

**MICROBIOTA EDAFICA COMO
INDICADORA DA REABILITAÇÃO DE
ÁREAS CONTAMINADAS POR
ELEMENTOS-TRAÇO**

MARYEIMY VARON LOPEZ

2010

MARYEIMY VARON LOPEZ

**MICROBIOTA EDAFICA COMO INDICADORA DA REABILITAÇÃO
DE ÁREAS CONTAMINADAS POR ELEMENTOS-TRAÇO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Lopez, Maryeimy Varon.

Microbiota edáfica como indicadora da reabilitação de áreas
contaminadas por elementos-traço / Maryeimy Varon Lopez. –
Lavras : UFLA, 2010.

60 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares.

Bibliografia.

1. Metais pesados. 2. Microorganismos. 3. Fungos micorrízicos
arbusculares. 4. DGGE. 5. Seqüenciamento. 6. Poluição do solo. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

MARYEIMY VARÓN LÓPEZ

**MICROBIOTA EDAFICA COMO INDICADORA DA REABILITAÇÃO
DE ÁREAS CONTAMINADAS POR ELEMENTOS-TRAÇO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 25 de Janeiro de 2010

Prof. Dr. Fatima Maria de Souza Moreira UFLA

Prof. Dulcineia de Carvalho UFLA

Prof. Romildo da Silvia UFLA

Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.

(Luiz Fernando Veríssimo)

| A Deus, e sua representação no
| Divino Menino Jesus, presente em
| toda minha vida, por senti-lo em
| cada passo e por me manter em pé
| para continuar o caminho,

Ofereço

Aos meus pais, Argélia e Heriberto;
a meu sobrinho Daniel; minha Irma
Yamile e meu cunhado David que,
embora longe, me deram as forças e o
apoio necessários para lograr meus
objetivos, com a esperança de voltar
e desfrutar da sua companhia.

Obrigada, Mãe, pelo imenso amor e a
infinita confiança.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Cláudio Roberto Fonsêca Sousa, pela orientação e por acreditar em meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Aos membros da banca examinadora, professora Fátima Maria de Souza Moreira, professora Dulcineia de Carvalho e Romildo da Silvia, pela participação e sugestões apresentadas.

Ao professor Marcio Lambais e ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Molecular da ESALq, em especial a Elisa Mattos pela ajuda no trabalho.

Ao professor Luis Roberto Batista e ao Laboratório de Microbiologia & Higiene de Alimentos da UFLA.

Aos funcionários Marlene e Manuel, pela contribuição, além do apoio, incentivo e amizade.

Ao Jessé, meu colega de curso e de projeto, pela ajuda e a amizade, por ter estado sempre presente desde o primeiro até o último dia do mestrado, e ter sido parte da minha família em Lavras. Obrigada, Macaco.

As minhas conterrâneas e amigas, Paula e Marcela, por serem parte da "República da Colômbia" nesta cidade.

Aos amigos em Piracicaba, Sandra, Eleonora, Maricela, Silvia e Jhon, que foram minha outra Colômbia no Brasil. A Carlos Vildoso, pela ajuda no sequenciamento e identificação dos fungos.

As minhas grandes amigas Elena e Natalia, por estarem presentes mesmo à distancia.

Aos colegas e estagiários do Laboratório de Microbiologia do Solo, pelo apoio e pela convivência, e aos que, mesmo não citados, contribuíram com este trabalho.

MUITO OBRIGADO !!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Contaminação do solo por elementos-traço.....	3
2.2 Efeitos dos elementos-traço.....	4
2.3 Análises da estrutura da comunidade microbiana no solo.....	7
2.4 Reabilitação de áreas contaminadas com elementos traço.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Caracterização da área e amostragem	11
3.1.1 Área de estudo.....	11
3.1.2 Antecedentes da área de estudo.....	11
3.1.3 Amostragem da área	13
3.2 Caracterização química do solo.....	16
3.3 Avaliações Microbiológicas.....	16
3.3.1 Densidade microbiana	16
3.3.2 Densidade e ocorrência Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA).....	16
3.4 Análises das comunidades microbianas (bactérias e fungos).....	17
3.4.1 Extração do DNA total do solo.....	17
3.4.2 PCR para o DGGE.....	17
3.4.3 DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante).....	18
3.5 PCR e seqüenciamento de fugos cultiváveis.....	19

3.5.1 Extração do DNA das colônias.....	19
3.5.2 Sequenciamento.....	21
3.6 Análises Estatísticas.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Características químicas do solo	23
4.2 Avaliações microbiológicas.....	23
4.2.1 Densidade microbiana.....	23
4.2.2 Densidade e ocorrência de Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)..	28
4.3 Estrutura da comunidade de Bactérias e Fungos.....	31
4.4 Fungos cultiváveis.....	39
4.4.1 Isolado 1.....	40
4.4.2 Isolado 2 e 3.....	41
4.4.3 Isolado 4.....	43
4.4.4 Isolado 5.....	45
4.4.5 Isolado 6.....	46
4.4.6 Isolado 8.....	47
5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Análises dos teores dos elementos-traço extraídos por Menhlich ¹ nos solos contaminados reabilitados, sem contaminação e contaminado sem vegetação no município de Três Marias - MG.....	24
TABELA 2	Coefficiente de correlação de Pearson entre a contagem dos microrganismos e os teores solúveis dos elementos-traço presentes nos ambientes estudados.....	27
TABELA 3	Ocorrência de FMA em amostras do campo e obtidas em cultura armadilha de áreas contaminadas com elementos-traço após programas de reabilitação.....	30
TABELA 4	Identificação morfológica e molecular dos isolados fungicos obtidos de solos contaminados submetidos a programas de reabilitação e de referencia sem vegetação.....	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Mapa da área de estudo, localizada em Três Marias - MG, destacando as áreas contaminadas submetidas a reabilitação (A1 e A2), área contaminada sem vegetação (SV) e sem contaminação Cerrado (C) e Pastagem (P), localizadas a 6 e 7 Km respectivamente de distância da empresa (Imagem obtida a partir do Google earth, Fevereiro, 2009).....	12
FIGURA 2	Áreas estudadas correspondentes aos diferentes programas de reabilitação (A1 = Área 1 e A2 = Área 2; EL = Entrelinha; L = linha), áreas sem contaminação (Cerrado e Pastagem) e com contaminação (Sem Vegetação).....	15
FIGURA 3	Número de UFC de bactérias (a), actinobactérias (b) e fungos (c) nos diferentes programas de revegetação, as áreas controle sem contaminação e sem vegetação. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott 5% de probabilidade.....	25
FIGURA 4	Dendograma de similaridade construído com os atributos microbiológicos e os teores dos elementos-traço das áreas estudadas.....	28
FIGURA 5	Número de esporos (50 cm ³ solo) de FMA obtidos no campo, nas diferentes áreas de solo submetido aos sistemas de reabilitação. Médias seguidas pela mesma letra nas barras não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5%.....	29
FIGURA 6	Amplicons da região V3 do rRNA 16S de <i>Bactérias</i> amplificadas de DNA metagenômico do solo contaminado com elementos-traço após programas de reabilitação.....	33
FIGURA 7	Riqueza de amplicons (Se) da região do rRNA 16S de <i>Bactérias</i> com base no número de bandas após DGGE. Os dados apresentam a média de três repetições ± erro padrão da média.....	34

FIGURA 8	Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de <i>Bacteria</i> de áreas contaminadas com elemento-traço após programas de reabilitação.....	34
FIGURA 9	DGGE de amplicons de <i>Fungos</i> da região ITS, de áreas contaminadas com elementos-traço após programas de reabilitação.....	36
FIGURA 10	Riqueza de amplicons (Se) da região ITS de Fungos, com base no número de bandas após DGGE. Os dados apresentam a média de três repetições \pm erro padrão da média.....	37
FIGURA 11	Agrupamento hierárquico da região ITS dos <i>Fungos</i> do DNA metagenômico total de solos contaminados com elementos-traço após de programas de reabilitação.....	37
FIGURA 12	Arvore filogenética por máxima verossimilhança do isolado 1, obtido de solo com elevados teores de elementos-traço, do gênero <i>Penicillium</i> com espécies próximas, baseado nas seqüências da região ITS, com <i>P. daleae</i> como grupo externo.....	41
FIGURA 13	Arvore filogenética por máxima verossimilhança dos isolados 2 e 3, obtidos de solo com elevados teores de elementos-traço, do gênero <i>Aspergillus</i> com espécies próximas, baseado nas seqüências da região ITS, com <i>A. ochraceus</i> como grupo externo.....	42
FIGURA 14	Arvore filogenética por máxima verossimilhança dos isolados 4 e 6, obtidos de solo com elevados teores de elementos-traço, do gênero <i>Penicillium</i> com espécies próximas, baseado nas seqüências da região ITS, com <i>P. islandicum</i> como grupo externo.....	44
FIGURA 15	Arvore filogenética por máxima verossimilhança do isolado 5, obtido de solo com elevados teores de elementos-traço, do gênero <i>Penicillium</i> com espécies próximas, baseado nas seqüências da região ITS, com <i>P. waksmanii</i> como grupo externo.....	46

FIGURA 16 Arvore filogenética por máxima verossimilhança do isolado 8, obtido de solo com elevados teores de elementos-traço, do gênero *Penicillium* com espécies próximas, baseado nas seqüências da região ITS, com *P. fellutanum* como grupo externo..... 48

RESUMO

LOPEZ, Maryeimy Varón. **Microbiota edáfica como indicadora da reabilitação de áreas contaminadas por elementos-traço**. 2010. 60 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O desenvolvimento mundial tem causado grande aumento nas atividades industriais e, conseqüentemente, pressão sobre o meio ambiente. As áreas de mineração constituem uma das fontes de contaminação mais relevantes, pois a partir delas é gerada alta quantidade de resíduos contendo elevadas concentrações de elementos-traço. Essa situação provoca diminuição no tamanho e na diversidade populacional de bactérias, actinobactérias e fungos. Por essa razão, torna-se importante desenvolver mecanismos para a reabilitação dos solos contaminados, nos quais seja estabelecida uma microbiota e vegetação inicial que permitam aumentar a diversidade para depois alcançar a estabilidade do ecossistema. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi conhecer o comportamento da estrutura da comunidade microbiana como indicadora da reabilitação de áreas contaminadas com elementos-traço, no município de Três Marias - MG. Foi avaliada a densidade de bactérias, actinobactérias e fungos, ocorrência e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e diversidade de bactérias e fungos, por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) do gene 16 S rDNA e a região ITS respectivamente e o sequenciamento da região ITS para a seleção dos isolados fúngicos, obtidos de solos contaminados com altos teores de elementos-traço. As áreas reabilitadas estudadas foram: Área 1: substituição do solo e plantio de *Eucalyptus camaldulensis*, nas linhas (A1L) e sem cobertura nas entrelinhas (A1EL); Área 2: substituição do solo e plantio de *E. camaldulensis*, nas linhas (A2L) e semeadura de *Brachiaria decumbens* nas entrelinhas (A2EL); cerrado (C); pastagem (P) e área contaminada sem vegetação (SV). Os resultados mostraram que as densidades das bactérias, actinobactérias e fungos aumentaram após a implantação dos programas de reabilitação, tendo contagens semelhantes às de áreas não contaminadas. O número de esporos e a diversidade de FMA foram maiores nas áreas reabilitadas quando comparadas com áreas C, P e SV, sendo o gênero *Glomus* o único de ocorrência em todos os ambientes. Mediante as

* Comitê Orientador: Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares – UFLA (Orientador)-
Márcio Rodrigues Lambais - ESALq

análises do DGGE, verificou-se que houve maior similaridade no perfil das comunidades das bactérias nos ambientes estudados do que no perfil das comunidades fúngicas. A diversidade das bactérias e dos fungos aumentou nas áreas reabilitadas, comparada com a área SV. Mediante sequenciamento de isolados fúngicos das áreas com maiores concentrações de elementos-traço, foram encontradas as espécies: *Aspergillus brasiliensis*, *Penicillium brefeldianum*, *P. purpurogenum*, *P. citrinum* e *P. variable*. De acordo com os resultados de densidade e diversidade obtidos neste trabalho, demonstrou-se que os microrganismos são indicadores sensíveis ao progresso de reabilitação e que a substituição do solo e a presença de vegetação constituem uma estratégia adequada no estabelecimento do programa de reabilitação.

Palavras-chave: 1. Metais pesados. 2. Microrganismos. 3. Fungos micorrízicos arbusculares. 3. DGGE . 4. Sequenciamento . 5. Poluição do solo.

ABSTRACT

LOPEZ, Maryeimy Varón. **Soil microbiota as indicator of rehabilitation of trace elements contaminated area.** 2010. 60 p. Dissertation (Masters in Agriculture Microbiology– Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

World development has caused great industrial activity increase and consequently diverse non-environmentally sound practices such as diverse types of contamination. Mining areas are the most relevant contamination sources, due to the disposal of large amounts of residues containing high trace elements concentration. This activity can have detrimental effects on diverse microbial communities that play an important role on ecosystem sustainability. Therefore, it is important to develop soil rehabilitation practices for vegetation to be established, thus allowing restoration of diversity and functionality of soil microorganisms. In this context, this work aimed to evaluate soil microbial communities as indicator of rehabilitation of areas contaminated by trace elements in the municipality of Três Marias-MG. It was evaluated: bacteria, actinobacteria and fungi densities, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) occurrence and diversity, and bacteria and fungi diversity by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of 16 S rDNA gene and ITS regions and sequencing of ITS regions for selected fungal isolates. The rehabilitated studied areas were: 1: replacement of surface soil layer and plantation of *Eucalyptus camaldulensis*, in lines (A1L) without planting rows (A1EL); 2: replacement of soil surface layer and plantation of *E. camaldulensis*, in lines (A2L) and *Brachiaria decumbens* in rows (A2EL). The rehabilitated areas were compared to adjacent non-contaminated areas of Cerrado (C) and Pasture (P) as well as to and a highly contaminated area without vegetation (SV). Results have shown that bacteria, actinobacteria and fungi densities increased after rehabilitation practices at levels similar to non contaminated areas. Spore number and AMF diversity were higher in rehabilitated areas when compared to areas C, P and SV. *Glomus* was the only genus occurring in all rehabilitated, non rehabilitated and non contaminated areas. The analysis of DGGE showed a greater similarity in the profiles of bacterial communities than in the fungal profile communities of the diverse areas. The diversity of bacteria and fungi increased in the

* Guidance Committee: Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares – UFLA (Major Professor), Márcio Rodrigues Lambais - ESALq

rehabilitated areas compared with the area SV. Sequences of fungal isolates from the area with higher concentration of trace elements were identified as belonging to the following species: *Aspergillus brasiliensis*, *Penicillium brefeldianum*, *P. purpurogenum*, *P. citrinum* and *P. variable*. All biological parameters studied were shown to be good indicators of the rehabilitation practices by the replacement of surface soil layer and revegetation.

Key Words: 1. Heavy metal . 2. Microorganisms. 3. Arbuscular Mycorrhizal Fungi. 3. DGGE . 4. Sequencing. 5. Soil pollution .

1 INTRODUÇÃO

O aumento das atividades industriais, agrícolas e da urbanização tem gerado maior poluição no solo, sendo as áreas de mineração e processamento uma das principais fontes de contaminação, pois a partir delas é originada alta quantidade de resíduos (Kabata & Pendias, 1981).

Nestas áreas, elementos metálicos, como Zn, Cu, Cd e Pb, se encontram em maior concentração. A presença desses elementos compromete a produtividade das plantas, além de causar mudanças na densidade, na composição e na atividade da comunidade microbiana (Guilherme & Marchi, 1985). Do mesmo modo, processos biológicos importantes para a funcionalidade dos ecossistemas como a mineralização de materiais orgânicos, amonificação, fixação biológica de nitrogênio e nitrificação, também são comprometidos (Moreira & Siqueira, 2006).

O decréscimo na comunidade microbiana causa forte impacto na estabilidade do ecossistema, já que os microrganismos são fundamentais na ciclagem dos nutrientes e no desenvolvimento das plantas.

Porém, conhecer a diversidade, a densidade e a atividade dos microrganismos, nessas condições, permite obter informações que auxiliam na implantação de estratégias de recuperação, já que os microrganismos, por serem sensíveis à contaminação com elementos-traço, servem como bioindicadores da perturbação, sendo bons indicadores dos progressos da (Dias Júnior, et al., 1998).

Uma das técnicas mais utilizadas na reabilitação é a fitorremediação, que envolve técnicas químicas e biológicas, como o uso de amenizantes de solo, de práticas agronômicas e de plantas e sua microbiota associada que, utilizadas

em conjunto, removem, imobilizam ou tornam os contaminantes menos disponíveis ao ecossistema (Lamb et al., 2005).

A inclusão da plantas na reabilitação é muito importante, já que as suas raízes exsudam diferentes compostos, principalmente carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos, os quais são fonte de C e nitrogênio, que fornece a energia adequada para estimular o crescimento das populações microbianas. Essas interações entre as plantas e os microrganismos induzem mudanças na biodisponibilidade dos elementos-traço e nas características químicas e físicas do solo, permitindo o restabelecimento de uma vegetação diversa, que ajuda evitar a dispersão dos elementos-traço pela água ou pelo ar, permitindo a recuperação da área (Moreira & Siqueira, 2006).

A maioria dos trabalhos sobre contaminação por elementos-traço e programas de reabilitação é focada em solos contaminados pela aplicação de resíduos orgânicos industriais ou urbanos, sendo escassos os estudos em áreas de mineração ou processamento. Além disso, as investigações avaliam mais o efeito nas plantas e nos animais, não considerando os gerados sobre os microrganismos e seus processos biológicos.

Neste contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de conhecer o comportamento dos microrganismos como indicadores da reabilitação de áreas de mineração contaminadas com elemento-traço no município de Três Marias, MG. Para isso, foram avaliadas a densidade de bactérias, actinobactérias e fungos, a diversidade e a ocorrência de FMAs e a diversidade de bactérias e fungos, empregando a técnica molecular de DGGE e sequenciamento de fungos isolados das áreas com as concentrações de elementos-traço mais elevadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Contaminação do solo por elementos-traço

É denominado solo contaminado aquele que apresenta concentrações de determinada espécie química, acima do esperado para condições naturais, sendo comumente o resultado de atividades antrópicas ou da acumulação devido a processos biogeoquímicos que ocorrem na natureza (McBride, 1994).

O termo metal pesado foi atribuído, por Alloway (1990), a elementos metálicos que apresentam densidade atômica superior a 5g/cm^3 . Embora este termo seja bastante utilizado, não é o mais adequado, pois é bastante utilizado para metais e metaloides, além de não ter sido definido por nenhum órgão oficial na área de química. Por esse motivo, o termo elemento-traço é mais adequado para se referir a ditos elementos (Guilherme & Marchi, 2005).

Os elementos-traço de maior interesse são aqueles associados com toxidez ou poluição (Cd, Co, Cr, Cu, Pb, Hg, Mo, Ni e Zn, além do arsênio, As, que é um semimetal e selênio, Se, não metal) (Nellessen & Fletcher, 1993), embora alguns desses elementos (como os micronutrientes Zn, Cu, Fe, Mn, Ni, Mo e Co) sejam essenciais para o crescimento das plantas. Mas, quando eles se encontram em excesso, podem gerar um efeito negativo, sendo considerados tóxicos (Guilherme & Marchi, 2005).

A contaminação do solo é um problema mundial, consequência da rápida industrialização e urbanização e do planejamento inadequado do uso do solo. As principais fontes de contaminação são a mineração e o processamento de metais, seguidos da aplicação de pesticidas, fertilizantes e lodos de esgoto urbano e industrial e da deposição atmosférica (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

A Companhia de Tecnologia de Saneamento de São Paulo - CETESB (2005), estabelece três categorias de classificação do solo referentes a concentrações de elementos-traço contaminantes: o valor de referência de qualidade (VRQ), para situações de não contaminação; o valor de prevenção (VP), para possível alteração prejudicial (quando este valor é excedido o monitoramento dos impactos é exigido) e valor de intervenção (VI), que indica o limite de contaminação no qual há riscos potenciais diretos ou indiretos à saúde humana, indicando a necessidade de ações de intervenção. Para os elementos Zn, Cu, Pb e Cd, na categoria de VRQ, os valores são, respectivamente, 60, 35, 17 e $< 0,5\text{mg.kg}^{-1}$; para a categoria VP, 300, 60, 72 e $1,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ e, para VI, para a indústria são 2.000, 600, 900 e 20.

2.2 Efeitos dos elementos-traço

Os elementos-traço interferem no funcionamento normal tanto das plantas como da biota do solo, inibindo uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos, afetando a produtividade e a sustentabilidade dos ecossistemas e induzindo danos, às vezes, irreversíveis (Klauber-Filho et al., 2005).

Em áreas contaminadas por elementos-traço são comuns danos como perda da cobertura vegetal, alteração na estrutura do solo, aumento da erosão, perda de nutrientes e de matéria orgânica (Ribeiro-Filho et al., 1999). As plantas são afetadas pelo excesso de elementos, como, por exemplo, Zn (Rosen et al., 1977) o qual pode levar à deficiência de Fe e à redução da fotossíntese nas plantas, ou uma absorção excessiva de íons metálicos pode bloquear a atividade de enzimas e, em casos severos, o metabolismo é paralisado e a planta morre (Baker, 1981). Além desses efeitos, as raízes, que são os primeiros órgãos vegetais afetados, podem apresentar escurecimento, engrossamento e inibição do crescimento radicular.

Alguns estudos têm mostrado que podem ocorrer reduções no tamanho do xilema devido à contaminação e este fato pode estar relacionado com espessamentos causados por deposições de elementos-traço nas paredes dos vasos, afetando, assim, a translocação de metais e água para a parte aérea (Shridihar, 2005)

A biodiversidade microbiana pode ser alterada de forma direta ou indireta pelo excesso dos elementos-traço. Na forma direta, os diversos processos biológicos, tais como mineralização de materiais orgânicos, amonificação, fixação biológica de N₂ e nitrificação, podem decrescer. Outros efeitos podem ser a diminuição na densidade e na biomassa ou o incremento nas espécies resistentes ao metal. Os efeitos indiretos são os gerados sobre a vegetação, causando decréscimo na quantidade de substratos liberados na região rizosférica. Seja um efeito ou outro dependerão das características do solo, concentração e formas químicas dos metais e do número de contaminantes e suas interações (Brookes, 1995).

Dias Júnior et al. (1998) avaliando o efeito de elementos-traço sobre a densidade e a atividade microbiana em solo multicontaminado por Zn, Cu, Pb e Cd, constataram que o número de bactérias situou-se entre 10⁵ e 10⁷; o de fungos, entre 10³ e 10⁴ e o de actinobactérias entre 0 (zero) e 10⁶ g⁻¹ de solo seco. Quando foram comparados os valores obtidos de fungos e actinobactérias entre as áreas contaminadas com aquelas que continham cobertura de diferentes plantas (*Andropogon*, *Brachiaria decumbens*), foi encontrada uma variação menor que a encontrada em bactérias, indicando que os fungos e as actinobactérias são mais tolerantes ao excesso de metais e seus efeitos adversos.

Diversos autores reportam a tolerância das actinobactérias aos metais, já que estas possuem diferentes estratégias de resistência, tais como a bioabsorção, a produção de metabólitos secundários, o efluxo contínuo e os plasmídeos (Bamborough & Cummings, 2009), fazendo que sejam microrganismos comuns

em áreas com altas concentrações de elementos-traço, com a presença de um grande número de isolados resistentes (Bamborough & Cummings, 2009).

Também é conhecida a alta capacidade dos fungos de suportar elevadas concentrações de elementos-traço, já que sua habilidade de sobreviver é dada pelas diversas interações, tais como a precipitação ou a complexação dos elementos-traço por produtos metabólicos excretados, a fixação dos metais à parede celular, a composição de parede, o tipo e a espécie metálica envolvida, o transporte de metais tóxicos através da membrana plasmática, a fixação intracelular dos metais às proteínas e peptídeos e a transformação de uma espécie metálica nociva em uma forma menos (Gaad 2000; Lemos et al., 2008) permitindo que sua presença seja abundante em áreas contaminadas, além de ser comprovada sua alta capacidade de resistência aos diferentes elementos-traço (Santiago & Souza-Motta, 2006; Rajapaksha et al., 2004; Iram et al., 2009, Valix et al., 2001).

Entre as comunidades microbianas presentes no solo, destacam-se também os fungos micorrízicos arbusculares como principais componentes da microbiota rizosférica, na maioria dos ecossistemas terrestres especialmente naqueles submetidos a alterações antrópicas, desempenhando importante função na recuperação de áreas impactadas. Os FMAs são muito comuns em áreas severamente degradadas, com rejeitos de mineração e com contaminantes orgânicos, como os hidrocarbonetos aromáticos. (Klauber-Filho, 1999; Nakatani et al., 2008)

Zarei et al. (2008), avaliando a variação da abundância dos esporos e a colonização de micorrizas arbusculares (MA) em ambientes poluídos com elementos-traço, constaram que os propágulos de MA permaneceram em solos com altas concentrações de elementos-traço (6.472 e 5.203 mg kg⁻¹ de Zn e Pb, respectivamente). A colonização das raízes variou de 35% a 85% e o número de esporos, de 800 a 1.306 por 200g de solo seco. Os esporos mais abundantes

pertenciam ao gênero *Glomus*, contrário aos esporos de *Acaulospora*, que só foram observados em solos moderadamente poluídos e no controle (sem contaminação).

Klauber-Filho (1999) foi o primeiro, no Brasil, a realizar estudos sobre a ecologia e a atividade de fungos micorrízicos arbusculares em solos poluídos com elementos-traço, avaliando o impacto deles na ocorrência, na germinação, na colonização, na esporulação desses fungos e os efeitos dos isolados de FMA na planta hospedeira, encontrando um total de 21 espécies fúngicas de FMA em área de cerrado com solo contaminado com Zn, Cd, Cu e Pb. Das espécies encontradas, sete pertenciam ao gênero *Acaulospora*, seis ao *Scutellospora*, cinco ao *Glomus*, duas de *Gigaspora* e uma de *Entrophospora*. Posteriormente o mesmo Klauber-Filho (2002) avaliou a ocorrência de FMAs em quatro locais com gramíneas com diferentes graus de contaminação de elementos-traço, verificando que a densidade dos esporos, a riqueza das espécies e o aumento da dominância relacionam-se inversamente com as concentrações de metais no solo. As espécies de *Acaulospora mellea* e *Glomus clarum* são dominantes na rizosfera das gramíneas estudadas, indicando seu maior potencial de adaptação ao excesso de elementos-traço.

2.3 Análises da estrutura da comunidade microbiana no solo

Os microrganismos do solo têm papel importante na qualidade e na produtividade do solo, sendo necessários métodos que permitam um conhecimento da diversidade, da distribuição e do comportamento deles. Tradicionalmente, têm sido utilizados os métodos de contagem direta, os quais detectam só uma pequena parte da comunidade, podendo limitar as considerações a respeito do impacto da contaminação (Moreira & Siqueira, 2006).

Contudo, técnicas moleculares têm sido empregadas amplamente para avaliar populações e comunidades microbianas, permitindo o acesso à diversidade que não é revelada pela contagem (Hill et al., 2000). No entanto, é importante lembrar que as técnicas tradicionais são também essenciais para o conhecimento das capacidades metabólicas e das características fenotípicas dos microrganismos, sendo necessária a abordagem por meio de vários enfoques (polifásica) para se chegar o mais próximo possível do estado real do ambiente.

Diversos autores têm comprovado a relação existente entre a contaminação do solo com metais pesados e a estrutura das comunidades bacterianas (Zhaojun et al., 2006) e de actinomicetes (Wang, 2006). Mediante a utilização de técnicas moleculares com DGGE foi possível comprovar que a estrutura das comunidades se vê afetada pelos metais pesados, sendo maior o número de bandas à medida que aumentava a distância das fontes de Cu e Zn de uma mineradora, demonstrando que a contaminação com metais pesados diminui a biomassa e a diversidade da comunidade bacteriana, sendo possível prever a atividade dos microrganismos e a composição da comunidade usando a disponibilidade de Cu e Zn. O conjunto de diferentes métodos permite um melhor entendimento dos efeitos dos metais pesados na estrutura, no tamanho e na atividade das comunidades microbianas no solo (Zhaojun et al., 2006; Wang, 2006; Muller, 2001; Hu et al., 2007).

As análises com DGGE também permitiram determinar que, além das comunidades bacterianas, outros grupos de organismos também são afetados. Muller (2001), avaliando, mediante DGGE, o efeito a longo prazo da poluição com Hg, demonstrou, por meio dessa técnica, que o tamanho da comunidade das bactérias e protozoários foi reduzido, contrariamente ao encontrado para a biomassa dos fungos, que não evidenciou uma diferença significativa ao ser medida com a atividade da quitinase. O comportamento da diversidade dos fungos em áreas de mineração tem sido pouco estudado, embora Anderson

(2008), avaliando a diversidade dos fungos mediante DGGE, tenha reportado que ela é pouco afetada quando as concentrações de elementos-traço estão próximas dos limites permissíveis.

Estes estudos mostram que os microrganismos são sensíveis à presença dos contaminantes, o que é evidenciado pela diminuição na densidade, diversidade e atividade (Silveira et al., 2006; Santos et al., 2007). Da mesma forma, a alteração da biodiversidade microbiana afeta diretamente o desenvolvimento das plantas, pois dela dependem as características do solo concentração e formas químicas dos metais e o número de contaminantes e suas interações, sendo bons indicadores da recuperação de áreas degradadas, além de exercer grande influência nas interações tróficas e na ciclagem de C e nutrientes (Siqueira et al., 1994).

2.4 Reabilitação de áreas contaminadas com elementos-traço

Os ecossistemas submetidos a processos degenerativos podem sofrer degradação em diferentes níveis, atingindo até a desertificação, sendo a sua recuperação uma tarefa difícil. Entretanto, pode ser reversível por meio do emprego de diferentes procedimentos de recomposição, incluindo: a **reabilitação**, que é definida como o retorno da área degradada a um estado biológico apropriado, constituindo um novo ecossistema; a **recuperação**, que se refere ao retorno a uma forma de utilização qualquer conforme um plano preestabelecido para uso do solo que, com o tempo, pode ter as funções ecológicas restabelecidas; a **restauração**, que corresponde ao retorno às condições originais por meio de processos espontâneos. Os dois primeiros processos, geralmente, consistem da adoção de práticas recuperadoras com fortes intervenções antrópicas, enquanto a terceira abrange intervenções simples, como a proteção e o pousio da área (Lamb et al., 2005).

Nos programas de revegetação deve-se buscar que eles sejam sustentáveis, ou seja, deve-se implementar ações que garantam o estabelecimento da vegetação inicial (ajustar o solo, selecionar as plantas e selecionar organismos benéficos para inoculação) e que essa possa facilitar o início e o processo da sucessão natural visando à completa cobertura vegetal e diversidade biológica e funcional no novo ecossistema (Siqueira et al., 2007).

Os diferentes estudos sobre os programas de recuperação de solos têm mostrado ser possível reverter em parte a degradação das áreas contaminadas, já que nas áreas recuperadas são incrementadas a densidade e a diversidade de bactérias, actinobactérias, fungos totais (Kelly et al., 2003, Silveira et al., 2006) e fungos micorrizicos arbusculares (Caproni et al., 2003; Melloni et al., 2003), populações essenciais na estabilidade do ecossistema, e portanto na recuperação dos solos (Moreira & Siqueira, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da área e amostragem

3.1.1 Área de estudo

O experimento foi realizado em uma área da Companhia Mineira de Metais (CMM), localizada no município de Três Marias, MG, cujo solo é classificado como antropogênico. Panoso et al. (1978), aplicando a classificação de Köppen, verificaram que a região se enquadra no tipo AW, que corresponde à savana, com inverno seco. A temperatura média anual varia de 19° a 22°C, a precipitação média anual é de 1.100 a 1.420 mm, a altitude é de 539 m, o relevo plano, a vegetação é original de cerrado e as coordenadas são latitude 45,11°S e longitude 18,24°W (Figura 1).

3.1.2 Antecedentes da área de estudo

O local de estudo corresponde a uma área onde foi implantado, durante os anos 2001 e 2002, um projeto piloto, desenvolvido pelo Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, para a reabilitação de uma área contaminada com rejeitos da indústria de zinco, em Três Marias, MG.

Antes de desenvolver o programa de reabilitação foi feito o diagnóstico da contaminação. Na profundidade de 0-30 cm foram feitas as análises químicas das áreas, avaliando-se os teores totais de Zn, Cd, Cu e Pb. Na área denominada de deposição de rejeito industrial (no presente estudo designada como Área 1) os teores totais avaliados por Ribeiro-Filho et al. (1999) foram de 17167, 584, 882 e 573 mg kg⁻¹ e na área ustulação (no presente estudo designada como Área 2) os teores foram de 1844, 29, 145 e 278 mg kg⁻¹ respectivamente. Vários estudos



FIGURA 1 Mapa da área de estudo, localizada em Três Marias - MG, destacando as áreas contaminadas submetidas a reabilitação (A1e A2), área contaminada sem vegetação (SV) e sem contaminação Cerrado (C) e Pastagem (P), localizadas a 6 e 7 Km respectivamente de distância da empresa (Imagem obtida a partir do Google earth, Fevereiro, 2009).

foram realizados com plantas nativas e exóticas para se verificar a tolerância aos altos teores de elementos-traço (Marques et al., 2000; Cury et al., 1998).

A partir de testes na própria área a ser reabilitada verificou-se que a espécie *Eucalypto camadulensis* se apresentou como uma das mais tolerantes, sendo por isto selecionada para ser implantada no programa de reabilitação. Diversos materiais com ação amenizadora da fitotoxidez foram avaliados. A aplicação de calcário ou silicato de cálcio reduziu a disponibilidade dos elementos-traço no solo facilitando o estabelecimento das plantas, representando uma alternativa para a fitoestabilização da área. A partir dos diversos estudos realizados nas áreas contaminadas, desenvolveu-se o modelo de reabilitação que consistiu em dois programas, que tinham por princípio a substituição de solo contaminado por solo não contaminado. Para isto valas de 10x1x1m foram abertas, sendo o solo retirado espalhado na própria área do experimento, não gerando material para descarte. O solo utilizado para substituição foi retirado de uma área de empréstimo, da própria Companhia, o qual recebeu tratamento com calcário, matéria orgânica e fertilizante (4-14-8) para garantir o estabelecimento adequado da vegetação (Accioly, 2001).

O primeiro programa de reabilitação consistiu na implantação de mudas de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) nas valas abertas, definidas como linhas de plantio, não havendo cobertura nas entrelinhas. No segundo programa, além das linhas de plantio com eucalipto, nas entrelinhas foi adicionada uma camada de calcário de 2 cm, além de uma de 20 cm de solo não contaminado, onde, posteriormente foi semeada *Brachiaria decumbens*. Em cada vala foram plantadas quatro mudas de eucalipto, com espaçamento de 2m entre as plantas, totalizando aproximadamente, 780 árvores na área (Accioly, 2001).

3.1.3 Amostragem da área

No mês de fevereiro de 2009, foram coletadas amostras de solos, na profundidade de 0-20 cm, nas áreas submetidas aos programas de reabilitação. Além dessas áreas, para efeitos comparativos, também foram coletadas amostras de solos de uma área contaminada sem cobertura de solo, de uma área sob pastagem e outra sob cerrado nativo, totalizando cinco áreas. Nos locais submetidos a programas de reabilitação foram coletadas amostras de solo nas linhas e nas entrelinhas. As seguintes designações foram adotadas para identificação das áreas: Área 1: contaminada e reabilitada com plantio de *Eucalyptus camaldulensis* nas linhas (A1L) e sem cobertura nas entrelinhas (A1EL); Área 2: contaminada e reabilitada com plantio de *Eucalyptus camaldulensis*, nas linhas (A2L) e semeada *Brachiaria decumbens*, nas entrelinhas (A2EL); Área 3: cerrado (C); Área 4: pastagem (P) e Área 5: contaminada sem vegetação (SV) (Figura 2).

Das áreas reabilitadas foram coletadas 10 amostras compostas, tanto nas linhas quanto nas entrelinhas, a partir de 5 amostras simples. Nas áreas de cerrado e pastagem foram coletadas 5 amostras compostas, totalizando 55 parcelas experimentais. O delineamento foi inteiramente casualizado. No momento da coleta, foi observada a ocorrência de pouca ou nenhuma vegetação espontânea na área 1 (linha e entrelinha), ao passo que na área 2, verificou-se intensa cobertura pela braquiária, bem como de vegetação espontânea. A área SV encontrava-se totalmente desprovida de cobertura vegetal. Esta área apresentava elevada umidade, decorrente da irrigação contínua, procedimento tomado para evitar espalhamento da contaminação pela ação do vento.

A coleta foi feita utilizando-se trado holandês, por caminhamento em ziguezague. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e colocadas em caixa de isopor com gelo até o Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras. As amostras de solo para análises moleculares

foram armazenadas à temperatura de -80°C e as utilizadas para as análises microbiológicas, a 4°C, até o momento da utilização.

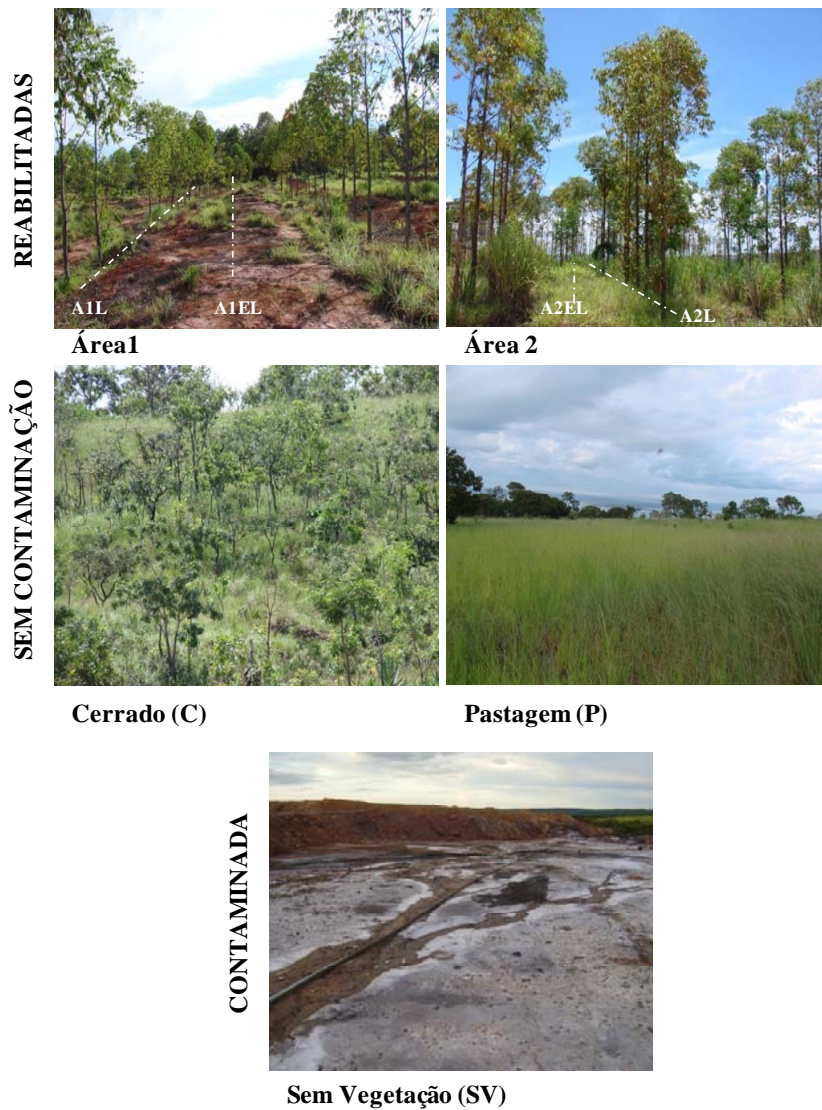


FIGURA 2 Áreas estudadas correspondentes aos diferentes programas de reabilitação (A1 = Área 1 e A2 = Área 2; EL = Entre-linha; L = linha), áreas sem contaminação (Cerrado e Pastagem) e com contaminação (Sem Vegetação).

3.2 Caracterização química do solo

As análises dos solos foram realizadas no Laboratório de Ciências do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram determinados o pH em água e o Zn e o Cd extraídos com a solução de Mehlich-1 (Tabela 1).

3.3 Avaliações microbiológicas

3.3.1 Densidade microbiana

As contagens de unidades formadoras de colônias foram feitas pelo método de inoculação de suspensões diluídas em meio ágar nutriente para bactérias totais (Wollum, 1982), em amido-caseína para actinobactérias e extrato de malte para fungos (Moreira & Siqueira, 2006). As placas com meios inoculados foram incubadas à temperatura de $27^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$. A contagem foi realizada aos 3, 6 e 8 dias de incubação, para bactérias, fungos e actinobactérias, respectivamente.

3.3.2 Densidade e ocorrência fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

Foi avaliada a ocorrência de FMAs, extraíndo-se os esporos presentes em 50cm^3 de solo, utilizando a técnica de peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963), seguida de centrifugação em solução de sacarose 50%. Os esporos foram separados por grupos e contados; posteriormente foram colocados em lâminas com álcool polivinílico lactoglicerol e reagente de Melczer, para a sua identificação.

Para recuperar o máximo de populações de FMAs presentes nas áreas revegetadas, foram estabelecidos vasos de cultura armadilha. Das amostras coletadas, foram selecionados 50cm^3 de solo e misturados com 450g de solo autoclavado que, posteriormente, foram semeados com *Brachiaria decumbens*.

As culturas foram mantidas em casa de vegetação e, após 10 meses, os esporos foram extraídos e identificados, conforme descrito anteriormente.

Amostras de raízes de *Brachiaria decumbens* dos ambientes das A2 E-L e P foram coletadas lavadas, clarificadas com KOH 5% e coloridas com azul de tripan (Koske & Gemma, 1989). Posteriormente, foram colocadas em placas Petri e feita a avaliação da percentagem de colonização (Giovannetti & Mosse, 1980).

3.4 Análises das comunidades microbianas (bactérias e fungos)

3.4.1 Extração do DNA total do solo

O DNA total do solo foi extraído de três amostras de cada tratamento utilizando-se o kit de isolamento de DNA Power Soil TM (mobio), seguindo as instruções do fabricante (Bio 101, Vista, Califórnia). A solução de DNA total foi armazenada a -20°C e, posteriormente, o DNA foi quantificado por comparação com o padrão de massa (Low DNA Mass Ladder-Invitrogen) em gel de agarose 1% por densitometria.

3.4.2 PCR para o DGGE

A partir do DNA do solo, fragmentos da região V3 do gene rRNA 16S de microrganismo do domínio Bactéria foram amplificados utilizando-se os iniciadores BA338Fgc (5`GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CAC GGA CTC CGG GAG GCA GCA 3`) e UN518r (5`ATTA CCG CGG CTG CTG G 3`). As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: a reação foi realizada em um volume de 25 µL com 1 unidade de Taq DNA polimerase, 2,5 µL de tampão para PCR 10X, 0,2 mmol L⁻¹ dNTPs, 3 mmol L⁻¹ MgCl₂, 5 pmol dos *primers* e 10 ng do DNA metagenômico e água Mili-Q para completar o volume. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler

Gradient (Eppendorf), nas seguintes condições: 95°C, por 5 minutos; 30 ciclos de 92°C, por 1 minuto; 55°C, por 1 minuto e 72°C, por 1 minuto, além de uma extensão final, a 72°C, por 10 minutos.

Para amplificar a região ribossomal rRNA 5,8S em fungos contendo o espaçador interno ITS, foram utilizados os *primers* ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') e EF4 (5'GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG 3'). Os amplicons resultantes da primeira amplificação foram utilizados como molde para uma nova amplificação com os iniciadores ITS2(5' GCG TTC ATC GAT GC 3') e ITS1FGC (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA 3'). A reação da PCR continha: 2,5 µL de tampão para PCR 10X, 2,5 mmol L⁻¹ dNTP, 3 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 3 U de Taq DNA polimerase, 10 ng de DNA total, 5 pmol dos oligonucleotídeos e água Mili-Q esterilizada, para um volume final de 25 µL.

As amplificações foram feitas em termociclador Mastercycle Gradiente (Eppendorf), nas seguintes condições para a primeira amplificação: 94°C, por 5 minutos; 34 ciclos de 94°C, por 30 segundos; 55°C, por 30 segundos; 72°, por 1 minuto e 30 segundos e extensão final a 72°C, por 5 minutos. Na segunda amplificação, foram mantidas as mesmas condições, exceto o tempo de anelamento para 72°C, por 30 segundos. Os amplicons resultantes foram quantificados por densitometria após eletroforese em gel de agarose, conforme descrito anteriormente.

3.4.3 DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante)

Para a separação dos amplicons do gene rRNA 16s para as bactérias e a região ITS para os fungos, foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). Os géis de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m) 8% foram preparados com gradiente desnaturante variando de

15% a 55%, utilizando-se uma solução desnaturante 100%, contendo 7 M de ureia e 40% de formamida e uma solução sem ureia e formamida (Øvreås et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 200 V e a 60°C constantes, por 3 horas, em um sistema de eletroforese vertical DCode (BioRad), utilizando solução tampão de TAE 0,5X (10 mmol L⁻¹ Tris-acetato e 0,5 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi imerso em uma solução de 10% de ácido acético glacial, por 10 minutos, em agitador horizontal. Em seguida, o gel foi lavado por três vezes em água destilada, imerso em solução de metanol 50% por 10 minutos, lavado três vezes com água destilada e imerso em solução de SYBR-Green I (Molecular Probes) (1:10.000, v:v), durante 30 minutos, em agitador horizontal, no escuro.

A imagem do gel foi capturada por varredura, utilizando-se um densitômetro a laser FluorImager e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences). A riqueza de amplicons (As) foi determinada com base no número de bandas com diferentes valores de migração relativa, detectadas após varredura.

3.5 PCR e sequenciamento de fungos cultiváveis

3.5.1 Extração do DNA das colônias

A partir do plaqueamento de diluições seriadas de solos contaminados com altos teores de elementos-traço, foram obtidas colônias de fungos. Da diluição 10⁻¹, foram escolhidos 7 isolados de fungos, por estarem presentes nos maiores teores de Zn e Cd e, por haver diferença morfológica entre eles, foi feita a purificação em meio BDA e, posteriormente, a identificação morfológica, no Laboratório de Microbiologia & Higiene de Alimentos da UFLA.

Dos isolados puros foi feito o sequenciamento mediante a extração do DNA das colônias crescidas em meio BDA. A partir da raspagem superficial, o

micélio foi macerado com nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 1.500 μL do tampão de extração (SDS 1%, EDTA 25mmol L^{-1} , Tris-HCl pH8,0 200mmol L^{-1} , NaCl 250mmol L^{-1}), transferidos para tubos de 2 ml e incubados, a 60°C, por 30 minutos. Centrifugou-se, a 10.000 rpm, por 10 minutos. Adicionaram-se 600 μL do sobrenadante em dois Eppendorfs de 1,5 mL. Foram acrescentados 600 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Centrifugou-se e coletaram-se 500 μL do sobrenadante em outro Eppendorf contendo 500 μL de isopropanol gelado. Centrifugou-se novamente, descartando-se o sobrenadante e lavando-se duas vezes com 1.000 μL de etanol 80%. Após seco, foi ressuspenso em 50 μL de água MilliQ autoclavada. Armazenando-se a -20°C, até a utilização (Vildoso, 2009).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para amplificar a região ribossomal contendo o espaçador interno ITS1, o gene do rRNA 5.8S e o espaçador interno ITS2 (região ITS). Cada PCR continha 5 μL do tampão da reação, 3,0 μL MgCl_2 (25 mmol L^{-1}), 5,0 μL de dNTPs (2,5 mmol L^{-1}), 2 unidades de Taq DNA polimerase, 5,0 μL de 100 mmol L^{-1} de cada *primer*, 1 μL de DNA molde e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para 50 μL . Controles negativos, sem DNA molde, foram incluídos para detectar possíveis contaminações dos reagentes. Os pares de *primers* da reação foram o ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White et al., 1990).

As amplificações foram feitas em um termociclador Mastercycle Gradiente (Eppendorf), com as seguintes condições: 94°C, por 5 minutos e 35 ciclos, a 94°C, por 30 segundos; 53°C, por 30 segundos e 72°C, por 50 segundos, além de uma extensão final, a 72°C, por 10 minutos e de uma incubação final a 4°C. O produto da PCR foi purificado mediante a adição do produto final da PCR a um tubo Eppendorf com 1.000 μL de álcool isopropílico e duas lavagens posteriores em álcool etílico 80% gelado e centrifugado a 10.000 rpm, por 10

minutos cada centrifugação. Deixou-se secar e ressuspendeu-se em 20 µL de água ultrapura (MilliQ) (Vildoso, 2009).

3.5.2 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado bidirecionalmente, utilizando-se os *primers* da PCR (ITS1 e ITS4) no Centro de Biotecnologia CEBTEC/ESALQ-USP, em aequenciador automático ABI 3100, utilizando-se o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare), com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase. As sequências preliminares foram editadas e alinhadas pelo programa Chromas Pro, conferindo com os eletroferogramas, obtendo-se sequência final, a qual foi alinhada no programa Blastn, em que foram obtidos os diferentes organismos com sequências similares presentes na base de dados do GenBank.

Foram escolhidas algumas sequências das obtidas no Blastn (NCBI, 2009) e outras das espécies próximas, informação obtida da base de dados do GeneBank. As sequências foram submetidas à plataforma de análises filogenética do site: www.phylogeny.fr, a qual faz um alinhamento pelo Muscle, em formato fasta, depuração pelo Gblocks, por parcimônia, retirando regiões não informativas, contendo gaps ou mal alinhadas, e a árvore filogenética é reconstruída pelo método da máxima verossimilhança pelo programa PhyML v.3, com o modelo de substituição HKY85 e estimado o parâmetro de distribuição gamma, as taxas de transição e transversão e a proporção de invariáveis. A representação gráfica da árvore é pelo TreeDyn v198.3 (Derepe et al., 2008)

3.6 Análises estatísticas

As contagens das UFC foram transformadas em Log_{10} . Os dados das contagens de bactérias, actinobactérias e fungos, além do número de esporos de

FMA's foram analisados pelo cálculo do erro padrão das médias, por meio do teste de Scott-Knott, a 5%. Foi realizado teste de correlação de Pearson entre os teores dos elementos-traço e as contagens dos microrganismos e um dendrograma de similaridade entre as áreas, com base nos teores dos contaminantes e na densidade da comunidade microbiana.

Foram analisados os perfis de bandas após DGGE por agrupamento hierárquico utilizando o programa SYSTAT 11.0, com base em dados binários, pelo método de concordância simples ("simple matching"), com algoritmo de Ward e distância euclidiana como unidade de medida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características químicas do solo

Verificou-se que as áreas revegetadas e sem vegetação apresentam altos teores de elementos-traço disponíveis (Tabela 1), acima dos estabelecidos para atividades industriais pelo CETESB (2005) (Zn=2000, Cu=600, Cd=900 e Pb=20mg kg⁻¹ valores totais), sendo o Cd o principal elemento contaminante.

Os principais contaminantes das áreas estudadas foram Zn e Cu, com teores 165, 5.266 e 4, 229 vezes maiores nos sítios contaminados em relação aos controles (P e C), respectivamente. O Cd apresentou valores de 6,5 a 282 vezes maiores que o controle, sendo a área SV a de valor mais elevado. O contaminante apresentado em menor teor foi o Pb, para o qual a variação foi de 7,5 a 38 vezes maior que nas áreas controle, sendo A1El a mais contaminada com este elemento.

De forma geral, a ordem decrescente dos níveis de contaminação foi Zn, Cd, Cu e Pb, sendo, para todos os metais, a área SV a de maior contaminação, seguida da A1EL, e a A1L, apresentando diferenças significativas para os teores de Zn e Cd com as áreas A2L, A2EL, P e C. Com relação ao teor total da contaminação, a ordem do maior para o menor, em teor de contaminação, foi SV, A1EL, A1L, A2L, A2EL, P e C.

4.2 Avaliações microbiológicas

4.2.1 Densidade microbiana

Os dados obtidos mostraram que os microrganismos que apresentaram as maiores contagens de UFC foram as bactérias, seguidas das actinobactérias e dos fungos (Figura 3).

TABELA 1 Análises dos teores dos elementos-traço extraídos por Menhlich 1 nos solos contaminados reabilitados (A1 e A2), sem contaminação (C e P) e contaminado sem vegetação (SV) no município de Três Marias-MG.

AREAS	Zn	Cu	Pb	Cd	pH	Umidade	P	Mn	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ²⁺	H+Al	(t)	MO
	mg/dm ³				H ₂ O	%	mg/dm ³			cmol _c /dm ³				dag/kg	
A1L	2866,5	138,6	35,3	80,5	6,5	15,3	5,8	46,8	52,6	1,6	1,7	0,0	1,5	3,4	0,7
A1EL	6680,3	456,3	77,3	159,5	6,9	15,7	11,2	56,6	56,8	1,6	0,7	0,0	1,3	2,4	0,6
A2L	688,8	14,0	15,6	13,0	6,3	19,1	8,8	55,8	80,8	2,2	1,0	0,1	2,1	3,5	0,9
A2EL	331,5	8,1	16,6	18,1	6,3	21,1	2,7	83,5	72,7	2,5	1,2	0,1	2,0	4,0	0,8
C	1,8	1,4	<2,0	<0,02	5,5	9,4	0,7	24,4	131,4	0,4	0,6	1,6	4,9	2,9	0,6
P	3,4	2,6	<2,0	<0,02	5,7	7,2	1,0	30,9	80,4	0,7	0,3	0,2	2,7	1,5	1,0
SV	13694,8	343,3	32,5	565,1	4,8	32,5	6,3	1446,3	40,8	81,3	22,0	1,4	14,4	104,8	0,4

Valores médios obtidos a partir de 10 repetições nas áreas reabilitadas Área 1 Linha (A1L1) e entrelinha (A1EL) e Área 2 linha (A2L) e Entrelinha (A2EL) e a partir de cinco repetições nos ambientes de Cerrado (C) e Pastagem(P) e área contaminada Sem Vegetação (SV).

SB – saturação por bases; MO – Matéria orgânica

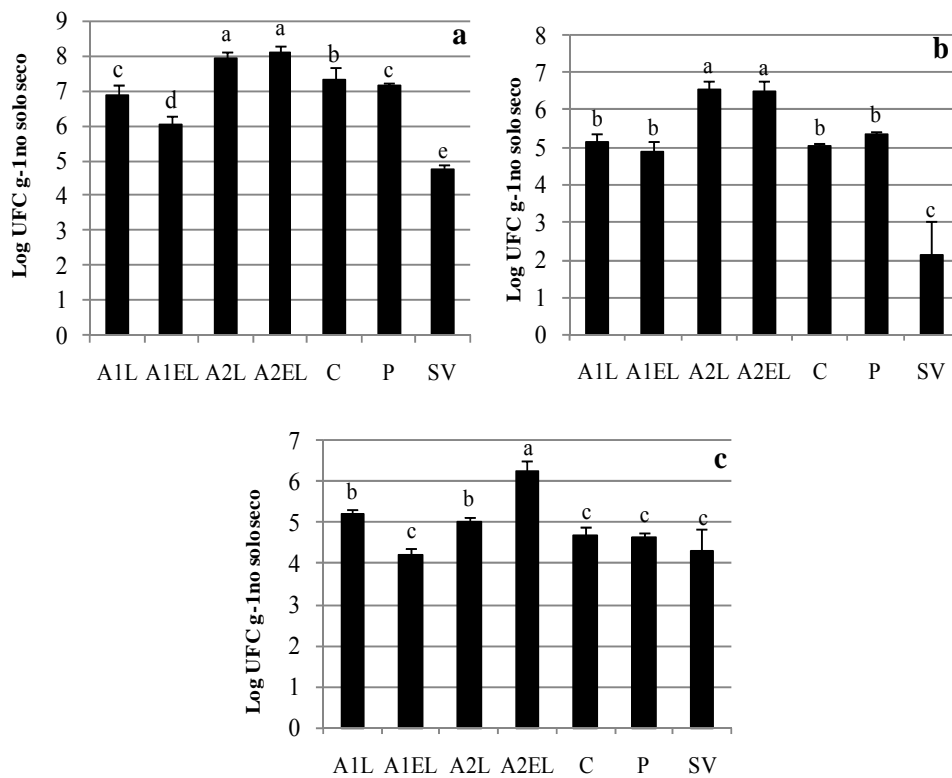


FIGURA 3 Número de UFC de bactérias (a), actinobactérias (b) e fungos (c) nos diferentes programas de revegetação, as áreas controle sem contaminação e sem vegetação. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scot-Knott 5% de probabilidade.

Observou-se que, para bactérias, a contagem foi maior na área 2 (EL e L), seguida dos ambientes de C, P, A1EL, A1L e, por último, SV (Figura 3a). Isso demonstra que esta diminuição teve forte relação com o aumento da contaminação (Šmejkalová et al., 2003).

As actinobactérias foram o grupo mais afetado pela contaminação (Figura 3b), evidenciado pelo fato de ter uma densidade três vezes menor em SV em relação ao solo controle sem contaminação C e P. Esses resultados são

diferentes dos encontrados por outros autores, os quais relataram que este grupo é resistente a altos teores de elementos-traço (Bamborough et al., 2009).

Para o grupo dos fungos não houve diferença significativa entre as áreas sem contaminação C e P e as áreas com maiores teores de elementos-traço SV e A1EL (Figura 3c). Esse comportamento é semelhante aos reportados em diferentes trabalhos, nos quais é destacada a alta capacidade de tolerância dos fungos a diferentes condições de estresse (Dias Júnior et al., 1998; Rajapaksha et al., 2004) o que pode ser devido ao fato de os fungos apresentarem diversos mecanismos de resistência tanto estruturais, como morfológicos e fisiológicos, que lhes permitem sobreviver nessas condições (Lemos et al., 2008),

As correlações simples entre médias gerais dos parâmetros avaliados encontram-se na Tabela 2.

A densidade bacteriana correlacionou-se negativamente com os metais, em ordem decrescente, Zn, Cd, Cu e Pb, mostrando-se como o grupo mais sensível à contaminação quando comparado com os outros grupos estudados. As actinobactérias apresentaram também correlação negativa com todos os metais (Cd>Zn>Cu>Pb), evidenciando que as populações de bactérias e actinobactérias, geralmente, são as mais afetadas pela contaminação dos solos, quando comparadas com a comunidade fúngica, embora esta também tenha apresentado correlação negativa com os elementos-traço, sendo, em ordem decrescente, afetados por Cu, Zn, Cd e Pb. Estes dados são diferentes dos encontrados por Dias Júnior et al. (1998) que relatou correlação negativa só para as bactérias, tendo o Cu e o Cd sido os elementos que mais influenciaram a comunidade. McDonald et al. (2007) demonstraram que os fungos sofrem mais efeito do elemento Cu que do Zn, corroborando os resultados encontrados neste estudo.

Dias Júnior et al. (1998) avaliando a mesma área, verificaram um acentuado decréscimo da densidade de fungos (38%), bactérias (82%) e actinobactérias (30%), nas áreas contaminadas por elementos-traço. No presente

estudo, verificou-se que, após implantado o programa de reabilitação, ocorreu elevação nas densidades das bactérias (68%), actinobactérias (206,1%) e fungos (16,3%). Os maiores acréscimos ocorreram na A2EL, com presença de *Brachiaria decumbens* [(bactérias (103,5%), actinobactérias (307,4) e fungos (39%)], fato que pode ser explicado, já que a vegetação pode estimular a comunidade microbiana por meio da exsudação radicular de diferentes compostos, tais como carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos, que são fontes ricas de carbono e nitrogênio, que favorecem o crescimento das populações microbianas (Moreira & Siqueira, 2006).

TABELA 2 Coeficiente de correlação de Pearson entre a contagem dos microrganismos e os teores solúveis dos elementos-traço presentes nos ambientes estudados.

	Bactérias	Actinobacterias	Fungos
Zn	-0,863*	-0,710*	-0,441*
Cu	-0,709*	-0,470*	-0,462*
Cd	-0,779*	-0,764*	-0,397*
Pb	-0,578*	-0,276**	-0,384*

** e * representam os coeficientes de correlação de Pearson significativos a $P \leq 0,005\%$ e $P \leq 0,001\%$, respectivamente.

Os resultados (Figura 4) demonstraram que a A2EL, embora tenha elevadas concentrações de elementos-traço, permitiu o maior crescimento das populações de bactérias, actinobactérias e fungos, comprovando que esse programa de reabilitação é mais eficiente quando comparado com a implantação do programa de reabilitação da área 1 (A1EL). O fato de essa área (A2EL) ter *Brachiaria* permitiu o incremento da comunidade microbiana, pois as raízes das plantas depositam alta diversidade e quantidade de compostos orgânicos na rizosfera que, junto com o ambiente físico-químico do solo, permitem o

estabelecimento de diversos tipos de microrganismos (Moreira & Siqueira, 2006). A presença dos microrganismos também gera efeitos benéficos nas plantas, incrementando as quantidades de nutrientes e minerais disponíveis para elas e, mediante a produção de antibióticos, sideróforos, compostos voláteis e enzimas hidrolíticas, evita-se o crescimento ou a atividade de patógenos de plantas, estimulando seu crescimento (Gremion, 2003).

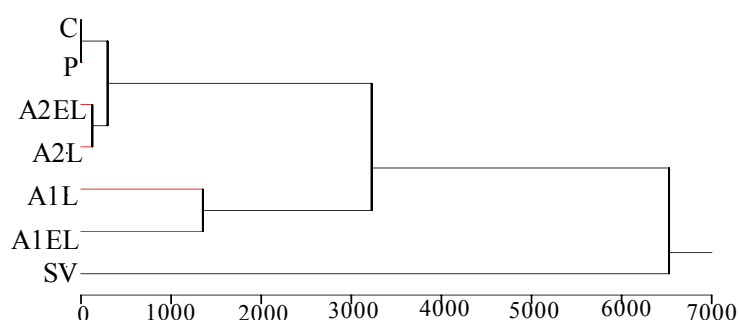


FIGURA 4 Dendrograma de similaridade construído com as contagens das bactérias, actinobactérias e fungos e os teores dos elementos-traço das áreas estudadas.

Assim, a diversidade da cobertura vegetal do solo também favorece a diversidade microbiana, pois, quanto maior a diversidade vegetal, maior a de compostos orgânicos secretados/excretados, os quais, por sua vez, favoreceram o crescimento de organismos com requerimentos nutricionais mais diversos (Klauber Filho et al., 2005).

4.2.2 Densidade e ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

A densidade de esporos variou significativamente, de 1 a 272 esporos/50g de solo. As áreas revegetadas apresentaram valores médios entre 3 e 272 esporos/50g de solo, tendo sido A2L a que apresentou maior abundância, fato que pode ser explicado pela maior ocorrência de plantas hospedeiras (Figura

5). As raízes finas de gramíneas em associação com FMAs incrementam muito a absorção de nutrientes (principalmente o P) e de água, favorecendo as plantas. Essa associação entre raízes e micélio fúngico proporciona melhorias na estruturação do solo, reduzindo o processo de erosão e contribuindo para a conservação do solo (Cordeiro et al., 2005).

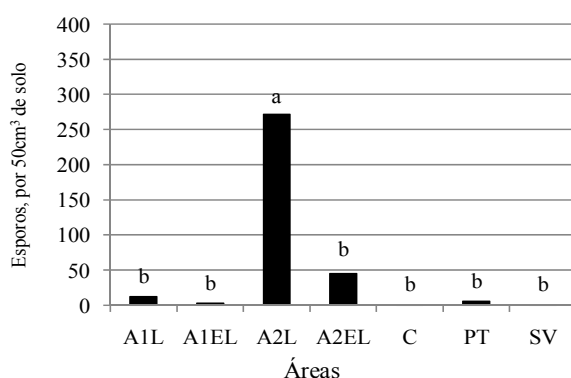


FIGURA 5 Número de esporos (50 cm³ solo) de FMA obtidos no campo, nas diferentes áreas de solo submetido aos sistemas de reabilitação. Médias seguidas pela mesma letra nas barras não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5%.

Nas áreas reabilitadas em cultura armadilha, foram encontrados valores médios, a partir de 3 repetições, de 554, 85, 97 e 35 esporos, respectivamente para A1L, A1EL, A2EL e A2L, sendo as espécies listadas na Tabela 3.

Estes dados evidenciam que, em áreas degradadas, a densidade de esporos é normalmente baixa, devido ao efeito dos metais na colonização, porém, a revegetação dessas áreas aumenta a densidade de esporos e a diversidade das populações. Melloni et al. (2003), em estudo com solos de área de mineração de bauxita em processo de reabilitação, verificaram que a mineração afetou a densidade de esporos e que esta aumentou após a reabilitação.

TABELA 3 Ocorrência de FMA em amostras do campo e obtidas em cultura armadilha de áreas contaminadas com elementos-traço após programas de reabilitação.

ÁREA	CAMPO	ARMADILHA	ESPÉCIES ENCONTRADAS
A1L	5	6	<i>Glomus intraradices*</i> , <i>Acaulospora longula*</i> , <i>Acaulospora morrowiae*</i> , <i>Glomus diaphanum*</i> , <i>Glomus sp*</i> , <i>Paraglomus occultum</i> , <i>Gigaspora</i> , <i>Scutellospora heterogama**</i>
A1EL	7	3	<i>Acaulospora morrowiae</i> , <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Glomus diaphanum</i> , <i>Glomus intraradices*</i> , <i>Glomus sp*</i> , <i>Paraglomus occultum*</i> , <i>Scutellospora sp</i> ,
A2L	6	4	<i>Acaulospora scrobiculata*</i> , <i>Acaulospora morrowiae</i> , <i>Paraglomus occultum*</i> , <i>Glomus sp*</i> , <i>Acaulospora longula</i> , <i>Scutellospora pellucida</i> , <i>Scutellospora pellucida</i> , <i>Glomus intraradices*</i>
AEL	9	4	<i>Acaulospora morrowiae</i> , <i>Paraglomus occultum*</i> , <i>Glomus sp*</i> , <i>Acaulospora scrobiculata*</i> , <i>Acaulospora sp</i> , <i>Glomus diaphanum</i> , <i>Acaulospora longula</i> , <i>Glomus intraradices*</i> , <i>Scutellospora heterogama</i>
C	1	Nd	<i>Glomus sp</i>
P	3	Nd	<i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Glomus sp</i> , <i>Scutellospora sp</i>
SV	3	Nd	<i>Scutellospora heterogama</i> , <i>Glomus sp</i> , <i>Glomus diaphanum</i>

*Espécies apresentadas na cultura armadilha. Nd = não determinado

As áreas controle C, P, e SV apresentaram valores entre 1 e (SV e C) 5 esporos. No C foi verificada baixa densidade de esporos. Diversos trabalhos têm reportado que em ambientes naturais existe baixa densidade de esporos, resultado da estabilidade do ecossistema (Gomide, 2009; Cordeiro et al., 2005; Caproni, 2003).

Na área da P foi baixa a densidade de esporos (6 esporos/50g de solo). Áreas sob cultivo agrícola são influenciadas pelas práticas de manejo do solo,

como aração e adubação, as monoculturas extensivas e os agrotóxicos, que podem reduzir a incidência de algumas espécies de FMA (Siqueira et al., 1989).

Foram identificados cinco gêneros de FMAs nas amostras dos solos estudados: *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Paraglomus* e *Scutellospora* (Tabela 3). A maioria (85%) das espécies encontradas neste experimento já tinha sido reportada por Klauberg-Filho et al. (2002) que avaliaram o solo da mesma área. No presente estudo, foram encontrados esporos de *Acaulospora longula*, mostrando que o programa de reabilitação permitiu a ocorrência de outras espécies, sendo aumentada a diversidade dos FMAs presentes na área.

O gênero *Glomus* foi o único que apresentou ocorrência em todos os tratamentos. Dados similares foram registrados por Zarei et al. (2008), os quais constataram que propágulos deste fungo foram os únicos que se mantiveram presentes em solos com altos teores de Zn (6.472mg kg^{-1}) e Pb (5.203mg kg^{-1}). Diversos autores têm reportado este mesmo gênero em áreas contaminadas com elementos-traço (Klauberg Filho et al., 2002).

A colonização micorrizica em *Brachiaria*, nos ambientes A2EL e P teve um valor médio de 48,6% e 49% respectivamente, valores maiores aos reportados por Klauberg Filho et al. (2002) que encontrou colonização de 20% em espécies de gramíneas crescidas na mesma área do presente estudo, antes da reabilitação. A colonização encontrada neste trabalho foi semelhante à verificada por Griffioen (1994) em *Agrostis capillaris*, que apresentou colonização extensiva em solo contaminado por Zn e Cd, e por Cordeiro et al. (2005) quem encontrou colonização abundante em cultura de gramíneas.

4.3 Estrutura da comunidade de bactérias e fungos

A separação dos amplicons de rDNA 16S de *Bactéria* por DGGE (Figura 6) permitiu detectar a presença de 83 bandas com diferente mobilidade no gel de poliacrilamida. A riqueza de espécies (Se) para cada amostra,

representada pelo número total das diferentes bandas detectadas. A área que apresentou o maior valor de S_E foi A1EL, com 33,3% e o menor foi verificado na área SV, com 19,7% do total de amplicons (Figura 7).

As imagens das análises do agrupamento hierárquico com base no perfil dos amplicons do gene rRNA 16S são mostradas na Figura 8, indicando que as amostras não se agruparam em função dos tratamentos. As estruturas das comunidades não apresentam alterações causadas pelas altas concentrações de elementos-traço, não havendo uma forte relação entre os níveis de contaminação e a diversidade mostrada na análise do DGGE das bactérias. Esses resultados diferem de diversos estudos em áreas contaminadas, os quais reportam que existe um decréscimo no número de bandas à medida que aumenta a concentração do metal e que os efeitos tóxicos na comunidade dependem do tipo e concentração do mesmo. (Wang et al., 2007; Li et al., 2006; Hu et al., 2007).

Na área SV, a presença de bandas foi considerada alta para um solo nessas condições de contaminação. É possível que os microrganismos presentes nesta área tenham sido provenientes da água de irrigação, prática constante desenvolvida pela empresa para evitar a dispersão pelo vento do solo contaminado.

Observa-se, na Figura 8, que os solos das áreas reabilitadas se agruparam com a área de C. Esse fato pode ser justificado pela adição de solo, o qual foi proveniente de área de cerrado, levando a comunidade original desse ambiente, a qual se somaria à da própria área contaminada, refletindo no número de amplicons na A1 e na A2, visualizados na Figura 7.

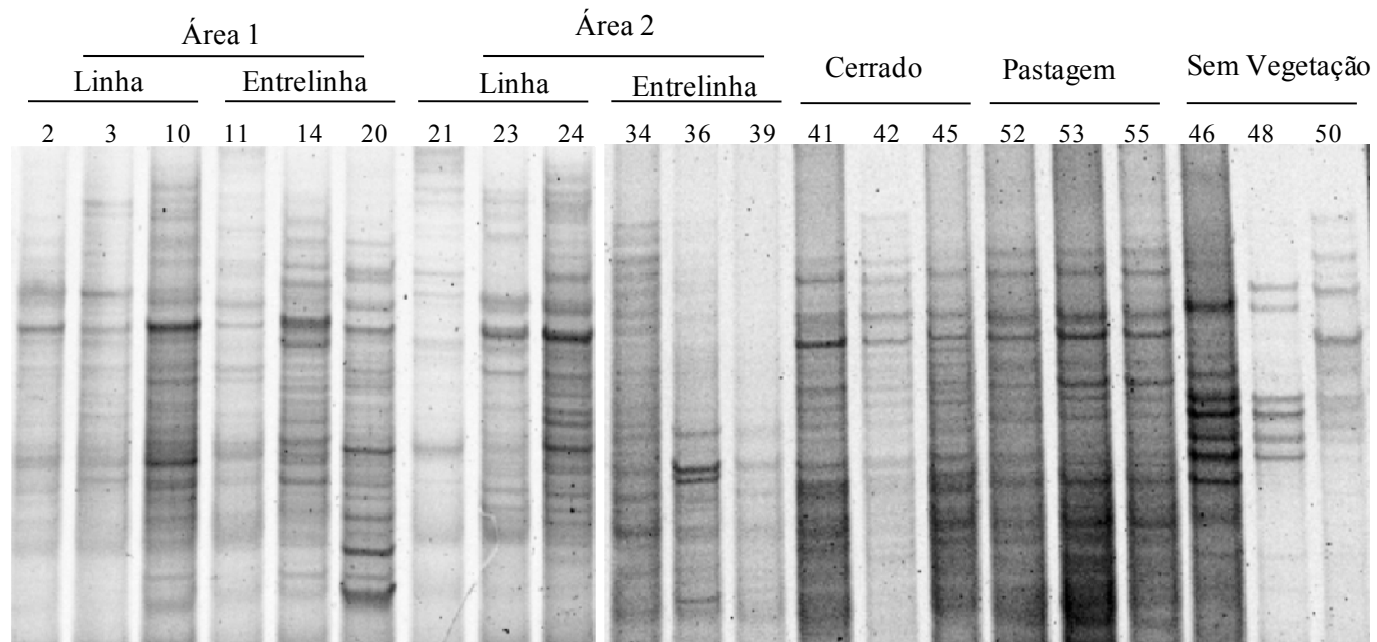


FIGURA 6 Amplicons da região V3 do rRNA 16S de *Bactérias* amplificados de DNA metagenômico do solo contaminado com elementos-traço após programas de reabilitação.

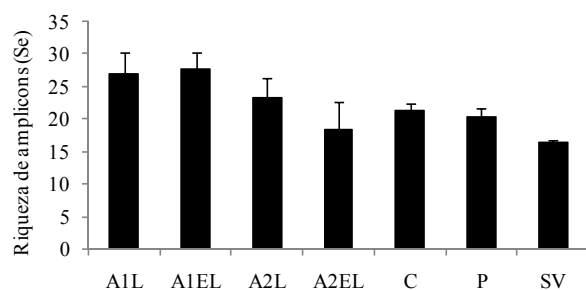


FIGURA 7 Riqueza de amplicons (Se) da região do rRNA 16S de *Bactérias* com base no número de bandas após DGGE. Os dados apresentam a média de três repetições \pm erro padrão da média.

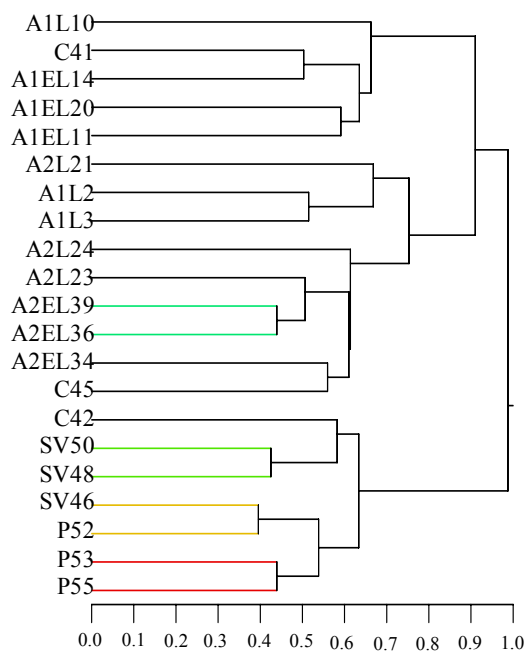


FIGURA 8 Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de *Bactéria* de áreas contaminadas com elementos-traço após programas de reabilitação.

Estes resultados evidenciam que o comportamento dos microrganismos não depende de um fator apenas, mas são influenciados por vários parâmetros (Moreira & Siqueira, 2006). Assim, o comportamento em cada área é dependente das características químicas, físicas e antropogênicas, como pH, matéria orgânica, disponibilidade de nutrientes, condições de cobertura, substituição de solo e presença de contaminantes, como os elemento-traço. Além disso, este fato pode ser explicado pela natureza dos contaminantes mais abundantes neste trabalho, o Zn e Cu, os quais são essenciais ao crescimento dos organismos, funcionando como catalisadores das reações bioquímicas, estabilizadores de estrutura de proteínas e paredes celulares, sendo constante a interação da célula com estes elementos.

As bactérias têm desenvolvido alta capacidade de adaptação aos diferentes ambientes, incluindo, em alguns casos, os contaminados por elementos-traço, por meio de diferentes mecanismos de resistência mediados pelos transposons cromossômicos e os plasmídeos (Briuns et al., 2000). Tem sido reportado que as bactérias podem resistir a altos teores desses elementos por mecanismos de exclusão, alteração da permeabilidade das barreiras celulares (Cu e Cd), transporte ativo do metal fora da célula (Pb, Cd, Cu, Zn), sequestro intracelular de metais por proteínas de ligação (Cd, Cu e Zn) e redução da sensibilidade ao metal por alteração dos componentes da membrana celular (Cu, Cd) (Briuns et al., 2000).

Na Figura 9 é apresentada a separação dos amplicons da região ITS para os fungos, por meio do DGGE. A análise do gel evidenciou a presença de 113 bandas distintas nas amostras avaliadas. A riqueza dos amplicons (Se) para os fungos foi diferenciada entre as áreas (Figura 10), mostrando uma diminuição no número de amplicons nas áreas com maiores concentrações de elementos-traço, com valores de Se de 7,1% (A1EL) e 8,3% (SV) e aumento nas áreas controle C e P com 23% e 26,6 %, respectivamente. Na Figura 11, pode-se observar

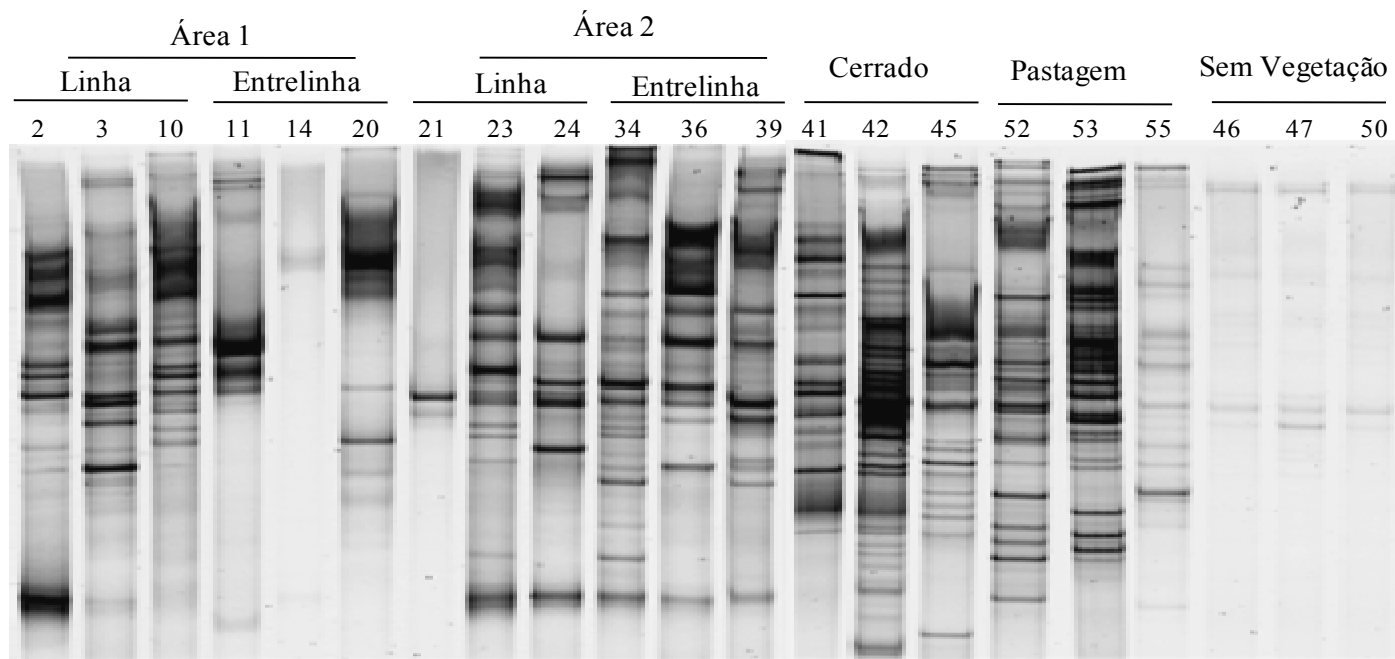


FIGURA 9 DGGE de amplicons de *Fungos* da região ITS, de áreas contaminadas com elementos-traço após programas de reabilitação.

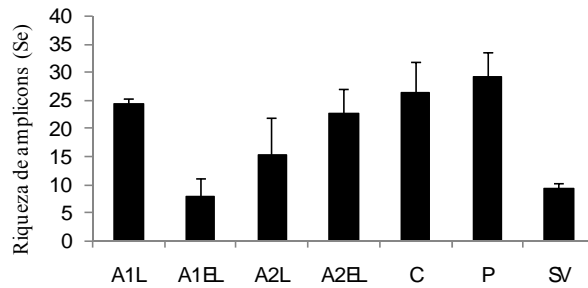


FIGURA 10 Riqueza de amplicons (Se) da região ITS de Fungos, com base no número de bandas após DGGE. Os dados apresentam a média de três repetições \pm erro padrão da média.

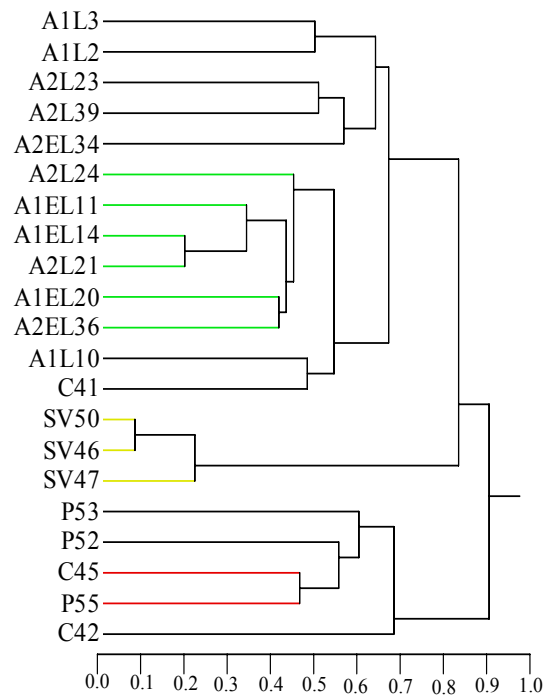


FIGURA 11 Agrupamento hierárquico da região ITS dos *Fungos* do DNA metagenômico total de solos contaminados com elementos-traço após de programas de reabilitação.

o agrupamento hierárquico, o qual mostrou uma diferenciação entre os tratamentos, estabelecendo, de forma geral, dois grandes grupos, um com os solos SV e os solos submetidos a programas de revegetação e o outro com os solos controle sem contaminação (C e P), mostrando que a diversidade de fungos nas áreas naturais e revegetadas tem comportamento similar.

Existem poucos estudos, no âmbito molecular, sobre influência dos metais na estrutura da comunidade fúngica, a maior parte deles limitada ao estudo do comportamento das comunidades das bactérias e actinobactérias (Khan et al., 2009; Wang et al., 2007; Li et al., 2006; Hu et al., 2007). Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a diversidade de fungos (Figura 9) diminuiu à medida que aumentou a concentração de Zn, Cd, Cu e Pb. Anderson et al. (2008) relataram que, quando os teores dos elementos-traço estão em baixos níveis, perto do limite permissível, a estrutura da comunidade fúngica não é afetada.

De forma geral, tanto nas análises do DGGE feitas para bactérias como para fungos, constatou-se que a implantação dos programas de revegetação induz ao aumento da diversidade, sendo similar a riqueza de amplicons nas áreas revegetadas com as áreas controle (P e C), indicando que a estrutura da comunidade está se recuperando. É conhecido que a coexistência entre plantas e microrganismos ajuda a diminuir a toxicidade dos metais no solo, fazendo com que essas áreas sejam mais favoráveis para o crescimento de diversos organismos, cujas interações levam a atingir a estabilidade do ecossistema. Esta resposta sugere que a vegetação tolerante em combinação com os microrganismos associados tem papel importante na reabilitação dos solos (Guo et al., 2009).

Os resultados obtidos para as bactérias na contagem e na diversidade mostraram que os teores de metal afetaram com maior intensidade a densidade (Figura 3a) que a diversidade (Figura 7), confirmando que, embora muitos

microrganismos estejam presentes em uma ambiente, nem sempre eles são detectados pelo método de contagem. Além disso, muitas bactérias precisam de condições especiais para o crescimento, evidenciando, dessa maneira, que o número de bactérias cultiváveis é menor que as realmente presentes, ressaltando a importância da junção dos métodos convencionais e moleculares.

Nos fungos, os resultados mostraram que os altos teores de metal afetaram a diversidade (Figura 10), mas não a densidade (Figura 3c), indicando que os elementos-traço podem ter efeitos seletivos, resultando na substituição de diversas espécies e no estabelecimento de espécies resistentes ou tolerantes, deixando só as cosmopolitas ou tolerantes (Schoenlein et al., 2008). Estudos de Tatsuyama et al. (1974), no Japão, revelaram que os solos poluídos por elevadas doses de metais apresentavam diversidade de fungos reduzida, mas com grande ocorrência de espécies cosmopolitas e tolerantes, como as de *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, resultados similares aos do presente estudo, no qual foram encontradas só espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*.

4.4 Fungos cultiváveis

Dos isolados de fungos obtidos foram selecionados os sete mais representativos das áreas com maiores teores de elementos-traço [Área SV (Isolados 1, 6 e 8), Área 1EL (Isolados 2 e 3), Área 1L (Isolados 4 e 5)]. Segundo a caracterização morfológica, os isolados foram identificados como *P. corylophilum* (Isolado 1), *A. niger* (Isolado 2 e 3), *P. purpurogenum* (Isolado 4), *P. citrinum* (Isolado 5), *P. mineoluteum* (Isolado 6) e *P. variable* (Isolado 8)

Com a sequência dos isolados foi construída uma árvore filogenética com todos os pertencentes ao gênero *Penicillium*. Os isolados pertencem a espécies e grupos diferentes de *Penicillium*, mas sem diferenciação de táxons próximos, como *P. citrinum*, *P. griseofulvum* e *P. westlingii*, no caso do isolado 5, mas que também ocorreu para os isolados 1, 4 e 8. Por isso, posteriormente,

foi realizada uma nova análise para cada isolado, com um grupo externo mais próximo, para permitir melhor diferenciação entre as espécies próximas, levando a uma maior confiabilidade na identificação molecular.

4.4.1 Isolado 1

Para o isolado 1, obtido do solo contaminado com Zn (14592 mg/dm³), Cd (738,6 mg/dm³), Cu (500,3 mg/dm³) e Pb (45,1 mg/dm³), com pH de 5,7 e umidade 26,42%, foi obtida uma região consenso de 300 nucleotídeos, da região ITS1- 5.8 – ITS 2, de dois sequenciamentos bidirecionais. A sequência, quando foi comparada no GenBank com o auxílio do Blastn, apresentou similaridade com as sequências de espécies dos gêneros *Penicillium*, *Melanospora* e *Paecilomyces*, variando de 92% ao 96% de identidade e e-value de 0 a 8×10^{-129} . As 99 sequências alinhadas apresentaram similaridade de 96% (*P. brefeldianum*), 95% (*P. reticulosum*, *P. levitum* e *P. fuscum*), 95% e 94% (*P. daleae*, *P. boreae* e *P. simplisium*), de 94% (*P. javanicum*, *P. dravuni*, *P. ehrlichii*, *P. canariense*, *P. piscarium*, *P. katagense*, *P. donkii* e *P. stolkiaei*), de 94% e 93% (*P. ochrochloron* e *P. janthinellum*), de 93% (*P. melinii*, *P. hirsutum*, *P. restrictum*, *P. decumbens*, *P. brassilianum* e *P. saccula*), de 93% e 92% (*P. citreogenium*), de 92% (*P. oxalicum*, *P. toxicarium*, *P. pulvillorum*, *P. expansum* e *P. corylophylum*). Houve similaridade de 95% com os gêneros *Melanospora* e *Paecilomyces*.

Para a análise filogenética escolheram-se sequências representantes do gênero *Eupenicillium* e algumas espécies obtidas inicialmente no Blastn para o isolado 1 (Figura 12). Os resultados mostram que a espécie mais próxima para o isolado 1 é *Penicillium brefeldianum*, a qual produz ascósporos lenticulares, com 3 a 3,5 µm no eixo longitudinal; sulco evidente, mas não pronunciado; paredes finamente equinuladas; monoverticiliada e as colônias não produzem

pigmentação abundante vermelho a marrom-avermelhado sobre a maioria dos substratos.

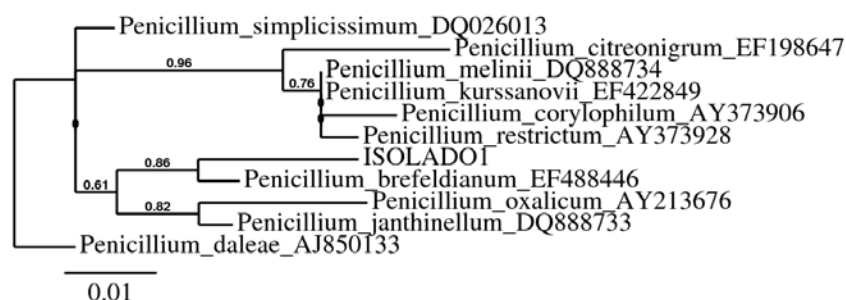


FIGURA 12 Árvore filogenética por máxima verossimilhança do isolado 1, obtido de solo com elevados teores de elementos-traço, do gênero *Penicillium* com espécies próximas, baseado nas seqüências da região ITS, com *P. daleae* como grupo externo.

4.4.2 Isolados 2 e 3

Na identificação molecular, o sequenciamento da região ITS1- 5.8 – ITS 2 dos isolados 2 e 3, encontrados no solo contaminado com Zn (7342 mg/dm³), Cd (51,9 mg/dm³), Cu (160,2 mg/dm³) e Pb (92,8 mg/dm³), com pH de 7,4 e umidade 14,32%, foi obtida uma região consenso de 471 e 509 nucleotídeos, respectivamente, de dois sequenciamentos bidirecionais. No GenBank, as seqüências apresentaram similaridade com as espécies do gênero *Aspergillus*, variando de 100% a 97% de identidade e e-value de 0. As 96 e 97 seqüências alinhadas no isolado 2 e 3, respectivamente, apresentaram similaridade entre 100% e 99% (*A. brasiliensis*), 100% e 98% (*A. niger*), 99% (*A. phoenicis*) e 98% (*A. ficuum*, *A. usami*, *A. awamori* e *A. foetidus*) para o isolado 2 e de 99% (*A. phoenicis*), 99% e 98% (*A. brasiliensis*), 98% e 97% (*A. niger*, *A. foetidus* e *A. awamori*) e 97% (*A. piperis* e *A. tubingensis*). Na análise filogenética dos isolados 2 e 3, foram escolhidas seqüências obtidas inicialmente no Blastn,

alguns representantes do gênero *Aspergillus* seção **nigri** e, como grupo externo, *Aspergillus ochraceus* (Figura 13).

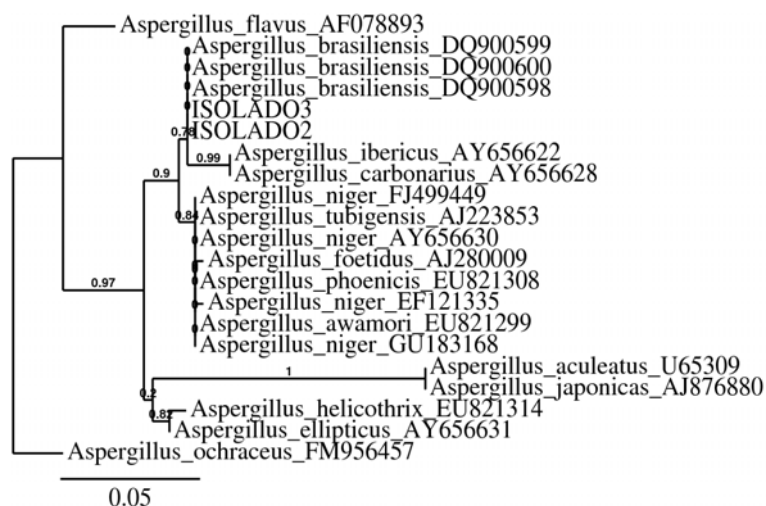


FIGURA 13 Árvore filogenética por máxima verossimilhança dos isolados 2 e 3, obtidos de solo com elevados teores de elementos-traço, do gênero *Aspergillus* com espécies próximas, baseado nas seqüências da região ITS, com *A. ochraceus* como grupo externo.

Os resultados encontrados mostraram que os isolados 2 e 3 são identificados como *Aspergillus brasiliensis*, espécie originária de solo brasileiro, recentemente identificada (Varga et al., 2007), sendo o primeiro registro de *A. brasiliensis* em solos contaminados com elementos-traço.

Varga et al. (2007) descrevem a *A. brasiliensis* como pertencente à seção **Nigri**, caracterizando-se por ter diâmetro da colônia após 7 dias de incubação no meio CYA a 25 e 37°C e meio CYAS a 25°C; 71-76mm, MEA 52-70mm, YES 75-80mm, AO 32-36mm, CREA 32-44mm, pobre crescimento e produção de ácido forte. Colônias inicialmente brancas, depois se tornando marrons a pretas; exsudados ausentes, reverso cor creme ou castanho-claro.

Cabeças dos conídios globosas no início e, depois, radiadas, ocasionalmente desenvolvendo-se em várias colunas de conídios, estípites 700 – 1700 x 8-13mm, paredes finas, suaves, marrom-claras, vesículas de 30-45mm de comprimento, quase globosa, bisseriada, métula cobrindo virtualmente a superfície inteira das vesículas, medidas de 22-30 x 3-6 μm , fiálides na forma de balão, de 7 a 9 x 3-4 μm , conídios subglobosos de 3,5-4,8 mm em diâmetro, equinulado. Todas as culturas produzem vários naphtho-c-pyrones, tensidol A e B e pirofeno

A. brasiliensis tem alta produção de xilanase e β -xylosidase (com valores ótimos de crescimento em pH 5 e temperatura de 75°C) com alta estabilidade (62% durante 1h a 60°C e 38% a 75°C) e especificidade enzimática (Pedersen et al., 2007). Enzimas degradadoras de xilane têm ampla aplicação na indústria de papel como auxiliares no branqueamento de polpas kraft, produção de pão e alimento de animais. Além disso, os fungos são organismos com alta potencialidade, já que têm a capacidade serem termotolerantes e de produzir enzimas termoestáveis (Castro, 1997). Além da grande vantagem de *A. brasiliensis* ser uma espécie não produtora de ocratoxina A (Pedersen et al., 2007).

4.4.3 Isolado 4

Na identificação molecular, o sequenciamento da região ITS1- 5.8 – ITS 2, chamado de isolado 4, encontrado no solo contaminado com Zn (5831mg/dm³), Cd (152,9 mg/dm³), Cu (375,4 mg/dm³) e Pb (82,2 mg/dm³), com pH de 7,1 e umidade 16,48%, foi obtida uma região consenso de 458 nucleotídeos, de dois sequenciamentos bidirecionais. A sequência, quando foi comparada no GenBank com o auxílio do Blastn, apresentou similaridade com as espécies dos gêneros *Penicillium*, *Talaromyces*, *Acremonium* e *Erythrogymnotheca*, variando de 94% a 96% de identidade e e-value de 0. As 81 sequências alinhadas apresentaram similaridade de 96% (*Penicillium*

aculeatum), 95% (*P. aculeatum*, *P. pinophilum*, *Talaromyces flavus*=*P. vermiculatum*, *T. macrosporus* = *T. flavus*, *Penicillium dextrii*, *T. intermedius*, *P. verruculosum* e *P. marneffii*) e 94% (*P. aculeatum*, *P. pinophilum*, *P. vermiculatum*, *T. macrosporus*, *Acremonium cellulolyticus*, *P. verruculosum*, *P. marneffii*, *P. funiculosum*, *T. galapagensis* e *Erythrogymnotheca paucispora*).

Para a análise filogenética, escolheu-se uma das sequências similares ao isolado 4, encontradas inicialmente no Blastn e algumas representantes do gênero *Eupenicillium* (Figura 14).

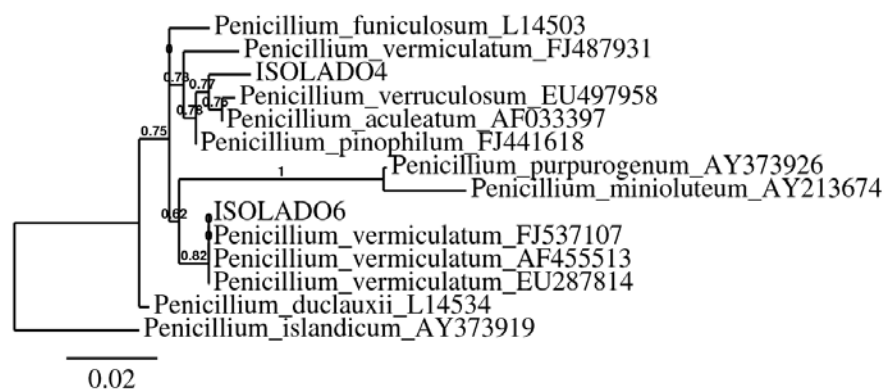


FIGURA 14 Árvore filogenética por máxima verossimilhança dos isolados 4 e 6, obtidos de solo com elevados teores de elementos-traço, do gênero *Penicillium* com espécies próximas, baseado nas sequências da região ITS, com *P. islandicum* como grupo externo.

Os resultados não mostram com exatidão a qual espécie de fungo pode pertencer este isolado, embora, na análise taxonômica convencional, tenha sido identificado como *Penicillium purpurogenum*.

P. purpurogenum se caracteriza por apresentar colônias no meio CYA de 15-30 mm de diâmetro, plano ou radial, micélio amarelo claro ou vermelho, conidiogênese de moderada a forte, exsudados laranja a vermelho, reverso

vermelho-escuro ou roxo, aproximando-se a preto, e no meio MEA, colônias de 22-35 mm de diâmetro, planas, densas, de micélio branco a amarelo-claro, reverso usualmente pálido, frequentemente marrom a vermelho-escuro no centro. Os conidióforos são suportados desde a superfície ou micélio aéreo, stipes de 70 -300µm de longo, paredes suaves, terminal biverticiliate, metulas e fialides apresada, cada 10-14µm de longo, conídio elipsoidal, algumas vezes começa a ser subesferoidal na maduras, 3,0-3,5 µm de longo, com paredes finas, finamente ásperas ou verrugosas, nascendo em cortas e cadeias irregulares (Pitt, 1985). É um dos poucos fungos que sintetizam a enzima β-glucosidase intracelular (Dhake et al., 2007), que é da classe das hidrolases que hidrolisam resíduos de glicose, além de várias xilanases, responsáveis pela quebra da xilana, um polissacarídeo hemicelulósico (Belancie et al., 1995).

4.4.4 Isolado 5

Na identificação molecular, no sequenciamento da região ITS1- 5.8 – ITS 2 do isolado 5, encontrado em solo contaminado com elementos-traço [Zn (3488 mg/dm³), Cd (212,2 mg/dm³), Cu (235,7 mg/dm³) e Pb (39,7 mg/dm³), com pH de 7,1 e umidade 16,42%], foi obtida uma região consenso de 405 nucleotídeos, de dois sequenciamentos bidirecionais. A sequência, quando comparada no GenBank, com o auxílio do Blastn, apresentou similaridade com as espécies do gênero *Penicillium*, variando entre 98% e 99% de identidade, com um e-value de 0. As 77 sequências alinhadas apresentaram similaridade de 99% (*P. citrinum*, *P. griseofulvum*, *P. westlingii* e *P. sartoryi*) e 98% (*P. citrinum*).

Para a análise filogenética, escolheram-se sequências pertencentes ao gênero *Eupenicillium* e algumas espécies obtidas inicialmente no Blastn para este mesmo isolado (Figura 15).

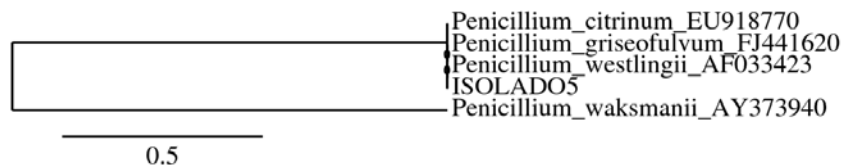


FIGURA 15 Arvore filogenética por máxima verossimilhança do isolado 5, obtido de solo com elevados teores de elementos-traço, do gênero *Penicillium* com espécies próximas, baseado nas seqüências da região ITS, com *P. waksmanii* como grupo externo.

Os resultados indicaram que este isolado tem similaridade com *P. citrinum*, *P. griseofulvum* e *P. westlingii*. Nas análises morfológicas, havia sido identificado como *P. citrinum*, indicando que, possivelmente, trata-se desta última espécie.

Penicillium citrinum apresenta colônias no meio CYA de 25-30mm de diâmetro, radiais, algumas vezes flocosas no centro, micélio branco nas áreas periféricas, no centro branco a laranja-acinzentado, conidiogênese moderada, cor turquesa-acinzentada, exsudado claro, amarelo-pálido ou marrom-pálido a marrom-avermelhado, raramente ausente, pigmentos solúveis amarelo-claros ou ausentes, reverso amarelo, marrom-amarelo, marrom-avermelhado, amarelo ou oliva.

As colônias no meio MEA têm de 14 a 18mm de diâmetro, raramente 22mm, planas ou radiais, micélio branco a laranja-acinzentado, conidiogênese de moderada a forte, de cor azul-acinçado nas margens. Apresenta conidióforos saindo desde a subsuperfície ou superfície das hifas, estipes de 100-300µm de comprimento, paredes suaves, terminação em verticilos bem definida, de 3-5 metulas divergentes (Pitt, 1985).

4.4.5 Isolado 6

Na identificação molecular, sequenciamento da região ITS1- 5.8 – ITS 2 do isolado 6, encontrado em solo contaminado com elementos-traço [Zn (14592mg/dm³), Cd (738,6 mg/dm³), Cu (500,3 mg/dm³) e Pb (45,1 mg/dm³) com um pH de 5,7 e uma umidade 26,42%], foi obtida uma região consenso de 447 nucleotídeos, de dois sequenciamentos bidirecionais. A sequência, quando foi comparada no GenBank com o auxílio do Blastn, apresentou similaridade com as espécies do gênero *Penicillium*, *Talaromyces* e *Acremonium*, entre 96% e 100% de identidade, com um e-value de 0. As 76 sequências alinhadas apresentaram similaridade de 100% (*Penicillium pinophilum*), 99% (*T. flavus*=*P. vermiculatum*), 98% (*P. vermiculatum*), 97% (*P. funiculosum*, *T. macrosporus*, *P. pinophilum* e *P. mineoluteum*), 96% (*P. vermiculatum*, *Talaromyces stipitatus*, *P. pinophilum*, *T. derxii*, *T. panasenkoi*, *T. stipitatus*, *P. verruculosum*, *T. intermedius*, *Acremonium cellulitycus* e *P. marneffeii*).

A análise filogenética do isolado 6 (Figura 14) mostrou alta similaridade com *Penicillium vermiculatum*. Esta espécie apresenta colônias de 18-30mm de diâmetro em meio CYA, planas, com micélio amarelo-claro ou marrom, exsudados ocasionais, reverso algumas vezes amarelo, mas usualmente laranja, vermelho ou marrom, colônias no meio MEA de 30-50mm de diâmetro similares ao meio CYA. Presença abundante de gymnotheca amarela. Esta espécie é comumente encontrada em solos (Pitt, 1985).

4.4.6 Isolado 8

Na identificação molecular, sequenciamento da região ITS1- 5.8 – ITS 2 do isolado 8, encontrado em solo contaminado com elementos-traço [Zn (14035mg/dm³), Cd (672,3 mg/dm³), Cu (309,3 mg/dm³) e Pb (33,8 mg/dm³) com pH de 4,5 e umidade de 26,84%], foi obtida uma região consenso de 521 nucleotídeos, de dois sequenciamentos bidirecionais. A sequência, quando

comparada no GenBank, com o auxílio do Blastn, apresentou similaridade com as espécies do gênero *Talaromyces*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Chromoclesta*, *Hamigera*, *Byssochlamys*, *Eupenicillium* e *Sagenomella*, entre 86% e 98% de identidade, com e-value de $0-9 \times 10^{-144}$. As 58 sequências alinhadas apresentaram similaridade de 98% e 97% (*Talaromyces wortmanni*=*Penicillium kloecker* e *P. variabile*), 97% (*P. radicum*), 96% (*Talaromyces wortmanni*, *P. islandicum*), 95% (*Penicillium rugulosum*), 94% (*Penicillium radicum*, *Talaromyces rotundus*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium islandicum*, *Penicillium piceum*, *Talaromyces tardifaciens* e *Sagenomella griseovidis*), 93% (*Penicillium islandicum*, *Penicillium piceum* e *Talaromyces rotundus*), 91% (*Talaromyces bacillisporus*), 89% (*Talaromyces hachijoensis*), 88% (*Talaromyces subinflatus*, *T. emodensis*, *T. ocoti*, *Byssochlamys zollerniae* e *Paecilomyces saturatus*), 87% (*Paecilomyces divaricatus*, *P. variotii*, *Hamigera stricta* e *B. nivea*) e 86% (*Penicillium resedanum*, *T. mimosinus*, *P. chermesinum*, *Hamigera avellanea*, *Eupenicillium eurebescens* e *Talaromyces striatus*).

Para a análise filogenética, escolheram-se sequências similares encontradas inicialmente no Blastn e algumas representantes do gênero *Eupenicillium* (Figura 16). Os resultados indicaram similaridade com espécies de *P. rugulosum*, *P. islandicum* e *P. fellutanum*, sendo a de maior similaridade *P. variabile* (LI4507).

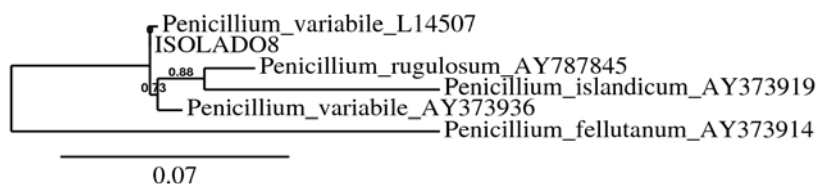


FIGURA 16 Árvore filogenética por máxima verossimilhança do isolado 8, obtido de solo com elevados teores de elementos-traço, do gênero *Penicillium* com espécies próximas, baseado nas sequências da região ITS, com *P. fellutanum* como grupo externo.

Penicillium variable apresenta colônias no meio CYA e MEA de 15-22 mm de diâmetro, planas ou irregulares, baixas e densas, micélio comumente de cor amarelo-sulfuroso, usualmente conspícuo só na margem e, próximo do centro da colônia, produz exsudados ocasionalmente. É uma espécie cosmopolita que, frequentemente, é isolada de solos.

Os resultados encontrados mostraram que os isolados 1 e 5, possivelmente, são as espécies *Penicillium brefeldianum* e *Penicillium citrinum*, respectivamente, embora com baixa confiabilidade. No caso do isolado 4, não foi possível definir uma espécie similar para este, podendo ser uma nova espécie e/ou os dados obtidos não são suficientes para conhecê-la. Esses resultados evidenciam a necessidade de apoiar os métodos moleculares com os convencionais. Da mesma maneira, também foi visto que o rDNA, embora seja o mais usado pelo grande número de cópias e de espécies que possuem suas sequências na base de dados, nem sempre pode resolver relações filogenéticas de alguns grupos, sendo necessário o uso de sequências de vários genes, tais como a tubulina, o fator de alongação α e as subunidades na RNA polimerase II (TUB, EF1 α , RPB1 e RPB2, respectivamente) e, assim, ser possível obter dados mais confiáveis (Hibbett et al., 2006).

Os resultados da identificação morfológica e molecular (Tabela 4) mostraram que só 28% dos isolados (5 e 8) apresentaram a mesma identificação taxonômica. Estudos de taxonomia suportados por identificação morfológica e molecular oferecem maior confiabilidade, embora a identificação molecular requeira o sequenciamento de vários genes para ter certeza nos resultados e, na identificação convencional, é necessário rever as chaves taxonômicas, as quais precisam ser constantemente atualizadas para incluir as novas espécies identificadas.

No caso dos isolados 2, 3, 6 e 8, foi possível a identificação ao nível da espécie. Os isolados 2 e 3 foram identificados como *Aspergillus brasiliensis*,

espécie esta próxima *A. niger*, a qual tem sido reportada pela sua alta capacidade de crescimento em altos teores de metais (Iram et al., 2009). *A. brasiliensis* é uma espécie promissora para futuros estudos envolvendo a retenção de elementos-traço e cuja manipulação é facilitada pelo fato de o mesmo não produzir micotoxinas (Pedersen et al., 2007).

TABELA 4 Identificação morfológica e molecular dos isolados fungicos obtidos de solos contaminados submetidos a programas de reabilitação e de referencia sem vegetação

ISOLADO	AREA	IDENTIFICAÇÃO	
		Morfológica	Molecular
1	SV	<i>P. corylophilum</i>	<i>P. brefeldianum</i>
2	A1,EL	<i>A. niger</i>	<i>A. brasiliensis</i>
3	A1,EL	<i>A. niger</i>	<i>A. brasiliensis</i>
4	A1,L	<i>P. purpurogenum</i>	Similar com: <i>P. aculeatum</i>
5	A1,L	<i>P. citrinum</i>	Similar com <i>P. citrinum</i>
6	SV	<i>P. mineoluteum</i>	<i>P. vermiculatum</i>
8	SV	<i>P. variabile</i>	<i>P. variabile</i>

P. variabile (Isolado 8) já havia sido reportado crescendo em altos de teores de Zn (até 1000mg/dm³) e Pb (1000mg/dm³) e *P. citrinum*, em Zn (100mg/dm³) em áreas contaminadas (Schoenlein et al., 2008), enquanto para *Penicillium vermiculatum* e *Penicillium brefeldianum* não foram encontrados relatos de ocorrência em áreas contaminadas com os elementos-traço, sendo interessante o estudo detalhado desses isolados para serem utilizados na remediação de áreas contaminadas.

5 CONCLUSÕES

Áreas contaminadas com elementos-traço, após programas de reabilitação, apresentam elevada densidade e diversidade de microrganismos no solo.

Houve relação inversa entre a densidade de vários grupos microbianos e os teores de elementos-traço, sendo observada menor sensibilidade de fungos do solo em comparação a bactérias e actinobactérias.

As áreas submetidas aos programas de reabilitação apresentaram maior densidade e diversidade de FMAs que as áreas sem contaminação C e P, e a área SV, tendo o gênero *Glomus* sido encontrado em todos os ambientes estudados.

Análises com DGGE revelaram maior diversidade de fungos e bactérias em áreas reabilitadas, em comparação com a área sem vegetação.

Vários fungos filamentosos foram identificados em solos com elevada contaminação, destacando-se *Penicillium brefeldianum*, *P. purpurogenum*, *P. citrinum*, *P. variabile* e *Aspergillus brasiliensis*, sendo *A. brasiliensis* o primeiro relato de ocorrência em solos contaminados por elementos-traço.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCIOLY, A. M. A. **Amenizantes e estratégias para o estabelecimento de vegetação em solos de áreas contaminadas por metais pesados**. 2001. 170 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. New York: J. Willey, 1993. 339p.
- ANDERSON, I. C.; PARKIN, P. I.; CAMPBELL, C. D. DNA and RNA-derived assessments of fungal community composition in soil amended with sewage sludge rich in cadmium, copper and zinc. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 9, p. 2358-2365, Sept. 2008.
- BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal Plant Nutrition**, New York, v. 3, n. 1/4, p. 643-654, 1981.
- BAMBOROUGH, L.; CUMMINGS, S. P. The impact of increasing heavy metal stress on the diversity and structure of the bacterial and actinobacterial communities of metallophytic grassland soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 45, n. 3, p. 273-280, Feb. 2009.
- BELANCIE, A.; SCARPA, J.; PEIRANO, A.; DIAZ, M.; SFEINER, J.; EYZAGUIRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 71-79, July 1995.
- BRIUNS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicological Environmental Safety**, New York, v. 45, n. 3, p. 198-207, Mar. 2000.
- CAPRONI, A. L.; FRANCO, A. A.; BERBARA, R. L. L.; TRUFEM, S. B.; GRANHA, J. R. D. O.; MONTEIRO, A. B. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em áreas revegetadas após mineração de bauxita em Porto Trombetas, Pará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1409-1418, dez. 2003.

CASTRO, L. P. M.; TREJO-AGUILAR, B. A.; OSORIO, G. A. Thermostable xylanases produced at 37°C and 45°C by a thermotolerant *Aspergillus* strain. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 146, n.1, p. 97-102, Oct. 1997.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL.
Decisão da Diretoria Nº 195/2005 de 23/11/2005. São Paulo: CETESB, 2005.
Disponível em:
<http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf>. Acesso em: 6 abr. 2005.

CORDEIRO, M. A. S.; CARNEIRO, M. A. C.; PAULINO, H. B.; SAGGIN J. O. J. Colonização e densidade de esporos de fungos micorrízicos em dois solos do cerrado sob diferentes sistemas de manejo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 3, p. 147-153, set./dez. 2005.

CURY, J. C.; SIQUEIRA, J. O.; GRAZZIOTTI, P. H.; MOREIRA, F. M. S. Amenização da toxidez de metais pesados por calcário, solomax e vermicomposto em dez espécies de eucalipto. In: FERTBIO, 1998, Caxambu. **Anais...** Lavras: UFLA/SBCS, 1998. p. 819.

DEREEPER, A.; GUIGNON, V.; BLANC, G.; AUDIC, S.; BUFFET, S.; CHEVENET, F.; DUFAYARD, J. F.; GUINDON, S.; LEFORT, V.; LESCOT, M.; CLAVERIE, J. M.; GASCUEL, O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, n. 2, p. W465-W469, Apr. 2008.

DHAKE, A. B.; PATIL, M. B. Effect of substrate feeding on production of fructosyltransferase by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 194-199, abr./jun. 2007.

DIAS JÚNIOR, H. E.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; SILVA, R. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 22, n. 4, p. 631-640, jul. 1998.

GAAD, G. M. Biorremedial potential of microbial mechanism of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 11, n. 3, p.271-279, June 2000.

GERDEMANN, J. B.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 235-246, June 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Cambridge, v. 84, n. 3, p. 484-500, Mar. 1980.

GOOGLE EARTH. Disponível em: <<http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&tab=wl>> Acesso em: 8 fev. 2009.

GOMIDE, P. H. O. **Atributos físicos, químicos e biológicos do solo em ambientes de voçorocas no município de Lavras**. 2009. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências do solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GREMION, F. **Analysis of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods**. 2003. 107p. Thèse (Doctorat Environment Natural) – École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne.

GRIFFIOEN, W. A. J. Characterization of a heavy metal-tolerant endomycorrhizal fungus from the surroundings of a zinc refinery. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 4, n. 5, p. 197-200, June 1994.

GUILHERME, L. R. G.; MARCHI, G. Elemento-traço: os metais pesados no solo. **DBO Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 5, p. 20-21, out. 2005.

GUO, Z.; MEGHARAJ, M.; BEER, M.; MING, H.; RAHMAN, M. M.; WU, W.; NAIDU, R. Heavy metal impact on bacterial biomass based on DNA analyses and uptake by wild plants in the abandoned copper mine soils. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 17, p. 3831-3836, Sept. 2009.

HIBBETT, D. S.; TSUNEDA, A.; MURAKAMI, M. The Secotioid From of *Lentinus tigrinus*: Genetics and Development of a Fungal Morphological Innovation. **American Journal of Botany**, New York, v. 81, n. 4, p. 466-478, Apr. 1994.

HILL, G. T.; MITKOWSKI, N. A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L. R.; JURKONIE, D. D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S. T.; NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.15, n. 1, p. 25-36, Aug. 2000.

HU, Q.; DOU, M. N.; QI, H. Y.; XIE, X. M.; ZHUANG, G. Q.; YANG, M. Detection, isolation, and identification of cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 19, n. 9, p. 1114-1119, Sept. 2007.

IRAM, S.; AHMAD, I.; JAVED, B.; YAQOOB, S.; AKHTAR, K.; KAZMI, M. R.; ZAMAN-UZ, B. Fungal tolerance to heavy metals. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v. 41, n. 5, p. 2583-2594, 2009.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC, 2001. 413p.

KELLY, J. J.; HÄGGLOM, M. M.; TATE, R. L. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, n. 2, p. 65-71, July 2003.

KLAUBERG FILHO, O. **Ecologia e atividade de fungos micorrizicos arbusculares em solo poluído com metais pesados**. 1999. 161p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

KLAUBERG FILHO, O.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Fungos micorrizicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 26, n. 1, p.125-134, jan. 2002.

KLAUBERG FILHO, O.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; SOARES, C. R. F. S.; SILVA, S. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrizicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E. J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: UFV, 2005. v. 4, p. 85-144.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 486-488, 1989.

LAMB, D.; ERSKINE, P. D.; PARROTO, J. A Restoration of degraded tropical Forest landscapes. **Science**, London, v. 310, n. 5754, p. 1628-1632, Dec. 2005.

LEMOS, J. L. S.; CARLOS, M. C.; FARIAS, Y. P. T. M. M.; SANTOS, R. L. C. dos. **Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

LI, Z.; XU, J.; TANG, C.; WU, J.; MUHAMMAD, A.; WANG, H. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, n. 8, p. 1374-1380, Mar. 2006.

MACDONALD, C. A.; SINGH, B. K.; PECK, J. A.; SCHAIK, V.; HUNTER, L. C.; HORSWELL, J.; CAMPBELL, C. D.; SPEIR, T. W. Long-term exposure to Zn-spiked sewage sludge alters soil community structure. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n.10, p. 2576-2586, Oct. 2007.

MARQUES, T. C. L. L. S. M.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasil**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 121-132, jan. 2000.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soil**. New York: Oxford University, 1994. 406p.

MELLONI, R.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 267-276, fev. 2003.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MULLER, A. K.; WESTERGAARD, K.; CHRISTENSEN, S. SORENSEN, S. J. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p.11-19, June 2001.

NAKATANI, A.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. ; LAMBAIS, M. R. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de “landfarming” de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, n. 4, p.1501-1512, July 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 12 dez. 2009.

NELLESEN, J. E.; FLETCHER, J. S. Assessment of published literature of the uptake, accumulation, and translocation of heavy metals by vascular plants. **Chemosphere**, Oxford, v. 27, n. 9, p.1669-1680, July 1993.

ØVREÅS, L. ; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORVISK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, Sept. 1997.

PANOSO, L. A.; SANTANA, D. P.; BARUQUI, A. M.; BARUQUI, F. M.; ALMEIDA, J. R.; FERREIRA, M. B.; SOUZA, C. C. **Levantamento e reconhecimento detalhado dos solos da área sob influência do reservatório de Três Marias-Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1978. (Boletim Técnico, 57).

PEDERSEN, M.; LAURITZEN, H. J.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. Identification of thermostable b-xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, n. 5, p. 743-748, May 2007.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. North Ryde: CSIRO, 1985. 187p.

RAJAPAKSHA, R. M. C. P.; TOBOR-KAPLON, M. A.; BÅÅTH, E. Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. **Applied and environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2966-2973, May. 2004.

RIBEIRO FILHO, M. R.; CURI, N.; SIQUEIRA, J. O. ; MOTTA, P. E. F. Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 23, n. 2, p. 453-464, Abr./Jun. 1999.

ROSEN, J. A.; PIKE, S.C.; GOLDEN, M. L. Zinc, iron, and chlorophyll metabolism in zinc-toxic corn. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 59, n. 6, p. 1085-1087, June 1977.

SANTIAGO, A. L. C. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase. **Acta Botanica Brasílica**, Porto Alegre, v. 20, n. 3, p. 641-647, mar. 2006.

SANTOS, D. L. C.; ANTONIOLLI, Z. I.; LEAL, L. T.; LUPATINI, M. População de bactérias e fungos no solo contaminado com cobre nas Minas do Camaquã, RS, Brasil. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 105-114, 2007.

SCHOENLEIN, N. C.; CORSO, C. R.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; SOUZA, J. I.; OLIVEIRA, L. H. D. S. Fungos anamorfos do solo da região dos lagos no Município de Santa Gertrudes, SP, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v.31, n. 4, p. 667-678, out./dez. 2008.

SHRIDIHAR, B. B. M.; DIEHL, S. V.; HAN, F. X.; MONTS, D. L.; SU, Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 54, n. 2, p. 131-141, Sept. 2005.

SILVEIRA, R. B.; MELLONI, R.; MELLONI, E. G. P. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 48-55, jan./mar. 2006.

SIQUEIRA, J. O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. de. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 12, p. 1499-1506, dez. 1989.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Microrganismos e processos biológicos no solo: perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1994. 142p.

SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; SANTOS, J. G. D.; SCHEIDER, J.; CARNEIRO, M. A. C. Micorrizas e degradação de solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. In: CERETTA, C. A.; SILVA, L. S. da; REIHCERT, J. M. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG: UFV, 2007. v. 5, p. 219-306.

ŠMEJKALOVÁ, M.; MIKANOVA, O.; BORŮVKA, L. Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms. **Plant Soil and Environmental**, Praha, v. 49, n. 7, p. 321-326, 2003.

SCHOENLEIN, N. C.; CORSO, C. R.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; SOUZA, J. I.; OLIVEIRA, L. H. D. S. Fungos anamorfos do solo da região dos lagos no Município de Santa Gertrudes, SP, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 667-678, out./dez. 2008.

TATSUYAMA, K.; EGAWA, H.; YAMAMOTO, H.; INOUE, K. Influence of metallic compounds on soil microflora in farm polluted by chemicals. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, Tóquio, v. 15, n. 1, p.18-22, July 1974.

VALIX, M.; TANG, J.Y.; MALIK. Heavy metal tolerance of fungi. **Minerals Engineering**. Oxford, v. 14, n. 5, p. 499-505, Feb. 2001.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R. A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 8, p. 1925 -1932, Aug. 2007.

VILDOSO, C. I. **Macrofungos em mudas cítricas**. 2009. 184p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

WANG, Y. P.; SHI, J. Y.; WANG, H.; LIN, Q.; CHEN, X. C, CHEN, Y. X. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 67, n. 1, p. 75-81, May 2007.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J.; Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

WOLLUM, A. G. Cultural methods for soil microorganisms. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1982. p. 781-802.

ZAREI, M.; RASTIN-SALEH, N.; JOUZANI, G. S.; SAVAGHEBI, G.; BUSCOT, F. Arbuscular mycorrhizal abundance in contaminated soils around a zinc and lead deposit. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 44, n. 4, p. 381-391, July/Aug. 2008

ZHAOJUN, L.; JIANMING, X.; CAIXIAN, T.; JIANJUN, W.; AKMAL, M.; HAIZHEN, W.; Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn- and Cd-contaminated paddy soils. **Chemosphere**. Oxford, v. 66, n. 8, p. 1374-1380, Mar. 2006.