,625	27,685	8,997	21,515		
C-HA.40			12,895*	17,935*	11,234*	16,495*		
C-HA.60			7,029	24,393	7,788	22,981		
Pb	17,536	129,164	17,048	110,765	21,966	106,365	1,279	12,023
Pb-HA.20			22,597	105,438	26,610	99,637		
Pb-HA.40			28,247*	98,885*	36,929*	91,195*		
Pb-HA.60			23,107	104,725	25,157	101,515		

* It indicates significant differences in P < 0,05 for HA treatments when compared to control treatment and Pb²⁺ treatments. B: Bioavailable, PST: Pseudototal

Under natural conditions, soil Pb²⁺ content values above 100 mg kg⁻¹ have been reported only for some soils in Japan, Denmark and a few other countries due to the impact of conta-

Em condições naturais valores do conteúdo de Pb²⁺ no solo acima de 100 mg kg⁻¹ têm sido reportado somente para alguns solos no Japão, Dinamarca e outros poucos países por impacto

mination (Nakata *et al.*, 2017). The content of Pb²⁺ in different parts of bean plant can be observed in the Table 3. Metal values detected in root were higher than those of the aerial part, being the treatment with presence of HA-40 mg L⁻¹, the one where the greatest extraction of the metal was shown. Studies by Venkatachalam *et al.* (2017), state that Pb²⁺ tolerant plant species accumulate higher concentrations in the roots. Under the conditions of this experiment, bean plants did not prevent the metal absorption, but limited their translocation to the aerial part, which could be a strategy to obtain the tolerance to the metal.

da contaminação (Nakata *et al.*, 2017). O conteúdo de Pb²⁺ nas diferentes partes das plantas de feijão é demonstrado na Tabela 3. Os teores do metal detectados na raiz foram maiores que os da parte aérea sendo os tratamentos com a presença do AH-40 mg L⁻¹ aquele onde se mostrou a maior extração do metal. Estudos de Venkatachalam *et al.* (2017), afirmam que as espécies de plantas tolerantes ao Pb²⁺ acumulam maiores concentrações nas raízes. Em nossas condições as plantas de feijão não evitaram a absorção do metal, mas limitaram sua translocação para a parte aérea, o que poderia ser uma estratégia para conseguir a tolerância ao metal.

TABLE 3. Total values of Pb²⁺ (mg kg⁻¹) in the different organs of plants
TABELA 3. Teores (mg kg⁻¹) totais do Pb²⁺ nos diferentes órgãos das plantas

	Leaves		Roots		Seeds
	FTL	TTL	FTL	TTL	
C	0,491	1,894	1,934	2,483	nd
C-HA.20	1,875	3,381	2,454	4,794	nd
C-HA.40	4,967*	5,002	8,369*	10,032*	nd
C-HA.60	3,174	4,914	3,637	4,300	nd
Pb	6,498	8,016	11,626	12,372	0,01
Pb-HA.20	5,128	8,154	15,546	17,358	nd
Pb-HA.40	11,945*	15,496*	16,401	19,253*	nd
Pb-HA.60	9,229	10,583	14,581	15,675	nd

* It indicates significant differences in P < 0,05 for HA treatments when compared to the control treatment and with treatments of Pb²⁺, nd: not detected

There was not metal detected in seeds, except for a minimum amount found in the treatment that only contained Pb²⁺. These results are of great importance considering that beans are widely consumed in Latin American countries, especially by low income social classes, constituting the main source of proteins, minerals, vitamins and fibres, due to their lower cost in relation to those of animal origin.

Na semente não foi detectado o metal, a exceção de uma mínima quantidade encontrada no tratamento que somente continha o Pb²⁺, resultados estes de grande importância tendo em conta que o feijão é consumido amplamente nos países de Latinoamérica, especialmente nas classes sociais de menor poder aquisitivo, constituindo a principal fonte de proteínas, minerais, vitaminas e fibras, devido a seu menor custo em relação à de origem animal.

CONCLUSIONS

- All treatments corresponding to the interaction Pb²⁺-HA showed a variation in the enzymatic activity depending on the concentration under study and the physiological phase of the culture. For the case of PAL and N metabolism, the trend was increasing over time, as a positive response of HA in the formation of phenolic compounds that can give a biological resistance and absorption of nitrates, fundamental components of amino acids, proteins and synthesis of the oxidative stress enzymes themselves.
- The concentration of 40 mg L⁻¹ of HA was the one that showed the best response to stress, being able to be used as organic biostimulant and possible activator of adaptation mechanisms, favoring also the greater absorption of the soil metal.

CONCLUSÕES

- Todos os tratamentos correspondentes à interação Pb²⁺-AH mostraram uma variação na atividade enzimática dependendo da concentração em estudo e da fase fisiológica da cultura. Para o caso da PAL e o metabolismo do N, a tendência foi o aumento no tempo, como uma resposta positiva dos AH na formação de compostos fenólicos que possam dar uma resistência biológica e, a absorção de nitratos, componentes fundamentais de aminoácidos, proteínas e síntese das próprias enzimas de estresse oxidativo.
- A concentração de 40 mg L⁻¹ de AH foi a que mostrou a melhor resposta ao estresse, podendo-se utilizar como bioestimulante orgânico e possível ativador de mecanismos de adaptação, propiciando também a maior absorção do metal no solo.

REFERENCES/REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.L. de; MARCOS, F.C.C.; SCHIAVINATO, M.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; ABREU, M.F. de: "Crescimento de feijão de porco na presença de chumbo", *Bragantia*, 67(3): 569-576, 2008, ISSN: 0006-8705, DOI: 10.1590/S0006-87052008000300003.
- BARROS, J.; SERRANI-YARCE, J.C.; CHEN, F.; BAXTER, D.; VENABLES, B.J.; DIXON, R.A.: "Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis", *Nature Plants*, 2(6): 16050, 2016, ISSN: 2055-0278, DOI: 10.1038/nplants.2016.50.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D.: "Rapid determination of free proline for water-stress studies", *Plant and Soil*, 39(1): 205-207, 1973, ISSN: 0032-079X, 1573-5036, DOI: 10.1007/BF00018060.

- CORPAS, F.J.; BARROSO, J.B.: "Lead-induced stress, which triggers the production of nitric oxide (NO) and superoxide anion (O₂⁻) in Arabidopsis peroxisomes, affects catalase activity.", *Nitric Oxide : biology and chemistry*, 2016, ISSN: 1089-8603, DOI: 10.1016/j.niox.2016.12.010, Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/med/28039072>, [Consulta: 23 de junio de 2017].
- GARCÍA, A.C.; DE SOUZA, L.G.A.; PEREIRA, M.G.; CASTRO, R.N.; GARCÍA-MINA, J.M.; ZONTA, E.; LISBOA, F.J.G.; BERBARA, R.L.L.: "Structure-Property-Function Relationship in Humic Substances to Explain the Biological Activity in Plants", *Scientific Reports*, 6: 20798, 2016, ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/srep20798.
- HARPER, J.E.: "Evolution of Nitrogen Oxide(s) during *In Vivo* Nitrate Reductase Assay of Soybean Leaves", *Plant Physiology*, 68(6): 1488-1493, 1981, ISSN: 0032-0889, 1532-2548, DOI: 10.1104/pp.68.6.1488.
- HERNÁNDEZ, J.A.; PÉREZ, J.M.; BOSCH, D.; RIVERO, L.; CAMACHO, E.; RUÍZ, J.; SALGADO, E.J.; MARSÁN, R.; OBREGÓN, A.; TORRES, J.M.; GONZÁLES, J.E.; ORELLANA, R.; PANEQUE, J.; RUIZ, J.M.; MESA, A.; FUENTES, E.; DURÁN, J.L.; PENA, J.; CID, G.; PONCE DE LEÓN, D.; HERNÁNDEZ, M.; FRÓMETA, E.; FERNÁNDEZ, L.; GARCÉS, N.; MORALES, M.; SUÁREZ, E.; MARTÍNEZ, E.: *Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba*, Ed. AGROINFOR, La Habana, Cuba, 64 p., 1999, ISBN: 959-246-022-1.
- HOWLADAR, S.M.: "A novel *Moringa oleifera* leaf extract can mitigate the stress effects of salinity and cadmium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100: 69-75, 2014, ISSN: 0147-6513, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.11.022.
- IUSS WORKING GROUP WRB: *World reference base for soil resources 2006. A framework for international classification, correlation and communication*, Micheli, E. (ed.), ser. World Soil Resources Reports, no. ser. 103, Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2.^a ed., Rome, Italy, 128 p., Primera Actualización, 2007, ISBN: 978-92-5-105511-3.
- LI, Y.; ZHOU, C.; HUANG, M.; LUO, J.; HOU, X.; WU, P.; MA, X.: "Lead tolerance mechanism in *Conyza canadensis*: subcellular distribution, ultrastructure, antioxidative defense system, and phytochelatin", *Journal of Plant Research*, 129(2): 251-262, 2016, ISSN: 0918-9440, 1618-0860, DOI: 10.1007/s10265-015-0776-x.
- MARTINEZ-BALMORI, D.; SPACCINI, R.; AGUIAR, N.O.; NOVOTNY, E.H.; OLIVARES, F.L.; CANELLAS, L.P.: "Molecular Characteristics of Humic Acids Isolated from Vermicomposts and Their Relationship to Bioactivity", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(47): 11412-11419, 2014, ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/jf504629c.
- NAKATA, H.; NAKAYAMA, S.M.M.; OROSZLANY, B.; IKENAKA, Y.; MIZUKAWA, H.; TANAKA, K.; HARUNARI, T.; TANIKAWA, T.; DARWISH, W.S.; YOHANNES, Y.B.; SAENGTIENCHAI, A.; ISHIZUKA, M.: "Monitoring Lead (Pb) Pollution and Identifying Pb Pollution Sources in Japan Using Stable Pb Isotope Analysis with Kidneys of Wild Rats", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1): 56, 2017, ISSN: 1661-7827, DOI: 10.3390/ijerph14010056.
- NIEUWENHUIZE, J.; POLEY-VOS, C.H.; AKKER, A.H. van den; DELFT, W. van: "Comparison of microwave and conventional extraction techniques for the determination of metals in soil, sediment and sludge samples by atomic spectrometry", *Analyst*, 116(4): 347-351, 1991, ISSN: 1364-5528, DOI: 10.1039/AN9911600347.
- SCHNEIDER, J.; BUNDSCHUH, J.; DO NASCIMENTO, C.W.A.: "Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation of a lead-contaminated site", *Science of The Total Environment*, 572: 86-97, 2016, ISSN: 0048-9697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.185.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.: *Fisiologia Vegetal, [en línea]*, Ed. Artmed, 5.^a ed., Porto Alegre, 918 p., 2013, ISBN: 978-85-363-2795-2, Disponible en: <https://www.saraiva.com.br/fisiologia-vegetal-5-ed-2013-4269764.html>, [Consulta: 23 de junio de 2017].
- VENKATACHALAM, P.; JAYALAKSHMI, N.; GEETHA, N.; SAHI, S.V.; SHARMA, N.C.; RENE, E.R.; SARKAR, S.K.; FAVAS, P.J.C.: "Accumulation efficiency, genotoxicity and antioxidant defense mechanisms in medicinal plant *Acalypha indica* L. under lead stress", *Chemosphere*, 171: 544-553, 2017, ISSN: 0045-6535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.092.
- WU, H.-H.; ZOU, Y.-N.; RAHMAN, M.M.; NI, Q.-D.; WU, Q.-S.: "Mycorrhizas alter sucrose and proline metabolism in trifoliolate orange exposed to drought stress", *Scientific Reports*, 7: 42389, 2017, ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/srep42389.
- ZHANG, S.; ZHANG, F.; HUA, B.: "Enhancement of phenylalanine ammonia lyase, polyphenoloxidase, and peroxidase in cucumber seedlings by *Bernisia tabaci* (Gennadius)", *Agriculture Sciences in China*, 7(1): 82-87, 2000, ISSN: 1671-2927.
- ZHANG, X.; LIU, C.-J.: "Multifaceted Regulations of Gateway Enzyme Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Biosynthesis of Phenylpropanoids", *Molecular Plant*, ser. Plant Metabolism and Synthetic Biology, 8(1): 17-27, 2015, ISSN: 1674-2052, DOI: 10.1016/j.molp.2014.11.001.

Received: 06/01/2017.

Approved: 15/06/2017.

Liane Portuondo Fariás, Prof. e Inv., Universidad Agraria de La Habana, Facultad de Agronomía, Departamento de Química, Autopista Nacional y carretera Tapaste km 23 ½ CP: 32 700. Apartado Postal: 1819, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. E-mail: liane@unah.edu.cu

Dariellys Martínez Balmori, E-mail: darielly@unah.edu.cu

Fernando Guridi Izquierdo, E-mail: fguridi@unah.edu.cu

Andrés Calderín García, E-mail: cg.andres@gmail.com

João Paulo Machado Torres, E-mail: liane@unah.edu.cu

Note: the mention of commercial equipment marks, instruments or specific materials obeys identification purposes, there is not any promotional commitment related to them, neither for the authors nor for the editor.