

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**EFEITO DO COBRE NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS E
FUNGOS DO SOLO, ASSOCIAÇÃO ECTOMICORRÍZICA E NO
DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE EUCALIPTO E
CANAFÍSTULA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lílian Castilho dos Santos

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**EFEITO DO COBRE NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS E
FUNGOS DO SOLO, ASSOCIAÇÃO ECTOMICORRÍZICA E NO
DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE EUCALIPTO E
CANAFÍSTULA**

por

Lílian Castilho dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência do Solo

Orientadora: Prof. Dra. Zaida Inês Antonioli

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO COBRE NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS DO
SOLO E ASSOCIAÇÃO ECTOMICORRÍZICA E NO
DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE EUCALIPTO E CANAFÍSTULA**

elaborada por
Lílian Castilho dos Santos

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA:

Zaida Inês Antonioli, Dra.
(Presidente/Orientador)

Antonio Carlos Ferreira da Silva, Dr. (UFSM)

Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 07 de dezembro de 2006.

A minha querida mãe, Loedir,
pelas suas renúncias em meu nome

EU DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus que me guia através das intuições no caminho do bem.

Aos meus queridos pais, que me educaram através dos bons exemplos.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelo conhecimento e formação.

A Professora Zaida Inês Antonioli, pela oportunidade ao aceitar-me como orientada, pela atenção dispensada e pelo conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho.

Aos bolsistas Manuelli Lupatini e Lineu Leal pelo auxílio responsável, a Carlos Augusto Moro pela ajuda na coleta a campo, a Andréa Hentz de Mello pelas sugestões oportunas e ao Laboratorista Antônio Bassaco pelos agradáveis momentos de convivência e auxílio quando solicitado.

As valiosas contribuições das amigas Elaine Pagnossin pela confecção do mapa e Simone Franzin pelo auxílio na estatística.

As colegas e amigas do Programa de Pós-Graduação, Cristiane Regina Michelin, Laura Patrícia da Luz e Regina Helena Cargnin, pelo apoio no enfrentamento das dificuldades.

As queridas colegas de trabalho da Escola Cícero Barreto, Diretora Elisabeth Jobim e Vice-diretora Regina Giuliane, pela compreensão e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O Cobre	15
2.1.1 Cobre no solo	15
2.1.2 Cobre e matéria orgânica	17
2.1.3 Cobre nas plantas	17
2.1.4 Cobre e microrganismos	19
2.2 Microrganismos	21
2.2.1 Bactérias do solo	21
2.2.2 Fungos do solo	22
2.2.2.1 Ectomicorrizas	24
2.2.2.2 Ectomicorrizas e a contaminação do solo	25
2.2.3 Principais fatores que influenciam os microrganismos do solo	28
2.2.3.1 pH	28
2.2.3.2 Temperatura e umidade	29
2.2.3.3 Nutrientes	30
2.3 Essências florestais	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 População de bactérias e fungos do solo em área contaminada por cobre nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS.	34
3.1.1 Localização da área	34
3.1.2 Descrição da área	35
3.1.3 Solo	35
3.1.4 Identificação dos fungos	35

3.1.5 Meios de cultura	37
3.1.6 Avaliação	38
3.1.7 Análise estatística	38
3.2 Efeito do cobre e de fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden e <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert	38
3.2.1 Preparação das mudas	38
3.2.2 Substrato	39
3.2.3 Adição de sulfato de cobre	39
3.2.4 Seleção do fungo ectomicorrízico	40
3.2.5 Produção de inoculante	40
3.2.6 Experimento com cobre, semente e inóculo de fungo ectomicorrízico	41
3.2.7 Avaliação	42
3.2.8 Análise estatística	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 População de bactérias e fungos do solo em área contaminada por cobre nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS.	43
4.2 Influência de fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden e <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert	50
5 CONCLUSÕES	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
APÊNDICE A- Efeito do cobre na população de bactérias e fungos do solo e no cultivo de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden e <i>Pinus elliotti</i> Engelm	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características químicas e físicas e teor de cobre em amostras de solo de área de rejeito, margem, cultivo de eucalipto, pinus 2 anos e pinus com mais de 10 anos de cultivo. Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, Brasil. 2006. ...	37
Tabela 2- População de bactérias e fungos do solo em diferentes locais de coleta nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006.	45
Tabela 3- Gêneros de fungos do solo encontrados nas diferentes áreas de coleta das Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006.	47
Tabela 4- Matéria seca da parte aérea, matéria fresca da parte aérea e da raiz, altura, diâmetro do colo e percentagem de colonização micorrízica de <i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden em resposta a inoculação com <i>Pisolithus microcarpus</i> aplicados ao substrato areia- vermiculita 1:1 (v/v), Santa Maria, RS, 2006.	52
Tabela 5- Matéria seca da parte aérea, matéria fresca da parte aérea e da raiz, altura, diâmetro do colo e percentagem de colonização micorrízica de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert em resposta a inoculação com <i>Pisolithus microcarpus</i> aplicados ao substrato areia- vermiculita 1:1 (v/v), Santa Maria, RS, 2006.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Etapas da execução do estudo do efeito do cobre sobre a população de bactérias e fungos nas Minas do Camaquã, RS, Brasil e sobre a associação ectomicorrízica em eucalipto e canafístula em casa de vegetação da UFSM, Santa Maria, RS, 2006.	33
Figura 2- Localização do município de Caçapava do Sul, RS, Brasil.	34
Figura 3- Locais de coleta das amostras de solo. Área de rejeito (A), margem (B), cultivo de eucalipto (C), pinus 2 anos e (D) pinus com mais de 10 anos (E) localizadas nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006.	36
Figura 4- Cultura do fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> Pt 116-UFSC selecionado para produção do inoculante. Santa Maria, RS, 2006.	40
Figura 5- Inoculante miceliano em mistura de turfa-vermiculita com 90 dias de incubação a 25°C. Santa Maria, RS, 2006.	41
Figura 6- Unidade experimental com substrato, cobre, semente e inóculo de fungo ectomicorrízico. Santa Maria, RS, 2006.	41
Figura 7- Características das colônias dos isolados de fungos das áreas de margem (Ma) (A e B) cultivo de eucalipto (C) área de pinus com 2 anos de cultivo (D) área de rejeito (E) e área de Pinus com mais de 10 anos de cultivo (F) nas Minas do	

Camaquã, Caçapava do Sul, RS, Brasil, 2006.	48
Figura 8- Mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden aos 110 dias inoculadas com Pt 116 (A), sem inoculação (B) com Pt 116. Santa Maria, RS, 2006.	51
Figura 9- Mudas de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert aos 110 dias inoculadas com Pt 116 (A), sem inoculação (B) com Pt 116. Santa Maria, RS, 2006.	54

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO DO COBRE NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS DO SOLO, ASSOCIAÇÃO ECTOMICORRÍZICA E NO DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE EUCALIPTO E CANAFÍSTULA

AUTORA: Lílian Castilho dos Santos

ORIENTADORA: Zaida Inês Antonioli

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 07 de dezembro de 2006.

Os microrganismos são sensíveis à presença de determinadas concentrações de cobre sendo considerados biorremediadores capazes de remover metais através de processos ativos e passivos, acumulando-os em seus compartimentos celulares. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do cobre sobre a população de fungos, bactérias do solo e associação ectomicorrízica, bem como avaliar a ação deste no desenvolvimento de mudas de eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden) e canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). As amostras de solo foram coletadas em área de rejeito, margem, cultivo de eucalipto, pinus com 2 anos e com 10 anos de cultivo, nas Minas do Camaquã, Caçapava, RS. A contagem da população de fungos e bactérias do solo foi realizada em meio de cultura incubado por 8 dias a 25 °C. Posteriormente, foi instalado experimento para avaliar o efeito do cobre (0, 100, 200, 300 mg kg⁻¹ copper) no desenvolvimento de mudas de eucalipto e canafístula inoculadas ou não com *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) Cunn. UFSC Pt 116. Avaliou-se altura, diâmetro do colo, matéria fresca da parte aérea e radicular, matéria seca da parte aérea e percentagem de colonização ectomicorrízica aos 110 dias. As maiores médias para a população de bactérias totais foram encontradas nas áreas de margem e cultivo de eucalipto, para a população de fungos do solo foram em área de margem. A quantidade de 203 mg dm⁻³ de cobre inibe a população de bactérias e fungos do solo. A inoculação das mudas de eucalipto e canafístula com *P. microcarpus* favoreceu o desenvolvimento da matéria fresca da parte aérea e radicular e da altura das plantas. Os resultados mostram também que a canafístula é capaz de realizar associação ectomicorrízica com *P. microcarpus* (4,96%). O desenvolvimento das plântulas de eucalipto e canafístula foram inibidas pelos níveis de cobre mesmo inoculadas com *P. microcarpus* UFSC Pt 116. A população de bactérias e fungos do solo, bem como as mudas de eucalipto e canafístula são diretamente influenciada pelo teor de cobre do solo, sendo favorecidas pela inoculação do *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116.

Palavras-chave: metal pesado; essências florestais; biorremediação

ABSTRACT

Master Dissertation in Soil Science
 Graduate Program in Soil Science
 Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFFECT OF COPPER IN BACTERIA AND FUNGI SOIL POPULATION, ECTOMYCORRHIZAL ASSOCIATION AND DEVELOPMENT OF EUCALYPTUS AND CANAFÍSTULA SEEDLINGS

Author: Lílian Castilho dos Santos

Advisor: Zaida Inês Antonioli

Santa Maria, December 07, 2006.

The microorganisms are sensitive to the presence of determined concentrations of copper being considered biorremediadores able to move metal through active and passive processes, accumulating them in his cellular compartments. The aim of this study was to evaluate the effects of copper on the soil bacteria and fungi population and ectomycorrhizal association, as well as on the growth of eucalyptus (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden) and canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) seedlings. The soil samples were collected in reject, adjacent, eucalyptus cultivation, pinus with 2 and 10 year old area, in the Camaquã Minas, Caçapava, Rio Grande do Sul, Brazil. The counting of bacteria and fungi soil population was carried out in the laboratory in culture medium, incubated 8 days, to 25 °C. Subsequently, experiment was installed to determine the copper level effect (0, 100, 200, 300 mg kg⁻¹ of Cu) on eucalyptus and canafístula seedlings, inoculated or not with the *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) Cunn. UFSC Pt 116. It was determine the height, stem diameter, aerial fresh matter and root dry matter, and ectomycorrhizal colonization percentage, at 110 days. The highest average for the total bacteria population was found in the adjacent and eucalyptus cultivation area, for the soil fungi population was in the adjacent area. The copper quantity of 203 mg dm⁻³ inhibits the bacteria and fungi soil population. The inoculation of the seedlings of eucalyptus and canafístula with *P. microcarpus* UFSC Pt 116 increase the development of aerial fresh matter and height of seedlings. The results show that the canafístula is able to form ectomycorrhizal association with *P. microcarpus* UFSC Pt 116 (4,96 %). The development of eucalyptus and canafístula seedlings were inhibited by the copper level even inoculated with *P. microcarpus* UFSC Pt 116. The population of bacteria and fungi in the soil as well as the seedlings of eucalyptus and canafístula are straightly influenced by the copper level in the soil, being favoured by the inoculation with *P. microcarpus* UFSC Pt 116.

Key-words: heavy metals; forest essences; bioremediation

1 INTRODUÇÃO

A população da microbiota do solo em condições naturais é elevada e sua redução pode ser sinônimo de desequilíbrio ecológico, causado principalmente por ações antrópicas. A degradação da vegetação pode alterar o equilíbrio da população microbiana do solo comprometendo por um longo período de tempo todo o ecossistema (Souto, 2002).

A densidade e a atividade microbiana depende de características químicas, físicas e biológicas do solo. Além disso estão diretamente influenciados por vários fatores ambientais como aeração, temperatura, umidade, mineralogia do solo, disponibilidade de nutrientes minerais (N, P, S, Ca, Mo, Co e Fe) e de substrato orgânico. O manejo e a cobertura vegetal, a presença de organismos antagonistas e de metais como zinco, cobre, cádmio e chumbo também influenciam a população de organismos do solo. Os metais dependendo da concentração e da forma como se apresentam podem comprometer os importantes processos biológicos realizados pelos microrganismos do solo.

As Minas do Camaquã estão localizadas em Caçapava do Sul, RS, Brasil, tendo sido exploradas até a década de 1980. Hoje, o local está erodido e com certa quantidade de rejeito prejudicando a estrutura e a atividade biológica do solo (Teixeira e Gonzalez, 1988).

Os microrganismos são agentes dos principais processos bioquímicos que ocorrem no solo como na decomposição da matéria orgânica e liberação de nutrientes, na formação e estabilização de agregados, na ciclagem de nutrientes, em transformações de elementos metálicos, produção de metabólitos, degradação de pesticidas e herbicidas e alterações nas características físicas do solo (Pfüller, 2000).

A contaminação do solo por metais devido a atividades exercidas pelo homem, como a mineração é um problema ambiental que merece atenção. Entre os metais, o cobre é um elemento que em determinadas concentrações pode exercer efeitos deletérios em diversas formas de vida, causando freqüentemente, de modo irreversível,

contaminação e poluição dos ecossistemas (Leyval et al., 1997; Siqueira et al., 1999). Alguns metais como o cobre e o zinco são considerados nutrientes essenciais sendo usados em reações bioquímicas como catalizadores, na formação de proteínas e na manutenção do equilíbrio osmótico da célula (Ji e Silver, 1995).

Bactérias e fungos do solo têm habilidade para transportar o cobre dentro de suas células. Isto porque existem proteínas específicas que protegem o organismo contra os efeitos de toxicidade do cobre, ligando-o a determinadas enzimas específicas (Turpeinen, 2002).

A concentração do metal e as propriedades químicas e físicas características de cada solo é que irão determinar a toxidez do cobre para o ambiente e microrganismos. A matéria orgânica regula a disponibilidade de vários nutrientes essenciais, bem como a atividade de metais pesados (Dias-Junior et al., 1998). Alguns microrganismos do solo podem auxiliar no estabelecimento de plantas em áreas contaminadas por mineração de cobre. Entre estes, destacam-se os fungos ectomicorrízicos que têm habilidade em reduzir a toxicidade dos íons de metais para a planta hospedeira (Kong et al., 2000). O aumento na absorção destes elementos pelas raízes e o seu acúmulo no micélio extraradical, confere ao hospedeiro maior tolerância a estes elementos (Grazziotti et al., 2001 a).

Neste contexto, a simbiose de plantas com fungos ectomicorrízico e o estudo da população de fungos e bactérias do solo mostram-se como boas alternativas para estudos visando processos de revegetação e de recuperação de áreas contaminadas por cobre. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do cobre sobre a população de bactérias, fungos do solo e na associação ectomicorrízica de eucalipto e canafístula. Além disso, determinar os efeitos do cobre sobre o crescimento de mudas de eucalipto e canafístula inoculadas ou não com *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cobre

2.1.1 Cobre no solo

A denominação “metal pesado” é aplicada a um grupo heterogêneo de elementos, incluindo metais, semi-metais e não metais que possuem número atômico maior do que 20 ou peso específico maior que 5 g cm^{-3} (Malavolta, 1994). Os principais metais pesados presentes no solo e nos produtos utilizados na agricultura são Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn e Zn (Abreu et al., 2002). Entre estes, deve-se ressaltar que alguns são essenciais às plantas (Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn), as bactérias fixadoras de nitrogênio (Co e Mo) e aos animais (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn). Entretanto, Turpeinen (2002) considera como metais os elementos (Co, Cr, Cu, Mg, Mn, Ni e Zn) e relata que estes desempenham papel essencial nos processos de vida dos microrganismos. Contudo, Sodr e e Lenzi (2001) estudando o comportamento do cobre em solos argilosos, classificam este elemento como um metal pesado.

A presença dos metais pesados nos solos pode ter origem natural ou antropog nica, sendo esta a principal razão do aumento crescente dos metais pesados nos solos, provocando distúrbios muitas vezes de difícil recupera o para o ambiente (Abreu et al., 2002). Atividades decorrentes da agricultura, indústria metalúrgica e minera o são responsáveis pela polui o de extensas áreas de solo em todo o mundo, sendo seus efeitos pouco conhecidos nas condi es brasileiras (Dias Junior et al., 1998). Metais pesados como cobre não são biodegradáveis e apresentam uma dinâmica no solo bastante complexa, alterada diretamente por fatores do meio, principalmente pela composi o química, física e mineralógica do solo, pela quantidade de matéria orgânica, pH e CTC (Sodr e e Lenzi, 2001).

O cobre ocorre na solução do solo quase que exclusivamente na forma de Cu^{2+} (Sodré e Lenzi, 2001; Abreu et al., 2001) e a concentração na solução é geralmente muito baixa (2 a 100 mg kg^{-1}) sendo governada pela adsorção as partículas do solo (Abreu et al., 2001). As formas reduzidas monovalentes e metálica são possíveis somente em solos sob condições de redução, especialmente na presença de íons de enxofre e halogênios (Sodré e Lenzi, 2001).

O cobre interage com outros nutrientes como o potássio, zinco, nitrogênio e fósforo, alterando sua disponibilidade. Entre estas interações, a que exerce com o fósforo é uma das mais importantes (Abreu et al., 2001). Íons de fosfato podem interferir na solubilidade dos elementos metálicos, formando precipitados pouco solúveis e diminuindo a concentração de íons em solução. O cobre está mais fortemente ligado à matéria orgânica que outros cátions micronutrientes como o Zn^{2+} e o Mn^{2+} (Camargo et al., 2001). O nível de cobre na solução do solo é reduzido com o aumento do pH devido a forte adsorção do cobre e precipitação (Lindsay, 1972). Em pH 6,5 o Cu^{2+} é a espécie dominante na solução do solo, entretanto em pH 7, a espécie predominante é $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Bahaminyakamwe et al., 2006).

A retenção dos metais pelo solo pode ser explicada por mecanismos de adsorção específica, troca iônica e precipitação. Os metais podem estar disponíveis no solo na forma de elementos solúveis como íons livres sendo absorvidos pelas plantas e ou lixiviados pelos solos (Guilherme et al., 1995). Estes ocorrem também na forma de elementos trocáveis, sendo adsorvidos por forças eletrostáticas em sítios carregados negativamente na matéria orgânica ou em minerais, ou estarem adsorvidos especificamente, ligados a materiais orgânicos insolúveis, ou precipitados na forma de carbonatos e sulfatos entre outros (Costa et al., 2004).

A matéria orgânica e o pH do solo são os fatores que atuam direta e indiretamente sobre a biodisponibilidade do cobre. Os radicais orgânicos como metais e óxidos de alumínio têm sítios OH^- com alto potencial para adsorção específica de cobre (Guilherme et al., 1995). A adsorção dos metais aos óxidos pode ocorrer pela formação de ligações covalentes com OH e ou O na superfície dos colóides (Costa et al., 2004). Em solos com pH menor que 2,5 o cobre compete com prótons por sítios de adsorção,

mas quando o pH for maior que 4,5, muitos sítios carregados são ligados ao cobre diminuindo a competição por prótons. Entretanto, em solos com pH entre 4,0 a 6,0 os óxidos de Fe e Al são a principal causa da solubilização e fixação do metal (Casagrande et al., 2004).

O cobre apresenta uma baixa mobilidade no solo, sendo influenciada diretamente pelo pH, formando óxidos, hidróxidos, carbonatos e sulfetos insolúveis. Quando cátions metálicos como o Cu^{2+} são adsorvidos pelos óxidos, formam complexos de esfera-interna com ligações covalentes e iônicas de alta energia. Assim, quanto maior o número de ligações entre o cobre e o grupo funcional de superfície maior será a energia de interação e menor sua mobilidade no perfil do solo e conseqüentemente na contaminação do ambiente (Costa et al., 2004).

É muito importante conhecer a forma em que se apresenta o metal no solo, a sua espécie, que pode variar em função de interações com outros elementos da solução do solo. A partir da informação da espécie do metal presente é possível inferir sobre biodisponibilidade para plantas, mobilidade no perfil do solo e atuação no solo.

2.1.2 Cobre e matéria orgânica

Os grupos funcionais da matéria orgânica podem complexar cátions presentes nos solos, como acontece com o Cu^{2+} . A complexação de íons metálicos que são tóxicos pelas substâncias húmicas pode reduzir a atividade desses elementos na solução do solo, atenuando sua capacidade de produzir efeitos de toxidez para as plantas ou de contaminar as águas superficiais e subterrâneas (Costa et al., 2004).

A importância desse tipo de reação de complexação pode ser expressa pelo aumento da solubilidade de cátions essenciais as plantas, como o Cu^{2+} para as plantas, que se encontram em formas inorgânicas pouco solúveis no solo. Por outro lado essas reações de complexação podem formar também complexos com esses micronutrientes que podem ser pouco disponíveis para as plantas (Costa et al., 2004).

2.1.3 Cobre nas plantas

O cobre é um metal pesado, sendo classificado como micronutriente, pois é essencial para o desenvolvimento das plantas. A concentração média desse metal no solo varia de 6 a 8 mg kg⁻¹, podendo oscilar em função das atividades desenvolvidas no local (Sodré e Lenzi, 2001). Quantidades excessivas de cobre quando acumuladas nos tecidos da plantas alteram severamente o crescimento e os processos fisiológicos e bioquímicos das mesmas (Fernandes e Henriques, 1991).

O metabolismo de carboidratos e do nitrogênio, a síntese de lignina e de clorofila e a constituição de proteínas das plantas são realizadas com a participação do cobre (Filho, 2005). Plantas expostas á presença de cobre têm a atividade da enzima nitrato redutase alterada, reduzindo o N total, e o tamanho da planta através da produção reduzida de clorofila (Luna et al., 1997).

Para as plantas, grandes concentrações de cobre causam manchas aquosas evoluindo para necrose das folhas, desfolhamento precoce, diminuição do crescimento e da ramificação (Filho, 2005). Estes sintomas estão diretamente relacionados com a redução das raízes que diminui a capacidade de absorção de água e nutrientes, fazendo com que a planta desenvolva mecanismos de redução de transpiração e aumento na capacidade de armazenamento da água (Panou-Filothou et al., 2001).

O pH do solo controla a disponibilidade do cobre para as plantas. Ambientes ácidos determinam maior mobilidade do metal (Nascimento et al., 2003). Em pH neutro ou básico a baixa fitodisponibilidade do metal é considerado um fator limitante em trabalhos de fitoextração de metais pesados (Kayser et al., 2000).

A fitorremediação é um termo empregado quando se usam plantas que têm a capacidade de hiperacumular metais para seletivamente remover e reciclar quantidades excessivas de metais em solos. Existe uma variação em relação á tolerância que está

condicionada a espécie e gênero da planta que será usada em processos de fitorremediação (Costa et al., 2004).

A fitorremediação inclui a fitoextração que usa plantas para remover os contaminantes do solo, conservando a estrutura física do solo e restaurando sua qualidade ecológica (Sell et al., 2000). Inclui também a fitovolatilização usando plantas para tornar volátil espécies ou elementos químicos do solo, a rizofiltração utilizando raízes de plantas para remover contaminantes de águas correntes e a fitoestabilização usando plantas para transformar metais do solo em formas menos tóxicas, sem, entretanto, remover o metal do solo (Costa et al., 2004).

O uso de plantas pode alterar as formas dos metais pesados, reduzindo sua mobilidade e disponibilidade no solo (Tordoff et al., 2000). As plantas podem acelerar os processos de remoção de metais, atuando sobre os contaminantes e contribuindo indiretamente através do efeito rizosférico sobre a microbiota biodegradadora ou acumulando o metal em suas raízes. (Moreira e Siqueira, 2002).

Plantas chamadas hiperacumuladoras de metais são capazes de completar seu ciclo de vida sem apresentarem sintomas da toxicidade do metal. *Pteris vittata* é capaz de acumular 119 mg kg^{-1} de arsênico em suas raízes, e sendo uma boa alternativa para ambientes com altas concentrações de arsênico (Fischerova et al., 2006).

Para a extração de metais do solo buscam-se plantas com capacidade de absorver contaminantes, acumulando-os em concentrações de 1 a 3% na matéria seca, ou usando-se plantas com capacidade acumuladora (Sell et al., 2000). Estes métodos podem ser uma alternativa promissora para descontaminação do ambiente por metais pesados.

2.1.4 Cobre e microrganismos

Certas concentrações de metais pesados exercem efeitos tóxicos no ambiente, interferindo negativamente nos processos biológicos que acontecem naturalmente no

solo. A acumulação de metais pesados reduz a biomassa microbiana, a atividade de várias enzimas e a estrutura da comunidade microbiana do solo diminuindo também a diversidade funcional dos microrganismos menos tolerantes aos metais pesados (De Mora et al., 2006).

Fatores como o pH do solo e características físicas, químicas e mineralógicas influenciam diretamente na disponibilidade do metal e seus efeitos tóxicos para os microrganismos do solo (Sanders et al., 1986). Os metais presentes na solução do solo podem estar na forma de quelatos com moléculas orgânicas em formas químicas não disponíveis para os microrganismos. A toxidez do cobre está condicionada ao tipo, concentração do metal e as propriedades características de cada solo (Dias-Júnior et al., 1998). Estes também têm influência da interação com outros metais e ao contrário dos contaminantes orgânicos os metais pesados não são degradados (De Mora et al., 2006).

Os metais são parte integrante dos processos vitais dos microrganismos. Alguns deles como o cobre e o zinco são nutrientes essenciais e são usados como catalizadores de reações bioquímicas, estabilizadores de proteínas e mantenedores do equilíbrio osmótico da célula (Ji e Silver, 1995). O cobre é um elemento essencial para a sobrevivência das bactérias e fungos do solo, mas pode se tornar tóxico quando a concentração exceder 750 mg g^{-1} (Bäath, 1989).

Os processos de crescimento dos organismos, morfologia da célula, metabolismo, formação e destruição da membrana celular são influenciados pelos metais pesados. A toxicidade resulta em alterações na estrutura dos ácidos nucleicos, proteínas, na fosforilação oxidativa e no balanço osmótico atuando de maneira comprometedoras nas reações bioquímicas essenciais (Bruins et al., 2000). Os microrganismos são biorremediadores eficientes capazes de remover os metais, através de processos ativos e passivos acumulando eficientemente os metais pesados do solo nos seus compartimentos celulares (Turpeinen, 2002).

As bactérias e os fungos do solo apresentam mecanismos para o transporte do cobre dentro de suas células. Determinadas proteínas protegem o organismo dos efeitos tóxicos do metal, ligando-o a enzimas específicas (Turpeinen, 2002). Pode

ocorrer o transporte do metal através de gradiente quimiosmótico pela membrana citoplasmática de bactérias, diminuindo seu potencial tóxico (Nies, 1999).

A comunidade microbiana do solo atua em processos de imobilização, mobilização, transformação de metais por reações de precipitação extracelular, acumulação intracelular, reações de oxidação e redução, metilação e demetilação. (Brierley, 1991). A partir dessas reações, as bactérias e os fungos obtêm energia para o desenvolvimento de seus processos vitais (Santini et al., 2000). Estas biotransformações são importantes componentes do ciclo biogeoquímico sendo mecanismos usados por bactérias e fungos em solos contaminados por metais pesados e que podem servir como meio para minimizar as conseqüências da contaminação do solo por cobre (Gaad, 2000). A exposição dos microrganismos aos metais leva ao desenvolvimento da tolerância pela comunidade microbiana do solo exercendo pressão seletiva a resistência aos metais por parte de fungos e bactérias do solo (Ellis et al., 2003). Pesquisas conduzidas desde 1970, identificaram organismos resistentes a certos metais, entre estes muitos organismos anaeróbios como *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp. (Bruins et al., 2000). Este mecanismo de tolerância varia em função da espécie do organismo envolvido, da forma e da quantidade do contaminante disponível.

A oxidação bacteriana da calcopirita (CuFeS_2) um dos mais abundantes minerais sulfetados do cobre, tem sido largamente estudada, e se mostra como um dos sulfetos mais resistentes ao ataque bacteriano, se comparada com outros sulfetos de cobre (Bruynesteyn, 1989). Dois outros minerais sulfetados de cobre, a covelita (CuS) e a calcocita (Cu_2S), são solubilizados via bacteriana. O ataque inicial bacteriano a calcocita resulta na liberação de sulfeto de cobre solúvel e também no aparecimento de uma "covelita artificial" (CuS), que pode ser oxidada pelas bactérias (Melo e Azevedo, 1997).

Os microrganismos apresentam condições catabólicas para degradar os contaminantes, mas para isso o contaminante tem que estar disponível para o ataque dos microrganismos e das enzimas. As condições ambientais devem ser adequadas para o crescimento e atividade da microbiota do solo. Estes mecanismos variam de

acordo com as espécies. Relatos de fungos do gênero *Mucor*, *Fusarium* e bactérias do gênero *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus* mostram que estes indivíduos apresentam resultados positivos em trabalhos de recuperação de áreas degradadas (Moreira e Siqueira, 2002).

2.2 Microrganismos

2.2.1 Bactérias do solo

As bactérias são organismos procariontes, de tamanhos que variam entre 0,2 a 2,0 μm de diâmetro e 2 a 8 μm de comprimento. As formas mais comuns de procariotos são cocos, espirilos e bacilus que podem apresentar alterações em função das condições ambientais. As bactérias podem ser gram-positivas quando apresentam na sua parede celular peptidoglicano, polissacarídeos e ácido teiólico (Tortora et al., 2004).

Nas bactérias gram-negativas há uma membrana externa permeável a moléculas de polissacarídeo e lipopolissacarídeo. O peptidoglicano é bastante poroso e circundado por lipoproteínas e pela membrana plasmática. A dispersão do material genético pelo citoplasma, cromossomos circulares e reprodução geralmente por fissão binária são características genéticas que os diferenciam dos eucariotos (Tortora et al., 2004). As bactérias mostram uma grande capacidade e diversidade no que se refere à colonização de ambientes adversos.

O número de bactérias normalmente é maior que os fungos e actinomicetos do solo, representando entre 25 e 30% de biomassa microbiana (Moreira e Siqueira, 2002). A população destes grupos é maior na superfície do solo declinando com a profundidade. Os microrganismos que vivem nos horizontes superficiais do solo são os mais envolvidos na formação do solo, no ciclo biogeoquímico dos nutrientes e na

regulação do fluxo da água (Goberna et al., 2005). Assim, a microbiota dos horizontes superficiais é responsável pelo funcionamento ecológico do solo, possuindo um importante papel nas atividades de decomposição e transformação de nutrientes.

Processos de redução de metais como cromo, cobre, urânio e ferro com a presença de bactérias do solo são possíveis (Slobodkin, 2005). A redução de Fe (III) e Mn (IV) é possível porque estes organismos usam esses metais em seus processos metabólicos como aceptores finais de elétrons (Straub et al., 2001).

Bactérias termofílicas *Sulfolobus acidocaldarius* Darland exibem habilidade em reduzir o Fe (III) em estudos de cultura pura (Vagras et al., 1998). Resultados positivos também foram encontrados em gêneros *Thermoanaerobacter*, *Anaerobranca* e *Sulfobacillus* (Slobodkin, 2005). Estudos com Ni mostram que a concentração do metal extraído aumentou de 2,2 mg kg⁻¹ para 2,6 mg kg⁻¹ quando o solo foi incubado com *Microbacterium arabinagalactanolyticum* (Abou-Shanab, 2006).

A produção de sideróforos é bastante estimulada na presença de metais pesados, alterando a biodisponibilidade dos metais para o solo e para plantas. Trabalhos com *Azotobacter vinelandii* Lipman em presença de Zn (II) e *Pseudomonas aeruginosa* mostraram aumento na produção de sideróforos (Gilis, 1990). Além das bactérias, outros organismos como os fungos, estão presentes em grandes quantidades no solo.

2.2.2 Fungos do solo

Os fungos podem ser classificados na Divisão Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (Moreira e Siqueira, 2002; Legaz et al., 1995). Os gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* são fungos tidos considerados os mais comuns encontrados no solo (Moreira e Siqueira, 2002).

Os eucariontes apresentam características distintas como a organização do seu material genético dentro do núcleo, presença de organelas citoplasmáticas e divisão do corpo por mitose (Tortora et al., 2004). Ao contrário dos procariotos, estes não apresentam a capacidade de usar compostos inorgânicos e de fixar nitrogênio atmosférico (Tortora et al., 2004). Mesmo não sendo um grupo predominante no solo, os fungos representam entre 70 e 80% da biomassa microbiana do solo e sua ocorrência está condicionada a fatores como pH, umidade e quantidade de matéria orgânica (Moreira e Siqueira, 2002).

Os fungos apresentam grande capacidade de adaptação à presença de metais pesados no solo. Este mecanismo pode ser explicado por mutações genéticas e adaptações fisiológicas dos fungos em contato com o metal pois a capacidade de um organismo sobreviver em condições adversas depende da rapidez de suas respostas fisiológicas as condições ambientais (Gaad, 2000).

A capacidade de biossorção dos fungos se aplica aos metais pesados. Testes contando o número de unidades formadoras de colônias (UFC) mostraram um aumento de 21% na dose de 200 mg Cu L⁻¹ quando comparado ao tratamento controle (Paoletti, 1999). Resultados encontrados pelo mesmo autor relatam um crescimento de 24% dos fungos em solos poluídos com Zn quando comparados com o tratamento controle onde o crescimento mostrado foi de 4,5 % (Bäath, 1989).

Os fungos podem ser sensíveis a compostos radioativos e defensivos agrícolas (Paoletti, 1999). *Fusarium oxysporum* apresenta alterações na presença de herbicidas da classe das triazinas (Galvão et al., 2003), mostrando diferenças na pigmentação e na velocidade de crescimento quando colocado na presença de diferentes concentrações de herbicidas (Coura et al., 2000).

Os processos de agregação do solo, decomposição de resíduos orgânicos, mineralização de nutrientes, controle de pragas, doenças e estabelecimento de relações simbióticas são realizados com a participação efetiva dos fungos. Participam também de processos de degradação de pesticidas e podem servir como compartimentalizadores de metais pesados do solo, diminuindo a sua toxidez para o ambiente (Moreira e Siqueira, 2002).

2.2.2.1 Ectomicorrizas

As micorrizas são associações simbióticas mutualísticas entre fungos do solo e a maioria das plantas vasculares. Através dessa associação, a planta fornece ao fungo os carboidratos necessários ao seu crescimento, enquanto o fungo por meio de suas estruturas externas (hifas) auxilia na absorção dos nutrientes da solução do solo e os transfere para as plantas (Antoniolli e Kaminski, 1991; Smith e Read, 1997).

Registros fósseis indicam que as associações ectomicorrizas surgiram há pelo menos 50 milhões de anos. A ocorrência das ectomicorrizas é em cerca de 3% das fanerógamas e nas regiões temperadas, em 90% das espécies florestais (Lepage et al., 1997). No Brasil, espécies como o eucalipto, acácia e pinus (Costa et al., 2000) e com certa raridade em outras espécies como em gabioba e unha-de vaca podem formar associações ectomicorrizicas (Moreira e Siqueira, 2002).

As micorrizas podem ser divididas em três grupos distintos de acordo com as características morfológicas e anatômicas. As ectomicorrizas; as endomicorrizas que se subdividem em 3 grupos: ericóides, orquidóides e arbusculares; e as ectendomicorrizas subdivididas em Monotropóide e Arbutóide. As micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas são as mais estudadas por estarem associadas à maioria das plantas vasculares e/ou de maior interesse econômico, diferentemente das ectendomicorrizas, que são de ocorrência limitada (Peterson e Farquhar, 1994).

As ectomicorrizas caracterizam-se por apresentarem uma camada de hifas, o manto, a rede de Hartig, e uma rede de filamentos que interligam as micorrizas ao solo e aos basidiocarpos (Smith e Read, 1997). A formação de ectomicorrizas no campo depende de vários fatores do ambiente, tais como a disponibilidade de nutrientes, pH do solo, temperatura, disponibilidade de água, aeração, intensidade luminosa, fisiologia da planta hospedeira, interações com os microrganismos do solo e a toxicidade de certos pesticidas (Smith e Read, 1997; Alves et al., 2001; Costa et al., 2002).

Existem diferenças quanto a morfotipos de ectomicorrizas. Este fato pode ser atribuído a fatores edáficos como acidez do solo e qualidade da matéria orgânica (Rumberger et al., 2004). Estudos sobre serrapilheira de carvalho e de pinus mostram que as diferenças na estrutura da comunidade ectomicorrizica correspondem ao tipo de serrapilheira do local amostrado (Conn e Dighton, 2000).

Diversos benefícios decorrem da associação da planta hospedeira com fungos ectomicorrízicos. As hifas dos fungos retiram da planta compostos orgânicos necessários á sobrevivência do fungo e a produção de novos cogumelos e basidiocarpos (Smith e Read, 1997). Em contrapartida, as plantas tornam-se mais bem nutridas e apresentam maior sobrevivência e longevidade no campo (Harley e Smith, 1983).

A disponibilidade de nutrientes como o fósforo e o nitrogênio estão intimamente ligados com os fungos ectomicorrízicos. A mineralização de formas orgânicas dos nutrientes e a solubilização de minerais por meio de ácidos orgânicos, tornam esses elementos disponíveis para a planta (Soares, 1986).

O desenvolvimento de ectomicorrizas em *Eucalyptus grandis* inoculado com o fungo *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch obteve a máxima taxa de colonização com 4,5 ppm de P extraível (Soares, 1986). Já, Mulette (1976) obteve alta taxa de colonização micorrízica com o fungo *Pisolithus tinctorius* quando os teores de P extraível no solo foram de 1 a 5 mg kg⁻¹ pelo método Melich.

As associações ectomicorrízicas respondem a especificidade fungo- hospedeiro. Determinadas espécies de fungos apenas exibem simbiose quando em contato com a planta hospedeira específica. Este mecanismo é governado por uma interação genética entre o fungo e a planta hospedeira (Costa et al., 2000).

2.2.2.2 Ectomicorrizas e a contaminação do solo

Estudos mostram que a incorporação e a mobilização de diversos metais no solo, entre estes o cobre, excedem em mais de dez vezes os processos naturais (Baker, 1987). Os resultados dessa contaminação podem comprometer a sobrevivência das mais variadas espécies, que podem apresentar efeitos irreversíveis.

Ainda não há meios para a completa recuperação de áreas com certo grau de contaminação pelo depósito de metais pesados no solo, mas alguns trabalhos mostram que o uso de materiais adsorventes e a imobilização biológica usando-se mudas de plantas nativas como cassia verrugosa (*Sena multijuga* (L. C. Rich.) Irwin et Barneby), açoita-cavalo (*Luehea grandiflora* Mart. et Zucc.), tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong), albizia (*Albizia lebeck* (L.) Benth.) e fedegoso (*Senna macranthera* (Collard.) Irwing et Barneby) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares mostram resultados positivos no crescimento pós transplântio de mudas em solo com 20% de Zn, Cd, Pb e Cu. (Siqueira et al., 1999).

Dentre os microrganismos, os fungos ectomicorrízicos mostram habilidade em absorver metais pesados do solo e podem ser usados como atenuadores da fitotoxicidade causada pelos metais minimizando os efeitos do metal no solo ou sobre as plantas (Leyval et al., 1997).

Em solos com excesso de metais pesados, os fungos ectomicorrízicos podem estabelecer simbiose com raízes de plantas hospedeiras. A partir dessa associação, os fungos podem aumentar a absorção de nutrientes e água pelas raízes e imobilizar os metais pesados diminuindo a sua disponibilidade para o solo (Grazziotti et al., 2001 a; Doria et al., 2002). Trabalhos com plantas de carvalho, mostram que os fungos ectomicorrízicos diferem na sua capacidade de mobilizar e transferir nutrientes da serrapilheira para plantas micorrizadas (Bending e Read, 1995).

Os fungos ectomicorrízicos aumentam o volume de solo explorado pelas raízes das plantas. Em consequência, elementos com estreita zona de difusão em torno das raízes como o cobre e o zinco são absorvidos com maior eficiência. (Grazziotti et al., 2001 b).

Pesquisas recentes indicam que estruturas fúngicas como o manto e a rede de Harting imobilizam os metais do solo funcionando como um filtro de retenção,

configurando um importante mecanismo de proteção (Costa et al., 2000). Mudanças de *Betula papyryfera* colonizadas por *Scleroderma flavidum* Pers. na presença de 85 mol L^{-1} de Ni, obtiveram um crescimento de 54% maior do que plantas não colonizadas, este feito se deu pela retenção dos metais no micélio (Jones e Hutchinson, 1986).

A capacidade de tolerância das ectomicorrizas aos metais pesados é bastante conhecida. A redução da disponibilidade dos metais para as plantas pode se dar pela excreção de substâncias quelantes, imobilização extracelular pela mucilagem, alteração no pH, adsorção do metal ao manto e modificação no sistema de absorção da planta (Costa et al., 2000; Moreira e Siqueira, 2002). As ligações a polímeros da parede celular tais como quitina ou melanina e precipitação de metais também são alguns mecanismos adaptativos usados pelas ectomicorrizas para sobreviver em ambientes com excesso de metais pesados (Grazziotti et al., 2001 a).

A condição de tolerância das ectomicorrizas aos metais difere entre os fungos e entre os metais. Testes com cinco isolados de *Paxillus involutus* apontaram três deles com crescimento na concentração de Cu de até $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sendo assim considerados tolerantes (Grazziotti et al., 2001 a).

Os fungos ectomicorrízicos exibem variações intra e interespecíficas e de adaptação ecológica a fatores abióticos adversos como o tipo de metal. Isolado de *Suillus bovinus* (L. Fr) O. Kuntze considerado tolerante a Zn, mostrou-se sensível ao Cu e Cd e *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch foi capaz de tolerar a presença de Cd, Zn e Cu em meio de cultura (Grazziotti et al., 2001 a). Estes resultados apontam a variação na tolerância em relação ao tipo de metal e a espécie de fungo envolvida.

A verificação de dez isolados de *Pisolithus involutus* quanto à tolerância de zinco em meio de cultura, mostrou que existem diferenças na habilidade dos isolados em colonizar raízes de *Betulla* sp. e de promover o crescimento de plantas em substrato com $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Zn (Denny e Wilkinns, 1987). Portanto, é muito importante conhecer o impacto dos metais sobre cada uma das espécies de fungos para se obter resultados positivos em trabalhos de recuperação de áreas impactadas.

A sensibilidade ao Cd foi testada em *Lactarius rufus* e os resultados mostraram que ele é menos sensível do que *Laccaria bicolor* (Jongbloed e Borst-Pauwels, 1990)

enquanto *Suillus bovinus* (L. Fr) foi menos sensível ao excesso de Zn do que outras quatro espécies de fungos ectomicorrízicos (Colpaert e Van Assche, 1987). Experimentos *in vitro* descritos relatam que *Pisolithus tinctorius* se mostra resistente á presença de Cd, Cu e Zn quando comparados com outros fungos (Tam ,1995)

A investigação sobre a contribuição de *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. e *Pisolithus tinctorius* em associação com plantas de *Salix viminalis* Wild. para absorção de Cd em solos contaminados revelam que o metal foi compartimentalizado por translocação na raiz da planta (Denny e Wilkinns, 1987). Estudos com *Scleroderma* sp. demonstraram que as plantas inoculadas apresentaram maior quantidade de Ni nas raízes do que na parte aérea da planta que concentrou 16 mg g⁻¹ a 62 mg g⁻¹ de matéria seca de Ni para plantas inoculadas e não inoculadas (Moreira e Siqueira, 2002). Assim, é importante conhecer o comportamento do fungo em contato com o metal quando se deseja realizar trabalhos de recuperação de áreas contaminadas.

2.2.3 Principais fatores que influenciam os microrganismos do solo

2.2.3.1 pH

Os microrganismos do solo podem ser classificados em relação á tolerância de pH como insensíveis quando são tolerantes a uma ampla faixa de pH, neutrófilos se não toleram acidez e alcalinidade, acidófilos quando crescem bem em condições ácidas e basófilos se apresentarem melhor crescimento em condições alcalinas (Tortora et al., 2004).

A maioria das bactérias cresce entre pH 6 e 8 e poucas crescem em pH 4,0. Um grupo distinto de bactérias, as acidófilas são capazes de se desenvolver em pH ácido e as quimioautotróficas que oxidam o enxofre para formar o ácido sulfúrico podem sobreviver em pH 1,0. Entretanto os fungos filamentosos e as leveduras são mais

tolerantes as variações de pH, crescem bem em pH de 5 a 6 e são bem adaptados a pH menor que 5 (Moreira e Siqueira, 2002).

A grande maioria dos solos tem pH entre 4,0 e 8,5. O pH pode baixar quando ocorrer nesse solo a fertilização em grandes quantidades e também a fixação biológica do nitrogênio. O substrato a ser metabolizado pelos microrganismos também influencia na flutuação do pH do solo (Catelan e Vidor, 1990 a).

A calagem e da adubação mineral ou orgânica favorecem o desenvolvimento microbiano de forma direta pelo aumento do pH e pela disponibilidade de nutrientes as células dos microrganismos. Conseqüentemente aumentará o efeito rizosférico estimulando o desenvolvimento da população microbiana do solo (Catelan e Vidor, 1990 a).

2.2.3.2 Temperatura e umidade

A temperatura afeta as reações fisiológicas e metabólicas das células e as características químicas do ambiente como por exemplo o volume do solo e as reações de difusão e pressão (Catelan e Vidor, 1990 b).

O solo é um ambiente onde ocorrem flutuações de temperatura. As maiores flutuações são encontradas nos primeiros 5 cm variando de 15 a 18°C. Essas variações de temperatura diminuem conforme aumenta a profundidade do solo (Martinez e Ramirez, 1978).

A interação entre o manejo do solo e da cobertura vegetal durante as diferentes épocas do ano, principalmente em regiões subtropicais faz com que ocorra flutuações no desenvolvimento da população microbiana (Catelan e Vidor, 1990 b). Essa flutuação é maior nas camadas superiores do solo, onde existem as maiores oscilações na umidade e temperatura (Martinez e Ramirez, 1978).

As altas temperaturas alteram funções metabólicas, causando mudanças na estrutura das moléculas e na ação das enzimas. Já em temperaturas mais baixas, as

proteínas podem sofrer alterações na sua forma pelo enfraquecimento das ligações que controlam as estruturas terciárias das proteínas (Moreira e Siqueira, 2002).

A superfície descoberta do solo fica sujeita a flutuações térmicas e hídricas que podem ocasionar morte de parte da biomassa (Silva Filho e Vidor, 1984). Trabalhos com a população bacteriana do solo mostram que houve um aumento na população em função da maior disponibilidade de água no solo (Campbell e Biederbeck, 1976). A população de fungos também se mostrou sensível ao déficit hídrico em diferentes sistemas de cultura e profundidades de solo (Catelan e Vidor, 1990 b).

2.2.3.3 Nutrientes

O solo é um grande reservatório de nutrientes para os microrganismos, de onde retiram os nutrientes conforme suas necessidades que variam de acordo com a espécie do microrganismo (Catelan e Vidor, 1990 b).

Alguns elementos como o carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio são constituintes principais das moléculas orgânicas. O carbono participa da síntese dos compostos orgânicos necessários para que a célula se torne viável, sendo considerado o elemento celular básico da constituição de todos os seres vivos (Tortora et al., 2004).

O fósforo e o nitrogênio estão envolvidos na síntese de DNA e ATP. O enxofre e o nitrogênio sintetizam proteínas. Alguns elementos como o ferro, zinco, cobre, molibdênio são necessários em pequenas quantidades para a célula e usados como cofatores na atividade de algumas enzimas (Moreira e Siqueira, 2002).

Os resíduos orgânicos quando incorporados ao solo são atacados pelos microrganismos para a formação dos seus constituintes celulares. Alterações na disponibilidade de nutrientes, provocadas por adubações químicas e orgânicas e pela calagem, atuam diretamente sobre a população microbiana do solo (Silva Filho, 1984).

2.3 Essências florestais

O estado do Rio Grande do Sul possuía originalmente 42% de sua superfície territorial coberta por florestas. No início do século XX a cobertura vegetal foi reduzida para aproximadamente 25% chegando a aproximadamente 4% em 1965 (IFCRS, 2003). As poucas áreas de mata nativa existentes pertencem às áreas de preservação, parques, reservas e pequenas áreas de matas de difícil acesso (Mattei e Rosenthal, 2002). No Rio Grande do Sul embora tenha ocorrido desmatamento, ainda há pontos isolados de matas nativas e algumas propostas para a recuperação dessas matas (Zachia et al., 2002).

As plantações de essências florestais têm um papel importante no desenvolvimento de um país, tanto do ponto de vista econômico e energético, quanto do ponto de vista social. A crescente demanda de matéria prima do setor florestal exige a aplicação de medidas eficazes para aumentar a produtividade das essências florestais no país, para suprir a falta de madeira. Este déficit acontece em função da limitação econômica e ambiental das expansões das áreas plantadas sendo suprido pelo corte de florestas nativas (Santos et al., 2001).

No Brasil, a produção de madeira é destinada à indústria moveleira, produção de energia, construção civil e, principalmente para a produção de papel e celulose.

Além de ser socialmente e economicamente importante para o Brasil, a floresta é essencial na qualidade de vida da população em função dos seus benefícios. A cobertura florestal protege o solo, os mananciais de água e a fauna, evita enchentes, captura dióxido de carbono vindo principalmente do uso de combustíveis fósseis, aumenta a vida útil dos reservatórios hídricos e propicia a existência da biodiversidade (Ferreira e Galvão, 2000).

Em processos de revegetação de áreas degradadas é importante escolher espécies de rápida adaptação a fatores limitantes de crescimento da planta, principalmente quando relacionados a solos degradados (Pralon e Martins, 2001).

Algumas espécies nativas leguminosas do sul do Brasil como a timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vellozo) Morong.) a bracatinga (*Mimosa scrabella* Bentham.) e a canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) e também espécies exóticas introduzidas no Brasil como o *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. podem ser uma boa alternativa para o reflorestamento de áreas degradadas (Carvalho, 1995).

A canafístula *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert pertencente à Família Leguminosae e a Ordem Fabales. É uma árvore decidual do estrato emergente do Alto Uruguai, podendo atingir 25 a 30 m de altura. Suas folhas são decíduas, as inflorescências são amplas e vistosas de coloração amarela e o fruto é do tipo vagem (Reitz et al., 1988). Espécie muito recomendada para arborização urbana por produzir sombra em virtude da folhagem delicada e densa, proporcionando sombra fechada (Reitz et al., 1988). É tida como uma espécie pioneira, rústica, com crescimento rápido e útil em reflorestamentos mistos de áreas degradadas (Lorenzi, 1992).

A canafístula é uma espécie nativa de crescimento rápido classificada como espécie apta à regeneração artificial (Carvalho, 1998). Sua madeira pode ser usada na indústria de móveis, construção civil e naval, carpintaria, marcenaria e na produção de papel (Reitz et al., 1978).

Dentre as espécies empregadas em práticas de silvicultura, o eucalipto é bastante utilizado devido às características intrínsecas da planta. Originário da Austrália, ocorre na maioria das regiões secas de todo continente australiano caracterizando zonas climáticas e formações vegetais. Atualmente, cerca de 500-600 espécies de eucalipto são reconhecidas, e embora possam ser encontradas mundialmente, possui distribuição restrita a certos nichos. Com um sistema de raízes resistentes adaptadas a condições de baixos nutrientes no solo, esta planta possui a capacidade de conservar e utilizar eficientemente os nutrientes absorvidos (Florence, 1996).

No Brasil, predominantemente no sul do país, o eucalipto é a essência florestal mais cultivada em razão do seu rápido crescimento e elevado rendimento econômico grande produção de celulose, resistência a doenças e a condições ambientais adversas (Silva, 2002; Santos et al., 2001). O desenvolvimento florestal nessas regiões é

baseado na introdução de espécies exóticas, as quais dependem obrigatoriamente das micorrizas. Associado ao fator da maioria desses solos serem pobres, a inoculação com fungos ectomicorrízicos de forma adequada poderá contribuir para o estabelecimento regular dos plantios e propiciar aumentos significativos na produção de biomassa vegetal (Bellei e Carvalho, 1992).

A partir dos anos 60, o eucalipto passou a ser intensamente utilizado em programas de reflorestamento do mundo e também nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Alves et al., 2001).

O eucalipto pode formar simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e ectomicorrízicos (EMC) com funções especializadas no solo. No eucalipto a sucessão entre fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos pode ser observada. A ocorrência de FMA e EMC no mesmo sistema radicular foi encontrada quando *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, *E. citriodora* Hook F., *E. grandis* W. Hill ex Maiden, *E. cloeziana* F. Muell e *E. camaldulensis* Dehnh foram inoculados simultaneamente com *Glomus etunicatum* Becker & Gederman e *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Cocker & Couch (Santos et al., 2001). A literatura relata que o aumento na colonização por fungos ectomicorrízicos é acompanhado pelo decréscimo dos fungos micorrízicos arbusculares. Assim, é de importância ecológica e tecnológica conhecer a capacidade de espécies florestais associadas com fungos ectomicorrízicos em resistir à toxidez de metais do solo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas da execução desta pesquisa estão esquematizadas da Figura 1.

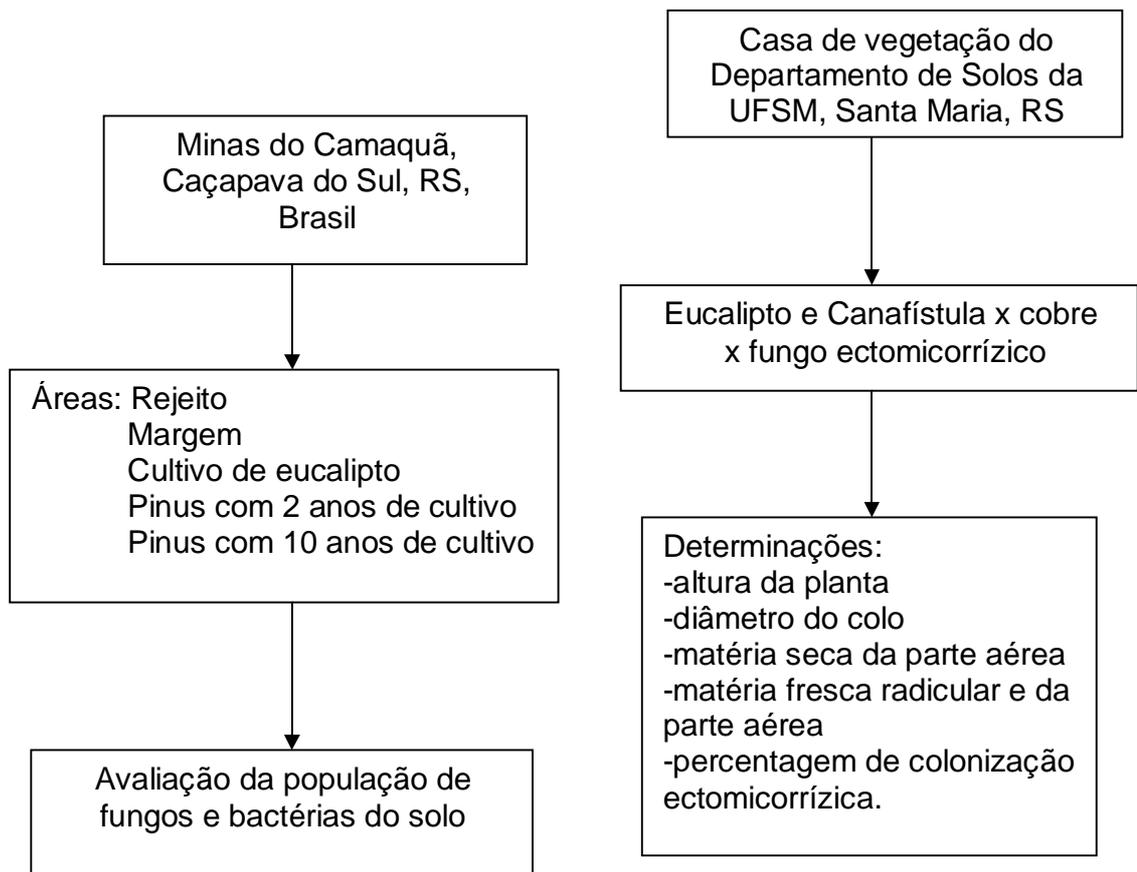


Figura 1- Etapas da execução do estudo do efeito do cobre sobre a população de bactérias e fungos nas Minas do Camaquã, RS, Brasil e sobre a associação ectomicorrízica em eucalipto e canafístula em casa de vegetação da UFSM, Santa Maria, RS, 2006.

3.1 População de bactérias e fungos do solo em área contaminada por cobre nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS.

3.1.1 Localização da área

As Minas do Camaquã estão situadas no município de Caçapava do Sul (30° 47'S e 52° 24' W) na região central do estado do Rio Grande do Sul (Figura 2), Brasil. O

clima é subtropical, com precipitação pluviométrica anual de 1500 mm e temperatura média de 17°C (Teixeira e Gonzalez, 1988).

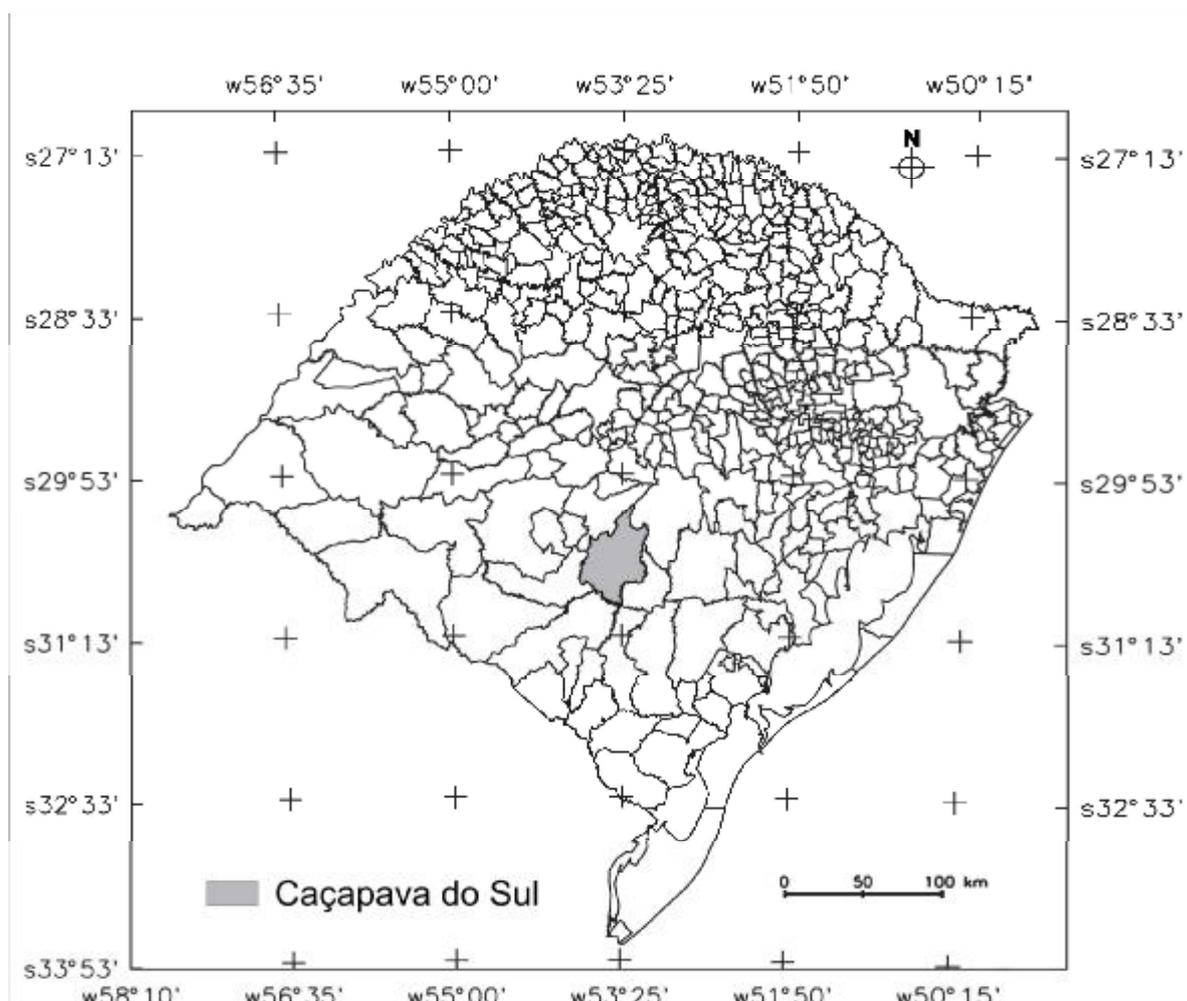


Figura 2- Localização do município de Caçapava do Sul, RS, Brasil.

Fonte: SPRING (Camara et al., 1996)

Organizado por: Trentin, R.

3.1.2 Descrição da área

Os diferentes locais amostrados foram selecionados conforme sua localização na área e cobertura vegetal (Figura 3) apresentando as seguintes características: Rejeito (Re) localizado entre a área de margem e de cultivo de pinus com 2 anos, sem a

presença de vegetação e com depósito do rejeito extraído das minas, Margem (Ma) local situado entre as áreas de rejeito e área de cultivo de eucalipto, com 30 a 50 m de largura composta por vegetação rasteira e esparsa; Cultivo de eucalipto (Euc) localizado entre a área de margem e pinus com 10 anos apresentando vegetação rasteira, arbustiva e bosque de eucalipto; Pinus 2 anos (com 2 anos de cultivo) localizado atrás da área de rejeito, exclusivamente cultivado com bosque de Pinus; Pinus com mais de 10 anos de cultivo, localizado após a área cultivada com eucalipto, somente com o cultivo de pinus.

3.1.3 Solo

As amostras de solo foram coletadas em junho de 2006, na profundidade de 0-20 cm, nos cinco locais da área. Em cada área coletaram-se cinco amostras compostas, consideradas repetições, formadas por três subamostras, perfazendo um total de 25. Depois de coletadas as amostras foram embaladas em sacos plásticos devidamente etiquetados e transportadas em caixa de isopor com gelo até o Laboratório de Microbiologia do Solo e do Ambiente Marcos Rubens Fries, do Departamento de Solos, UFSM. As amostras de solo ficaram guardadas em freezer a 4 °C por 48 horas, até o momento da determinação da população microbiana do solo. As amostras compostas de solo foram coletadas e analisadas quanto à fertilidade no Laboratório Central de Análises de Solo da Universidade Federal de Santa Maria/ UFSM/ RS (Tabela 1).

3.1.4 Identificação dos fungos

Após o período de incubação os fungos encontrados nas placas foram identificados em nível de gênero, através de microscópio estereoscópico e ótico, com base na bibliografia especializada (Barnett e Hunter, 1999).

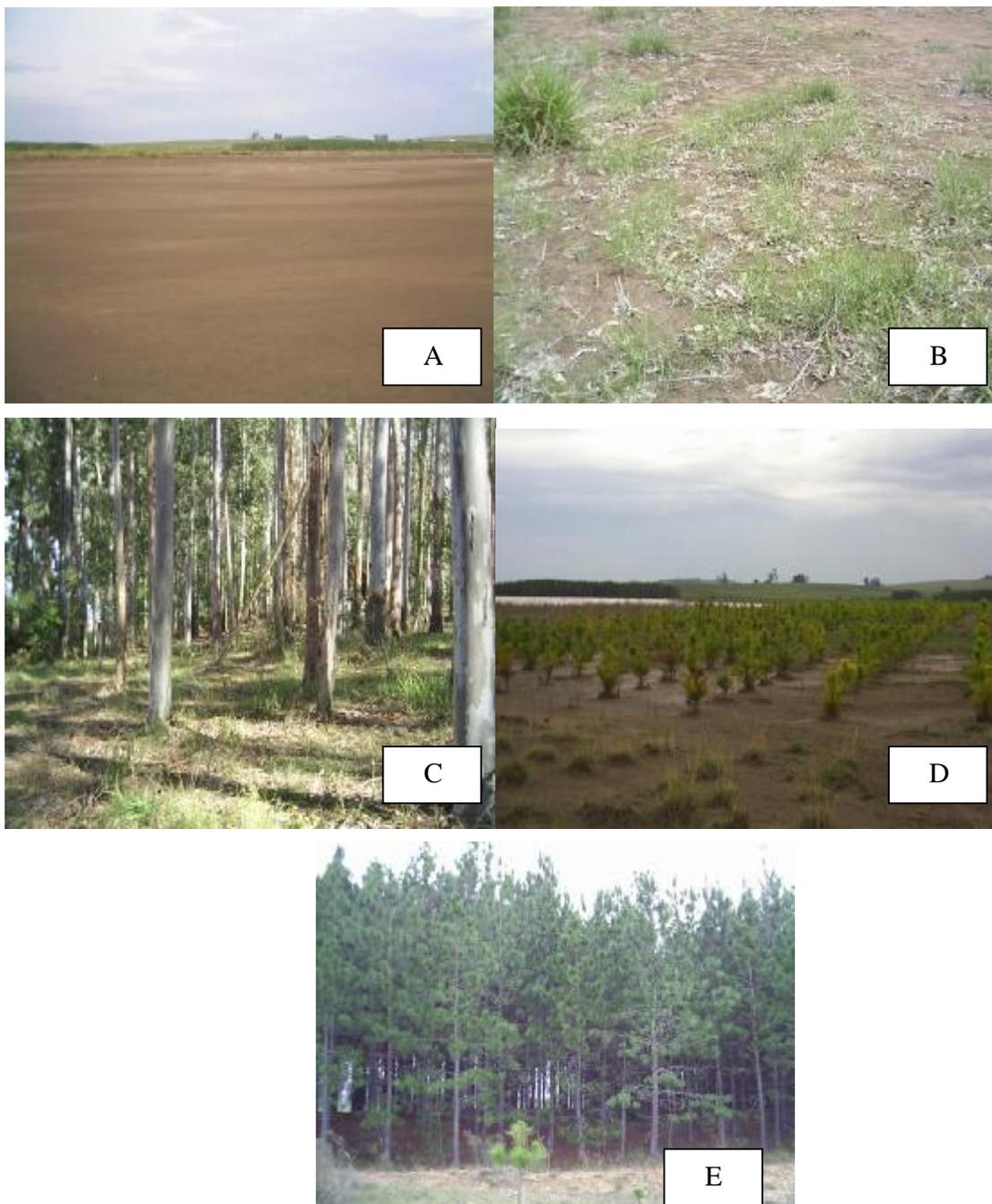


Figura 3- Locais de coleta das amostras de solo. Área de rejeito (A), margem (B), cultivo de eucalipto (C), pinus 2 anos e (D) pinus com mais de 10 anos (E) localizadas nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006.

3.1.5 Meios de cultura

Para a determinação da população de bactérias do solo utilizou-se o meio Ágar-PG (Moreira e Siqueira, 2002) o qual contou dos seguintes nutrientes por litro: 0,1 g de glicose, 1,0 g de peptona, 0,1 g de K_2HPO_4 , 0,02 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g de ágar, 2,4 g de PCNB. O pH foi ajustado a 7 antes do meio ser autoclavado. Para avaliação da população de fungos utilizou-se o meio Martin's-Bengala Agar (Martin, 1950) com os seguintes nutrientes por litro: 10 g de glicose, 5 g de peptona, 1 g de KH_2PO_4 , 3,3 mL de rosa bengala, 16 g de ágar, 300 mg de rifampicina. Os meios de cultura usados foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

Tabela 1- Características químicas e físicas e teor de cobre em amostras de solo de área de rejeito, margem, cultivo de eucalipto, pinus 2 anos e pinus com mais de 10 anos de cultivo. Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006.

Local	pH H ₂ O	P mg dm ⁻³	K mg dm ⁻³	Ca -----cmol _c dm ⁻³ -----	Mg cmol _c dm ⁻³	CTC _e ** -----	M.O -----%-----	Argila	Cu mg dm ⁻³
Rejeito	3,4 *	76	43	2,4	0,2	2,7	0,4	22	203
Margem	6,5	40	93	5,8	1,9	8,0	1,7	23	92
Cultivo de Eucalipto	4,8	25	82	3,7	1,2	7	3	43	24
Pinus 2	7,2	61	120	3,4	1,1	4,8	0,4	60	199

anos

Pinus +	4,7	3,7	48	2,9	0,8	5,5	1,8	60	6
10 anos									

*Média de cinco repetições coletadas em cada local

**CTC _{efetiva}

3.1.6 Avaliação

A contagem do número de unidades formadoras de colônias de bactérias e fungos (UFC) foi determinada pelo método da inoculação em suspensões diluídas de solo em meio de cultura. Para tanto, preparou-se uma diluição decimal em série partindo-se de 10 g de solo colocado em frascos de erlenmeyer com 90 mL de água destilada e esterilizada. De cada diluição, foi retirado uma alíquota de 1 mL por placa de petri, sobre o qual verteu-se o meio. Para cada diluição foram feitas três repetições por placa. As placas foram envolvidas em papel filme e armazenadas em estufa à 25°C no escuro. A contagem das UFC de bactérias e fungos foi realizada aos 8 dias após a incubação em estufa usando-se o contador de colônias.

3.1.7 Análise estatística

Os resultados obtidos sobre os grupos de bactérias e fungos do solo foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo Teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003). Para a análise estatística, os dados obtidos das avaliações foram transformados para raiz quadrada de $y + 0,5$.

3.2 Efeito do cobre e de fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden e *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

3.2.1 Preparação das mudas

O experimento foi realizado na casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (RS), no período de abril a julho de 2006, totalizando 110 dias.

As sementes de eucalipto foram obtidas junto a Fepagro-Florestas- Boca do Monte, Santa Maria/RS. Depois de selecionadas, as sementes foram colocadas em uma solução para germinação com os seguintes componentes por litro de água destilada: 0,068 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,186 g de H_3BO_3 , 2 g de glicose. O pH foi ajustado em 5,7. As sementes ficaram submersas na solução em agitação constante durante 48 horas.

As sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) foram submetidas a uma solução de quebra de dormência com ácido sulfúrico por 60 minutos. Posteriormente as sementes foram lavadas com água corrente repetidas vezes para retirar o excesso de ácido sulfúrico.

3.2.2 Substrato

Para o experimento foi usado areia e vermiculita na proporção 1:1 (v/v). O substrato depois de misturado foi autoclavado em saquinhos de polipropileno com capacidade para 1 Kg por 60 minutos a 120 °C e 1,5 atm de pressão.

Este procedimento foi repetido 3 vezes em um espaço de tempo de 24 h entre cada autoclavagem. Após, o substrato foi colocado em potes com capacidade para 500 g de solo.

3.2.3 Adição de sulfato de cobre

As doses de cobre testadas foram 0, 100, 200, 300 mg kg⁻¹, na forma de CuSO₄ 5H₂O. A adição do sulfato de cobre ao substrato foi feita usando-se pipetas esterilizadas.

3.2.4 Seleção do fungo ectomicorrízico

O isolado usado *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt 116 (Figura 4) pertence à coleção da Micoteca do Laboratório de Microbiologia do Solo e do Ambiente Marcos Rubens Fries do Departamento de Solos da UFSM, Santa Maria (RS).



Figura 4- Cultura do fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt 116 selecionado para produção do inoculante. Santa Maria, RS, 2006.

3.2.5 Produção do inoculante

O inóculo de *Pisolithus microcarpus* foi obtido inicialmente a partir da multiplicação e crescimento em estufa a 25°C por aproximadamente 30 dias. Após esse período, discos de micélio de 8mm de diâmetro aí obtidos foram transferidos para erlenmeyer de 250 mL com 25 mL de meio MNM líquido (Marx, 1969) e levados para estufa a 25°C para a incubação por um período de 45 dias.

Em seguida, o conteúdo de dois frascos foi fragmentado com 200 mL de meio MNM líquido, em liquidificador previamente autoclavado durante 5 segundos. O conteúdo resultante da fragmentação, foi adicionado a 100 mL de meio MNM líquido, e inoculados em uma mistura de turfa-vermiculita (4:1) (v/v) acondicionada em vidro do tipo conserva com capacidade para 900 mL. Os frascos foram mantidos a 25°C em estufa, no escuro, por aproximadamente 90 dias (Figura 5).

A mistura de turfa-vermiculita foi previamente esterilizada em autoclave a 121°C a 1,5 atm de pressão durante 60 minutos.



Figura 5- Inoculante miceliano em mistura de turfa-vermiculita com 90 dias de incubação, á 25°C. Santa Maria, RS, 2006.

3.2.6 Experimento com cobre, semente e inóculo de fungo ectomicorrízico

O substrato recebeu a quantidade de cobre correspondente ao tratamento, que foi adicionado ao mesmo por meio de uma pipeta. Após, foram colocadas as sementes de eucalipto ou canafístula e sobre estas 3 gramas de inóculo (Figura 6). As plantas foram irrigadas diariamente.

As mudas de eucalipto e canafístula foram consideradas prontas para o desbaste aos 40 dias a partir da montagem do experimento quando atingiram dois pares de folhas definitivas, ficando apenas uma muda por unidade experimental.

Aos 40, 55, 70, 85 e 100 dias as mudas receberam 10 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Jarstfer e Sylva (1992).



Figura 6- Unidade experimental com substrato, cobre, semente e inóculo de fungo ectomicorrízico. Santa Maria, RS, 2006.

3.2.7 Avaliação

A avaliação do experimento foi 110 dias após a instalação e avaliou-se:

a) Diâmetro do colo e altura da planta

Para a medida do diâmetro do colo e da altura da planta foi utilizada uma régua milimetrada.

b) Matéria fresca da parte aérea e do sistema radicular e matéria seca da parte aérea

A parte aérea das plantas foi separada da raiz e lavada com água destilada. Logo após, determinou-se matéria fresca da parte aérea. Para determinação da matéria seca as plantas foram secas em estufa a 70°C, por 72 horas.

As raízes foram separadas do solo, lavadas com água destilada, secas em papel toalha e então pesadas.

c) Avaliação da colonização micorrízica

Depois da determinação da matéria fresca, as raízes foram armazenadas em álcool 50% em temperatura ambiente. Após, foram submetidas ao clareamento (KOH a 10%) e coloração com azul de trypan a 0,05% (Phyllips e Hayman, 1970). A percentagem de colonização ectomicorrizas foi determinada pelo método da placa quadriculada (Giovannetti e Mosse, 1980).

3.2.8 Análise estatística

Os resultados obtidos sobre a altura da planta, diâmetro do colo, matéria fresca da parte aérea e radicular, matéria seca da parte aérea e percentagem de colonização micorrízica foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo Teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico SANEST (Zonta e Machado, 1984).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 População de bactérias e fungos do solo em área contaminada por cobre nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS.

A área de rejeito apresentou os níveis mais altos de cobre quando comparados com os outros locais de coleta de solo (Tabela 1). A União Européia determina que o limite máximo permitido para o cobre no solo é de 140 mg kg^{-1} (Chaudri et al., 1993). As concentrações de 40 a 100 mg kg^{-1} são fitotóxicas e variam respectivamente entre solo arenoso e argiloso (Moreira e Siqueira, 2002). Neste trabalho, os teores de cobre encontrados excederam os dois limites propostos, podendo ter dificultado o desenvolvimento de vegetação e da população de microrganismos do solo.

O número reduzido de bactérias na área de rejeito era esperado em função do elevado grau de degradação do local, mostrado pelos baixos valores de pH e matéria orgânica, elevada concentração de cobre (Tabela 1) e ausência de vegetação (Figura 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Catelan e Vidor (1990 a) em solo descoberto onde encontraram um baixo número de bactérias e fungos do solo.

Embora a área de rejeito tenha apresentado elevados teores de cobre, os microrganismos se estabeleceram no local (Figura 3). Sabe-se que os microrganismos são influenciados de modo diferenciado pela presença de metais pesados no solo. Este comportamento depende do metal, da sua concentração no solo e dos microrganismos envolvidos no processo. Os fungos filamentosos, as leveduras, as bactérias e as algas são biorremediadores eficientes, removendo metais via mecanismos ativos ou passivos, podendo acumular eficientemente os metais pesados como o Cd, Zn, Ni, Cu e Pb do ambiente (Guelfi, 2001).

A hipótese mais provável para a presença e o estabelecimento da população de bactérias nesta área pode ser explicada por mecanismos bioquímicos. O cobre pode ter sido absorvido no envelope celular resultando na biossorção. A adsorção de íons metálicos ao redor do envoltório celular microbiano, a chamada biossorção é independente da atividade metabólica (Rosa et al., 2001). A absorção através do metabolismo celular e a translocação para dentro da célula com a posterior bioacumulação também poderá ter ocorrido com esses microrganismos.

O sistema de transporte de metais (Co, Cu, Cr, Mg, Ni e Zn) dentro da célula é regulado por proteínas (Turpeinen, 2002). Entre estas a metalotioneína que tem elevada

afinidade por metais pesados como o Cu, Cd e Zn (Waalkes, 2000). Elevadas concentrações do metal podem também ter exercido pressão seletiva na tolerância e resistência da comunidade microbiana a presença de metais pesados. Este mecanismo adaptativo foi relatado por Ellis et al. (2003) em estudos com diversidade de bactérias em solo contaminado por Zn e Pb.

As áreas de margem e cultivo de eucalipto não mostraram diferenças significativas quanto ao número de bactérias (Tabela 2). O pH do solo dessas áreas teve uma variação de 6,5 a 4,8. Isto pode evidenciar que os valores de pH interferiram na população de bactérias comparando-se com a população destes organismos em outras áreas de avaliação. O pH altera a especiação química dos íons metálicos, podendo atuar sobre sua toxicidade para o solo e para os microrganismos. Os organismos do solo sobrevivem em um pH ótimo, onde o crescimento e as funções metabólicas são mais eficientes (Bäath, 1989). É provável que neste caso, as bactérias mostram-se adaptadas ao pH baixo, não influenciando diretamente nas suas atividades metabólicas, quando comparadas com as outras áreas. Assim, nessas condições o pH pode ser considerado ótimo para o grupo de bactérias encontradas nestes locais, mostrando a habilidade do grupo em sobreviver nessas condições ambientais adversas.

A cobertura vegetal influencia o número de microrganismos do solo (Silva Filho e Vidor, 1984). Quando o solo é protegido por vegetação, aumenta a disponibilidade de nutrientes orgânicos, diminuindo os efeitos de variação de temperatura e umidade, tornando o ambiente propício para o desenvolvimento das bactérias e outros organismos. O crescimento da vegetação promove a liberação de exsudatos das raízes alterando a disponibilidade dos metais para os microrganismos (Zilli et al., 2003). Esses mecanismos podem justificar o número significativo de bactérias nas áreas de margem e cultivo com eucalipto, pois havia presença de resíduos orgânicos sobre o solo.

Tabela 2- População de bactérias e fungos do solo em diferentes locais de coleta nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006.

Local	Bactérias ($\times 10^2$)	Fungos ($\times 10^2$)
-------	-----------------------------	--------------------------

Rejeito	1,9 b*	1,5 c
Margem	4,2 a	3,7 a
Cultivo de Eucalipto	5,1 a	2,5 b
Pinus 2 anos	1,6 b	3,0 b
Pinus 10 anos	2,5 b	1,0 c
cv (%)	27	40

* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo Teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro.

A população de bactérias do solo nos locais de cultivo com Pinus com 2 anos e com mais de 10 anos e rejeito não diferiram significativamente (Tabela 2). O fato das bactérias se apresentarem em um número menor na área de Pinus com 2 anos de cultivo e rejeito poderia ser explicado pelos baixos teores de matéria orgânica (Tabela 1) levando assim a pouca complexação do cobre. Também o desenvolvimento de endósporos, que não foram contados no experimento, poderiam justificar o número de bactérias dessas áreas. Os endósporos, são estruturas de proteção a estresses ambientais como a contaminação do solo por cobre. Resultados semelhantes foram encontrados por Dias-Junior et al. (1998) em locais contaminados por rejeito de indústria de zinco. A população de bactérias é influenciada pela presença da cobertura vegetal através da produção de exsudatos radiculares. Na área de Pinus com 2 anos de plantio, não havia nenhuma espécie como vegetação de cobertura do solo. Assim, a produção de exsudatos de raízes era pequena. Este resultado está de acordo com Catelan e Vidor (1990 a) que estudando os efeitos dos fatores ambientais sobre a biomassa, população e atividade microbiana no solo em diferentes sistemas de

culturas, concluiu que o desenvolvimento dos microrganismos foi influenciado pela variação dos fatores climáticos como umidade e temperatura, que influenciam diretamente sobre a cobertura vegetal.

O uso de plantas pode acelerar os processos de degradação de poluentes atuando sobre os contaminantes e contribuindo indiretamente através do efeito rizosférico sobre a microbiota biodegradadora. (Moreira e Siqueira, 2002) Quando associadas com microrganismos podem alterar as formas dos metais pesados (De Mora et al., 2006). Isto pode ser verificado na área de plantio de pinus com mais de 10 anos, onde houve um aumento da população de bactérias podendo ser mais influenciadas pelo efeito rizosférico do que os fungos.

A variação nos valores de matéria orgânica e cobre no solo (Tabela 1) pode explicar resultados sobre bactérias em plantio de pinus com 2 anos. Neste local, a quantidade de cobre é maior porque havia pequena quantidade de matéria orgânica, isto é, pouca complexação de metais pela matéria orgânica, ficando assim o cobre mais disponível para os microrganismos.

A temperatura do solo atua sobre a toxicidade do metal para os microrganismos (Guelfi, 2001). O solo descoberto na área de Pinus com 2 anos de cultivo pode ter elevado a sua temperatura. Essa variação aparentemente teria influenciado de maneira negativa sobre a atividade metabólica das bactérias presentes nessa área. Estudos mais aprofundados são necessários envolvendo unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias e fungos, pH e matéria orgânica pois, conforme Bäath (1989) suas relações com a toxicidade dos metais e as variáveis microbiológicas do solo ainda não estão bem esclarecidas.

A área de margem apresentou a maior média de fungos (Tabela 2), mostrando diferenças significativas em relação às outras áreas amostradas. O local caracteriza-se pela presença de gramíneas cobrindo o solo e estas por terem um sistema radicular denso exercem maior efeito rizosférico, propiciando o desenvolvimento de fungos no solo. Resultados semelhantes foram encontrados por Nuernberg et al. (1984), onde a cobertura vegetal alterou o número de fungos do solo.

Os eucariotos geralmente são mais tolerantes do que os procariotos a contaminação por metais pesados (Hiroki, 1992; Hattori, 1992). Os gêneros de fungos respondem de maneira diferenciada em relação à concentração e ao tipo de metal presente no solo. A sensibilidade à toxidez pela comunidade microbiana responde de maneiras diferentes entre solos, dependendo das características químicas, físicas e biológicas (Giller, 1989).

Os fungos encontrados na área de margem pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Penicillium* (Tabela 3). Neste trabalho, o gênero *Penicillium* sp. exibiu tolerância à presença de sulfetos de cobre do solo. Resultados semelhantes foram encontrados por Bãath (1989) que encontrou fungos do gênero *Penicillium* como espécie abundante em solos com alto teor de cobre.

Há variações na tolerância aos metais por parte dos microrganismos. Trabalhos realizados por Williams et al. (1977) relatam a diminuição do número de fungos do gênero *Penicillium* sp. em solos contaminados por metais pesados, podendo em alguns casos acontecer também o desaparecimento deste gênero quando em presença de grandes concentrações do cobre.

Tabela 3- Gêneros de fungos do solo encontrados nas diferentes áreas de coleta das Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006.

Área	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Penicillium</i>	Gêneros NI*
Rejeito	x		x	x	
Margem	x	x	x	x	x
Cultivo de Eucalipto	x	x	x	x	x
Pinus 2 anos		x		x	x

Pinus +

10 anos

x

x

x

x

*NI - não identificados

Gêneros de *Fusarium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* também foram encontrados na área de margem (Figura 7). Estes fungos possivelmente apresentam adaptações fisiológicas e mudanças genéticas para tolerar a presença do cobre no solo (Gaad, 1978).

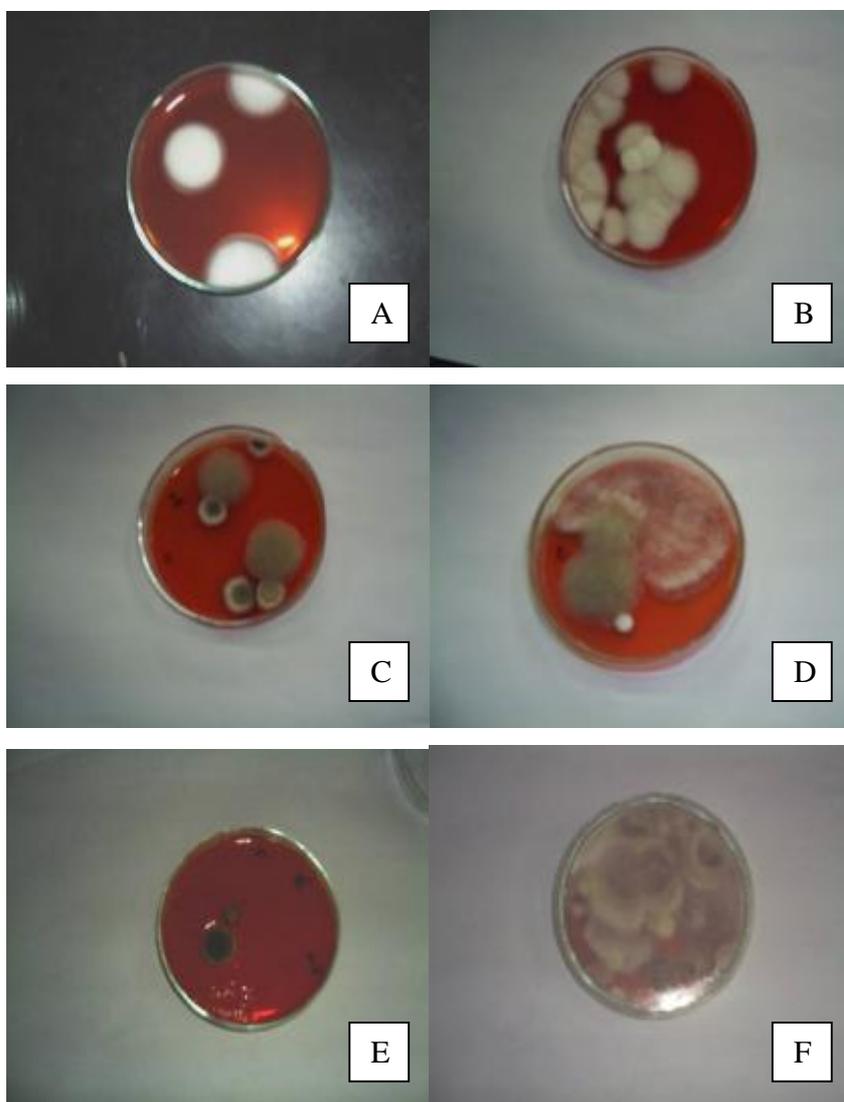


Figura 7- Características das colônias dos isolados de fungos das áreas de margem (Ma) (A e B) cultivo de eucalipto (C) área de pinus com 2 anos de cultivo (D) área de rejeito (E) e área de Pinus com mais de 10 anos de cultivo (F) nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006.

A população de fungos não apresentou diferenças significativas de ocorrência entre as áreas de cultivo de eucalipto e pinus 2 anos. Os teores de cobre e valores de pH (Tabela 1) entre as duas áreas amostradas possivelmente não influenciaram no desenvolvimento da população dos fungos (Tabela 2). O pH da área de cultivo de eucalipto variou de 4,5 a 5,0. Segundo Moreira (2002) os fungos são mais adaptados a pH menor do que 5 e este valor foi encontrado na área de cultivo de eucalipto. Fatores como o pH, teor de matéria orgânica e textura do solo atuam sobre os metais e os microrganismos (Hattori, 1992). Destes, o pH exerce grande influência na solubilidade e especiação dos ions metálicos (Sanders et al., 1986) e no estado metabólico dos microrganismos (Bäath, 1989). Os gêneros presentes nesses dois locais de coleta se mostraram tolerantes as doses de cobre (Tabela 3, Figura 7).

O gênero *Trichoderma* exhibe baixa tolerância á adição de sulfetos de cobre no solo (Bettiol e Trach, 2001). Os resultados encontrados na área de cultivo de pinus com 2 anos de idade não mostram a presença de *Trichoderma*. Isto possivelmente aconteceu em função das elevadas doses de cobre do solo, que poderiam ter inibido o desenvolvimento desta população de fungos.

A área de rejeito (Re) e área de Pinus com mais de 10 anos de cultivo apresentaram as menores médias na contagem da população de fungos quando comparadas com as outras áreas de coleta (Tabela 2). Os resultados podem ser explicados pelos elevados teores de cobre no solo, baixos valores de pH e matéria orgânica e com pouca vegetação de cobertura.

Geralmente locais com pH neutro e com uma relativa quantidade de matéria orgânica reduzem os efeitos tóxicos dos metais pesados, tornando-os menos disponíveis para os microrganismos (Banu et al., 2006). O Zn, Co e Ni presentes na solução do solo podem não estar biodisponíveis, mas na forma de quelatos com moléculas orgânicas em formas químicas não disponíveis (Sanders et al., 1986). A

população de fungos na área de pinus com mais de dez anos de cultivo pode ter sido alterada pela ação oligodinâmica do cobre. Essa ação pode acontecer quando substâncias mesmo em concentrações baixas, atuam em função das condições que o organismo vivo se encontra, podendo inibir, estimular ou mesmo destruir os indivíduos (Borzani, 2000). A ação oligodinâmica do cobre é conhecida em fungos filamentosos *Aspergillus* e *Penicillium* (Borzani, 2000), cujos gêneros ocorreram nas áreas em estudo (Tabela 3, Figura 7).

Comparações entre sítios poluídos e não poluídos mostram que os fungos são adaptados até um certo grau e para a espécie sensível aquela toxicidade (Bäath, 1989). Há variações entre os gêneros de fungos quanto à tolerância adaptativa em relação à quantidade elevadas de metais no solo, podendo levar os indivíduos à morte (Banu et al., 2006). Trabalhos com crescimento micelial de alguns fungos fitopatogênicos mostraram que houve drástica redução da população total de fungos com adição de 0,3 kg de cobre (Bettiol e Trach, 2001). Assim, as quantidades de cobre disponíveis na solução do solo possivelmente atuam no desenvolvimento da população de fungos que varia em condições de tolerância e resistência a presença do metal.

4.2 Influência dos fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden e *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

A altura da planta e a matéria fresca da parte aérea e da raiz aos 110 dias das mudas de eucalipto cultivadas variaram entre os tratamentos (Figura 8). Houve um efeito significativo da inoculação nos dois parâmetros avaliados. As médias da altura das mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com Pt 116 (8,87 cm) foram significativamente maiores do que as médias encontradas no tratamento sem inoculação (4,95 cm) (Tabela 4).

Quanto à matéria fresca da parte aérea, sua média foi significativamente maior nos tratamentos com inoculação com Pt 116 (0,53 cm) quando comparados com os

tratamentos sem inoculação (0,19 cm). Resultados semelhantes foram encontrados por Vieira e Peres (1990) onde a altura da planta e a matéria fresca da parte aérea de *Pinus caribea* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* e submetidas a doses de 15, 30 e 60 mg kg⁻¹ de fósforo aplicado no solo apresentaram valores superiores comparados com mudas não inoculadas.

Eucalyptus grandis inoculado com *Pisolithus tinctorius* ou não inoculado, com diferentes níveis de fósforo aplicados em um Latossolo Vermelho escuro do Cerrado, mostrou as maiores médias de altura em mudas micorrizadas, onde o P extraível era de 1,71 mg kg⁻¹, apesar das elevadas taxas de ectomicorrizas nas mudas cultivadas em vasos com 3,5 e 11,1 mg kg⁻¹ de P extraível (Vieira e Peres, 1988).

A inoculação de *Eucalyptus grandis* com *Pisolithus tinctorius*, isolado Pt 90, promoveu maior crescimento da parte aérea e da raiz da planta nas doses de 20, 50, 90 mg dm⁻³ de enxofre com uma dose única de 60 mg dm⁻³ de P em solução nutritiva testadas em um substrato solo-areia (Trindade , 2001).

A inoculação com fungos micorrízicos seria uma alternativa para substituir doses elevadas de enxofre para o melhor crescimento da planta. A absorção e o metabolismo do enxofre parecem estar ligados ao do P e as informações obtidas com micorrizas arbusculares indicam que pode haver aumento na absorção do elemento pela translocação das hifas para as raízes (Rhodes e Gerdmann, 1978 a). Pode haver aumento da absorção de enxofre como resultado indireto do aumento da absorção de P pela planta micorrizada (Rhodes e Gerdmann, 1978 b).





Figura 8- Mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden aos 110 dias inoculadas com Pt 116 (A), sem inoculação (B) com Pt 116. Santa Maria, RS, 2006.

O diâmetro do colo e a matéria seca da parte aérea não apresentaram diferenças significativas em suas médias (Tabela 4). Em mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com Pt 116, o diâmetro do colo da planta (1,0 mm) obteve as mesmas médias das mudas não inoculadas com Pt 116 (1,0 mm) mostrando que para esses parâmetros testados não houve interferência positiva da inoculação com *Phisolitus microcarpus*.

Talvez o fungo Pt 116 não seja capaz de estabelecer uma simbiose perfeita com mudas de *Eucalyptus grandis*, assim os efeitos da micorrização não são claramente observados em todas as avaliações. *Pisolithus tinctorius* coletado de *Pinus caribea* var. *hondurensis* em área de cerrado mostrou uma simbiose imperfeita, explicando a menor média encontrada na matéria seca da parte aérea da planta quando comparados com resultados obtidos por outros isolados de fungos ectomicorrizicos coletados (Vieira e Peres, 1990). Os autores relataram que a área de *Pinus* era circundada por plantas de eucalipto, onde a incidência de basidiocarpos de *Pisolithus tinctorius* era grande, podendo ser este fungo um simbiote de eucalipto incapaz de manter uma simbiose perfeita com as espécies de *Pinus*.

Tabela 4- Matéria seca da parte aérea, matéria fresca da parte aérea e da raiz, altura, diâmetro do colo e percentagem de colonização micorrízica de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden em resposta a inoculação com *Pisolitus microcarpus* aplicado ao substrato areia- vermiculita 1:1 (v/v), Santa Maria, RS, 2006.

Tratamento	Matéria seca	Matéria fresca		Altura	Diâmetro do colo	Colonização micorrízica
	Parte aérea	Parte aérea	Raiz			
	----- g/vaso -----	-----	-----	---cm---	---mm---	-----%-----
Pt 116 ¹	0,18 a*	0,53 a	0,34 a	8,87 a	1,0 a	22,62 a
Sem inoculação	0,16 a	0,19 b	0,19 b	4,95 b	1,0 a	0 b
cv (%)	25	24	20	15	18	30

¹Pt 116 *Pisolithus microcarpus*

* Os valores na mesma coluna seguidos de letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro.

Os fungos ectomicorrízicos variam em compatibilidade e eficiência dependendo das espécies simbiotes e das condições ambientais (Alvez et al., 2001). Estes organismos têm capacidade diferenciada em promover os benefícios a seus hospedeiros, como resultados das diferenças fisiológicas e ecológicas intraespecíficas (Smith e Read, 1997).

Neste trabalho, além do Pt 116 possivelmente não estabelecer uma simbiose perfeita com o eucalipto, fatores como inadequação da aplicação do inóculo ao substrato podem ter influenciado de maneira negativa nos resultados.

O controle da micorrização exige o desenvolvimento de métodos de produção de inoculantes em larga escala (Hung e Molina, 1986). Uma das alternativas é o inoculante vegetativo, constituído de micélio em cultura pura numa mistura vermiculita-turfa e meio de cultura (Marx et al., 1982). O inóculo aplicado no experimento correspondeu ao citado acima, mas a quantidade (3g) e uma única aplicação poderiam não ter sido suficiente para promover uma completa micorrização refletindo nos resultados obtidos no trabalho.

A matéria fresca da parte aérea e da raiz e a altura (110 dias) das mudas de canafístula cultivadas variaram entre os tratamentos (Figura 9). Efeitos benéficos da micorrização foram observados na matéria fresca da parte aérea e na altura das mudas

de canafistula. A altura das mudas de *Peltophorum dubium* inoculadas com Pt 116 apresentou média superior (8,75 cm) do que as médias encontradas no tratamento sem inoculação (8,12 cm) (Tabela 5).

O efeito sobre altura das plantas, matéria seca e absorção de N pela araucária foram observados. Os resultados indicam que as respostas foram devidas provavelmente ao estabelecimento da simbiose micorrízica, visto que em estudos com inóculos de micorrizas nativas em araucária em que o substrato não tinha sido fumigado, os efeitos da adição de inóculo de micorriza são pouco acentuados (Oliveira et al., 1992).

A inoculação com fungos micorrízicos pode influenciar diretamente o crescimento pós-transplante de espécies florestais. No açoita cavalo (*Luehea divaricata* Martius.) verificou-se resposta linear, sendo maior a altura das plantas quando inoculadas com fungos micorrízicos. Este comportamento foi observado também para sesbânia (*Sesbania* sp.) e tamboril (*Entelobium contortisiliquum* (Vellozo Morong.) que mostraram diferenças no crescimento já aos 30 dias (Rojas e Siqueira, 1990).

Em geral, essências florestais nativas formam simbiose com fungos micorrízicos, como as plantas da família Leguminosae, que podem associar-se com dois tipos de fungos micorrízicos geralmente endomicorrizas e ectomicorrizas favorecendo o estabelecimento e desenvolvimento das mudas a campo e em casa de vegetação (Sturner e Bellei, 1994).

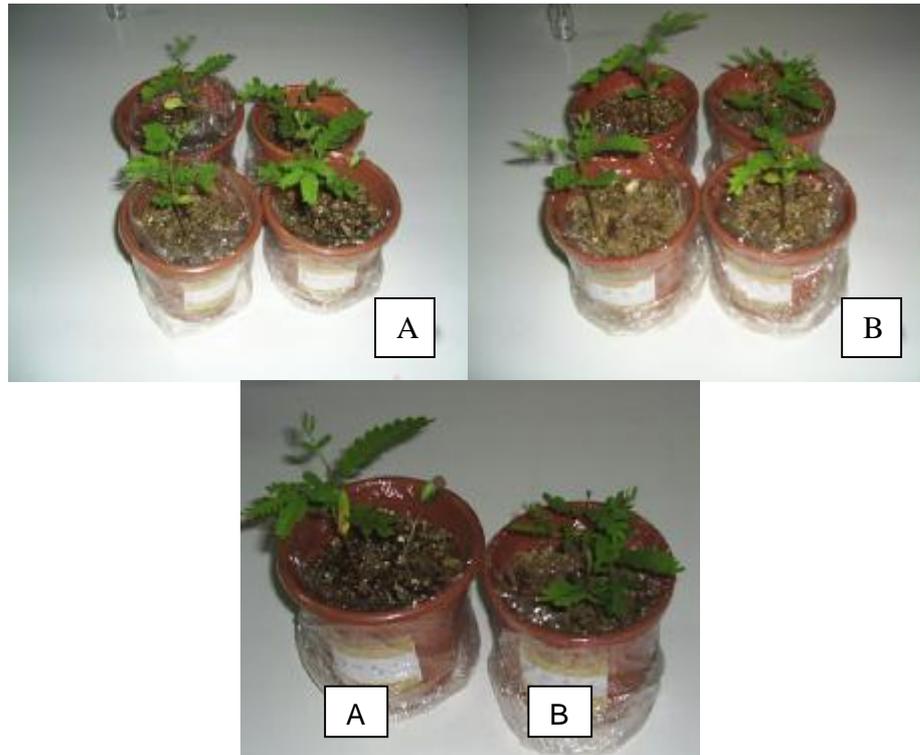


Figura 9-Mudas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert aos 110 dias inoculadas com Pt 116 (A), sem inoculação (B) com Pt 116. Santa Maria, RS, 2006.

O diâmetro do colo e a matéria seca da parte aérea das mudas de canafístula (110d) não apresentaram diferenças significativas nas médias obtidas quanto ao tratamento inoculado com *Phisolitus microcarpus* e não inoculado (Tabela 5). Embora tenha sido encontrada evidência de colonização ectomicorrízica (4,96%) esta apresentou baixos valores. Estudos com a canafístula e o isolado UFSM RA 2,8 mostrou que houve a formação do manto fúngico e da rede de Hartig, mas não obteve diferenças significativas na altura da planta, matéria fresca da raiz e da parte aérea e matéria seca da parte aérea (Andreazza, 2006).

Associações ectomicorrizas com canafístula em ambiente natural não foram encontradas (Frioni et al., 1999; Zangaro et al., 2002). Isto pode acontecer devido a fatores ambientais, tipo de solo, presença de pouco inóculo e temperatura e não ter ocorrido a presença de inóculo compatível ou viável próximos às raízes de plantas e em

quantidades suficientes para promover a associação ectomicorrízica (Giachini et al., 2000).

Tabela 5- Matéria seca da parte aérea, matéria fresca da parte aérea e da raiz, altura, diâmetro do colo e percentagem de colonização micorrízica de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert em resposta a inoculação com *Pisolithus microcarpus* aplicado ao substrato areia- vermiculita 1:1 (v/v), Santa Maria, RS, 2006.

Tratamento	Matéria seca	Matéria fresca	Altura	Diâmetro do colo	Colonização micorrízica	
	Parte aérea	Parte aérea Raiz				
	-----g/vaso-----		---cm---	---mm---	-----%-----	
Pt 116 ¹	0,17 a*	0,52 a	0,25 a	8,75 a	2,75 a	4,96 a
Sem inoculação	0,15 a	0,44 b	0,15 b	8,12 b	2,75 a	0 b
cv (%)	25	24	20	15	18	30

¹Pt 116 *Pisolithus microcarpus*

* Os valores na mesma coluna seguidos de letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro.

A inoculação de mudas com fungos ectomicorrízicos se mostra como uma boa alternativa para produção de mudas com uma melhor qualidade e capacidade de sobrevivência a campo, sendo então essa associação muito importante para as essências florestais quando presente. Há especificidade entre os fungos ectomicorrízicos e seus hospedeiros e alguns isolados não são capazes de formar associações ectomicorrízicas não colonizando determinadas espécies de plantas Voight et al. (2000). Neste trabalho, as doses de 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ de cobre inibiram o desenvolvimento de mudas de eucalipto e canafístula inoculadas ou não com Pt 116, sobrevivendo apenas 15 dias, não sendo usadas para a discussão dos resultados.

5 CONCLUSÕES

A população de fungos e bactérias foi maior na área de margem 92 mg dm⁻³ e menor na área de rejeito com 203 mg dm⁻³ de cobre.

O pH do solo, quantidade de matéria orgânica e presença de vegetação influenciaram na população fungos e bactérias do solo na área de Minas do Camaquã.

As mudas de eucalipto e canafístula inoculadas e não inoculadas com *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt 116, não sobreviveram com 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ de cobre adicionado ao solo.

A inoculação das mudas de eucalipto e canafístula com *Pisolithus microcarpus* em solo sem adição de cobre favoreceram o desenvolvimento da matéria fresca da parte aérea e radicular e da altura das plantas.

A canafístula é capaz de formar associação ectomicorrízica com *Pisolithus microcarpus*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-SHANAB, R. A., ANGLE, J. S., CHANEY, R. L. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alysicarpus muralis* from low, moderate and high Ni soil. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 38, n. 9, p. 2882- 2889, 2006.

ABREU, C. A. ; ABREU, M. F.; BERTON, R. S. Análise química de solo para metais pesados. In: ALVAREZ, V. V. H.;SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. **Tópicos em Ciência do Solo**. v. 2. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p. 645-692.

ABREU, C. A.; FERREIRA, M. E.; BORKERT, J. C. Disponibilidade e avaliação de elementos catiônicos: zinco e cobre. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P.; VAN RAIJ, B.; ABREU, C.A. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTATOS, 2001. p.125-150.

ALVES et al. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 36, n. 2, p. 307-313, 2001.

ANDREAZZA, R. **Associação de fungos ectomicorrízicos com espécies florestais nativas do estado do Rio Grande do Sul**. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ANTONIOLLI, Z.; KAMINSKI, J. Micorrizas. **Ciência Rural**. v. 2, n. 3, p. 441-455, 1991.

BÄATH, E. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). **Water, Air e Soil Pollution: Focus**. v. 47, n. 5, p. 335-379, 1989.

BAHAMINYAKAMWE, L. et al. Copper mobility in soil as affected by sewage sludge and low molecular weight organic acids. **Soil Science**. v. 171, n. 1, p. 29-38, 2006.

BAKER, A. J. M. Metal tolerance. **New Phytologist**. v. 106, n. 1, p. 93-1011, 1987.

BANU, N. A.; SINGH, B.; COPELAND, L. Influence of copper on soil microbial and biodiversity in some NSW soil. **Faculty of Agriculture, Food and Natural Resources**. University of Sydney. Australia. 2006.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth edition. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BELLEI, M. M. & CARVALHO, E. M. S. Ectomicorrizas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Eds). **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 297-318.

BENDING, G. D.; READ, D. J. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. **New Phytologist**. v. 130, n. 3, p. 401-409, 1995.

BETTIOL, W.; TRACH, R. Efeito do biofertilizante sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. 2001. Disponível em: < <http://atlas.sct.embrapa.br/pab/pab.ns> >. Acesso em: 25 de agosto 2006.

BORZANI, W. Ação oligodinâmica. In: Escola de Engenharia. Centro Universitário Do Instituto Mauá de Tecnologia. São Caetano do Sul. 2000. Disponível em: <http://www.hottopos.com/regeq11> >. Acesso: em 10 de maio de 2006.

BRIERLEY, C. L. Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwaters. **Geomicrobiology Journal**. v. 8, p. 201-233, 1991.

BRUINS, M.; KAPIL, S.; OEHME, F. Microbial resistance to metal in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 45, n. 3, p. 198-207, 2000.

BRUYNESTEYN, A. Mineral Biotechnology. **Journal of Biotechnology**. v. 11, p. 1-10, 1989.

CAMARA, G. et al. **SPRING**: Integrating remote sensing and GIS by object-oriented data modeling. *Computers & Graphics*, 20: (3) 395-403, May-Jun, 1996.

CAMARGO, O. A.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P.; VAN RAIJ, B.; ABREU, C.A. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTATOS, 2001. p. 89-117.

CAMPBELL, C. A.; BIEDERBECK, V. O. Soil bacterial changes as affected by growing season weather conditions: a field and laboratory study. **Canadian Journal of Soil Science** v. 56, n. 15, p. 293-310, 1976.

CARVALHO, P. E. R. Espécies alternativas para o reflorestamento e o seu futuro industrial nos estados do sul do Brasil. In: V SIMPÓSIO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL. I SIMADER-RS. 1995, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 1995, p. 21-25.

CARVALHO, P.E. R. Espécies nativas para fins produtivos. In: CARVALHO. E. R. **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais**. Colombo: Embrapa CNPF. 103-125p. 1998.

CASAGRANDE, J. C. et al. Copper desorption in a soil with variable charge. **Scientia Agrícola**. v. 61, n. 2, p. 196-202, 2004.

CATELAN, A. J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Campinas, v. 14, n. 2, p. 125-133, 1990 a.

CATELAN, A. J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 133-142, 1990 b.

CHAUDRI, A. M. et al.; Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarium* biovar *trifolii* in soil previously treated with metal-contaminated sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 25, n. 3, p. 301-309, 1993.

COLPAERT, J. V.; VAN ASSCHE, J. A. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. **Plant Soil**. v. 143, n. 2, p. 201-211, 1987.

CONN, C. ; DIGHTON, J. Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 32, n. 4, p. 489-496, 2000.

COSTA, C. N. et al. Contaminantes e Poluentes do Solo. In: MEURER, E. J. **Fundamentos de Química do Solo**. 2 ed. Gênese: Porto Alegre. 2004.

COSTA, M. D. et al. Ectomicorrizas: a face oculta das florestas: Aplicações biotecnológicas das ectomicorrizas na produção florestal. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v.10, 2000.

COSTA, M. D. et al. Physiology and genetics of ectomycorrhiza formation in the *Pisolithus- Eucalyptus* symbiosis. In: ALVAREZ, V. V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. **Tópicos em Ciência do Solo**. v. 2. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p. 645-692.

COURA, S. M. et al.; *Fusarium oxysporum* como bioindicador de herbicida a base de ametrina. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2000, [S. l: s.n.] **Anais...** 2000.

DE MORA et al. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 38, n. 2, p. 327-341, 2006.

DENNY, H. J.; WILKINNS, D. A. Zinc tolerance in *Betulla* spp. III. Variation in response to zinc among ectomycorrhizal associates. **New Phytologist**. v. 10, n. 2, p. 256-271, 1987.

DIAS-JÚNIOR, H. E. et al. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 22, n. 1, p. 631-640, 1998.

DORIA, K. et al. Influência do fungo micorrízico *Phisolithus tinctorus* no desenvolvimento de mudas de Eucalipto aplicados no substrato. In: IX REUNIÃO CIENTIFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO LAGEADO, 2002, Lageado. **Anais...** 2002.

ELLIS, R. J. et al. Cultivation dependant and independent approach for determining bacterial diversity in heavy-metal contaminated soil. **Applied Environmental Microbiology**. v. 69, p. 3223-3230, 2003.

FERNANDES, J. C.; HENRIQUES, F. S. Biochemical, physiology and structural effects of excess copper in plants. **Bot. Rev.** v. 57, p. 246-273, 1991.

FERREIRA, C. A.; GALVÃO, A. P. Importância da atividade florestal no Brasil. In: GALVÃO, A. P. (Org.). **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais**: um guia para ações municipais e regionais. Brasília:Embrapa, 2000. cap. 1, p. 15-18.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análises estatísticas para dados balanceados**. Lavras: UFLA/ DEX/ SISVAR, 2003, 145p.

FILHO, H. G. Cobre na planta. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônomicas. Departamento de Recursos Naturais. Área de Ciência do Solo. 2005. Disponível em: < <http://www.fca.unesp.br/intranet/arquivo>>. Acesso em: 8 de setembro 2006.

FISCHEROVA, Z. et al. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. **Environmental Pollution**. v. 144. n. 3, p. 93-100, 2006.

FLORENCE, R. G. **Ecology and Silviculture of Eucalypt Forests**. SHORT, E. & VERONI, M. (Eds.). CSIRO. Austrália. 1996. 413p.

FRIONI, L.; MINASIAN, H.; VOLFOVICK, R. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. **Forest Ecology and Management**. v. 115, n. 1, p. 41-47, 1999.

GAAD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanism of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 11, p. 271-279. 2000.

GALVÃO, J. G. et al. Uso do fungo *Fusarium oxysporium* como indicador de ametrina , através da medida da biomassa, pela quantificação do ergosterol. **Ciênc. Agrotec. Lavras**, v. 27, n. 4, p. 840-845, 2003.

GIACHINI, A. J. et al. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycological Society of América**. Laurence. v. 92, n. 6, p. 1166-1177, 2000.

GILIS, A. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganism. **Microbiology**. v. 46 n. 51, p. 834-840, 1990.

GILLER, K. E. Toxicity of heavy metals to microorganisms an microbial processes in agricultural soil: a review. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 30, n. 10, p. 1389-1414. 1989.

GIOVANETTI, M. G.; MOSSE, B. Na evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, New York, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GOBERNA , M. et al. Microbial community structure at different depths in disturbed and undisturbed semiarid Mediterranean forest soil. **Microbial Ecology**. v. 5, n. 40, p. 315-326, 2005.

GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeito do Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 25, n. 10, p. 831-838, 2001a.

GRAZZIOTTI, P. H. et al. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 25, n. 10, p. 839-848, 2001b.

GUELFY, A. **Resposta das enzimas antioxidantes em linhagens do fungo *Aspergillus* sp. na presença do metal pesado cádmio**. 2001. 76f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, 2001.

GUILHERME, L. R. G.; LIMA, J. M.; ANDERSON, S. J. Efeito do fósforo na adsorção de cobre em horizontes A e B de Latossolos do Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 1995, Viçosa, **Anais...**Santa Maria, 1995. p. 316-318.

HARLEY, J. L. H.; SMITH, S. E. **Mycorrhizal Symbiosis**. New York, Academic Press Inc., 1983. 483p.

HATTORI, H. Influence of heavy metals on soil microbial activities. **Soil Science**. v. 38, n. 9, p. 93-100, 1992.

HIROKI, M. Effects of heavy metal contamination on soil microbial population. **Soil Science**. v. 38. n. 9, p. 93-100, 1992.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley. CA: University of California (California Agricultural Experiment Station). Circular.1941. 347p.

HOWE, R.; EVANS, R. L. ; KETTERIDGE, S. W. Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**. v. 135, n. 1, p. 123-131, 1997.

HUNG, L. L., MOLINA, R. Temperature and time in storage influence the efficacy of selected isolates of fungi in commercially produced ectomycorrhizal inoculum. **Forest Science**. v. 32, n. 2, p. 534-545, 1986.

IFCRS- INVENTÁRIO FLORESTAL CONTÍNUO DO RIO GRANDE DO SUL. 2003. Disponível em : www.ufsm.br/ifcrs. Acesso em 10 de outubro de 2006.

JI, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. **Journal Industry Microbiology**. v. 14, p. 61-75, 1995.

JONES, M. D.; HUTCHINSON, T. C. The effect mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. **New Phytologist**. v. 102, n. 3, p. 429-442, 1986.

JONGBLOED, R. H. ; BORST-PAUWELS, G. W. F. H. Differential response of some ectomycorrhizal fungi to cadmium in vitro. **Acta Botanica Brasilica**. v. 39, n. 2, p. 251-259, 1990.

KAYSER, A. et al. Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd and Cu from calcareous soil: the use of NTA and sulfur amendments. **Environmental Science Technology** . v. 34, n. 24, p. 1778-1783, 2000.

KONG, F. X. et al. Biochemical responses of the mycorrhizae in *Pinus massoniana* to combined effects of Al, Ca and low pH. **Chemosphere**. v. 41, n. 3, p. 311-318, 2000.

LINDSAY, W. L. Inorganic phase equilibria of micronutrients in soils. In: MORTUEDT, J. J.; GIORDANO, P. M.; LINDSAY, W. L. (eds). **Micronutrients in Agriculture**. Madison. Soil Science Society of América, 1972. p.41-57.

LEGAZ, M. E. et al. **A Esperança Biotecnológica**. João Pessoa: A União. 171 p. 1995.

LEPAGE, B. A. et al. Fossil ectomycorrhizae from the Middle Eocene. **American Journal Botany**. v. 84, p. 410-412. 1997.

LEYVAL, C.; TURNAU, K. & HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**. v. 7, n. 10, p. 139-153, 1997.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 325p.

LUNA, C. M.; CASANO, I. M.; TRIPPI, V. S. Nitrate reductase is inhibited in leaves of *Triticum aestivum* treated with high levels of copper. **Physiologia Plantarum**. v.101, n.1, p. 103-108, 1997.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrientes e metais pesados: mitos, mistificação e fatos. São Paulo: Produquímica, 1994. 153p.

MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**. v. 69, n. 2, p. 215-232, 1950.

MARTINEZ, A. T.; RAMIREZ, C. Microfungal biomass and number of propagules in an andosol. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 10, n. 6, p. 529-531, 1978.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to roots pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**. St Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.

MARX, D. H. et al. Comercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* inoculation techniques for the development of ectomycorrhizae on container-grow tree seedlings. **Forest Science**. v. 28, n. 2, p. 373-400, 1982.

MATTEI, V. L.; ROSENTHAL, M. D. Semeadura direta de canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) no enriquecimento de capoeiras. **Revista Árvore**.v. 26,n. 6. 2002.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 440p.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, 2002. 623 p.

MULETTE, K. J. Studies of Eucalypt mycorrhizas. I. Method of mycorrhiza induction in *Eucalyptus grummifera* (Gaertn & Horchr) by *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch. **Australian Journal Botany**. v. 24, p. 193-200, 1976.

NASCIMENTO, C. W. A.; FONTES, R.L.F.; MELICIO, A. C. F. D. Copper availability as related to soil copper fractions in oxisoil under liming. **Scientia Agricola**. v. 60, n.1. p. 167-173, 2003.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 51, p. 730-750, 1999.

NUERNBERG, N. J.; VIDOR, C.; STAMMEL, J. S. Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 8, n. 2, p.197-203, 1984.

OLIVEIRA, I. B. et al. Eficiência de inóculo com micorrizas nativas em Araucária angustifolia. **Agropecuária Catarinense**. v.5, n. 4, p. 51-52, 1992.

PANOU-FILOTHEU, H. BOSABALIDIS, A. M.; KARATAGLIS, S. Effectes of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*). **Annals of Botany**. v. 88, p. 207-214, 2001.

PAOLETTI, M. G. Using bioindicators base don biodiversity to assess landscape sustainability. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. Amsterdam, v. 17, n. 1/3, p. 1-18, 1999.

PETERSON, R. L.; FARQUHAR, M. L. Mycorrhizas – Integrated development between roots and fungi. **Mycologia**, v. 86, n. 3, p. 311-326, 1994.

PFÜLLER, E. **População Microbiana de um solo sob dois sistemas de plantio e dois sistemas de rotação de culturas**. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2000.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v. 55, p. 158-161, 1970.

PRALON, A. Z. ; MARTINS, M. A. Utilização do resíduo industrial Ferkal na produção de mudas de Mimosa caesalpinifolia em estéril de extração de argila, inoculadas com

fungos micorrizicos arbusculares e rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 25, n. 1, p. 55-63, 2001.

REITZ, R., KLEIN, R. M., REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul**. Corag. 1988. 525 p.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira de Santa Catarina**. Selowwia, n. 34/35, p. 525, 1978.

RHODES, L. H.; GERDMANN, J. W. Hypal translocation and uptake of sulfur by vesicular-arbuscular mycorrhizae of onion. **Soil Biology and Biochemistry**. v.10, n. 2, p. 335-360, 1978 a.

RHODES, L. H.; GERDMANN, J. W. Influence of phosphorus nutrition on sulfur uptake by vesicular-arbuscular mycorrhizae of onion. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 10, n. 2, p. 361-364, 1978 b.

ROJAS, E. P. ; SIQUEIRA, J. O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Revista Agropecuária Brasileira**. v. 49, n. 1, p. 103-114, 1990.

ROSA, L.H. et al. Capacitação do *Aspergillus niger* para remoção de Cd na presença de íons complexantes. 2001. Disponível em: <http://www.ufsc.br/ccb> >. Acesso: em 30 de agosto de 2006.

RUMBERGER, M. D. et al. Changes in diversity and storage function of ectomycorrhiza and soil organoprofile dynamics after introduction of beech into Scots pine forest. **Plant in Soil**. v. 264, n. ½, p. 111-126, 2004.

SANDERS, J. R.; Mc GRATH, S. P. ; ADAMS, T. M. Zinc, cooper and nickel concentrations in ryegrass growt on sludge-contaminated soil different pH. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 37, p. 961-968, 1986.

SANTINI, J. M. et al.; A new chemolitoautotrophic arsenit-oxidizing bacterium isolated from a gold-mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. **Applied Environment Microbiology**. v. 66, p. 92-97, 2000.

SANTOS, V. L. et al., Vesicular-arbuscular/ ecto-mycorrhiza sucesión in seedling of *Eucalyptus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 32, n. 2, p. 81-86, 2001.

SELL, J. et al., Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. **Plant and Soil**. v. 237, n. 2, p. 245-253, 2000.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. As práticas de manejo de solo na população microbiana. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 8, n. 5, p. 291-296, 1984.

SILVA, R. F. **População de fungos micorrízicos e influência de ectomicorrizas na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Pinus elliottii* em solo arenoso**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) 105p. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

SIQUEIRA, J. O.; POUYU, E.; MOREIRA, F. M. S. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplante de mudas de árvores em solo com excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 23, n. 5, p. 569-580, 1999.

SLOBODKIN, A.I. Thermophilic microbial metal reduction. **Microbiology**. v. 74, n. 5, p. 501-514, 2005.

SMITH, S. E. ; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. London: Academic Press, 1997. 605p.

SOARES, I. **Níveis de fósforo no desenvolvimento de ectomicorrizas por *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch e no crescimento de mudas de Eucalipto**. 1986. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1986.

SODRÉ, F. F.; LENZI, E. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. **Química Nova**. v. 24, n. 3, p. 324-330, 2001.

SOUTO, P. C. **Estudo da dinâmica de decomposição de esterco na recuperação de solos degradados no semi-árido paraibano**. 110 p. Dissertação (Mestrado em Manejo de Solo e Água). Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2002.

STRAUB, K. L. et al. Iron metabolism in anoxic environment at near neutral, pH, FEMS. **Microbial Ecology**. v. 34, n. 50, p. 181-186, 2001.

STUNER, S. L.; BELLEI, M; M. Composition and seasonal variation of spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi in dune soils in island of Santa Catarina, Brazil. **Canadian Journal Botany**. v. 72, p. 359-365, 1994.

TAM, P. C. F. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. **Mycorrhiza**. v. 5, p. 181-187, 1995.

TEIXEIRA, G. ; GONZALEZ, M. Minas de Camaquã, Município de Caçapava do Sul, RS. **Principais depósitos minerais do Brasil**, 1988. cap. 3, p. 33-44.

TORDOFF, G. M. ; BAKER, A. J. M.; WILLIS, A. J. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous wastes. **Chemosphere**. v. 41, n.1/2, p. 219-228, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**: an introduction. E. Pearson, 8 ed. p.83, 2004.

TRINDADE, A. V. Efeito de fungos ectomicorrízicos na resposta de mudas de *Eucalyptus grandis* a enxofre no solo. **Revista Árvore**. Viçosa, v. 25, n. 2, p. 175-181, 2001.

TURPEINEN, R. **Interactions between metals, microbes and plants- Bioremediation of arsenic and lead contaminated soils**. 48 f. Dissertação (Mestra do em Ecologia e Ciência Ambiental) – University of Helsinki, Lahti, 2002.

VAGRAS, M. et al. Microbiological evidence for Fe (III) reduction early earth. **Nature**, v. 395, n. 31, p. 65-67, 1998.

VIEIRA, R. F.; PERES, J. R. R. Definição do teor de fósforo no solo para máxima eficiência da associação ectomicorrizica em *Eucalyptus grandis*. . **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 12, n. 5, p. 237-241, 1988.

VIEIRA, R.F.; PERES, J. R. R. Fungos ectomicorrizicos para Pinus spp cultivados em solos sob vegetação de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 14, n. 10, p. 33-39, 1990.

VOIGHT, E. L.; OLIVEIRA, V. L.; RANDI, A. M. Mycorrhizal colonization and compounds accumulation on roots of *Eucalyptus dunii* Maiden inoculated with ectomycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, n. 9, p. 1905-1910, 2000.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis in review. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 79, p. 241-244, 2000.

WILLIAMS, S. T. ;NEILLY, T. Mc. ; WELLINGTON, E. M. H. The decomposition of vegetation growing on metal mine waste. **Soil Biology and Biochemistry**. v.9, n. 4, p. 271-275, 1977.

ZACHIA, R. A. et al. Florística e síndromes de dispersão de espécies lenhosas em um fragmento de floresta ripária em Santa Maria. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO FLORESTAL DO CONE-SUL. A floresta e o Meio Ambiente. 2002, Santa Maria, 2002. **Anais...** p.121.

ZANGARO, W. et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da Bacia do rio Ibagi. Paraná. **Cerne**. v. 8, p. 77-87, n. 1, 2002.

ZILLI, J. E. et al. Diversidade microbiana como indicador da qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. Brasília. v. 20, p. 391-411, 2003.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sistema de Análise Estatística. Departamento de Matemática e Estatística (SANEST)**. ESALQ-USP. 1984. 151p.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como proposto, este trabalho avaliou primeiramente a população de bactérias e fungos do solo e associação ectomicorrízica em raízes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) e eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden) em diferentes níveis de cobre.

O levantamento prévio dos gêneros de fungos do solo (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*) encontrados na área de mineração de cobre permite o desenvolvimento de futuros trabalhos envolvendo o uso destes organismos nos mais diversos sistemas de cultivo ou manutenção de sistemas florestais em áreas degradadas por este metal. A ocorrência populacional média de bactérias em torno de $3,1 \times 10^2 \text{ g}^{-1}$ de solo, indica que são necessários mais estudos sobre o mecanismo de utilização do cobre pelas bactérias, tanto em condições naturais como em laboratório e casa de vegetação.

A inoculação com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) formou associação com a canafístula e eucalipto, entretanto o cobre mostrou efeito

negativo sobre esta simbiose. Para isso recomenda-se mais avaliações utilizando outros isolados da mesma espécie ou mesmo outras espécies de fungos ectomicorrízicos. A inoculação com espécies destes fungos isolados da área de mineração poderia ser mais promissora na formação desta simbiose.

APÊNDICE A- Efeito do cobre na população de bactérias e fungos do solo e no cultivo de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden e *Pinus elliotti* Engelm

RESUMO

O cobre é um metal pesado que pode exercer efeitos tóxicos para microrganismos e plantas. Os microrganismos são capazes de remover os metais do solo atuando como biorremediadores eficientes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de cobre na produção de mudas de eucalipto e pinus e sobre a população de fungos e bactérias do solo, bem como fazer o levantamento dos principais gêneros de fungos encontrados nestas condições. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, durante 60 dias. A contagem da população microbiana foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Solo e do Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries da UFSM. As mudas de eucalipto e pinus foram produzidas na Fepagro-Florestas, Santa

Maria/RS. Os tratamentos formados pela combinação de fatores UFC (bactérias e fungos), sulfato de cobre aplicado ao solo (quatro doses: 0,7; 0,708; 0,716; 0,724 mg kg⁻¹) e mudas (eucalipto e pinus) foi em delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições. A população total de bactérias e fungos do solo foi alterada pela presença do cobre. As mudas de eucalipto e pinus não sofreram os efeitos da adição do cobre. Os gêneros de fungos *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram encontrados em solo com cobre.

Palavras chave: espécies florestais; metal; microrganismos

INTRODUÇÃO

O solo é um sistema bastante complexo e muito dinâmico onde há interação de fatores químicos, físicos e biológicos de modo contínuo, assim quando houver uma modificação em algum desses fatores haverá alterações diversas nos demais componentes do solo.

Os microrganismos do solo, por sua vez, atuam como agentes reguladores dos principais processos bioquímicos no solo como: decomposição da matéria orgânica, mineralização de compostos orgânicos, transformações inorgânicas do N e S, transformações de elementos metálicos, produção de metabólitos (fitormônios, ácidos orgânicos), degradação de pesticidas e herbicidas e alterações nas características físicas do solo como agregação e estabilidade de agregados (Pfüller, 2000).

A contaminação de áreas por atividades de mineração e processamento de metais é reconhecida como um grande problema ambiental. Entre os metais, o cobre merece destaque, sendo um elemento que em concentrações superiores aos limites permitidos se torna tóxico para animais e plantas (Alloway, 1990). Pode causar efeitos sobre a atividade microbiana do solo, na produtividade agrícola, afetando a biomassa microbiana, a atividade das enzimas e a funcionalidade e a diversidade dos microrganismos do solo alterando a estrutura do ambiente (Kandeler et al., 1996).

Geralmente, os metais pesados no solo podem estar de forma solúvel ou em complexos orgânicos e inorgânicos. A mobilidade e a disponibilidade do metal pesado

para o solo e microrganismos depende da forma em que ele se encontra. A disponibilidade dos metais depende do pH do solo, tempo de contato entre o metal e o solo e a competição com outros íons metálicos por ligantes orgânicos e inorgânicos (Banu et al., 2006).

O uso de plantas associadas com microrganismos pode alterar as formas dos metais pesados, reduzindo sua mobilidade e disponibilidade (Tordoff et al., 2000). O uso de plantas pode acelerar os processos de remoção de metais, atuando sobre os contaminantes e contribuindo indiretamente através do efeito rizosférico sobre a microbiota biodegradadora ou acumulando o metal em suas raízes (Moreira e Siqueira, 2002). Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da quantidade de cobre na produção de mudas de eucalipto e pinus e sobre a população de fungos e bactérias do solo e identificar os principais gêneros de fungos encontrados nas condições propostas.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do solo e transplântio de mudas

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, no período de julho a setembro de 2005, totalizando 60 dias. O solo usado no experimento foi um Argissolo Vermelho Distrófico típico (EMBRAPA, 1981) sem histórico de recebimento de cobre, com suas principais características químicas e físicas apresentadas na Tabela 1.

Doses de 0,7; 0,708; 0,716; 0,724 mg kg⁻¹ de cobre na forma de sulfato de cobre (CuSO₄5H₂O) foram adicionadas ao solo armazenado em vasos plásticos, permanecendo incubado por sete dias. Após este período, mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden e *Pinus elliotti* Engelm foram transplantadas para os vasos, recebendo irrigação diária. Aos 20, 35, 50 dias as mudas receberam 10 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Jarstfer e Sylva (1992).

Tabela 1- Características químicas e físicas e teor de cobre em amostras de solo de um Argissolo Vermelho Distrófico típico, Santa Maria, RS, 2005.

pH	P	K	Ca	Mg	CTC _{ef}	M.O	Argila	Cu
H ₂ O	mg dm ³		-----cmol _c dm ⁻³ -----			-----%-----		mg dm ⁻³
4,8	7,6	96	3,3	2,1	6,6	1,4	22	0,7

Coleta de amostras de solo

As coletas foram realizadas aos 0, 30 e 60 dias após a instalação do experimento. Depois de coletadas, as amostras foram colocadas em sacos plásticos etiquetados e acondicionadas em caixa de isopor.

No Laboratório de Microbiologia do Solo e do Ambiente Marcos Rubens Fries, o material foi guardado no freezer a 4 °C, até o momento das análises previstas. A coleta no tempo zero dias foi imediatamente após a colocação do cobre no solo.

Meios de cultura

Para a determinação das UFC (unidades formadoras de colônias) de bactérias do solo utilizou-se o meio Ágar-PG (Moreira e Siqueira, 2002) com os seguintes nutrientes por litro: 0,1 g de glicose, 1,0 g de peptona, 0,1 g de K₂HPO₄, 0,02 g de FeSO₄.7H₂O, 15 g de ágar, 2,4 g de PCNB. O pH foi ajustado em 7,0 antes do meio ser autoclavado. A contagem das UFC de fungos foi feita utilizando-se o meio Martin's-Bengala Agar (Martin, 1950), com os seguintes nutrientes por litro: 10 g de glicose, 5 g de peptona, 1 g de KH₂PO₄, 3,3 mL de rosa bengala, 16 g de agar, 300 mg de rifampicina. Os meios de cultura usados foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1,5 atm por 20 minutos.

Avaliação da população microbiana

A contagem do número de unidades formadoras de colônias de bactérias e fungos (UFC) foi determinada pelo método da inoculação em suspensões diluídas de solo em meio de cultura. Para isso, preparou-se uma diluição decimal em série

partindo-se de 10g de solo colocado em frascos de erlenmeyer com 90 mL de água destilada e esterilizada. De cada diluição, foi retirado uma alíquota de 1 mL por placa de petri, sobre o qual verteu-se o meio. Para cada diluição foram feitas três repetições por placa. As placas foram envolvidas em papel filme e armazenadas em estufa à 25°C no escuro. A contagem das UFC de bactérias e fungos foi realizada aos 8 dias após a incubação em estufa usando-se o contador de colônias.

Identificação dos fungos

Após o período de incubação os fungos encontrados nas placas foram identificados em nível de gênero, através de microscópio estereoscópico e ótico, com base na bibliografia especializada (Barnett e Hunter, 1999).

Análise estatística

Os resultados obtidos sobre os grupos de bactérias e fungos do solo foram submetidos à análise de variância e teste de regressão pelo Programa estatístico SANEST (Zonta e Machado, 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostram que no tempo de zero, a população de bactérias em solo cultivado com *Eucalyptus grandis* aumentou significativamente nos tratamentos com maiores doses de cobre adicionado ao solo (Figura 1). Quando o metal está em grande concentração no sistema passando a ser tóxico para os microrganismos, estes exibem a capacidade de reduzir a sua sensibilidade celular e desenvolver resistência ao metal (Ji e Silver, 1995). A remoção do metal também poderia ter acontecido devido à exclusão por permeabilidade celular, seqüestro intra e extracelular e redução enzimática (Bruins et al., 2000).

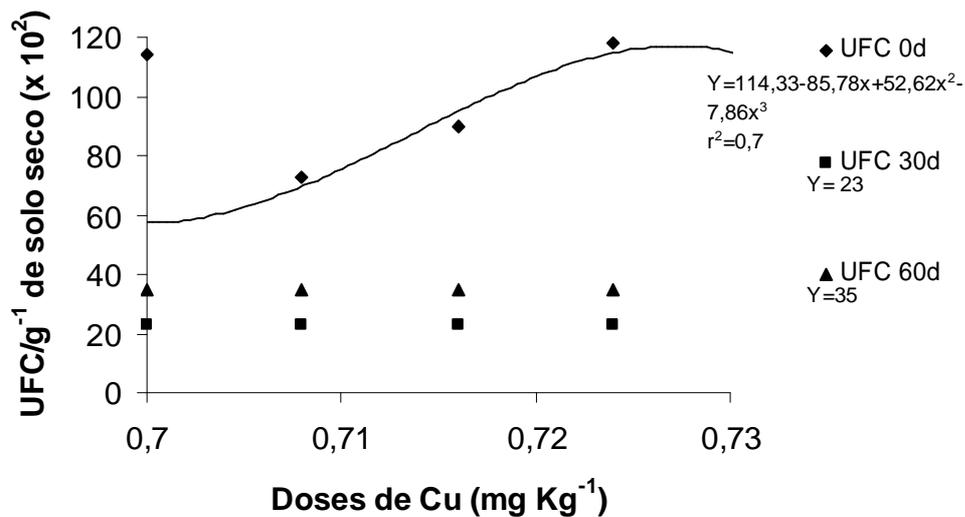


Figura 1- População total de bactérias em solo com diferentes doses de cobre no tempo 0, 30 e 60 dias com cultivo de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, Santa Maria, RS, 2005.

O tempo de exposição das bactérias e a quantidade do metal influenciam diretamente na sua capacidade de tolerância e resistência ao metal, atuando sobre a formação da membrana plasmática e síntese protéica (Banu et al., 2006). Os resultados encontrados relataram uma redução na população bacteriana aos 30 e 60 dias que se manteve em todas as doses testadas (Figura 1).

A contagem da população de bactérias totais revelou uma redução em 31% no tempo 30 dias comparado a contagem feita no tempo zero nas mesmas doses de cobre. Aos 60 dias, houve uma redução de 24 % em comparação com o tratamento zero na mesmas doses de cobre. Fatores como umidade, temperatura e pH do solo influenciam diretamente a população microbiana (Vargas e Hungria, 1997). O solo usado para a contagem da população de bactérias apresentava pH 4,8 que poderia ser ácido para algumas espécies de bactérias presentes, inibindo assim o seu desenvolvimento (Tabela 1).

O número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias em solo cultivado com *Pinus elliotti* no tempo zero diminuiu à medida que aumentaram as doses de cobre (Figura 2). Os microrganismos podem sofrer interferência direta dos metais e das diferentes doses sobre seus processos metabólicos (Banu et al., 2006). Os

resultados encontrados neste trabalho evidenciaram que este mecanismo pode ter acontecido.

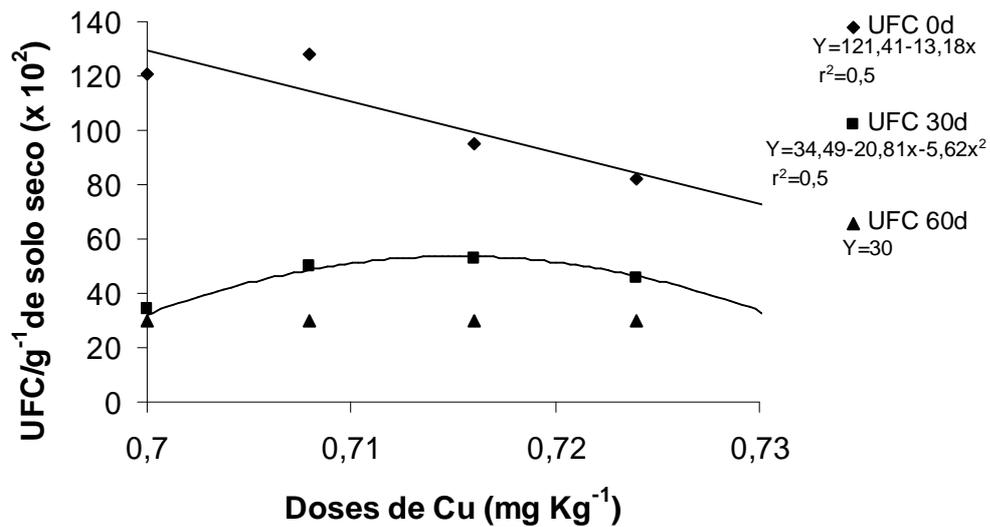


Figura 2- População total de bactérias em solo com diferentes doses de cobre no tempo 0, 30 e 60 dias com cultivo de *Pinus elliotti* Engelm, Santa Maria, RS, 2005.

Alguns grupos de bactérias apresentam em sua constituição proteínas que regulam a bioacumulação celular dos metais, este sistema de transporte depende do grau de tolerância do organismo ao metal. A capacidade de adsorção e acúmulo nos tecidos microbianos mostra efeitos diferenciados em relação aos diferentes metais e organismos envolvidos (Moreira e Siqueira, 2002).

Neste trabalho foi observada uma diminuição do número de bactérias no tempo 30 dias em relação ao tempo zero. Provavelmente os organismos presentes neste tempo apresentavam baixo grau de tolerância em suportar a presença do metal no solo, afetando assim o seu desenvolvimento e sobrevivência.

O uso de plantas pode acelerar os processos de remoção de metais, atuando sobre os contaminantes e contribuindo indiretamente através do efeito rizosférico sobre a microbiota degradadora (Moreira e Siqueira, 2002; Silva Filho e Vidor, 1984). Os

resultados encontrados mostraram que o uso da planta não foi eficiente para diminuir os efeitos do metal sobre a população de bactérias do solo.

A população de fungos na cultura de *Eucalyptus grandis* aumentou significativamente após 30 dias na maior dose de cobre. Isto pode acontecer devido ao chamado “sinal de resistência” a presença do cobre no solo, onde os microrganismos exibem a capacidade de sobrevivência e adaptação a condições ambientais adversas (Borzani, 2000) (Figura 3).

No tempo 60 dias, a população de fungos se manteve constante independente das doses testadas (Figura 3). Possivelmente, isto deve-se a presença de gêneros de crescimento mais lento em presença de metais, não sendo contados no período de 8 dias, tempo estipulado para a contagem das UFC. O gênero *Trichoderma* sofre inibição da sua população pela aplicação de sulfato de cobre (Bettiol e Trach, 2001). Neste trabalho, foram encontrados fungos do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*. O gênero *Trichoderma* totalizou 28% do total de fungos desta coleta.

A população de fungos do solo no tempo zero, sofreu um decréscimo à medida que a quantidade de cobre aumentou, possivelmente pelo contato dos microrganismos com o metal, sem que houvesse tempo para adaptação dos indivíduos às condições ambientais geradas pelo cobre (Figura 3). Também é preciso considerar a influencia dos fatores como umidade, pH e temperatura do solo que atuam diretamente na dinâmica dos microrganismos do solo (Moreira e Siqueira, 2002).

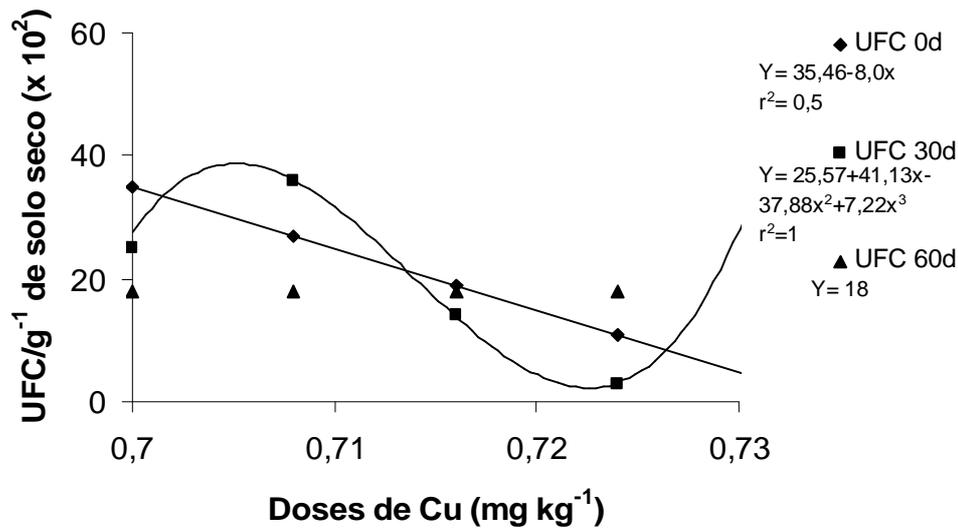


Figura 3- População total de fungos em solo com diferentes doses de cobre no tempo 0, 30 e 60 dias com cultivo de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, Santa Maria, RS, 2005.

O número de unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos no tempo zero e 30 dias na cultura do Pinus, mostrou um aumento significativo no tratamento com maior quantidade de cobre (Figura 4). Possivelmente, isto tenha acontecido em resposta adaptativa às condições de estresse provocadas pelo metal pesado. Outro aspecto que deve ser considerado no tempo zero em relação a um aumento da população de fungos, é que devido ao pouco tempo de contato dos organismos com o metal, não houve uma grande interação entre os dois, preservando a viabilidade reprodutiva desses indivíduos. O comportamento da população de fungos aos 60 dias mostrou um declínio em função das maiores doses do metal, isto pode ser explicado pela ação oligodinâmica do cobre sobre os fungos. Essa ação pode acontecer quando substâncias mesmo em concentrações baixas, atuam em função das condições em que o organismo vivo se encontra, podendo estimular, inibir ou mesmo destruir os indivíduos (Borzani, 2000). A ação oligodinâmica do cobre é conhecida nos fungos filamentosos *Aspergillus* e *Penicillium* (Borzani, 2000). Os resultados deste trabalho mostram que a população de *Aspergillus* e *Penicillium* diminuiu em 20% do total encontrado no tratamento testemunha.

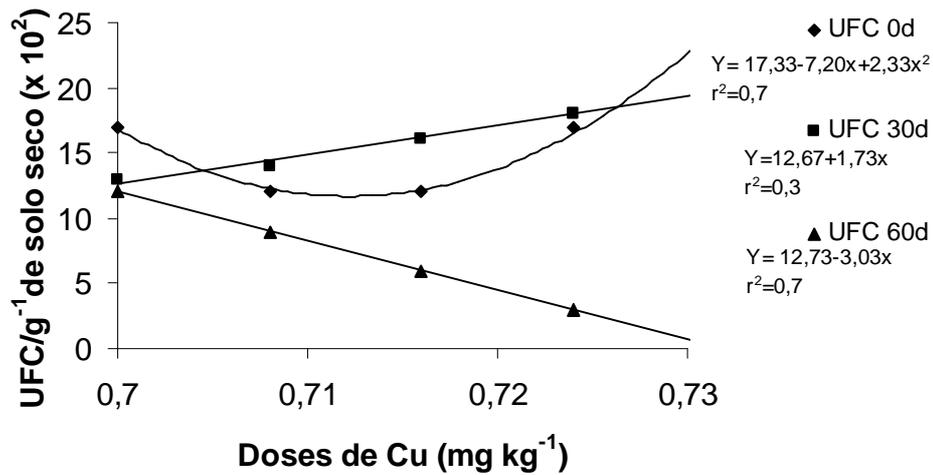


Figura 4- População total de fungos em solo com diferentes doses de cobre no tempo 0, 30 e 60 dias com cultivo de *Pinus elliotti* Engelm, Santa Maria, RS, 2005.

A diminuição da população neste tempo, poderia ser devido á um tempo maior de exposição dos fungos ao cobre, atuando diretamente nos processos de síntese protéica e formação da membrana plasmática (Banu et al., 2006).

CONCLUSÕES

A população total de bactérias foi maior no solo cultivado com *Pinus elliotti* quando comparado ao solo cultivado com *Eucalyptus grandis*, na presença de cobre.

A população total de bactérias do solo foi maior na cultura de *Pinus elliotti* enquanto a população total de fungos foi maior na cultura de *Eucalyptus grandis*. Em doses superiores a de 0,7 mg kg⁻¹ de cobre ocorre á diminuição da população de bactérias nos tempos 0 e 30 dias na cultura de *Pinus elliotti*.

Os gêneros de fungos *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram encontrados em solo com cobre.

Os fungos do gênero *Trichoderma* foram tolerantes até o nível de $0,716 \text{ mg kg}^{-1}$, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* até $0,724 \text{ mg kg}^{-1}$ de cobre no solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOWAY, B. J. **Heavy Metals in soils**. John Wilwy & Sons, Inc. New York, 1990.

BANU, N. A.; SINGH, B.; COPELAND, L. Influence of copper on soil microbial and biodiversity in some NSW soil. **Faculty of Agriculture, Food and Natural Resources**. University of Sydney. Australia. 2006.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth edition. Minesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BETTIOL, W.; TRACH, R. Efeito do biofertilizante sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. 2001. Disponível em: < <http://atlas.sct.embrapa.br/pab/pab.ns> >. Acesso em: 10 de agosto 2006.

BORZANI,W. Ação oligodinâmica. In: Escola de Engenharia. Centro Universitário Do Instituto Mauá de Tecnologia. São Caetano do Sul. 2000. Disponível em: <http://www.hottopos.com/regeq11> >. Acesso: em 10 de maio de 2006.

BRUINS, M. ; KAPIL, S.; OEHME, F. Microbial resistance to metal in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 45, p. 198-207, 2000.

EMBRAPA-**Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos**. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Rio de Janeiro. 1981. 107 p.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley. CA: University of California (California Agricultural Experiment Station). Circular.1941. 347p.

JI, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. **J. Ind. Microbiol.** v.14, p. 61-75, 1995.

KANDELER, E.; KAMPICHELER, C.; HORAK, O. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. **Biol. Fertil. Soil**. v. 29, n. 3, p. 299-306, 1996.

MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**. v. 69, n. 2, p. 215-232, 1950.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, 2002. 623 p.

PFÜLLER, E. **População Microbiana de um solo sob dois sistemas de plantio e dois sistemas de rotação de culturas**. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. As práticas de manejo de solo na população microbiana. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 8, n. 5, p. 291-296,1984.

TORDOFF, G. M.; BAKER, A. J. M.; WILLIS, A. J. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous wastes. **Chemosphere**. v. 41, n.1/2, p. 219-228, 2000.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos Solos do Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. 524p.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sistema de Análise Estatística. Departamento de Matemática e Estatística (SANEST)**. ESALQ-USP. 1984. 151p.