

EFEITO DO COBRE NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS DO SOLO, NA ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA E NO CULTIVO DE MUDAS DE *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, *Pinus elliottii* Engelm E *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

EFFECT OF COPPER ON SOIL BACTERIA AND FUNGUS POPULATION, ON MYCORRHIZAL ASSOCIATION AND ON PRODUCTION OF *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, *Pinus elliottii* Engelm AND *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert SEEDLINGS

Zaida Inês Antonioli¹ Lílian Castilho dos Santos² Manoeli Lupatini³
Lineu Trindade Leal⁴ Guilherme Karsten Schirmer⁵ Marciel Redin⁶

RESUMO

O cobre é um metal pesado que pode exercer efeitos tóxicos para micro-organismos e plantas. Os fungos ectomicorrízicos são capazes de proteger a planta hospedeira da toxidez dos metais pesados, mas a presença de certas concentrações de metais pode inibir o crescimento destes, prejudicando a simbiose micorrízica e alterar o desenvolvimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de doses de cobre na população de bactérias e fungos do solo, bem como seus efeitos na associação ectomicorrízica e no desenvolvimento de mudas de eucalipto, pinus e canafístula. O levantamento da população de micro-organismos do solo foi realizado em casa de vegetação durante 60 dias e os tratamentos foram doses de sulfato de cobre aplicadas ao solo (0,7; 0,708; 0,716; 0,724 mg kg⁻¹ de solo) e mudas de eucalipto e pinus. No segundo experimento, mudas de eucalipto e canafístula inoculadas e não inoculadas com *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) Cunn (UFSC Pt 116) receberam doses de cobre de 0, 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ de solo. Aos 110 dias, avaliaram-se a massa fresca da parte aérea e radicular, massa seca da parte aérea, altura, diâmetro do colo e porcentagem de colonização ectomicorrízica. No primeiro experimento, a população total de bactérias e fungos do solo foi alterada pela presença do cobre, porém as mudas de eucalipto e pinus não mostraram efeitos da adição do cobre. No segundo experimento, a inoculação das mudas de eucalipto e canafístula com o isolado UFSC Pt 116 favoreceu o desenvolvimento da massa fresca da parte aérea e radicular e a altura das plantas. Conforme os resultados obtidos, a canafístula foi capaz de realizar associação ectomicorrízica com o isolado testado. O desenvolvimento das plântulas de eucalipto e canafístula foi inibido pelos níveis de cobre, mesmo inoculadas com o isolado UFSC Pt 116.

Palavras-chave: essências florestais; microrganismos; micorrização.

1. Bióloga, Doutora em Ciência do Solo, Professora Associada do Departamento de Solos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). zaida@smail.ufsm.br. Bolsista de produtividade do CNPQ.
2. Bióloga, Mestre em Ciência do Solo, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). lilianbio@terra.com.br
3. Engenheira Agrônoma, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). Bolsista da CAPES. mlupatini@gmail.com
4. Engenheiro Agrônomo, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). Bolsista da CAPES. lineuleal@yahoo.com.br
5. Engenheiro Agrônomo, Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre (RS). Bolsista da CAPES. skguilherme@gmail.com
6. Engenheiro Agrônomo, Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). Bolsista do CNPQ. marcielredin@gmail.com

Recebido para publicação em 12/03/2009 e aceito em 12/04/2010.

ABSTRACT

Copper is a heavy metal that can have toxic effects on microorganisms and plants. Ectomycorrhizal fungi are able to protect the plant from heavy metal toxicity, but the presence of certain metal concentrations can inhibit the growth of this fungus, damage the mycorrhizal symbiosis and also altering the development of the plants. The aim of this study was to evaluate the effect of copper on soil bacteria and fungus population, as well as the effects on the ectomycorrhizal association in the development of *Eucalyptus grandis*, *Pinus elliottii* and *Peltophorum dubium* seedlings. The survey of the soil microorganism population was carried out in a greenhouse during 60 days and the treatments consisted of applications of copper sulphate (0.7; 0.708; 0.716; 0.724 mg Kg⁻¹) to the soil and to eucalyptus and pinus seedlings. Eucalyptus and *Peltophorum dubium* seedlings inoculated and not inoculated with *Pisolithus microcarpus* (Cooke and Masee) Cunn (UFSC Pt 116) received copper levels of 0, 100, 200 and 300 mg kg⁻¹. The height, stem diameter, shoot and root fresh biomass, shoot and root dry biomass and ectomycorrhizal colonization were evaluated at 110 days. Soil bacteria and fungus population were altered by the presence of copper and the eucalyptus and pinus seedlings were not affected by copper addition. The inoculation of the eucalyptus and canafistula seedlings with isolate UFSC Pt 116 favored the height of the plants and the development of shoot and root fresh biomass. According to the results, canafistula was able to form an ectomycorrhizal association with the isolate tested. The eucalyptus and canafistula seedling development was inhibited by copper following inoculation with the UFSC Pt 116 isolate.

Keywords: forest essences; microorganisms; mycorrhizal association.

INTRODUÇÃO

A contaminação de áreas por atividades de mineração e processamento de metais é reconhecida como um grande problema ambiental. Entre os metais, o cobre (Cu) é um elemento que em altas concentrações pode exercer efeitos deletérios em diversas formas de vida e causar poluição dos ecossistemas (LEYVAL et al., 1997; SIQUEIRA et al., 1999; ALLOWAY, 1990). O cobre não é biodegradável e apresenta uma dinâmica no solo bastante complexa, a qual pode ser alterada diretamente por fatores do meio, sobretudo pela composição química, física, mineralógica, quantidade de matéria orgânica, pH e CTC do solo (SODRÉ e LENZI, 2001).

Esse elemento pode causar efeitos sobre a atividade microbiana do solo, alterando a sua produção de biomassa, a atividade das enzimas e a funcionalidade e diversidade dos micro-organismos do solo (KANDELER et al., 1996; SIQUEIRA et al., 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). Partindo dessas reações, as bactérias e os fungos obtêm energia para o desenvolvimento de seus processos vitais (SANTINI

et al., 2000). Tais biotransformações são importantes componentes do ciclo biogeoquímico, sendo usados por bactérias e fungos em solos contaminados por metais pesados e que podem servir como meio para minimizar as consequências da contaminação do solo por cobre (GAAD, 2000). Porém, quando em altas concentrações, o cobre pode causar danos à célula desestabilizando comunidades biológicas (HASSEN et al., 1998).

Vários parâmetros microbiológicos têm sido usados como indicadores de alterações no solo, mas nenhum é adequado a todas as situações, em razão da natureza dinâmica e complexa dos ecossistemas. Dentre os métodos de avaliação da comunidade microbiana encontram-se os indiretos, dos quais fazem parte o cultivo e avaliação da densidade de microorganismos em meios nutritivos, a quantificação da biomassa microbiana, biomarcadores ou moléculas assinatura e isolamento e identificação de DNA do solo. Pela facilidade de execução, a avaliação da microbiota em meios de cultura é o método mais utilizado (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). As avaliações microbiológicas possibilitam a adoção de medidas de correção no ambiente antes que a perda da qualidade do solo seja mais severa (TÓTOLA e CHAER, 2002), pois a rapidez de resposta às perturbações causadas ao solo permite aos parâmetros microbiológicos a condição de bons candidatos a bioindicadores de poluentes

em ecossistemas (BROOKES, 1995).

Alguns micro-organismos do solo podem auxiliar no estabelecimento de plantas em áreas contaminadas por cobre. Entre estes, destacam-se os fungos ectomicorrízicos, os quais podem ser usados como atenuadores da fitotoxidez, minimizando os efeitos do metal sobre as plantas (LEYVAL et al., 1997). As plantas podem acelerar os processos de remoção de metais, atuando sobre os contaminantes e contribuindo indiretamente pelo efeito rizosférico sobre a microbiota biodegradadora ou acumulando o metal em suas raízes (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). O aumento na absorção desse elemento pelas raízes das plantas e o seu acúmulo no micélio extraradical do fungo podem diminuir a sua disponibilidade para o solo, conferindo ao hospedeiro maior tolerância a esse elemento (GRAZZIOTTI et al., 2001). Alguns sistemas microbianos de tolerância a esse elemento poderiam ser utilizados em processos biológicos, tal como, biorremediação de ambientes poluídos com metais (CERVANTES et al., 2006).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do cobre na população de bactérias e fungos do solo, bem como seus efeitos na associação ectomicorrízica com *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116 e no desenvolvimento de mudas de eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden), pinus (*Pinus elliottii* Engelm) e canafistula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert).

MATERIAL E MÉTODO

Experimento I: Avaliação da população de bactérias e fungos em solo contaminado com cobre

Para a determinação da população de bactérias e fungos do solo, foi realizado um experimento em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS por um período de 60 dias. O experimento foi conduzido em vaso com 0,5 Kg de solo. O solo usado foi um Argissolo Vermelho Distrófico típico (EMBRAPA, 2006) sem histórico de recebimento de cobre, apresentando pH em H₂O de 4,8, 7,6 mg dm⁻³ de fósforo, 96 mg dm⁻³ de potássio, 3,3 mg dm⁻³ de cálcio, CTC_{ef} de 6,6, 1,4% de matéria orgânica, 22% de argila e 0,7 mg dm⁻³ de cobre.

Os tratamentos aplicados foram realizados em delineamento experimental inteiramente

casualizado, constituídos de quatro doses de cobre (0,7; 0,708; 0,716; 0,724 mg kg⁻¹) na forma de sulfato de cobre (CuSO₄·5H₂O) e mudas de eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden) e pinus (*Pinus elliottii* Engelm), com três repetições. As sementes de eucalipto e pinus foram obtidas na FEPAGRO-Florestas, distrito de Boca do Monte, Santa Maria, RS. As sementes de eucalipto foram desinfestadas em álcool 70% por 20 minutos e, após, lavadas em água esterilizada, por três vezes. A quebra de dormência das sementes de pinus foi realizada de acordo com Fowler e Bianchetti (2000).

As mudas foram transplantadas para os vasos e a umidade do solo foi mantida a 80% da sua capacidade de campo, completando a diferença do peso dos vasos, com água destilada até 1,2 kg (com base no peso dos vasos inicialmente saturados). Aos 20, 35 e 50 dias, as mudas receberam 10 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). Para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias e de fungos do solo, as coletas das amostras de solo foram realizadas aos 0, 30 e 60 dias após a instalação do experimento. Para a determinação das UFC de bactérias do solo, utilizou-se o meio Ágar-PG (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002), e para a contagem das UFC de fungos utilizou-se o meio Martin's-Bengala Agar (MARTIN, 1950).

A contagem do número de UFC de bactérias e fungos 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 10 g de solo colocado em frascos de erlenmeyer com 90 mL de água destilada e esterilizada. De cada diluição, foi retirada uma alíquota de 1 mL por placa de petri, sobre a qual verteu-se o meio (método *pour plate*). Para cada diluição foram feitas três repetições por placa. As placas foram armazenadas em estufa a 25°C, e a contagem das UFC de bactérias e fungos foi realizada aos 8 dias após a incubação.

Após o período de incubação, os fungos encontrados nas placas foram identificados em nível de gênero, com base na bibliografia especializada (BARNETT e HUNTER, 1999).

Os resultados obtidos sobre a contagem de UFC de bactérias e fungos do solo foram submetidos à análise de variância e teste de regressão pelo programa estatístico SANEST (ZONTA e MACHADO, 1984).

Experimento II: Avaliação do efeito do cobre sobre a micorrização e desenvolvimento de mudas de eucalipto e canafístula

O experimento foi realizado na casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS por um período de 110 dias. As sementes de eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden) e canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) foram obtidas na FEPAGRO-Florestas, distrito de Boca do Monte, Santa Maria, RS. As sementes de canafístula foram submetidas à quebra de dormência de acordo com Oliveira et al. (2003).

O substrato usado foi areia e vermiculita 1:1 (v/v) que depois de misturado foi autoclavado três vezes, por 60 minutos, a cada 24 horas. O experimento foi conduzido em vasos com 0,5 Kg do substrato.

O isolado de fungo ectomicorrízico utilizado para promover a inoculação foi *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) Cunn (UFSC Pt 116) fornecido pela Prof^a. Vetúria Lopes de Oliveira, da Universidade Federal de Santa Catarina. Para a utilização deste, foi utilizado o inoculante vegetativo constituído de micélio fúngico em turfa-vermiculita de acordo com Marx et al. (1982).

O substrato recebeu a quantidade de cobre correspondente a cada tratamento (0, 100, 200, 300 mg kg⁻¹ de solo) na forma de sulfato de cobre. Após, foram colocadas as sementes de eucalipto e canafístula e sobre estas, 3 gramas de inoculante. O experimento foi conduzido sob delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições.

As mudas de eucalipto e canafístula foram desbastadas aos 40 dias, partindo 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).

Ao final do experimento, avaliaram-se a massa fresca da parte aérea e da raiz, a massa seca da parte aérea, a altura da planta, o diâmetro do colo e a colonização micorrízica. As raízes foram submetidas ao clareamento e coloração de acordo com Phillips e Hayman (1970, e a porcentagem de colonização ectomicorrízica foi determinada pelo método da placa quadriculada (GIOVANNETTI e MOSSE, 1980).

Os resultados obtidos do desenvolvimento

e micorrização das mudas de eucalipto e canafístula foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, por meio do programa estatístico SANEST (ZONTA e MACHADO, 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: População de bactérias e fungos do solo

O número de UFC de bactérias, no tempo zero, aumentou em função do aumento das doses de cobre em solo cultivado com eucalipto, porém foram menores do que o número encontrado na menor dose (Figura 1a). Esse aumento do número de UFC pode ser em razão da capacidade dos organismos de reduzir a sensibilidade celular ou ao desenvolvimento de resistência ao cobre quando este está em alta concentração no sistema (JI e SILVER, 1995). Este comportamento também pode estar associado à fatores ambientais como umidade, temperatura e pH do solo, os quais influenciam diretamente a população microbiana, mascarando o efeito dos poluentes (VARGAS e HUNGRIA, 1997; SANTO, 2004). Outro aspecto que deve ser considerado na fase inicial em relação a um aumento da população de bactérias devido ao pouco tempo de contato dos organismos com o cobre, não houve uma grande interação entre os dois, podendo ser preservada a viabilidade reprodutiva desses organismos.

A contagem das UFC mostrou uma redução, em média, de 31% aos 30 dias e 24% aos 60 dias, comparado à contagem realizada no início da aplicação de cobre (Figura 1a). Em áreas contaminadas com cobre, os micro-organismos podem apresentar interferência direta da presença das diferentes doses desse elemento e da vegetação sobre seus processos metabólicos (BANU et al., 2009). O resultado condiz com dados encontrados na avaliação da microbiota em áreas de rejeito de mineração onde a menor contagem de UFC ocorreu em áreas com maiores concentração de cobre (SANTOS et al., 2007).

No tempo zero, o número de UFC de bactérias apresentou relação inversa à concentração de cobre em solo cultivado com pinus (Figura 1b). Em áreas próximas a rejeitos de mineração de cobre, onde havia altas concentrações desse elemento, a contagem do número de UFC de bactérias foi

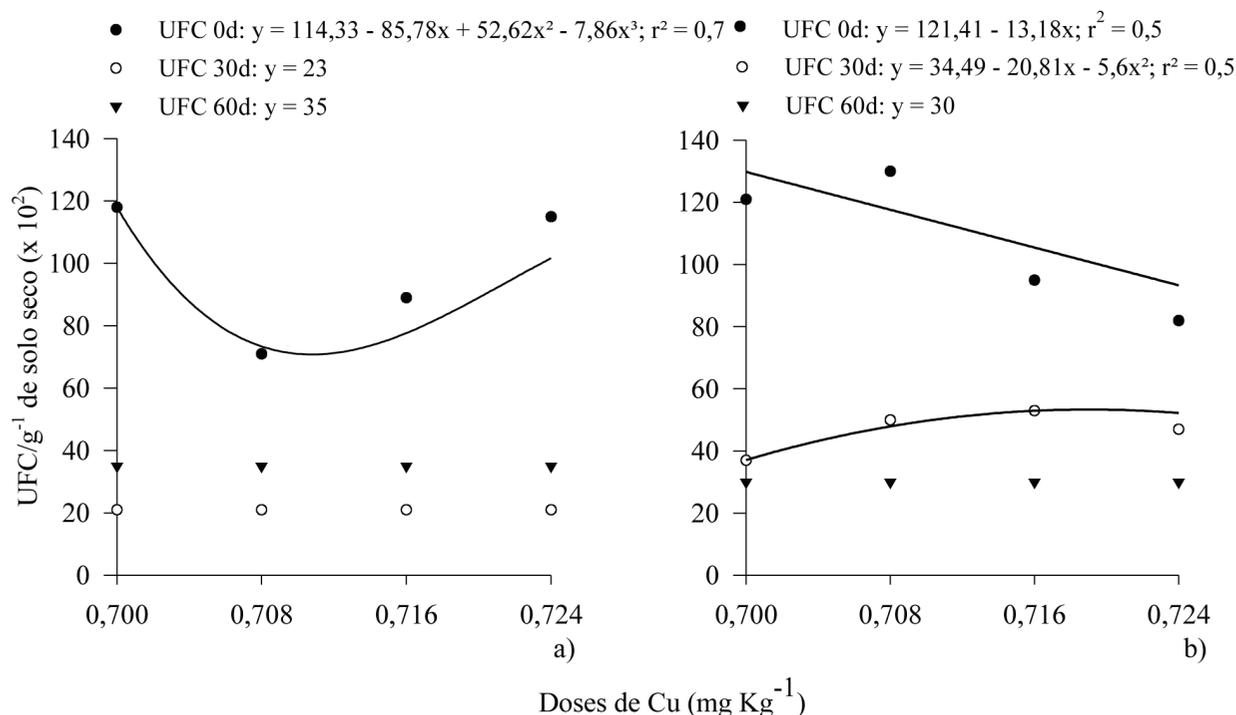


FIGURA 1: Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias em solo com diferentes doses de cobre (Cu) aos 0 (0d), 30 (30d) e 60 (60d) dias com o cultivo de mudas de *Eucalyptus grandis* (a) e *Pinus elliottii* (b).

FIGURE 1: Number of colony forming units (CFU) for soil bacteria with different copper (Cu) level at 0 (0d), 30 (30d) and 60 (60d) days, in soil with *Eucalyptus grandis* (a) and *Pinus elliottii* (b) seedlings.

menor do que em áreas com menor quantidade (SANTOS et al., 2007). Esse resultado pode ser pela ação antimicrobiana do cobre, incluindo ação sobre gêneros bacterianos encontrados no solo (DUFFY e DÉFAGO, 1999).

O número de UFC de bactérias reduziu aos 30 e 60 dias nas diferentes doses de cobre em solo cultivado com pinus, em relação à fase inicial (Figura 1b). O maior número de UFC aos 30 dias ocorreu nas doses intermediárias de cobre. Esse fato pode ser devido a alguns grupos de bactérias apresentarem em sua constituição proteínas que regulam a bioacumulação celular dos metais, sendo que esse sistema 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 elementos, suas concentrações no ambiente e organismos envolvidos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

O aumento de UFC também pode ter ocorrido em consequência da exclusão por permeabilidade celular, sequestro intra e/ou extracelular e redução enzimática do cobre (BRUINS et al., 2000). 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., 2009).

Houve semelhanças no comportamento da população de bactérias em relação às doses de cobre testadas e às plantas utilizadas nos tempos 30 dias e 60 dias. Para ambas as culturas, nessas coletas, o número de UFC de bactérias encontradas praticamente não foi alterado pelas doses de Cu aplicadas. No entanto, no tempo zero, o número de UFC de bactérias na cultura de eucalipto aumentou com as maiores doses de Cu, enquanto que, na cultura de pinus, o número de UFC diminuiu.

Os fungos encontrados, neste trabalho, foram do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo o gênero *Trichoderma* totalizando 28% do total de fungos na coleta. A população de fungos na cultura de eucalipto diminuiu nos tempos 0 e 30 dias em função do aumento das doses de cobre aplicadas. Isso pode ter ocorrido pela exposição das células fúngicas ao cobre, o qual atua diretamente

nos processos de síntese protéica e formação da membrana plasmática (BANU et al., 2009) (Figura 2a).

Aos 60 dias, a população de fungos se manteve praticamente constante, independentemente das doses de cobre testadas (Figura 2a). Possivelmente, isso se deve à presença de gêneros de crescimento mais lento em presença de metais, não apresentando crescimento no período de 8 dias, tempo utilizado para a contagem das UFC, como acontece com o gênero *Trichoderma*, que pode ser inibido pela aplicação de sulfato de cobre (TRATCH e BETTIOL, 1997).

O uso de plantas pode acelerar os processos de remoção de metais, atuando sobre os contaminantes e contribuindo indiretamente por meio do efeito rizosférico sobre a microbiota degradadora (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Porém, os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que o uso de algumas espécies de plantas não são eficientes para diminuir os efeitos do cobre sobre a população de bactérias e fungos do solo.

O número de UFC de fungos nos tempos zero e 30 dias, na cultura do pinus, mostrou um aumento no tratamento com maior quantidade de cobre (Figura 2b). No tempo zero, deve ser considerado que, pelo pouco tempo de contato dos organismos com o cobre, não houve uma grande interação entre os mesmos, preservando a viabilidade reprodutiva desses indivíduos. No tempo 30 dias, possivelmente o comportamento de alguns organismos tenha ocorrido em resposta adaptativa às condições de estresse provocadas pelo elemento (BRUINS et al., 2000). O comportamento da população de fungos aos 60 dias (Figura 2b) mostrou um declínio em função das maiores doses do cobre, isso pode ser explicado pela ação oligodinâmica deste sobre os fungos. Essa ação pode acontecer quando substâncias, mesmo em baixas concentrações, atuam em função das condições em que o organismo vivo se encontra, podendo estimular, inibir ou mesmo destruir os indivíduos. A ação oligodinâmica do cobre é conhecida nos fungos filamentosos *Aspergillus* e *Penicillium* (BORZANI, 2006). Os resultados deste trabalho mostram que a população de *Aspergillus* e

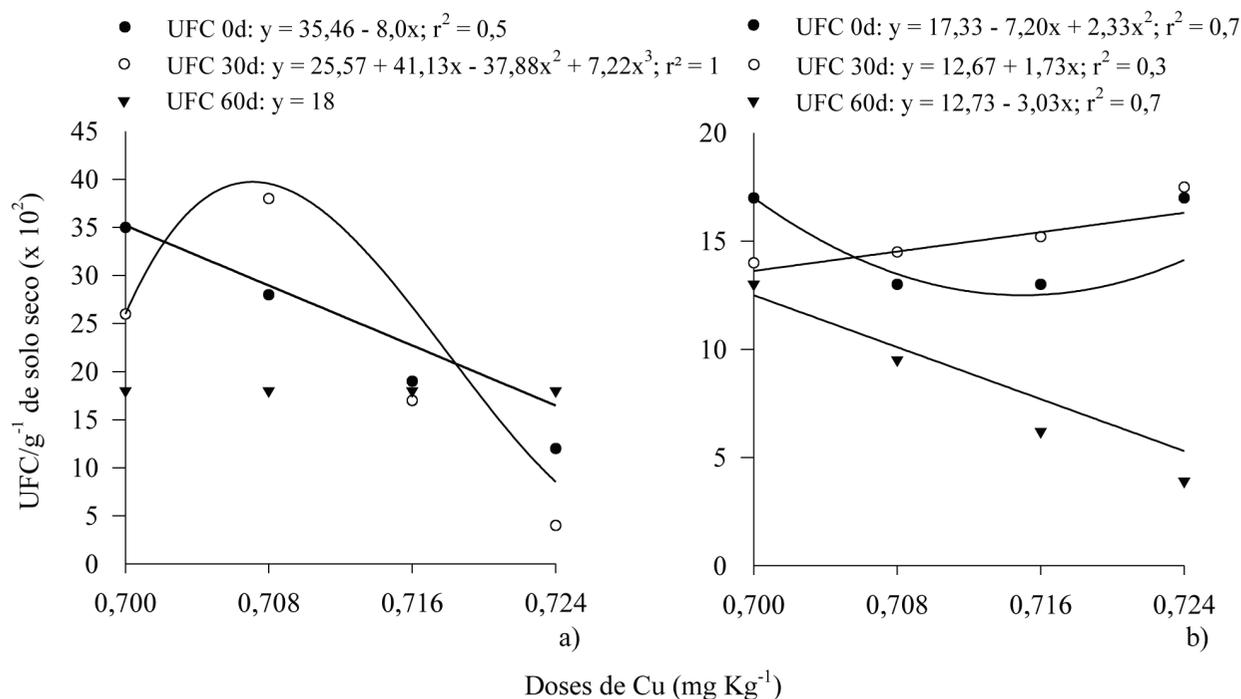


FIGURA 2: Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos em solo com diferentes doses de cobre (Cu) aos 0 (0d), 30 (30d) e 60 (60d) dias com cultivo de *Eucalyptus grandis* (a) e *Pinus elliotii* (b).

FIGURE 2: Number of colony forming units (CFU) for soil fungi with different level of copper (Cu) at 0 (0d), 30 (30d) and 60 (60d) days in soil with *Eucalyptus grandis* (a) and *Pinus elliotii* (b) seedlings .

Penicillium diminuiu em 20% do total encontrado no tratamento testemunha.

Experimento II: Influência de fungos ectomicorrízicos sobre o desenvolvimento de mudas de eucalipto e canafístula

Neste trabalho, as doses de cobre de 100, 200 e 300 mg kg⁻¹ inibiram o desenvolvimento de mudas de eucalipto e canafístula inoculadas ou não com o isolado ectomicorrízico UFSC Pt 116, todas sobrevivendo apenas 15 dias, não sendo usadas para a discussão dos resultados. Esse resultado contribui para os estudos do efeito do cobre sobre a germinação e vigor de sementes e mudas, pois este, em altas concentrações, pode exercer efeitos tóxicos na germinação e no desenvolvimento de mudas de diversas espécies de plantas (OUZOUNIDOU, 1995; LUCHESE, 2004). A assimilação dos elementos pelos micro-organismos não tem consequências significativas para as plantas, mas as transformações biológicas sofridas por estes são fatores críticos da sua disponibilidade (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Houve um efeito significativo, na dose de cobre 0 mg kg⁻¹, nos parâmetros massa fresca da parte aérea e da raiz e altura da muda, aos 110 dias nas mudas de eucalipto inoculadas. Esses parâmetros avaliados foram significativamente maiores do que as médias encontradas no tratamento sem inoculação

(Tabela 1). A importância da inoculação em mudas de *Eucalyptus grandis* foi bem relatada por Mello (2006), em que mudas cultivadas em solo arenoso e micorrizadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116 obtiveram melhores resultados do que as mudas não inoculadas, nos parâmetros altura, diâmetro do caule e taxa de sobrevivência, demonstrando a importância da inoculação para o aumento da resistência em ambientes adversos. Garbaye et al. (1988) também obtiveram resultados no aumento do crescimento de mudas de eucalipto com a inoculação de micélio de *Pisolithus tinctorius* produzido em vermiculita/turfa.

Em mudas de eucalipto inoculadas com UFSC Pt 116, o diâmetro do colo da planta obteve as mesmas médias das mudas não inoculadas, mostrando que para esse parâmetro testado não houve interferência positiva da inoculação com UFSC Pt 116 (Tabela 1). Provavelmente esse fungo micorrízico não seja capaz de estabelecer uma simbiose perfeita com mudas de eucalipto, assim os efeitos da micorrização podem não ser claramente observados em todas as avaliações. Estudos com *Pisolithus tinctorius*, coletado de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* em área de cerrado, mostraram uma simbiose imperfeita, explicando a menor média encontrada na massa seca da parte aérea da planta quando comparados com resultados obtidos por outros isolados de fungos ectomicorrízicos coletados (VIEIRA e PERES, 1990).

TABELA 1: Massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), altura da muda, diâmetro do colo e porcentagem de colonização micorrízica de *Eucalyptus grandis* e *Peltophorum dubium* inoculadas com *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116.

TABLE 1: Aerial dry matter (MSPA), aerial (MFPA) and root (MFR) fresh matter, seedling height, collar diameter and mycorrhizal association percentage of *Eucalyptus grandis* and *Peltophorum dubium* inoculated with *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116.

Tratamento	Massa Seca	Massa fresca		Altura (cm)	Diâmetro do colo (mm)	Colonização micorrízica (%)
	MSPA	g/vaso				
		MFPA	MFR			
Eucalipto						
UFSC Pt116	0,18 a	0,53 a	0,34 a	8,87 a	1,00 a	22,62
Sem inoculação	0,16 a	0,19 b	0,19 b	4,95 b	1,00 a	0,00 b
Canafístula						
UFSC Pt116	0,17 a	0,52 a	0,25 a	8,75 a	2,75 a	4,96
Sem inoculação	0,15 a	0,44 b	0,15 b	8,12 b	2,75 a	0,00 b
CV (%)	25	24	20	15	18	30

Em que: Os valores na mesma coluna seguidos de letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os fungos ectomicorrízicos variam em compatibilidade e eficiência dependendo das espécies simbiotes e das condições ambientais (ALVES et al., 2001). Esses organismos têm capacidade diferenciada em promover os benefícios a seus hospedeiros, como resultado das diferenças fisiológicas e ecológicas intraespecíficas (SMITH e READ, 1997).

O controle da micorrização exige o desenvolvimento de métodos de produção de inoculantes em larga escala (HUNG e MOLINA, 1986). Uma das opções 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 podem não ter sido suficiente para promover uma completa associação micorrízica.

Os fungos ectomicorrízicos variam em compatibilidade e eficiência dependendo das espécies simbiotes e das condições ambientais (ALVES et al., 2001). Tais organismos têm capacidade diferenciada em promover os benefícios a seus hospedeiros, como resultado das diferenças fisiológicas e ecológicas intraespecíficas (SMITH e READ, 1997).

O controle da micorrização exige o desenvolvimento de métodos de produção de inoculantes em larga escala (HUNG e MOLINA, 1986). Uma das opções 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 podem não ter sido suficiente para promover uma completa associação micorrízica.

A massa fresca da parte aérea e da raiz e a altura das mudas de canafístula cultivadas variaram entre os tratamentos, demonstrando um efeito benéfico da micorrização nesses parâmetros avaliados. Os parâmetros diâmetro do colo e a massa seca da parte aérea das mudas de canafístula não apresentaram diferenças significativas nas médias obtidas quanto aos tratamentos inoculado com o isolado UFSC Pt 116 e não inoculado. Embora tenha sido encontrada evidência de colonização ectomicorrízica, esta apresentou baixos valores (Tabela 1). Estudos de interação entre canafístula e isolados ectomicorrízicos mostraram que houve a formação do manto fúngico e da rede de Hartig,

mas não obteve diferenças significativas na altura da planta, massa fresca da raiz, da parte aérea e massa seca da parte aérea e apresentaram baixa porcentagem de colonização (ANDREAZZA, 2006; SILVA, 2007).

Associações ectomicorrizas com canafístula em ambiente natural não foram encontradas (ANDREAZZA, 2006; ZANGARO, 2002). Esse comportamento pode ser devido a fatores ambientais, tipo de solo, temperatura, ausência de inóculo compatível ou viável próximo às raízes de plantas e em quantidades suficientes para promover a associação ectomicorrízica (GIACHINI, 2000). A colonização ectomicorrízica em canafístula somente foi visualizada em laboratório, sob condições controladas, porém apresentando baixa porcentagem de micorrização (ANDREAZZA, 2006; SILVA, 2007).

A inoculação de mudas com fungos ectomicorrízicos mostra-se 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. Porém, 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). Por esse motivo é de extrema importância o estudo das interações entre fungos micorrízicos e seus hospedeiros.

CONCLUSÕES

O número de unidades formadoras de colônias de bactérias e fungos foi maior no solo cultivado com pinus quando comparado ao solo cultivado com eucalipto na presença de cobre.

A população de bactérias e fungos do solo foi alterada de maneira diferente em relação às doses e ao tempo em que permaneceram em contato com o cobre no solo.

Quantidades elevadas de cobre no solo limitaram o desenvolvimento de mudas de eucalipto e canafístula, mesmo quando inoculadas com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116.

A inoculação das mudas de eucalipto e canafístula, em solo sem adição de cobre, favoreceu o desenvolvimento da massa fresca da parte aérea, da raiz e da altura das plantas.

AGRADECIMENTOS

À UFSM, ao PPGCS, à CAPES, ao CNPq e à FAPERGS os nossos agradecimentos pela oportunidade e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- ALLOWAY, B. J. **Heavy Metals in soils**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 339 p.
- ALVES, J. R. et al. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 307-313, fev. 2001.
- ANDREAZZA, R. **Associação de fungos ectomicorrízicos com espécies florestais nativas do estado do Rio Grande do Sul**. 2006. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.
- BANU, N. A.; SINGH, B.; COPELAND, L. **Influence of copper on soil microbial biomass and biodiversity in some NSW soils**. Disponível em: <(http://www.regional.org.au/au/asssi/)> Acesso em: 04 de janeiro de 2009.
- BORZANI, W. **Ação oligodinâmica**. Disponível em: <(http://www.hottopos.com/regeq11)> Acesso em: 10 de maio de 2006.
- BRUINS, M.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metal in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 45, n. 3, p. 198-207, mar. 2000.
- BRIERLEY, C. L. Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwaters. **Geomicrobiology Journal**, v. 8, n. 3/4, p. 201-233, 1991.
- BROOKES, P. C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, v. 19, p. 269-279, 1995.
- CERVANTES, C. et al. Microbial interactions with heavy metals. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v. 48, n. 2, p. 203-210, abr./jun. 2006.
- DUFFY, B. K.; DÉFAGO, G. Environmental factors modulation antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Nova Orleans, v. 65, p. 2429- 2438. 1999
- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa produção de informações, 2006. 306 p.
- FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A. **Dormência em sementes florestais**. Colombo: EMBRAPA-Florestas, 2000. (Documentos, n. 40). 28 p.
- GAAD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanism of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 11, p. 271-279. 2000.
- GARBAYE, J.; DELWAULLE, J. C.; DIANGANA, D. Growth response of eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 151-157. 1988.
- GIACHINI, A. J. et al. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycological Society of America**, Laurence, v. 92, n. 6, p. 1166-1177, nov./dez. 2000.
- GIOVANETTI, M. G.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, New York, v. 84, n. 3, p. 489-500, mar. 1980.
- GRAZZIOTTI, P. H. et al. Efeito do Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 10, p. 831-838, jul./dez. 2001.
- HASSEN, A. et al. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology**, Essex, v. 64, n. 1, p. 7-15, abr. 1998.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. (Circular, n. 347). 32 p.
- 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**, Bethesda, v. 32, n. 2, p. 534-545, dez. 1986.
- JI, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Basingstoke, v. 14, n. 2, p. 61-75, fev. 1995.
- KANDELER, E.; KAMPICHELER, C.; HORAK, O. F. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. **Biology and Fertility of Soils**, Netherlands, v. 29, n. 3, p. 299-306, out. 1996.
- LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 7, n. 10, p. 139-153, set. 1997.

- LUCHESE, A. V. et al. Emergência e absorção de cobre por plantas de milho (*Zea mays*) em resposta ao tratamento de sementes com cobre. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, nov./dez. 2004.
- MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, Baltimore, v. 69, n. 2, p. 215-232, mai. 1950.
- MARX, D. H. et al. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v. 28, n. 2, p. 373-400, jun. 1982.
- MELLO, A. H. **Ocorrência, caracterização e eficiência de fungos micorrízicos em *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii***. 2006. 136 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Viçosa: UFLA, 2002. 623 p.
- OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 597-603, set./out. 2003.
- OUZOUNIDOU, G. Effect of copper on germination and seedling growth of *Minuartia*, *Silene*, *Alyssum* and *Thlaspi*. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 37, n. 3, p. 411-416, set. 1995.
- PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 55, n. 1, p. 158-161, ago. 1970.
- SANTOS, L. C. et al. População de bactérias e fungos no solo contaminado cobre nas Minas do Camaquã, RS, Brasil. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 105-114, dez. 2007.
- SANTINI, J. M. et al. A New Chemolithoautotrophic Arsenite-Oxidizing Bacterium Isolated from a Gold Mine: Phylogenetic, Physiological, and Preliminary Biochemical Studies. **Applied and Environmental Microbiology**, Nova Orleans, v. 66, p. 92-97, jan. 2000.
- SANTO, A. A. E. **Influência da poluição atmosférica e variáveis ambientais no comportamento de bioindicadores de solo no entorno de uma metalúrgica de cobre na Bahia**. 2004. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Biomonitoramento) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. London: Academic Press, 1997. 605 p.
- SILVA, R. F. **Tolerância de espécies florestais arbóreas e fungos ectomicorrízicos ao cobre**. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- SIQUEIRA, J. O.; POUYU, E.; MOREIRA, F. M. S. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplântio de mudas de árvores em solo com excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, n. 3, p. 569-580, jul./set. 1999.
- SODRÉ, F. F.; LENZI, E. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 324-330, mai./jun. 2001.
- TRATCH, R.; BETTIOL, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 11, p. 1131-1139, abr./jun. 1997.
- TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V. H. et al. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: SBCS, 2002. p. 195-276.
- VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos Solos do Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. 524 p.
- VIEIRA, R. F.; PERES, J. R. R. Fungos ectomicorrízicos para *Pinus* spp. cultivados em solos sob vegetação de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 14, n. 10, p. 33-39, jul./set. 1990.
- VOIGHT, E. L.; OLIVEIRA, V. L.; RANDI, A. M. Mycorrhizal colonization and phenolic compounds accumulation on roots of *Eucalyptus dunnii* Maiden inoculated with ectomycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1905-1910, set. 2000.
- ZANGARO, W. et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da Bacia do rio Ibagi, Paraná. **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 77-87, 2002.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sistema de Análise Estatística. Departamento de Matemática e Estatística (SANEST)**. São Paulo: ESALQ-USP, 1984. 151 p.