HENRIQUE EDUARDO DIAS JÚNIOR

DENSIDADE E ATIVIDADE MICROBIANA EM SOLO CONTAMINADO COM METAIS PESADOS.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

M[illegible]AS - BR[illegible]

1996

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da Biblioteca Central da UFLA

Dias Júnior, Henrique Eduardo
Densidade e atividade microbiana em solo contaminado com metais pesados / Henrique Eduardo Dias Júnior. -- Lavras: UFLA, 1996.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.
Dissertação (Mestrado) - UFLA.
Bibliografia.

1. Solo - Metal pesado. 2. Microbiologia. 3. Densidade. 4. Comunidade microbiana. I. Universidade Federal de Lavras. II Título.

CDD-631.41

HENRIQUE EDUARDO DIAS JÚNIOR

DENSIDADE E ATIVIDADE MICROBIANA EM SOLO CONTAMINADO COM METAIS PESADOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 29 de Agosto de 1996

Prof. José Oswaldo Siqueira

Prof. Romildo da Silva

Prof[a]. Fátima Maria
de Souza. Moreira
(orientadora)

Aos meus pais,
Henrique e Maria Tereza

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade de realização do curso.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES), pela concensão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Ciência do Solo e à Companhia Mineira de Metais (CMM) - Três Marias (MG), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Professora Fátima M. S. Moreira, pelo apoio, incentivo e orientação.

Aos Professores José Oswaldo Siqueira e Romildo da Silva, pelas oportunas críticas e sugestões apresentadas.

À Eliane, pela grande colaboração, apoio nesta difícil etapa e, principalmente, pela amizade no decorrer do curso.

Aos estudantes Divino, Marcão, João Marcelo e Luís Arnaldo pelo auxílio nas análises de laboratório realizadas.

Ao Aldo, à Paula e à Adriana pelo convívio, amizade e apoio emocional para alcançar este objetivo.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia do Solo e demais colegas de curso pelo companheirismo e agradável convívio.

À Josane, do Departamento de Ciências dos Alimentos, pela colaboração e amizade na execusão do presente trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ciência do Solo, em especial Fabiano e Manoel pela ajuda e amizade durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

DIAS JÚNIOR, Henrique Eduardo. **Densidade e atividade microbiana de solo contaminado com metais pesados.** Lavras: UFLA, 1996. 82 p. (Dissertação - Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)*.

A densidade e atividade microbiana foram avaliadas através de quantificação do C da biomassa microbiana, contagem em placas do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos, bactérias e actinomicetos cultiváveis, número mais provável (NMP) de amonificadores, nitrificadores e diazotróficos de vida livre, respiração basal do solo, respiração específica da biomassa ou quociente metabólico (qCO_2) e relação C microbiano / C orgânico total do solo, em sete sítios contaminados com metais pesados (Zn, Cu, Mn, Pb e Cd), em área pertencente à Companhia Mineira de Metais (MG), e um sítio controle, localizado à, aproximadamente, 1 km de distância dos sítios contaminados. Todos os parâmetros avaliados, com exceção do NMP de amonificadores, o qual não apresentou diferenças significativas entre os diversos sítios estudados, foram afetados pela contaminação, variando, entretanto, com as características químicas, físicas e biológicas dos sítios estudados. O C da biomassa microbiana, medido através do método da fumigação-extração, apresentou uma redução acima de 80 % nos sítios CSv e CU, ambos sem vegetação, e nos sítios CCB_1 e CVc em relação ao sítio controle (Sa). A respiração basal do solo foi maior no sítio CATi, onde havia a presença de capim *Andropogon* sp. As menores atividades

*Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira. Membros da Banca: José Oswaldo Siqueira e Romildo da Silva.

foram observadas nos sítios sem vegetação (CSv e CU). A população de actinomicetos e fungos cultiváveis foi menos afetada pela contaminação em relação à população bacteriana. A população de diazotróficos de vida livre (*Azospirillum amazonense*, *A. lipoferum* e *A. brasilense*) foi altamente sensível à contaminação, estando presente apenas no sítio Sa. Microrganismos oxidantes de amônio apenas foram verificados nos sítios CATi e CBd, enquanto os microrganismos oxidantes de nitrito foram verificados em todos os sítios, com excessão do sítio CSv, sendo o maior valor encontrado no sítio CATi, seguido do sítio Sa. Os parâmetros qCO_2 e a relação entre C-microbiano e C orgânico do solo não se mostraram como bons indicadores da contaminação. A biomassa microbiana correlacionou-se positivamente com a evolução de CO_2 , com as populações de amonificadores, oxidantes de nitrito, actinomicetos, bactérias e fungos cultiváveis do solo. Amonificadores, oxidantes de nitrito e actinomicetos também correlacionaram-se positivamente com a respiração basal do solo. Entretanto, a concentração total dos metais correlacionou-se significativamente apenas com a população bacteriana e com o qCO_2. A densidade de bactérias correlacionou-se negativamente com Cu e Cd (e Zn a 10% de probabilidade), enquanto qCO_2 correlacionou positivamente com estes três metais. Os resultados mostram efeito benéfico da presença de vegetação, principalmente, do capim *Andropogon* sp, que reduziu o impacto causado pela contaminação por metais sobre a biomassa microbiana, respiração, população de actinomicetos e nitrificadores.

SUMMARY

MICROBIAL DENSITY AND ACTIVITY IN SOIL CONTAMINATED WITH HEAVY METALS

Microbial density and activity were evaluated through biomass-C, colony-forming-units (CFU) of culturable fungi, bacteria and actinomycetes, most-probable number (MPN) of amonifiers, nitrifiers and free-living diazotrophs, basal respiration, metabolic quocient (qCO_2) and microbial C/soil organic C ratio in seven sites contaminated with heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb e Mn), belonging to "Companhia Mineira de Metais" (CMM), and one control site, 1 km far from the others. All evaluated parameters, except, amonifiers MNP, were affected by the high contamination levels, depending on soil physical, chemical and biological characteristics. Biomass - C, measured by fumigation-extraction method, was reduced by 80 % in sites CSv e CU, without vegetation, and also in sites CCB_1 e CVc compared to the control site (Sa). Basal respiration was highest in site CATi with the grass *Andropogon* sp. The lowest activities were observed in the sites without vegetation (CSv and CU). Culturable fungi and actinomycetes populations were less affected by contamination than bacterial population. Free-living diazotrophs (*Azospirillum brasilense*, *A. amazonense* e *A. lipoferum*) was highly sensitive to contamination. They were found only in the control site (Sa). Ammonium oxidizers were detected just in sites CATi and CBd, meanwhile, nitrite oxidizers were found in all sites, except, CSv site. MPN of amonifiers

were high and similar in all sites. The qCO_2 and microbial - C /soil organic - C ratio were not good indicators of soil contamination. Biomass C was also positively correlated with CO_2 evolution, amonifiers, nitrite oxidizers and culturable actinomycetes, bacteria and fungi population. Amonifiers, nitrite oxidizers and actinomycetes populations were positively correlated with soil basal respiration. However, total heavy metal concentrations was only correlated with qCO_2 and bacterial population . Bacterial density was negatively correlated with Cu, Cd and Zn, meanwhile qCO_2 were positively correlated with Cu, Zn and Cd. The results showed a beneficial effect of vegetation, mainly *Andropogon* sp, in reducing heavy metal contamination impacts on Biomass-C , respiration, actinomycetes and nitrifiers populations.

1 INTRODUÇÃO

Na faixa tropical do planeta, além dos problemas sociais e econômicos, existem cerca de 650 milhões de hectares sendo utilizados como áreas de cultivo e, aproximadamente, 2 bilhões de hectares nos mais diversos estágios de degradação (Jesus, 1994). Parte desta degradação é devido à atividade mineradora, a qual, apesar de pontual, movimenta um elevado volume de material, causando, conseqüentemente, um grande impacto ao ambiente. Entretanto, a atividade de mineração é de grande importância social e econômica pela geração de empregos diretos e indiretos, além de divisas para o país.

Atualmente, existe exigência legislativa de que áreas degradadas pela mineração devam ser recuperadas. A recuperação dessas áreas degradadas deve ser parte integrante do processo, a partir do início do planejamento até um longo período após encerrada a atividade extrativista, devendo-se levar em conta, os aspectos ecológicos fundamentais como a biodiversidade e a sustentabilidade dos ecossistemas o que poderá, a médio e a longo prazo melhorar os resultados biológicos, além de reduzir os custos das operações.

Um dos grandes problemas enfrentados na recuperação de algumas áreas degradadas é a alta concentração de metais pesados, impossibilitando a revegetação local devido à sua elevada toxidez. A redução da toxidez de metais visando o crescimento de plantas em solos contaminados pode ser alcançado por processos biológicos e químicos como mudanças no pH do solo, através

da calagem, incorporação de matéria orgânica ou material argiloso, remoção da camada de solo poluída ou diluição com solo não contaminado ou com substratos inertes.

Os processos biológicos mediados pela comunidade microbiana do solo são de fundamental importância na recuperação de áreas degradadas. A disponibilidade de vários nutrientes para as plantas, ciclos biogeoquímicos, o desenvolvimento da estrutura do solo e melhoria de condições físicas e químicas são alguns dos processos realizados pelos microrganismos do solo importantes na sustentabilidade dos ecossistemas. Além disso, são importantes em processos de remoção de metais atuando como biorremediadores. No entanto, o excesso de metais tóxicos exerce efeitos diversos sobre a população microbiana do solo e sua atividade, podendo reduzir sua diversidade, causar a morte ou afetar seus processos bioquímicos.

Apesar da atividade de mineração abranger extensões significativas do território brasileiro, seu impacto ambiental tem sido verificado somente na vegetação e, especificamente, em áreas de mineração e operações industriais de ferro e alumínio. Os efeitos dos metais pesados sobre a comunidade microbiana do solo têm sido investigada quantitativamente (C microbiano, ATP, contagem em placas e observações diretas de diferentes grupos microbianos) ou enfatizando atividades específicas (enzimas dos solos, respiração e fixação de N_2), além de estudos de tolerância e diversidade microbiana.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a densidade e a atividade de microrganismos em amostras de solo coletadas em área contaminadas por metais pesados, pela atividade de extração e industrialização de zinco.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metais pesados, microrganismos do solo e processos biológicos

As atividades industriais, de mineração e agrícolas resultaram em um aumento da contaminação de metais pesados para o meio ambiente. Estes metais quando presentes no solo em baixas concentrações são benéficos às plantas e microrganismos, visto que, vários constituem-se de elementos essenciais ao desenvolvimento vegetal e animal. Entretanto, quando em excesso, podem tornar-se bastantes tóxicos aos organismos vivos, pela sua introdução na cadeia alimentar (Costa, 1991). Alguns metais pesados, como Cu, Zn, Fe e Mn, são nutrientes essenciais para a maioria dos organismos, os quais necessitam destes elementos em concentrações muito baixas que variam entre 1 e 100 $\mu g \cdot g^{-1}$ de biomassa seca. Naturalmente, a maioria dos metais pesados ocorre no solo como elementos raros, estando presentes em altas concentrações apenas em certo minerais (Tyler, 1981).

Nas últimas décadas, tem-se verificado um grande interesse no estudo de metais pesados nos solos não só pela toxidez destes às plantas, animais e outros organismos, mas também devido à sua difícil remoção, já que são imobilizados por diferentes componentes do solo como matéria orgânica humificada, óxidos e hidróxidos de Fe e Al e argila, podendo em determinadas situações,

processo de contaminação e ocupação dos sítios de troca do solo resulta num aumento da concentração de íons metálicos livres na solução do solo (Tyler, 1981). Além disso, mudanças em propriedades do solo como, potencial redox, pH, aumento da decomposição da matéria orgânica, perdas de partículas de textura fina, são responsáveis pela mobilização de metais para a solução (Gupta, 1992). Os fatores que afetam a disponibilidade de metais no solo são: textura, pH, capacidade de troca de cátions, teor de matéria orgânica e competição iônica (Kurek, Czaban e Bollag, 1982; Malavolta, 1994; Tisdale, Nelson e Beaton, 1985). Segundo Msaky e Calvet (1990), os metais podem ser retidos no solo por precipitação e adsorção, os quais dependem de fatores como a natureza do metal, tipo do solo e dos constituintes orgânicos e minerais. A retenção de metais nos solos pode ocorrer por adsorção específica à superfície de carga variável, troca catiônica em superfície de carga permanente e precipitação de novas fases sólidas (Madrid e Diaz-Barrietos,1992). Estes mecanismos de retenção determinam a biodisponibilidade e mobilidade de metais pesados no solo.

A população microbiana do solo exerce um papel fundamental para o perfeito funcionamento do sistema solo-planta, especialmente, nos ecossistemas naturais onde a fertilidade do solo depende quase que inteiramente dos processos microbianos (Siqueira et al., 1994). Processos como fixação de N_2 , nitrificação, mineralização da matéria orgânica do solo, amonificação, entre outros, todos mediados pela biomassa microbiana do solo, podem ser afetados diretamente pela contaminação com metais ou, indiretamente, devido a efeitos tóxicos sobre as plantas, causando um decréscimo na quantidade de substratos liberados na região rizosférica. Estes efeitos dependerão do tipo e da concentração do metal ou metais, além das características dos solos (Brookes, 1995). Segundo Tyler (1981), solos que possuem alta contaminação com

metais pesados, geralmente, apresentam uma redução na diversidade de espécies e o desenvolvimento de linhagens resistentes. A inibição desses processos essenciais ao perfeito funcionamento do ecossistema, pode aumentar a longo prazo a dependência das plantas aos fertilizantes químicos.

Estresses abióticos causados pela poluição com metais pesados, tanto em fontes orgânicas e inorgânicas, podem afetar a morfologia, crescimento e metabolismo dos microrganismos do solo, devido à desnaturação protéica, distúrbios funcionais ou perda da integridade das membranas celulares (Leita et al, 1995). Assim, solos sob impacto da poluição com metais pesados podem apresentar significativa redução no tamanho e atividade da biomassa microbiana (Bardgett e Saggar, 1994; Brookes et al., 1986; Brookes e McGrath, 1984; Chander e Brookes, 1991a, b, c, 1992 e 1993; Doelman e Haanstra, 1984; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Leita et al., 1995; Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995). Além disso, a inibição de processos como a decomposição e mineralização de resíduos orgânicos específicos no solo, influenciados pela atividade de diferentes grupos de microrganismos, devido à estresses ambientais, tais como metais pesados, pode causar sérias consequências para o funcionamento do ecossistema em termos de ciclagem de nutrientes e fertilidade do solo (Bewley e Parkinson, 1986). O acúmulo de C orgânico, devido a menor decomposição da matéria orgânica do solo tem sido verificada em solos contaminados com metais pesados (Chander e Brookes, 1991a).

Deve-se considerar também, que os efeitos dos metais pesados ocorrem devido à interações dos mesmos, ou seja, são efeitos aditivos, sendo quase impossível a determinação de efeitos isolados em situações de multicontaminação (Chander e Brookes, 1993; Flieβbach, Martens e Reber, 1994).

Os efeitos benéficos da presença de vegetação sobre a população microbiana do solo tem sido relatado por vários pesquisadores (Cattelan e Vidor, 1990a,b; Rovira e Davey, 1974; Siqueira e Franco, 1988; Siqueira et al., 1994). Na rizosfera, região de influência das raízes, onde a atividade química, física e, principalmente, biológica torna-se muito maior, ocorre a liberação de compostos orgânicos, como exsudatos e secreções, para o solo adjacente, tornando este sítio muito especializado e favorecendo a população microbiana (Rovira e Davey, 1974; Siqueira e Franco, 1988). Além disso, plantas tolerantes ou hiperacumuladoras desenvolveram mecanismos que reduzem a disponibilidade e/ou toxicidade de metais presentes no solo, os quais variam com a espécie de planta e metal ou metais poluentes. A produção de fitoquelatinas por espécies tolerantes e hiperacumuladoras constitui um mecanismo de proteção à elevadas concentrações de metais no solo (Steffens, 1990). Plantas hiperacumuladoras podem absorver grande concentrações de metais chegando a mais de 10000 $\mu g.g^{-1}$ de Zn e Mn e 1000 $\mu g.g^{-1}$ de Co, Cu, Cr, Pb e Ni (Baker e Brooks, 1989) reduzindo, com isto, a concentração de metais na região rizosférica, podendo favorecer, portanto, o desenvolvimento da população microbiana. Algumas plantas podem ainda apresentar a capacidade de reduzir a solubilidade e toxicidade de metais nos solos na região rizosférica através de processos de oxirredução, modificação do pH ou formação de complexos organo-metálicos solúveis ou insolúveis menos tóxicos. A produção de ácidos oxálicos e malônico na zona radicular pode reduzir a toxicidade de metais pelo processo de complexação (Foy, Scott e Fisher, 1988; Foy, 1988). O aumento do pH na rizosfera tem sido verificado em plantas tolerantes a metais como o Al sendo, geralmente, adaptadas a solos ácidos (Foy, 1988).

Alterações químicas, físicas e biológicas ocorrem em conseqüência da retirada da vegetação nativa do solo, podendo causar queda na produtividade e degradação do ecossistema

(Siqueira et al.,1994). A importância da presença da cobertura vegetal sobre a microbiota foi observada em um trabalho na Região Sul do Brasil, o qual estudou diferentes tipos de manejo do solo sobre a população microbiana. Os resultados mostraram um decréscimo de 65% na biomassa quando retirou-se a vegetação de um campo nativo, apresentando os menores valores de biomassa e atividade microbiana quando comparados aos diferentes sistemas de cultivos, consorciados ou não, além do campo nativo (Cattelan e Vidor, 1990a). A população de fungos, actinomicetos, solubilizadores de fosfato e, principalmente, a de bactérias foram afetadas pela retirada da cobertura vegetal neste ecossistema (Cattelan e Vidor, 1990b), confirmando a importância da presença de cobertura vegetal afetando a população microbiana e seus processos biológicos.

A maioria dos trabalhos têm estudado os efeitos dos metais sobre o crescimento de plantas e saúde animal, não levando em conta os efeitos sobre microrganismos do solo, principalmente, "in situ", ou sobre seus importantes processos biológicos. Além disso, a maior parte dos experimentos avaliaram o impacto da contaminação com metais pesados sobre a população microbiana e seus processos em solos contaminados pela a aplicação de resíduos orgânicos, como lodo de esgoto, muitas vezes enriquecido com metais na forma de sais inorgânicos (Brendecke, Axelson e Pepper, 1993; Brookes et al., 1986; Brookes e McGrath, 1984; Brookes, McGrath e Heijnen, 1986; Chander e Brookes, 1991a, b, c, d, 1993; Chaudri, McGrath e Giller, 1992a, b; Chaudri et al., 1993a, b; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Giller et al., 1993, Hiroki, 1992; Hirsch et al., 1993; McGrath, Brookes e Giller, 1988; Obbard, Sauerbecke Jones, 1993; Reddy, Cheng e Dunn, 1983; Smith e Giller, 1992; Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995).

As concentrações encontradas no solo têm sido usadas para fixar os limites permissíveis de metais nos solos. Atualmente, cada país membro da Comunidade Européia apresenta os limites permissíveis de concentração de metais potencialmente tóxicos em poluentes e os solos que os recebem. Entretanto, evidências científicas que explicam estes limites são ainda escassas, principalmente, no que se refere à sensibilidade de microrganismos do solo. Um conceito único baseado em fatores químicos do solo que poderia predizer a disponibilidade de metais e sua toxicidade biológica sob diferentes condições de solo, é ainda inexistente (Lorenz, McGrath e Giller, 1992). Recentemente, tem-se verificado significativos efeitos tóxicos de metais pesados sobre a população microbiana do solo e seus processos em concentrações próximas ou abaixo dos valores estabelecidos nestes limites (Brookes, 1995; Brookes et al., 1986; Brookes, McGrath e Heijnen, 1986; Chander e Brookes, 1991a; 1993; Chaudri et al., 1993b; Flieβbach, Martens e Reber, 1994).

Parâmetros microbiológicos têm se mostrado mais sensíveis à contaminação com metais pesados, sendo, portanto úteis no monitoramento da poluição de solos (Brookes, 1995). Segundo Lima (1994), a atividade microbiana constitui um excelente indicador das condições biológicas do solo, além de seus efeitos benéficos sobre o crescimento de plantas. Entretanto, Doelman et al. (1994), alertam para a dificuldade de utilização dos microrganismos como um todo no monitoramento da poluição do solo, pois sua atividade e número são afetados por uma grande quantidade de fatores como pH, matéria orgânica, temperatura, umidade, teores de O_2 e CO_2, sendo os primeiros a serem afetados pela poluição do solo devido suas características morfológicas e fisiológicas. Estes mesmos autores, sugerem o uso do índice de sensitividade/resistência da comunidade microbiana do solo no monitoramento de níveis de metais

pesados. Segundo eles, este índice é de fácil obtenção, baixo custo e padronizável, constituindo um teste ecológico de grande importância.

Pouca ou nenhuma atenção tem sido dada à contribuição dos microrganismos na recuperação de áreas degradadas. Entretanto, o sucesso da recuperação dessas áreas depende do desenvolvimento da comunidade microbiana do solo (Tate, 1985). Os microrganismos podem ser um importante instrumento na remoção de metais e, conseqüente recuperação dessas áreas contaminadas, atuando como importantes biorremediadores, através de processos de imobilização, mobilização e transformações de metais por reações de precipitação extracelular, acumulação intracelular, reações de oxidação e redução, metilação e demetilação, ligação extracelular e complexação (Brierley, 1991). Estudos sobre a imobilização e transporte de metais pesados por dois fungos de solo constataram que a sorção de metais variou com o pH, a concentração e natureza do metal e com o fungo testado. Além disso, verificou-se que os metais foram removidos do meio por diferentes mecanismos (Mullen et al., 1992). Diferentes microrganismos (7 espécies de bactérias e 4 de fungos) foram capazes de remover metais pesados do meio de cultura, constituindo em um importante fator de imobilização de metais no ambiente do solo, regulando a disponibilidade dos mesmos para as plantas (Kurek, Czaban e Bollag, 1982).

As espécies de microrganismos predominantes em áreas contaminadas com metais pesados, geralmente, são tolerantes às condições locais devido a um processo de seleção (Tyler, 1981). Tem-se verificado que a maioria das espécies de bactérias tolerantes a altas concentrações de metais pesados eram gram negativas (Duxbury e Bicknell, 1983). A população fúngica do solo tem se mostrado mais tolerante em áreas contaminadas com metais pesados do que as populações bacterianas e de actinomicetos (Hattori, 1992; Hiroki, 1992; Yamamoto, Tatsuyama e Uchiwa,

1985). Assim, a seleção de estirpes de microrganismos resistentes às condições adversas, eficientes e competitivos para posterior introdução dos mesmos nas áreas de recuperação, pode ser de extrema importância.

O restabelecimento da microbiota em solos degradados pode ocorrer naturalmente, necessitando, porém, de um longo período de tempo. Para que este restabelecimento ocorra é necessário que se forneça uma fonte de carbono (Mills, 1985). A adição de fonte de C a qual, aumente a atividade microbiana podem estimular a incorporação de metais ou sua complexação por produtos da decomposição da matéria orgânica (Pompéia, 1994).

Assim, na recuperação de áreas contaminadas com metais pesados deve-se utilizar de um conjunto de tratamentos para a obtenção de resultados satisfatórios, sendo que na escolha de métodos adequados deve-se levar em conta o uso da terra, tipo e características do solo e efeitos a longo prazo. Além disso, embora a atividade biológica não esteja correlacionada com produtividade, uma baixa atividade biológica está, provavelmente, associada a áreas sob impacto como, por exemplo, a contaminação de metais pesados. Práticas de manejo como a fertilização química, podem a curto prazo manter a produtividade em áreas em recuperação. Entretanto, a longo prazo, o sucesso desta recuperação sem a adição de excessivas fontes de nutrientes, dependerá de práticas que estimulem o retorno da atividade biológica no solo.

2.2 Densidade e atividade microbiana do solo

2.2.1 Carbono da biomassa microbiana

A biomassa microbiana do solo é composta de bactérias, fungos, microfauna e cianofícias e é definida como a parte viva da matéria orgânica do solo (Jenkinson e Ladd, 1981). Ela funciona como um importante reservatório lábil de vários nutrientes essenciais às plantas, desempenhando um papel fundamental na ciclagem de nutrientes e na funcionalidade dos ecossistemas. A biomasssa microbiana pode armazenar, aproximadamente, 1 a 4 % do carbono total, 2 a 6 % do nitrogênio total e 2 a 5 % do fósforo total do solo, sendo fundamental na manutenção e produtividade de vários ecossistemas naturais e de muitos agrossistemas, os quais dependem, em grande parte, de processos mediados pelos microrganismos, como a decomposição da matéria orgânica do solo (Grisi e Gray, 1986; Jenkinson e Ladd, 1981). Quando em condições ambientais favoráveis, a extensão do "turnover" da matéria orgânica do solo é controlada, principalmente, pelo tamanho e atividade da biomassa microbiana. O material orgânico incorporado ao solo constitui a força motriz dos processos metabólicos envolvendo vários nutrientes essenciais, pois é convertido em energia e novos metabólitos pela população microbiana dos solos (Martens, 1995). Alta correlação entre C orgânico e C microbiano tem sido verificada (Anderson e Donsch, 1989; Weigand, Auerswald e Beck, 1995).

A estimativa da biomassa microbiana pode fornecer dados úteis sobre modificações nas propriedades biológicas dos solos, decorrentes de práticas ágrícolas, como diferentes tipos de manejo dos solos e diferentes culturas (Alvarez et al., 1995; Andrade, Miyazama e Hamakawa,

1994, Cattelan e Vidor, 1990b; Franzluebbers, Zuberes, Hons 1995; Jordan et al, 1995), efeito do uso de fertilizantes orgânicos ou químicos e biocidas em geral (Anderson e Domsch, 1989; Bardegett e Leemans, 1995; Biederbeck, Campbell e Smith, 1987; Cheng e Colman, 1990; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Franzluebbers, Zuberes, Hons 1995; Ghoshal e Singh, 1995; Harden et al., 1993; Jordan et al, 1995; Lovell e Jarvis, 1996), desmatamento e formação de pastagens (Pfenning, Eduardo e Cerri,1992), além de ser um indicador mais sensível de mudanças edáficas e biológicas que afetam a qualidade dos solos, ao contrário de análises químicas e físicas em solos sob impacto, como por exemplo, metais pesados (Anderson e Domsch, 1989; Brookes, 1995; Brookes et al., 1986; Brookes e McGrath, 1984; Franzluebbers, Zuberes e Hons 1995; Grisi e Gray, 1986; Powlson, Brookes e Christensen, 1987).

A relação C microbiano/C orgânico tem se mostrado como um indicador mais sensível de mudanças ocorridas no ambiente devido à poluentes químicos, como metais pesados, do que apenas o teor de matéria orgânica. Solos que receberam lodo de esgoto contaminado com zinco e cobre apresentaram uma alta redução na % de C microbiano em relação ao C orgânico do solo (Chander e Brookes, 1991a; 1993). Isto também foi observado por Valsecchi, Gigliotti e Farini (1995), que verificaram uma drástica redução neste parâmetro em solos altamente contaminados por vários metais pesados. De modo contrário, este parâmetro não funcionou para indicar os efeitos adversos da contaminação com metais pesados em 3 diferentes solos, situados próximos à usina de fundição de metais, provavelmente, devido à grande variação nas características dos solos como pH, textura e teor de matéria orgânica (Insan, Hutchinson e Reber, 1996). Segundo Anderson e Domsch (1989), a relação C microbiano / C orgânico pode indicar se um solo está no estado de equilíbrio, perda ou acumulação de C.

O método da fumigação-incubação é utilizado como padrão para calibração dos outros métodos na quantificação da biomassa microbiana dos solos, o qual tem como princípio básico que as células mortas da biomassa indígena pelo fumigante é usada como substrato durante a recolonização da população através de inóculo durante um período padrão de 10 dias de incubação aeróbica. Diferenças nas propriedades químicas e físicas dos solos podem mascarar os resultados de biomassa obtidos pelo método da fumigação incubação. Este método apresenta restrições quando se trabalha com solos com pH < 4,5-5,0, que não contenham fontes de carbono facilmente degradáveis, solos secos ao ar ou aqueles que receberam recentes adições de substratos orgânicos frescos, as quais são superadas quando se utiliza o método da fumigação-extração (Brookes et al, 1986; Martens, 1995; Dumontet e Mathur; 1989). O método da fumigação-extração apresenta como princípio básico a extração do C microbiano após a morte dos microrganismos e lise celular pelo ataque do clorofórmio e liberação dos constituintes celulares, os quais são degradados por autólise enzimáticas e transformados em componentes extraíveis (Joergensen, 1995).

2.2.2 População de bactérias, fungos e actinomicetos cultiváveis

As bactérias são microrganismos procariontes sendo, geralmente, a maioria heterotróficas nos solos. Representa o grupo de maior número nos solos representando, entretanto, 25 a 30% da biomassa microbiana total dos solos agrícolas. Estão envolvidas em processos importantes como a fixação biológica de N_2, nitrificação, denitrificação, decomposição da matéria orgânica, ciclagem

de nutrientes e produção de substâncias promotoras de crescimento, entre outros (Paul e Clark, 1989; Siqueira e Franco, 1988).

A densidade e composição da flora bacteriana são altamente influenciadas pela combinação de fatores ambientais como umidade, aeração, temperatura, teor de matéria orgânica do solo, acidez e suprimento de nutrientes (Alexander, 1977).

Outro importante grupo de microrganismos do solo é representado pelos actinomicetos, o qual é bastante heterogênio apresentando produção de micélio e esporos assexuais (conídios) assemelhando-se com isto, aos fungos, e às bactérias gram negativas por serem procariontes, apresentar sensibilidade aos vírus e produzirem antibióticos (Siqueira e Franco, 1988). No solo, em relação a outras populações bacterianas, são numericamente inferiores, sendo entretanto, mais numerosos que as populações de fungos. Normalmente, de 10 a 50% da comunidade microbiana do solo é constituída por populações destes microrganismos (Alexandre, 1977).

Os actinomicetos participam de importantes processos como a degradação de substâncias normalmente não decomposta por fungos e bactérias como fenóis, quitina, húmus e parafina, decomposição da matéria orgânica em temperaturas mais altas, atua no equilíbrio microbiológico através da produção de antibióticos, além da fixação biológica de nitrogênio atmosférico através do estabelecimento da simbiose com espécies de angiospermas, a maioria de porte arbustivo e arbóreo, sendo os gêneros mais estudados, *Alnus*, *Casuarina* e *Myrica* (Siqueira e Franco,1988). São microrganismos heterotróficos podendo ser encontrados em muitos "habitats" sendo, portanto, diretamente influenciados pela disponibilidade de substratos oxidáveis, o que os torna, geralmente, mais abundantes em solos ricos em matéria orgânica. A combinação de fatores ambientais como teor de matéria orgânica, pH, umidade e temperatura influenciam o tamanho da

comunidade, sua atividade bioquímica e os gêneros e espécies encontrados de actinomicetos nos solos (Alexander, 1977). Mais de vinte gêneros já foram isolados dos solos, sendo *Streptomyces*, *Nocardia* e *Micromonospora* os mais comuns (Williams e Wellington, 1982). Tipicamente, o gênero *Streptomyces* é dominante no solo representando 70 a 90% das colônias desenvolvidas em meio de cultura sólido (Paul e Clark, 1989).

Ao contrário da população bacteriana e de actinomicetos, os fungos são microrganismos eucariotos e, embora não sejam predominantes numericamente, representam 70 a 80% da biomassa microbiana dos solos (Siqueira e Franco, 1988). Como os actinomicetos, os fungos também são heterotróficos em sua nutrição, tendo, conseqüentemente, a distribuição de sua população determinada pela disponibilidade de substratos orgânicos oxidáveis (Alexander, 1977; Paul e Clark, 1989). Os principais fatores externos que mais influenciam a comunidade fúngica incluem o teor de matéria orgânica, pH, uso de fertilizantes orgânicos ou inorgânicos, umidade do solo, aeração, temperatura, estação do ano e tipo de vegetação (Alexander, 1977).

Uma das principais funções desempenhadas pela população fúngica nos solos é a sua atividade heterotrófica sobre o material orgânico do solo, o que os torna agentes de controle biológicos de outros fungos e nematóides fitopatogênicos, além de realizarem importantes relações simbióticas mutualísticas (micorrizas) e parasíticas (doenças) com as raízes da maioria das plantas (Siqueira e Franco, 1988).

A técnica de isolamento e contagem em placas pelo método de diluição em série é amplamente empregada para estimar a população de microrganismos do solo. Apresenta como princípios básicos a dispersão da amostra de solo e distribuição de uma alíquota em um meio de cultura apropriado, incubação sob condições adequadas e contagem das colônias desenvolvidas

(Wollum II, 1982). Entretanto, este método é considerado extremamente limitado por detectar apenas uma pequena proporção dos microrganismos, ou seja, aqueles capazes de se desenvolver em meios de cultura seletivos para cada grupo (Paul e Clark, 1989). Apesar de cuidados de padronização na agitação e dispersão das amostras de solo durante o processo de diluição, pode ocorrer durante estas operações a fragmentação de hifas, as quais em ambientes onde existam uma alta população de microrganismos que apresentem crescimento micelial, ocasionam a superestimação da população, uma vez que serão contadas como colônias simples (Lorch, Benckieser e Ottow, 1995). Por esta razão, este método tem se mostrado muitas vezes inadequado ao isolamento e enumeração da população fúngica do solo, podendo, no entanto, ser utilizado no estudo de fatores ambientais sobre a população microbiana.

De modo geral, para o isolamento de grandes grupos de microrganismos do solo, usam-se meios ricos em nutrientes e com inibidores seletivos. Para o isolamento e crescimento de actinomicetos, deve-se ter um meio especial onde o uso de antibióticos para fungos, como por exemplo ciclohexamida, micostantin, entre outros, e para bactérias, como a estreptomicina, é recomendado.

Geralmente, os actinomicetos apresentam desenvolvimento mais lento, de aproximadamente, 10 a 14 dias de incubação à temperatura de 25 a 30° C, formando colônias pequenas, arredondadas e tenáceas apresentando micélio aéreo. Os neutrófilos (pH 6,5-7,0) são os mais representativos deste grupo. Para o isolamento de bactérias e fungos presentes no solo têm-se utilizado meios ricos em fontes de carbono, como glicose, e proteínas, como peptona. O desenvolvimento das colônias bacterianas é muito rápido, ocorrendo em, aproximadamente, 3 dias `a temperatura de 30° C. Para estudos da população fúngica é recomendado o uso de antibióticos

como estreptomicina e penicilina para evitar o rápido crescimento bacteriano, pois estes apresentam um desenvolvimento mais lento (Wollum II, 1982; Lorch, Benckieser e Ottow, 1995).

Alguns trabalhos tem sido realizados para estudar os efeitos de diferentes sistemas de cultivo e do uso de adubação química e orgânica sobre a população de bactérias, fungos actinomicetos, solubilizadores e celulolíticos cultiváveis pelo método da diluição em série da amostra seguido da inoculação em meios específicos e do isolamento e contagem em placas das unidades formadoras de colônias (Silva Filho e Vidor, 1984; Nuernberg, Vidor e Stammel, 1984; Cattelan e Vidor, 1990a;b), estando sujeitos às limitações do método. Este método foi utilizado para avaliar o número de unidades formadoras de colônias de fungos e bactérias em área sob impacto da atividade de mineração de ferro (Trindade, Tótola e Dias Júnior, 1994), além de estudos dos efeitos da contaminação de solos com metais pesados sobre a população microbiana (Brendecke, Axelson e Pepper, 1992; Hattori, 1992; Hiroki, 1992; Landmeyer, Bradley e Chapelle, 1993; Yamamoto, Tatsuyama e Uchiwa, 1985), e isolamento de microrganismos resistentes à contaminação (Yamamoto, Tatsuyama e Uchiwa, 1985). De modo geral, a população fúngica tem se mostrado mais resistente aos efeitos adversos da contaminação com metais, seguido da população bacteriana e de actinomicetos (Hattori, 1992; Hiroki, 1992).

2.2.3 Microrganismos amonificadores e nitrificadores

O nitrogênio do solo está quase todo na forma orgânica fazendo parte de aminoácidos, ácidos nucléicos, açúcares aminados e formas complexas (Siqueira et al., 1994). Para se tornar disponível para as plantas é necessário que seja transformado para N inorgânico pelo processo de

mineralização, através da degradação desses compostos orgânicos até a forma mineral NH_4^+ (Paul e Clark, 1989), o qual é essencialmente microbiológico, sendo dividido em duas etapas (Alef, 1995a; Victoria, Piccolo e Vargas, 1992):

1) A amonificação de compostos orgânicos realizadas por um grande número de microganismos heterotróficos;

2) A nitrificação ou oxidação da amônia liberada, principalmente, por bactérias quimioautotróficas.

A população de microrganismos amonificadores é composta por uma grande diversidade de microrganismos heterotróficos aeróbicos e anaeróbicos, sendo que este último grupo, realiza mais lentamente o processo (Alef, 1995a; Paul e Clark, 1989; Tsai, Baraibar e Romani, 1992). O processo de amonificação é altamente dependende da relação C:N dos compostos orgânicos, estando ligada ao metabolismo de células ativas, exceto para a hidrólise da uréia pela urease extracelular. A amônia pode ser liberada por diferentes mecanismos (Alef, 1995a):

1) Desaminação hidrolítica:

$$R\text{-}NH_2 + H_2O \rightarrow R\text{-}OH + NH_3$$

2) Desaminação oxidativa:

$$R\text{-}CHNH_2\text{-}COOH + H_2O \rightarrow R\text{-}CO\text{-}COOH + 2H^+ + NH_3$$

3) Desaminação redutiva:

$$R\text{-}CHNH_3\text{-}COOH + 2H^+ \rightarrow R\text{-}CH_2 = COOH + NH_3$$

4) Desaminação dessaturativa:

$$R\text{-}CH_2\text{-}CHNH_2\text{-}COOH \rightarrow R\text{-}CH = CH\text{-}COOH + NH_3$$

A nitrificação consiste na oxidação da amônia a nitrato via nitrito realizada, principalmente, por dois grupos altamente especializados de bactérias quimioautotróficas

aeróbicas gram negativas da família *Nitrobacteriaceae*, tendo a atividade limitada, principalmente, pelas concentrações de NH_3 e O_2, além de fatores como temperatura, umidade, pH e suas interrelações (Alexander, 1977; Paul e Clark, 1989; Schmidt e Belser, 1982; Tsai, Baraibar e Romani, 1992). Segundo Alexander (1977), a nitrificação torna-se negligível em valores de pH abaixo de 5,0, pois além de afetar o processo em si, reduz o número de microrganismos envolvidos. O processo segue os seguintes passos (Alef, 1995a):

1) Oxidação da amônia:

$$NH_4 + 1{,}5\ O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + 2H^+$$

$$G^o = -273{,}9\ kJ/mol$$

2) Oxidação do nitrito:

$$NO_2^- + 0{,}5\ O_2 \rightarrow NO_3^-$$

$$G^o = -76{,}7\ kJ/mol$$

Devido a impossibilidade de separação dos diversos grupos de microrganismos pelo método do plaqueamento direto em placas, pois apesar do uso de meios de cultivo estritamente inorgânicos, ainda ocorre o crescimento de contaminantes heterotróficos presentes no inóculo (Andrade, Miyazama e Hamakawa, 1994; Schmidt e Belser, 1982) a estimativa da população de microrganismos amonificadores e nitrificadores, geralmente, é realizada por inoculações de suspensões diluídas de solo, em meio líquido de cultura (Sarathchandra, 1978) e o número de células viáveis estimado através de tabelas do número mais provável (NMP), considerando positivas as culturas onde a amônia, nitrito e nitrato são detectados por reações químicas. A

amonificação de aminoácidos tem sido proposta para estimar a atividade microbiana nos solos como um método simples e rápido (Alef et al., 1988).

O nitrogênio inorgânico produzido no processo de mineralização está sujeito à perdas por lixiviação ou pelo processo de denitrificação. Pode ainda ser imobilizado pela população microbiana do solo ou fixado nas argilas do solo (Alef, 1995a).

A amonificação e nitrificação do nitrogênio pode ser inibida ou estimulada por elementos metálicos, variando com o tipo, concentração e disponibilidade do metal ou metais em questão. A inibição desses processos, devido à contaminação por metais pesados é de difícil interpretação, principalmente, por que as propriedades dos solos que afetam a disponibilidade e, conseqüentemente, a toxicidade dos metais. Por outro lado, a acumulação de nitrogênio mineral no solo pode refletir efeitos adversos de íons metálicos sobre a imobilização (Tyler, 1981).

2.2.4 Microrganismos diazotróficos de vida livre

Os microrganismos estão altamente envolvidos na ciclagem do nitrogênio dos solos através de processos como a fixação de N_2 , nitrificação, denitrificação, mineralização e imobilização (Döbereiner, 1995).

Antes de 1970, considerava-se que diazotróficos aeróbicos eram bactérias que utilizavam o N_2 atmosférico como sua única fonte de N para o desenvolvimento, sendo capazes de crescer sob concentrações atmosféricas de O_2 devido à mecanismos de proteção da nitrogenase contra o oxigênio como *Azotobacter* spp. Após 1970, ocorreram isolamentos de novas espécies e gêneros de diazotróficos aeróbicos como *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Azospirillum* e *Azoarcus* que não

possuiam mecanismos de proteção da nitrogenase contra o oxigênio e que por isso eram consideradas microaerofílicas quando fixavam N_2 (Döbereiner, 1995).

As espécies do gênero *Azospirillum* são as mais bem estudadas deste grupo de diazotróficos e infectam raízes de gramíneas forrageiras e cereais, proliferando nos espaços inter e intracelulares e, principalmente, no protoxilema das raízes sendo encontrados na maioria dos solos tropicais (Döbereiner, 1992; Siqueira e Franco, 1988). São capazes de crescer em meio de cultura semi-sólidos, onde através de mecanismos de quimiotaxia, se movem para a região onde taxa de difusão de O_2 está em equilíbrio com a taxa de respiração da bactéria. Como a maioria das gramíneas são mais eficientes na realização da fotossíntese (plantas C_4) do que as leguminosas, o estudo da fixação de N_2 e sua conversão em formas assimiláveis pelas plantas tem despertado grande interesse dos pesquisadores (Döbereiner, 1992). Além disso, apesar da pequena quantidade de N_2 fixada na associação gramínea-microrganismo, a economia em adubos nitrogenados pode ser significativa devido às extensas áreas de cultivo dessas espécies (Siqueira e Franco, 1988).

A enzima nitrogenase é responsável pela redução do dinitrogênio à amônio. Além disso, pode catalisar a redução de acetileno, cianeto, isocianeto, azoto, ciclopropano, diazirina e óxido dinitrogênio. Teoricamente, a nitrogenase consome 6 elétrons e 6 prótons para reduzir uma molécula de N_2 em duas de NH_3, além da liberação de duas moléculas de H^+, consumindo, aproximadamente, 16 moles de ATP/mol de N_2 durante a reação, como na equação abaixo (Alef, 1995b):

$$8\ H^+ + N_2 + 8e^- \rightarrow 2\ NH_3 + H_2$$

Estudos sobre os efeitos adversos da contaminação de metais pesados sobre microrganismos fixadores de N_2 estão quase todos concentrados em trabalhos com bactérias do

gênero *Rhizobium* (Chaudri, McGrath e Giller , 1992a, b; Chaudri et al., 1993a, b; Giller et al., 1993; Heggo, Angle e Chaney, 1990; Hirsch et al., 1993; McGrath, Brookes e Giller, 1988; Obbard, Sauerbecke Jones, 1993; Reddy, Cheng e Dunn, 1983; Smith e Giller, 1992). Estes estudos verificaram que em solos contaminados, geralmente, ocorre morte e redução na diversidade das espécies, além de afetar a capacidade de fixação de nitrogênio, muitas vezes com total perda de efetividade desta característica. De modo contrário, poucos trabalhos estudaram estes efeitos sobre bactérias heterotróficas de vida livre, além de cianobactérias (Brookes, McGrath e Heijnen, 1986; Lorenz, McGrath e Giller, 1992). A contaminação com metais em concentrações próximas ou abaixo dos limites permitidos pela Comunidade Européia ocasionou reduções significativas na fixação de N_2 por bactérias heterotróficas (Brookes et al., 1984, citado por Brookes, 1995; Lorenz, McGrath e Giller , 1992). Entretanto, devido às baixas taxas de fixação assimbiótica de N_2 na maioria dos solos, este não é um parâmetro recomendado para ser usado como indicador de solos poluídos (Brookes, 1995). No entanto, o estudo dos efeitos da contaminação por metais pesados sobre os organismos envolvidos neste processo se justifica, devido à importância destes na sustentabilidade dos ecossistemas.

2.2.5 Respiração microbiana do solo

Várias definições têm sido dadas ao termo respiração. Anderson (1982), definiu respiração como sendo um processo de produção de energia no qual compostos orgânicos ou inorgânicos reduzidos atuam como doadores de elétrons. Constitui um processo universal não sendo restrito aos microganismos dos solos. Representa o mais antigo e mais utilizado parâmetro

para quantificar a atividade metabólica nos solos (Kieft e Rosacker, 1991), podendo ser avaliada através da evolução de CO_2 ou consumo de O_2 e dividida em dois tipos, segundo Alef (1995b), sendo a respiração basal aquela definida como a respiração sem a adição de substrato ao solo e a respiração induzida pelo substrato como a respiração do solo medida quando adiciona um substrato específico, como por exemplo, glicose, aminoácidos, sacarose, etc.

Geralmente, a atividade microbiana é avaliada através da evolução de CO_2, podendo ser altamente influenciada por diversos fatores do solo, como teor de umidade, temperatura, estrutura do solo e disponibilidade de nutrientes (Alef, 1995b), além da presença de compostos tóxicos como biocidas, em geral, e metais pesados (Biederbeck, Campbell e Smith, 1987; Brendecke, Axelson e Pepper, 1993; Brookes et al, 1986, Brookes e McGrath, 1984; Chander e Brookes, 1991c; Chander e Brookes, 1992; Doelman e Haanstra, 1984; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Harden et al, 1993; Leita et al, 1995; Olson, McKercher e Germida, 1984; Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995).

A respiração basal (RB) do solo ou induzida por substrato (RIS) pode ser utilizada para avaliar a atividade da população microbiana em áreas mineradas. A RB e RIS foram utilizadas para verificar o impacto da mineração de ferro sobre a atividade de microrganismos em um "top soil", em estéril com e sem vegetação, em rejeito e numa área em recuperação (Trindade, Tótola e Dias Júnior, 1994)

Pesquisas avaliando os efeitos de metais pesados sobre a respiração dos solos têm apresentado, algumas vezes, resultados distintos. Estudos tem verificado que a contaminação não teve efeitos consistentes sobre respiração microbiana do solo (Bardgett e Saggar, 1994), enquanto outros têm verificado um decréscimo (Brookes et al, 1986; Chander e Brookes, 1991c; Doelman e

Haanstra, 1984; Fritze et al., 1989; Hattori, 1992; Insan, Hutchinson e Reber, 1996) ou um aumento (Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Leita et al., 1995; Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995) nas taxas de evolução de CO_2. Este aumento na respiração deve-se, provavelmente, a uma maior reciclagem da população microbiana, necessitando com isto de um maior consumo de energia para sua sobrevivência (Chander e Brookes, 1993; Leita et al., 1995).

Os efeitos da contaminação com metais pesados sobre a respiração específica da biomassa ou quociente metabólico (qCO_2), já foram relatados em vários trabalhos (Bardgett e Saggar, 1994; Brookes e McGrath, 1984; Chander e Brookes, 1991c; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Insan, Hutchinson e Reber, 1996; Leita et al, 1995, Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995). Este parâmetro ecofisiológico tem se mostrado como um indicador mais sensível da contaminação dos solos com metais pesados do que valores de biomassa e respiração isolados. Solos contaminados têm apresentado maiores valores de qCO_2 em relação a solos não contaminados, mostrando que ocorreu um maior gasto de energia para a manutenção da população microbiana existente (Bardgett e Saggar, 1994; Chander e Brookes, 1991c; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Leita et al, 1995, Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995). Isto sugere que microrganismos consomem mais substrato para sobreviver nessas condições de estresse devido a um processo de seleção e adaptação (Chander e Brookes, 1993). Entretanto, Insan, Hutchinson e Reber (1996) verificaram que o qCO_2 não se mostrou como um bom parâmetro para diferenciar sítos contaminados por metais daqueles não contaminados, provavelmente, devido às diferenças químicas e físicas como textura, pH e teor de C orgânico ocorridas na área estudada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área estudada

O presente estudo foi realizado em área de, aproximadamente, 14 hectares localizada na Companhia Mineira de Metais (CMM), no município de Três Marias, região norte do Estado de Minas Gerais. A área é remanescente de depósito de mineração, misturado, ao longo de décadas com resíduos industriais provenientes da extração e industrialização de zinco, apresentando alto grau de contaminação por diversos metais pesados e em estádio avançado de degradação ambiental.

3.2 Adequação de procedimentos e métodos para a avaliação da densidade e atividade microbiana em amostras de solo contaminadas com metais pesados

Antes da determinação definitiva das análises biológicas (carbono da biomassa microbiana, contagem em placas do número de unidades formadoras de colônias de bactérias, fungos e actinomicetos cultiváveis, estimativa do número de amonificadores, nitrificadores e diazotróficos de vida livre e a respiração basal do solo) foi realizada a adequação dos procedimentos e metodologias a serem utilizados no laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA.

3.3 Coleta e preparação das amostras

A primeira coleta das amostras foi realizada dia 31 de novembro de 1995 para adequação da metodologia a ser utilizada. Portanto, coletou-se as amostras na profundidade de 0-20 cm, em sete sítios contaminados e um sítio controle, em área adjacente, à aproximadamente 1 km de distância. Em cada sítio coletaram-se três repetições perfazendo um total de 24 amostras no estudo. Os diferentes sítios amostrados foram selecionados de acordo com a cobertura vegetal existentes conforme descritos na Tabela 1. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Para o transporte, processamento e armazenamento das amostras seguiu-se a metodologia descrita por Valsecchi, Gigliotti e Farini (1995). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e colocadas em caixa de isopor com gelo até o transporte para o laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA. As amostras foram, em seguida, peneiradas (abertura = 4mm), quando realizou-se a retirada manual de raízes e restos vegetais, sendo determinada a capacidade de campo (CC) de cada amostra e o conteúdo de umidade ajustado para 60% da CC. As amostras foram então armazenadas em temperatura de 4° C, por no máximo de 60 dias quando foram utilizadas para as análises microbiológicas. Oito dias antes das análises as amostras foram retiradas e incubadas à temperatura de 27 ± 2° C no escuro, visando reduzir os efeitos da amostragem, transporte, peneiramento e armazenagem sobre os microrganismos e seus processos (Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995).

Após a adequação da metodologia, realizou-se nova coleta de amostras, nos mesmos sítios estudados (Tabela 1), no dia 8 de abril de 1996. Para o transporte, processamento, armazenamento e incubação das amostras utilizou-se o procedimento realizado na primeira coleta

Tabela 1: Características dos sítios amostrados

Identificação Códigos	Principais características dos sítios amostrados
CSv	Contaminado e sem cobertura vegetal (frente de escorrimento do rejeito)
CU	Contaminado e sem cobertura vegetal, área da ustulação.
CBd	Contaminado e com cobertura vegetal, predominando *Brachiaria decumbens* Stapf. Prain. (retirado ao lado da toceira).
CATi	Contaminado e com cobertura vegetal, predominando *Andropogon* sp, trema (*Trema micrantha* (L.) Blum.) e ingá (*Inga* sp).
CVc	Contaminado e com vegetação arbustiva típica de cerrado, sem vegetação graminóide.
CCB_1	Contaminado e com cobertura vegetal de *Brachiaria mutica* (Forsk.) Stapf. (capim bengo) e com fortes sintomas de fitotoxidez (morte acentuada).
CCB_2	Contaminado e com cobertura vegetal de *Brachiaria mutica* (Forsk.) Stapf. (capim bengo) e com algum sintoma de fitotoxidez
Sa	Solo agrícola adjacente cultivado com de hortaliças e milho

(Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995), como descrito anteriormente.

3.4 Análises biológicas

As análises biológicas foram realizadas através da determinação do carbono da biomassa microbiana, contagem em placas do número de unidades formadoras de colônias de bactérias, fungos e actinomicetos cultiváveis, estimativa da população de algumas espécies de diazotróficos

de vida livre, amonificadores e nitrificadores cultiváveis através da técnica do número mais provável, enquanto que a atividade microbiana foi avaliada através da medição da respiração basal do solo.

3.4.1 Carbono da biomassa microbiana

A determinação do carbono da biomassa microbiana foi realizado através do método da fumigação-extração e oxidação do carbono orgânico pelo dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (Vance, Brookes e Jenkinson, 1987; Joergensen, 1995). Para isto, 20 gramas das amostras (peso fresco) foram fumigadas com 25 ml clorofórmio livre de etanol sob vácuo de, aproximadamente, 600 mm de Hg por 2,0 minutos após o início da ebulição em "dessecador umidecido", permanecendo 24 horas em contato com o vapor deste fumigante, em local escuro e a uma faixa de temperatura de 27 ± 2 ° C. O carbono orgânico do solo foi extraído por 50 ml de uma solução de sulfato de potássio 0,5 M (K_2SO_4) sob agitação de 30 minutos, após o qual o extrato foi filtrado em filtro de papel Whatman 42. Uma alíquota de 8 ml do filtrado, juntamente com 2 ml de $K_2Cr_2O_7$ 66,7 mM, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , 98%) e 5 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 88 %) foram aquecidos em chapa térmica por refluxo por 3 minutos após o surgimento da primeira bolha, quando ocorreu a reação de oxidação do carbono presente nas amostras de solo. Após o resfriamento da mistura, o $K_2Cr_2O_7$ residual foi quantificado através de titulação com sulfato ferroso amoniacal 33,3 mM ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 6H_2O$) e difenilamina 1%, em meio ácido, como indicador. Devido à instabilidade do titulante ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 6H_2O$), antes de cada análise, realizou-se sua padronização (Anderson e Ingram, 1993), que consistiu na titulação de 1 mL de

$K_2Cr_2O_7$ 66,7 mM na presença do indicador difenilamina a 1%, sendo que a exata concentração do $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 6H_2O$ foi dada pela fórmula:

Concentração do $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 6H_2O$ = 0,4 / v

onde: v = volume gasto de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 6H_2O$ na titulação

O carbono da biomassa microbiana foi calculado pelas fórmulas:

$$\text{C oxidável do solo } (\mu g\ C.\ g^{-1} \text{ de solo seco}) = \frac{(Br - A) \times N \times 0{,}003 \times 50 \times 10^6}{8 \times PS}$$

onde: Br = volume gasto para titular o branco;

A = volume gasto para titular a amostra;

N = normalidade exata do sulfato ferroso amoniacal;

0,003 = meq do C;

50 = volume de extrator;

8 = volume da alíquota;

PS = peso seco da amostra;

10^6 = fator de conversão para μg C

Carbono da biomassa microbiana = (μg C. g^{-1} de solo seco)

$$C_{mic} = (C_F - C_{NF}) \cdot kc$$

onde: C_{mic} = carbono da biomassa microbiana do solo;

C_F = carbono da amostra fumigada;

C_{NF} = carbono da amostra não fumigada;

kc = 2,78 (fator de correção obtido por Vance, Brookes e Jenkinson, 1987)

A partir dos resultados do C da biomassa microbiana e do teor do C orgânico total das amostras de solo, calculou-se a relação entre estes dois parâmetros, expresso como a percentagem de C microbiano em relação ao C total do solo (Anderson, 1994).

3.4.2 Contagem de bactérias, fungos e actinomicetos

O número de bactérias, fungos e actinomicetos cultiváveis no solo foi determinado através da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) pelo método da inoculação de suspensões diluídas de solo em meios de cultura (Wollum II, 1982). Assim, preparou-se uma diluição decimal em série, colocando-se 10 gramas (base seca) da amostra composta de cada sítio (3 amostras simples) em erlenmeyer de 250 mL que continham 95 mL de solução tampão fosfato esterelizada em autoclave à 121° C por 20 minutos (diluição 10^{-1}). Estes frascos foram agitados por 30 minutos em agitador de movimento circular horizontal de, aproximadamente, 200 rpm para dispersão das amostras de solo. Em seguida, efetuaram-se as diluições posteriores retirando, com uma pipeta estéril, 1 mL dos frascos da diluição 10^{-1} para tubos de ensaio com 9 mL da solução tampão fosfato (diluição 10^{-2}). Para as próximas diluições foram retirados 1 mL da diluição anterior e colocadas em tubos de ensaio com 9 mL da solução tampão-fosfato. Foram feitas três repetições (três placas) por diluição para cada grupo de microrganismo e sítio estudado. Para a população de fungos cultiváveis utilizou-se as diluições 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} para os sítios contaminados e 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} para o sítio controle. Para a população de actinomicetos cultiváveis as diluições utilizadas foram 10^{-3}, 10^{-4} e 10^{-5} para os sítios contaminados e 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-5} para o sítio controle, finalmente, para a população de bactérias

cultiváveis utilizou-se as diluições 10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6} para os sítios contaminados e 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} para o sítio controle. Os meios utilizados foram meio Ágar Nutriente (Wollum II, 1982), meio Martin (Wollum II, 1982) e meio Waksman (Waksman,1961), respectivamente, para bactérias, fungos e actinomicetos (Tabela 2). Foi adicionado ciclohexamida (actidione), (Sigma Chemical), esterelizada por filtragem através de membrana de celulose nitrato, com poros de 0,2 μm de diâmetro (Schleicher & Schiill) suficientes para obter a concentração de 150 mg / L de meio Waksman para evitar crescimento fúngico e, ampicilina + estreptomicina, também esterelizadas por filtragem, como descrito acima, suficientes para obter a concentração de 50 mg / L de meio Martin para cada antibiótico, no intuito de evitar o crescimento de bactérias do solo. Neste meio também foi utilizado o corante rosa bengala na concentração de 30 mg / L de meio, com a finalidade reduzir o crescimento radial fúngico (Martin, 1950). Aos meios de cultura vertidos 1 dia antes da inoculação, adicionou-se, superficialmente, 0,1 mL da suspensão de solo por placa ("spread plate"), espalhando-se com uso da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas na posição invertida em sala de crescimento, a uma faixa de temperatura de 27 ± 2 °C. Realizou-se a contagem do número de colônias de bactérias após 3 dias de incubação, para fungos, depois de 6 dias e para actinomicetos, após 8 dias. Para a contagem de bactérias e actinomicetos foram consideradas as diluições onde houve crescimento de até 300 colônias por placa e para fungos de até 100 colônias por placa.

3.4.3 Número de amonificadores e nitrificadores

Para estimativa do número de microrganismos amonificadores e nitrificadores seguiu-se o método das inoculações de suspensões diluídas de solo, em meios de cultura líquidos segundo

TABELA 2: Composição química dos meios utilizados para isolamento e crescimento de fungos, bactérias e actinomicetos cultiváveis.

Constituintes Químicos	Fungos	Bactérias	Actinomicetos
	Quantidades utilizadas (gramas . L^{-1})		
Glicose	10,0	5,0	--
Peptona	5,0	5,0	--
K_2HPO_4	0,5	--	0,3
KH_2PO_4	0,5	--	--
$MgSO_4\ 7H_2O$	0,5	--	1,0
Amido solúvel	--	--	10,0
$NaNO_3$	--	--	1,0
NaCl	--	--	0,5
Extrato de levedura	0,5	1,0	--
Extrato de carne	--	3,0	--
Rosa-de-bengala	0,03	--	--
Ágar	20,0	20,0	20,0

Schmidt e Belser (1982) e Saratchchandra (1978) (Tabelas 3 e 4) e a estimativa do número de células viáveis através da utilização de tabela do número mais provável (NMP). O preparo da série de diluições foi realizada conforme o itém 3.4.2. Após a inoculação, os tubos foram incubados em sala de crescimento a uma faixa de temperatura de 27 ± 2 °C por 7 dias no escuro, para microrganismos amonificadores, com uma avaliação preliminar no terceiro dia, já que nas diluições mais baixas, devido à maior densidade de microrganismos, pode ocorrer nitrificação da amônia, tornando o meio amarelo claro, devido à acidez. Os tubos positivos, ou seja, aqueles com produção de amônia, apresentam mudança na coloração de laranja para rosa. Os tubos para

contagem de microrganismos nitrificadores (oxidantes de amônio e de nitrito), foram incubados em estufa de crescimento à temperatura de 29 ± 1 °C por 7 semanas, no escuro, quando se realizou a avaliação da presença ou não de nitrificadores, detectando-se através de reações químicas, a presença de NO_2^- e/ou NO_3^-.

3.4.4 Número de *Azospirillum* spp

A estimativa do número de diazotróficos de vida livre do gênero *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. amazonense* e *A lipoferum*), foi realizada utilizando o método da inoculação de suspensões diluídas de solo, em meio de cultura semi-sólido, em vidros de 10 cc contendo 4 mL de meio por vidro. O preparo da série de diluições foi realizada conforme o itém 3.4.2. Utilizou-se o meio Nfb semi-sólido (Döbereiner, 1978), para isolamento de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* e o meio LGI semi-sólido (Magalhães et al., 1983) para o isolamento e crescimento de *Azospirillum amazonense* (Tabela 5). Foram realizadas três diluições por meio, com três repetições por diluição, para cada sítio estudado. Após a inoculação com 0,1 mL das suspensões das amostras compostas de solo, os vidros foram incubados em sala de crescimento à temperatura de 27 ± 2 °C por 10 dias. A presença do crescimento desses microrganismos foi realizada através de observações visuais da formação de "películas" brancas próximas à superfície, seguido da confirmação da atividade da nitrogenase pelo método da redução de acetilelo (ARA) por cromatografia gasosa e, finalmente, observações microscópicas. A estimativa do número de células viáveis foi realizada através da utilização de tabela do número mais provável (NMP).

TABELA 3: Composição do meio de cultivo para nitrificadores.

Constituintes químicos	Concentração da solução estoque (g/100 mL)	Meio de cultivo (mL solução estoque/ L. de meio)	
		Oxidantes de amônio	Oxidantes de Nitrito
$(NH_4)_2SO_4$	5,0	10,0	--
KNO_2	0,85	--	1,0
$CaCl_2.2H_2O$	1,34	1,0	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	4,00	1,0	5,0
Azul de bromotimol	0,04	5,0	--
K_2HPO_4 (0,2 M)	3,48	--	4,0
KH_2PO_4 (0,2 M)	2,72	7,5	1,0
Ferro Quelatado		1,0	1,0
$FeSO_4.7H_2O$	0,246		
EDTA dissódico	0,331		
Elementos Traços		1,0	1,0
$NaMoO_4.2H_2O$	0,01		
$MnCl_2$	0,02		
$CoCl_2.6H_2O$	0,0002		
$ZnSO_4.7H_2O$	0,01		
$CuSO_4.5H_2O$	0,002		

3.4.5 Respiração microbiana do solo

A atividade microbiana foi avaliada através da respiração basal das amostras de solo, sendo determinada pela captura do CO_2 evoluído de uma amostra de 50 gramas de solo (base

TABELA 4: Composição química do meio para isolamento de microrganismos amonificadores.

Constituintes químicos	Quantidade utilizada ($g . L^{-1}$)
Ácido casamino (arginina ou caseína hidrolisada)	10,0
Extrato de levedura	0,1
K_2HPO_4	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,1
$FeSO_4.7H_2O$	0,01
$MnSO_4.4H_2O$	0,01
Vermelho de Fenol	0,02

seca) por 20 mL de uma solução de NaOH 0,05 M em um recipiente de 1000 cc, hermeticamente fechado e incubado por três dias no escuro à temperatura de 27 ± 2°C. Após o período de incubação, o CO_2 capturado foi precipitado como carbonato de bário, através da adição de 5 mL de cloreto de bário 0,5 M, e o excesso de NaOH foi titulado com solução HCl 0,05 M na presença de fenolftaleína 0,1 % (modificado de Alef, 1995b). A taxa de evolução de CO_2 é calculada através da seguinte fórmula:

$$CO_2 \text{ (mg / kg de solo seco)} = \frac{(Vo - V) \times 1{,}1 \times 1000}{PSS}$$

onde: Vo = volume de HCl gasto na titulação do branco (média dos brancos);

V = volume de HCl gasto na titulação da amostra;

PSS = peso do solo seco;

1,1 = fator de conversão (1 ml NaOH 0,05 M = 1,1 mg de CO_2);

1000 = para ter resultados kg de solo seco.

TABELA 5: Composição química dos meios utilizados para isolamento e crescimento de diazotróficos de vida livre.

Constituintes químicos	*Azospirillum amazonense* (pH = 6,0)	*Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* (pH = 6,8)
Sacarose	5,0 g	--
KH_2PO_4	0,12 g	--
K_2HPO_4	0,03 g	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,2 g	0,2 g
$CaCl_2.2H_2O$	0,02 g	0,02 g
NaCl	0,1 g	0,1 g
FeEDTA (1,64%)	4mL	4mL
Sol. de vitaminas [1]	1mL	1mL
Sol. micronutrientes[2]	2mL	2 mL
Agar	1,75g	1,75g
Azul de bromotimol (0,5% em 0,2N NaOH)	--	2 mL
Ac. málico	--	5,0 g

[1] Solução de vitaminas

- Biotina---------- 10mg
- Piridoxina---------- 20mg
- Água estéril (dissolver em "banho maria" e manter em geladeira) 100ml

[2] Solução de micronutrientes

- $NaMoO_4.2H_2O$---------- 0,2g
- $MnSO_4 H_2O$---------- 0,235g
- H_3BO_3---------- 0,28g
- $CuSO_4.5H_2O$---------- 0,008g
- $ZnSO_4.7H_2O$---------- 0,024g
- H_2O---------- 200ml

3.4.6 Respiração específica da biomassa ou quociente metabólico (qCO_2)

A partir da resultados da respiração basal das amostras de solo e do C da biomassa microbiana, calculou-se o quociente metabólico (qCO_2), que representa a quantidade de C-CO_2 evoluída por unidade de C microbiano (μg C-CO_2.hora^{-1} /μg C-biomassa.g^{-1} solo seco) (Anderson, 1994).

3.5 Análises químicas

As análises químicas de rotina e dos teores de metais solúveis em água e biológicas foram realizadas na Universidade Federal de Lavras (UFLA), nos laboratórios de Microbiologia do Solo, Fertilidade do Solo, Física do Solo e Relação Solo-Planta, do Departamento Ciência do Solo. As análises de teores totais de metais foram realizadas no laboratório da Empresa Mineira de Metais (CMM).

Foram realizadas análises químicas de pH em água, na relação 1,0:2,5 (solo : água); Ca, Mg e Al trocáveis extraídos com KCl 1N e analisados por titulometria, respectivamente (EMBRAPA, 1979; Vettori, 1969); P e K disponíveis foram obtidos através de uma solução extratora Mehlich I (HCl 0,05 N + H_2SO_4 0,025 N) e determinados por colorimetria e fotometria de chama, respectivamente (Vettori, 1969); e o S determinado pelo método turbimétrico (Blanchar, Rehm e Caldwell, 1965). A acidez potencial (H^+ + Al^{3+}) foi determinada de forma indireta, através da solução SMP e quantificada em potenciômetro (Quaggio, Raij e Malavolta, 1985). O carbono orgânico foi determinado pelo método colorimétrico através de digestão por

bicromato de sódio (Raij, Quaggio e Cantarella, 1987). Indiretamente, através da quantificação do C orgânico, realizou-se o cálculo da matéria orgânica do solo. A CTC efetiva, CTC a pH 7,0, soma de bases, saturação por bases e saturação por alumínio foram determinadas de forma indireta através dos valores de acidez potencial, bases trocáveis e alumínio trocável.

A concentração total de metais (Cd, Zn, Cu, Pb, Cr e Mn) foi obtida através de dissolução das amostras de solo por uma mistura concentrada (1:3) de HNO_3 : HCl (ácido nítrico:ácido clorídrico) ("*aqua regia*") conforme Forster (1995) seguido da determinação dos metais pesados por Espectometria Atômica de Emissão de Plasma.

3.6 Análises estatísticas

As determinações de biomassa e respiração foram realizadas em triplicata, enquanto que as demais, devido à grande quantidade de material envolvido (placas de petri, tubos e vidros), foram feitas à partir de amostras compostas e em duplicata. Foram realizadas transformações dos dados das variáveis para satisfazer os princípios de distribuição normal de média e desvio padrão (teste de Lillieforms) ou da homogeneidade das variâncias (teste de Cochran). Os resultados do C da biomassa microbiana, respiração e contagens foram transformados para Logarítmo (x + 1) antes da realização da ANAVA. Para a respiração específica da biomassa e a % de C microbiano em relação ao C orgânico total do solo utilizou-se a transformação arco seno da raiz quadrada de (x/100). Os dados foram submetidos à análise de variância, ao teste de média e a regressão linear múltipla em backward pelo Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 5.0-93

(Euclides, 1983). As interrelações entre os parâmetros avaliados foram verificadas através de análises de correlação de Pearson.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características químicas do solo

As quantidades totais médias de Cu, Zn, Cd, Pb, Cr e Mn solúveis em "*aqua regia*" nos sítios amostrados, o somatório da concentração total média de todos os metais, bem como os limites superiores permitidos pela Comunidade Econômica Européia (CEE), encontram-se na Tabela 6. Com excessão do Cd, os teores de todos os metais no sítio controle (Sa), se encontra bem abaixo dos valores máximos permitidos pela CEE. A concentração de todos os metais, exceto Cr, foi muito superior nos sítios contaminados em relação ao controle, sendo que neste, todos os metais, com excessão do Cd, encontram-se em níveis normalmente encontrados em solos não contaminados (Doelman, 1986; Malavolta, 1994). Apesar de serem verificadas concentrações totais maiores de Cd em determinadas situações como, por exemplo, alto teor deste elemento na rocha de origem, provavelmente, ocorreu uma pequena contaminação neste sítio, devido sua proximidade da unidade de processamento, em torno de 1,0 km. Segundo Kabata-Pendias e Pendias (1985), o teor de Cd pode ser muito alto nas proximidades de minas e, em especial, perto das unidades de processamento.

Através das concentrações totais médias dos elementos, verifica-se que todos os sítios da área estudada apresentaram altos níveis de contaminação, sendo Cu e o Zn os principais contaminantes, variando de 4 a 49 e 11 a 89 vezes maiores nos sítios contaminados em relação ao

TABELA 6: Quantidades médias extraídas de metais pesados solúveis em "*aqua regia*", somatório da concentração total média nos sítios estudados e limites superiores de concentração total de metais (solúveis em "*aqua regia*") permissíveis pela Comunidade Econômica Européia (CEE):

	Metais ($mg.kg^{-1}$)						
Sítio	Mn	Cr	Cu	Pb	Cd	Zn	$\Sigma^{(1)}$
CSv	133	25	446	134	53	3042	3833
CU	287	30	68	70	26	1483	1964
CBd	1625	33	887	1016	79	11969	15609
CATi	758	20	808	383	92	6526	8587
CVc	602	35	619	250	86	6791	8383
CCB_1	797	26	865	393	109	10372	12562
CCB_2	516	21	543	333	41	5523	6977
Sa	98	28	18	24	7	135	310
Limite superior CEE[2]	---	50	140	50	3	150	

[1] Somatória da concentração total média de todos metais estudados

[2] Limites superiores de concentração total de metais (solúveis em "*aqua regia*") permissíveis pela Comunidade Econômica Européia (CEE) em solos que receberam lodo de esgoto ou composto de lixo (Doelman, 1986; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Chander e Brookes, 1991a; 1993).

sítio Sa, respectivamente. A concentração total média de Pb no sítio CBd, o mais contaminado com este metal, foi 42 vezes maior que no sítio Sa, ultrapassando 1000 $mg.kg^{-1}$. Nos demais sítios variou entre 3 e 16 vezes (70 e 393 $mg.kg^{-1}$) em relação ao controle. O Mn seguiu a mesma tendência do Pb, sendo sua concentração maior, também, no sítio CBd (1625 $mg.kg^{-1}$). O Cd apresentou concentrações inferiores aos demais elementos, com exceção do Cr, sendo o menor valor encontrado no sítio CU (26 $mg.kg^{-1}$), e o restante apresentando concentrações variando de 41 a 109 $mg.kg^{-1}$.

As concentrações totais médias encontradas para Cu, Zn, Pb e Cd nos sítios contaminados estão acima dos limites permissíveis de metais em solos europeus que receberam resíduos orgânicos (Tabela 6). Além disso, os valores encontrados estão muito acima da concentração verificada em muitos trabalhos (Brookes, 1995; Brookes e McGrath, 1984; Brookes et al., 1986; Brookes, McGrath e Heijnen, 1986; Chander e Brookes, 1991a, b, c, d; 1993; Chaudri, McGrath e Giller, 1992a, b; Chaudri et al., 1993a, b; Doelman e Haanstra, 1984; Dumontet e Mathur, 1989; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Hattori, 1992; Hiroki, 1992; Hirsch et al., 1993; Lorenz, McGrath e Giller, 1992; McGrath, Brookes e Giller, 1988; Obbard, Sauerbecke e Jones, 1993; Reddy, Cheng e Dunn, 1983; Smith e Giller, 1992; Yamamoto, Tatsuyama e Uchiwa, 1985) que avaliaram o impacto da contaminação dos solos com metais pesados sobre a população microbiana e seus processos.

Deve ser considerado que a contaminação nos diferentes sítios ocorreu por uma fonte inorgânica (rejeito de mineração e processamento de Zn) e os limites de concentração total de metais foram estabelecidos, principalmente, para contaminantes orgânicos como lodo de esgoto e composto de lixo, os quais podem atuar na complexação de metais reduzindo a disponibilidade e, conseqüentemente, a toxicidade dos mesmos, fornecendo, ao mesmo tempo, carbono para os microrganismos do solo. Assim, estes limites podem estar superestimados para contaminações via materiais inorgânicos, como o caso deste estudo.

Visando estimar o grau de contaminação de cada sítio, uma vez que os efeitos da contaminação com metais pesados são aditivos, realizou-se a somatória da concentração de todos os metais (Tabela 6). Verifica-se que os sítios CBd e CCB_1, apresentaram valores da somatória (Σ) das concentrações totais dos metais superiores a 10000 $mg.kg^{-1}$. Os menores valores foram

verificados para os sítios sem vegetação CU e CSv. Entretanto, a biodisponibilidade desses metais variam com as características dos solos e com o tipo e concentração do metal ou metais em questão (Malavolta, 1994; Tisdale, Nelson e Beaton, 1985).

As características químicas e físicas dos diferentes sítios estudados encontram-se na Tabela 7. Observa-se que, de modo geral, maiores valores de pH, teores de P, K, Mg, soma e saturação de bases e menores valores de alumínio trocável, acidez potencial e saturação de alumínio nos sítios contaminados em relação ao controle. Os menores valores de pH e P disponível foram verificados nos sítios CU e Sa. Além disso, os sítios sem vegetação (CU e CSv), os sítios com capim bengo (CCB_1 e CCB_2) e o controle (Sa) apresentaram os menores teores de carbono orgânico. Apenas os sítios CATi e CU apresentaram maiores valores de CTC efetiva e total em relação ao controle. A textura não apresentou grandes variações entre os diversos sítios, indo de franco-argiloso nos sítios CVc e CSv a franco-arenoso no sítio CCB_2.

Os teores de matéria orgânica foram baixos a médios (Kiehl, 1985) nos sítios estudados, sendo os maiores teores verificados nos sítios CBd, CATi e CVc (Tabela 7).

A matéria orgânica pode complexar metais reduzindo ou aumentando sua disponibilidade nos solos, o que vai depender do tipo de matéria orgânica, características do solo e do metal em questão (Lo, Yang e Lin, 1995; Tisdale, Nelson e Beaton, 1985). O cobre, por exemplo, é um dos elementos que mais fortemente se ligam à matéria orgânica do solo tendo sua disponibilidade altamente afetada pela formação de complexos metal-matéria orgânica, que são importantes para explicar porque as deficiências do elemento não são tão freqüentes quanto as de zinco em valores alto de pH (Malavolta, 1994; Tisdale, Nelson e Beaton, 1985).

TABELA 7: Parâmetros de fertilidade dos sítios da área estudada:

Sítios	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H + Al	S	t	T	m	V	C org	Areia	Silte	Argila
		$mg.kg^{-1}$		$cmol_c . dm^3$						%			$g.kg^{-1}$	%		
CSv	5,43	10,00	43,67	0,93	1,70	0,13	3,53	2,73	2,87	6,27	5,00	44,00	8,30	31	40	29
CU	4,43	2,00	49,33	4,23	2,37	0,77	5,63	6,70	7,47	12,33	11,67	52,00	3,30	24	50	26
CBd	6,07	16,00	88,67	2,40	1,30	0,10	2,60	3,93	4,03	6,53	3,67	62,33	14,33	26	49	25
CATi	6,47	23,33	71,00	6,57	0,80	0	2,13	7,53	7,53	19,67	0	73,00	16,30	19	44	37
CVc	5,87	29,00	50,00	2,17	1,90	0,03	3,20	4,17	4,20	6,90	0,67	47,00	12,33	29	41	30
CCB_1	6,27	20,00	86,33	2,13	1,23	0,03	1,77	3,57	3,60	5,33	1,00	67,33	9,00	35	43	22
CCB_2	6,37	23,33	72,00	1,30	1,23	0,03	1,37	2,73	2,77	4,10	1,00	66,33	5,33	51	34	15
Sa	4,83	4,67	68,67	2,27	1,13	0,90	4,63	3,57	4,47	8,20	21,67	44,67	8,30	14	50	36

4.2 Carbono da biomassa microbiana

Verificaram-se diferenças siginificativas entre os sítios amostrados (Figura 1a), sendo encontrados os maiores valores nos sítios CATi e Sa (725,2 e 706,7 μg de $C.g^{-1}$ de solo seco, respectivamente). Os sítios CSv e CU, ambos sem vegetação e os sítios CCB_1 (capim bengo) e CVc (cerrado sem vegetação rasteira) que apresentaram menor biomassa (98,9; 139,0; 92,4 e 135,6 μg de $C.g^{-1}$ de solo seco, respectivamente), tiveram uma redução acima de 80% em relação ao sítio Sa, evidenciando o elevado grau de impacto da contaminação sobre a biomassa nestes sítios. Os sítios CBd e CCB_2 não diferiram significativamente entre si e com o sítio controle.

Além da elevada contaminação nos sítios CSv e CU, a ausência de vegetação e o baixo teor de carbono e baixo pH, podem ter contribuído para uma redução na biomassa nestes sítios.

Cattelan e Vidor (1990a), verificaram que um solo sem cobertura vegetal apresentou a menor biomassa, em relação ao mesmo solo, quando sujeito a seis tipos diferentes sistemas de cultivo, onde ocorreu maiores teores de matéria orgânica, que constitui importante fonte de energia e nutrientes para os microrganismos heterotróficos (Alexander, 1977), além de ter aumentado a retenção de umidade, o que favoreceu o desenvolvimento microbiano.

O pH do solo pode afetar diretamente o metabolismo microbiano, influenciando a absorção de nutrientes e a permeabilidade das membranas pela concentração de H^+ ou OH^- ou ter efeitos indiretos sobre a fisiologia, interação com outros organismos, adsorção de substratos, disponibilidade e solubilização de nutrientes e outros elementos tóxicos (Siqueira e Franco, 1988). Além disso, a maioria dos solos ácidos apresentam concentrações inadequadas de nutrientes ou elementos prejudicando o desenvolvimento de plantas e microrganismos (Tsai, Baraibar e Romani,

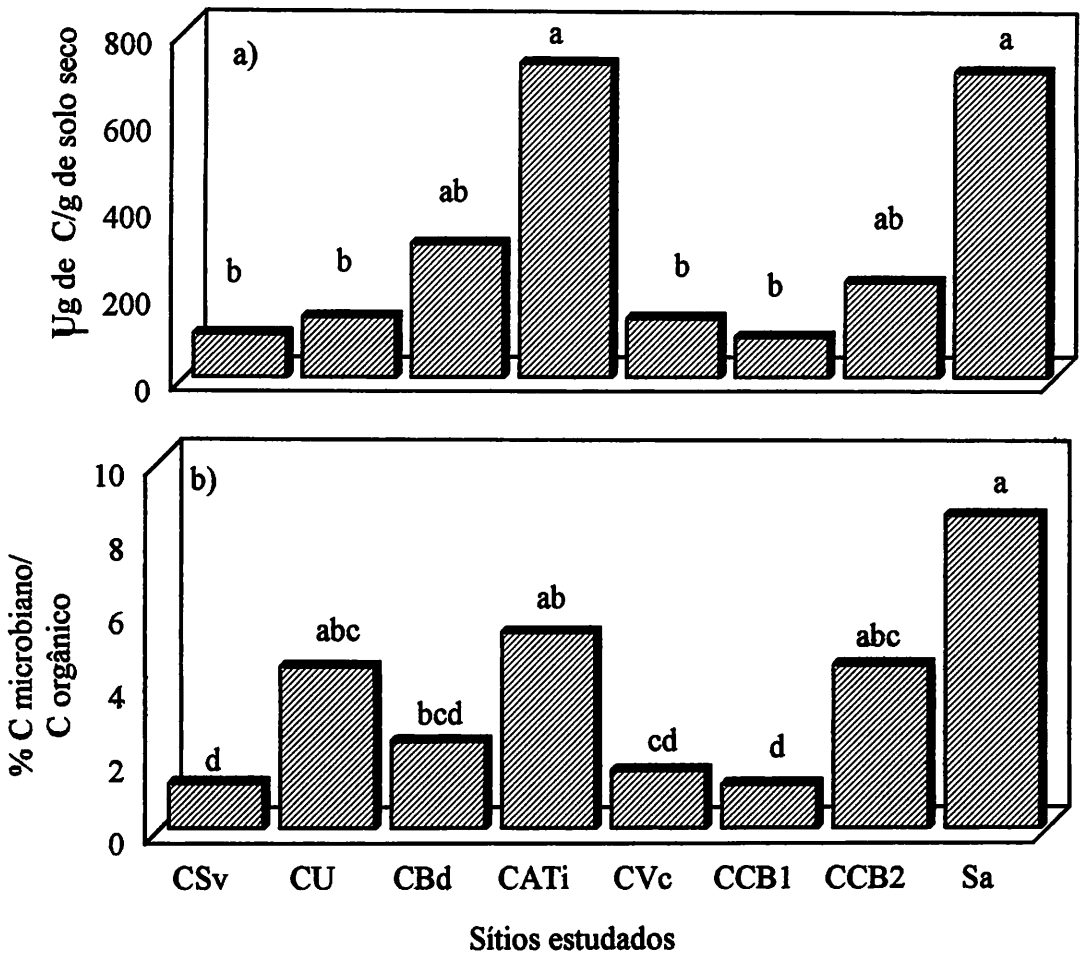

FIGURA 1: Carbono da biomassa microbiana (a) e C-microbiano como % do C orgânico do solo (b) nos diferentes sítios estudados. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

1992). Deve-se levar em conta também, que a solubilidade de metais potencialmente tóxicos como Mn, Fe, Zn, Cu, Cd e Pb aumenta com a redução do pH do solo (Siqueira et al., 1994).

Estudos verificaram uma redução na biomassa microbiana do solo em área onde ocorreu decréscimo do pH pelo incremento da deposição ácida com dióxido de enxofre (SO_2) (Bewley e Parkinson,1984; 1985).

Apesar da elevada contaminação com Zn, Cu e Cd do sítio CATi, a biomassa foi alta e não diferiu daquela verificada no sítio controle. Este sítio apresentou um maior teor de carbono orgânico que os demais sítios, podendo ter ocorrido uma maior complexação de metais pelos materiais orgânicos depositados pela vegetação.

Dumontet e Mathur (1989), verificaram que um solo contaminado com 5000 $\mu g.g^{-1}$ de Cu apresentou efeito reduzido sobre a população microbiana sendo isto atribuido à formação de complexos entre Cu-matéria orgânica do solo. Entretanto, a solubilidade destes complexos irá depender do tipo de componente orgânico envolvido. Ácidos húmicos formam complexos de baixa solubilidade, diminuindo a mobilidade de metais. Entretanto, ligações entre metais e ácidos orgânicos, tais como ácido acético, aumentam sua mobilidade e disponibilidade biológica (Lo, Yang e Lin, 1992). Portanto, os efeitos da matéria orgânica sobre o comportamento dos metais pesados no solo, aumentando ou reduzindo a sua disponibilidade, dependerá da natureza dos complexos formados (Lo, Yang e Lin, 1992; Tisdale, Nelson e Beaton, 1985).

Outro fator a ser considerado, é que a matéria orgânica do solo constitui a força geradora de energia utilizada nos processos metabólicos realizados pela população microbiana envolvendo vários nutrientes essenciais (Alexander, 1977; Martens, 1995; Siqueira e Franco, 1988),

constituindo fonte de energia e C para o crescimento e metabolismo da população microbiana (Bolton, Fredrickson e Elliott, 1992).

Também pode ter ocorrido influência do tipo de cobertura vegetal reduzindo a toxicidade de altas concentrações de metais sobre a biomassa do solo. A população microbiana é altamente influenciada na região rizosférica atingindo valores muitas vezes superiores àquele encontrado no solo não rizosférico (Rovira e Davey, 1974). Isto ocorre porque a região rizosférica constitui um ecossistema muito especializado devido a liberação compostos orgânicos, os quais favorecem a população microbiana do solo. Estes compostos constituem a principal fonte de energia e carbono para o crescimento e metabolismo da população microbiana presentes na rizosfera (Bolton, Fredrickson e Elliott, 1992). Além disso, algumas plantas através de processos de oxirredução, modificação do pH ou formação de complexos organo-metálicos solúveis ou insolúveis menos tóxicos tem reduzido a solubilidade e toxicidade de metais nos solos na região rizosférica. A produção de ácidos oxálicos e malônico na zona radicular pode reduzir a toxicidade de metais pelo processo de complexação (Foy, Scott e Fisher, 1988; Foy, 1988). Plantas tolerantes ou hiperacumuladoras possuem mecanismos que reduzem a disponibilidade e/ou toxicidade de metais podendo, além disso, absorver maiores concentrações de metais (Baker e Brooks, 1989) reduzindo com isto, a concentração dos mesmos na região rizosférica.

O conteúdo médio do C da biomassa microbiana encontrado nos sítios estudados variou de 92,4 a 725,2 μg de $C.g^{-1}$ de solo seco, se situando em faixas de valores semelhantes ou próximas às encontradas por autores em outros solos contaminados por metais pesados. Valsecchi, Gigliotti e Farini (1995), estudando os efeitos da contaminação com metais pesados pela aplicação de resíduos orgânicos em uma área de 8 km^2 , encontraram valores de biomassa C

que variaram de 105 a 508 μg de $C.g^{-1}$ de solo. A biomassa microbiana foi, entretanto, pouco afetada pelos metais pesados quando se comparou sítios de diferentes contaminações. Isto, provavelmente, ocorreu devido às diferenças químicas e físicas entre os sítios estudados, o que deve ter influenciado a biomassa microbiana e sua atividade, mascarando os efeitos diretos dos metais pesados. Chander e Brookes (1991a) e Chander e Brookes (1993) verificaram que o C da biomassa variou entre 79 a 716 μg de $C.g^{-1}$ de solo, em função do grau de contaminação, devido a aplicação de lodo de esgoto e características dos solos, como textura e teor de C orgânico. Brookes et al. (1986) e Brookes e McGrath (1984) observaram valores do C da biomassa microbiana em solos contaminados e não contaminados com metais pela aplicação de lodo de esgoto entre 68 e 191 e 127 e 287 μg de $C.g^{-1}$ de solo, respectivamente.

Os dados referentes à % de C microbiano em relação ao C orgânico total do solo encontram-se na Figura 1b. Os valores médios obtidos variaram de 1,2 a 8,5%. Segundo Weigand, Auerswald e Beck (1995), esta variação na relação C microbiano/C orgânico do solo, pode ser explicada pelas diferenças químicas e físicas entre os sítios estudados. O maior valor foi encontrado no sítio controle (8,5 %), seguido pelo sítio CATi (5,3 %). Os sítios CCB_2 e CU, apresentaram valores de % C microbiano em relação ao C orgânico de, aproximadamente, a metade daquele verificado no sítio controle (4,4 %), sendo, entretanto, estatisticamente iguais. Estes altos valores encontrados nos sítios CCB_2 e CU, deve-se às baixas concentrações de C orgânico total nestes sítios com 5,0 e 3,0 $g.kg^{-1}$, respectivamente, indicando alto grau de estresse neste ambiente. Os sítios CSv e CCB_1 apresentaram os mais baixos valores (1,2 %), devido à baixa biomassa apresentada e aos baixos teores de C orgânico, sendo entretanto, mais altos do que os valores de C orgânico total verificados nos sítios CCB_2 e CU.

A elevada porcentagem encontrada para o sítio Sa (8,5%) está muito acima daquela proposta por Jenkinson e Ladd (1981), que consideram normal entre 1 e 4% do C orgânico total do solo. Provavelmente, o valor encontrado neste sítio, deve-se ao manejo empregado, visto que constitui uma área de uso intensivo com plantio de hortaliças e milho, o que deve ter estimulado uma maior reciclagem ou "turnover" do C orgânico do solo depositado na região rizosférica e, conseqüentemente, sua redução e estabilização em níveis mais baixos neste sítio. Entretanto, apesar destes baixos níveis de C orgânico, a elevada biomassa neste sítio pode ser explicada por não haver o fator estressante, ou seja, a contaminação com metais pesados.

Cattelan e Vidor (1990a) encontraram valores médios de % de C microbiano em relação ao C orgânico total do solo entre 1,0 e 2,0 % em solos sujeitos à diferentes sistemas de cultivo. Vários estudos com solos de regiões temperadas que receberam ou não resíduos orgânicos contaminados e não contaminados com metais pesados, além de resíduos inorgânicos contaminados, foram observados valores de % C microbiano em relação ao C orgânico do solo dentro da faixa estabelecida por Jenkinson e Ladd (1981), apresentando uma variação de 0,2 a 4,1% dependendo do grau de contaminação e das características dos solos (Chander e Brookes 1991a; Chander e Brookes, 1993; Insan, Hutchinson e Reber, 1996; Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995).

O uso deste parâmetro como indicador de efeitos negativos sobre a dinâmica do carbono do solo, causados pela contaminação com metais pesados, tem apresentado resultados contraditórios. Chander e Brookes (1991a), encontraram valores de % C microbiano em relação ao C orgânico, aproximadamente, duas vezes maior em solos que não receberam lodo de esgoto ou receberam lodo não contaminado com metais em relação aos solos que receberam lodo de

esgoto com elevada concentração de Cu ou Cu e Zn. Resultados semelhantes foram observados por Valsecchi, Gigliotti e Farini (1995) e Chander e Brookes (1993), que verificaram uma redução nos valores desta relação em solos contaminados com metais pesados quando comparados aos solos não contaminados. Entretanto, solos contaminados e não contaminados por metais pesados, estudados por Insan, Hutchinson e Reber (1996) não diferiram em relação a este parâmetro, provavelmente, devido à grande heterogeneidade das características dos solos estudados como teor de matéria orgânica, pH e textura.

No presente trabalho, este parâmetro também não se mostrou como um bom indicador dos efeitos da contaminação sobre a dinâmica do carbono no solo para os sítios CATi, CCB_2 e CU como proposto por Chander e Brookes (1991a; 1993). Nestes sítios este parâmetro não diferiu estatisticamente daquele verificado para o sítio controle. Isto, provavelmente, ocorreu devido às diferentes coberturas vegetais e características químicas e físicas dos diversos sítios estudados como verificado por Insan, Hutchinson e Reber (1996).

4.3 Respiração microbiana e quociente metabólico (qCO_2)

Os dados referentes à respiração microbiana do solo encontram-se na Figura 2a, com os valores médios entre os sítios contaminados diferindo significativamente entre si. O sítio CATi apresentou os maiores valores de respiração (32 mg de $CO_2 .kg^{-1}$ de solo seco), seguido dos sítios CBd, CCB_1 e Sa (11,5; 10,5 e 12,5 mg de $CO_2 .kg^{-1}$ de solo seco, respectivamente). Os sítios CSv e CU apresentaram valores de respiração bem inferiores aos demais (1,6 e 2,0 mg de $CO_2 .kg^{-1}$ de solo seco, respectivamente). Estes dois sítios tinham como características comuns, além da

elevada contaminação, a ausência de cobertura vegetal, baixos valores de pH e C orgânico total do solo. Portanto, provavelmente, a atividade microbiana avaliada através evolução de CO_2 , também foi influenciada pela presença e tipo de cobertura vegetal sobre os efeitos adversos da contaminação do solo por metais pesados, como foi verificado para a biomassa.

O teor de C orgânico e pH também influenciam na respiração microbiana do solo. Como relatado anteriormente, o C orgânico do solo constitui a fonte de nutrientes e energia para a realização dos processos microbianos, como a respiração do solo enquanto o pH pode afetar diretamente ou indiretamente a população microbiana e seus processos (Alexander, 1977; Bolton, Fredrickson e Elliott, 1992; Siqueira e Franco, 1988).

Estudos em área onde ocorreu o decréscimo do pH devido a poluição com dióxido de enxofre (SO_2), verificaram menores taxas de respiração basal do solo (Bewley e Parkinson, 1986a, citado por Bewley e Parkinson, 1986) e menores taxas de evolução de CO_2 quando adicionou-se celulose ou uréia, em relação a duas áreas menos contaminadas (Bewley e Parkinson, 1986).

A respiração do solo tem respondido de modo contraditório em relação à contaminação com metais pesados. Alguns estudos tem verificado que a contaminação não teve efeitos consistentes sobre respiração microbiana do solo (Bardgett e Saggar, 1994), enquanto outros têm verificado um decréscimo pela adição de resíduos orgânicos (Brookes et al, 1986; Chander e Brookes, 1991c; Doelman e Haanstra, 1984; Hattori, 1992) ou inorgânicos (Fritze et al., 1989; Insan, Hutchinson e Reber, 1996) ou um aumento (Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Leita et al., 1995; Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995) nas taxas de evolução de CO_2. Este aumento na respiração deve-se, provavelmente, a uma maior reciclagem da população microbiana, necessitando com isto de um maior consumo de energia para sua sobrevivência (Chander e Brookes, 1993; Leita et al., 1995). Segundo Leita et al. (1995), muitas vezes, em baixos níveis de

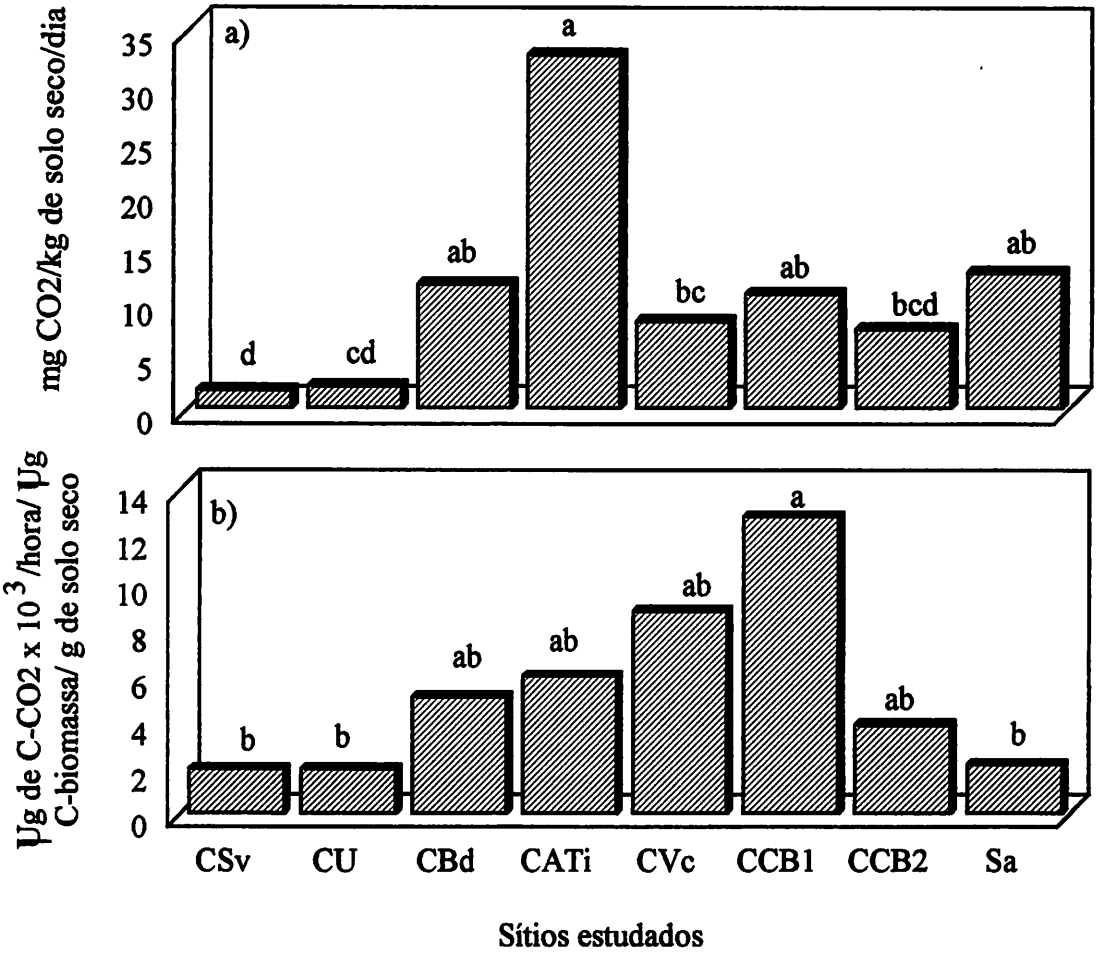

FIGURA 2: Evolução de CO2 (a) e Respiração específica da biomassa ou quociente metabólico -*q*CO2 (b) nos diferentes sítios estudados. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

contaminação tem-se verificado um aumento na evolução de CO_2, mas quando a contaminação ocorre em maiores concentrações, a respiração do solo decresce.

Os resultados médios da respiração específica da biomassa ou quociente metabólico (qCO_2) encontram-se na Figura 2b. O sítio CCB_1 apresentou o maior valor de qCO_2 (12,8 µg de C-CO_2 .10^3. hora^{-1}/µg de C-biomassa.g^{-1} de solo seco) sendo mais de 6 vezes maior do aquele verificado no sítio controle (2,18 µg de C-CO_2 .10^3. hora^{-1}/µg de C-biomassa.g^{-1} de solo seco). Os sítios CATi, CBd, CVc e CCB_2 apresentaram valores estatisticamente iguais ao do sítio controle.

Estes resultados mostram que apesar da baixa biomassa verificada no sítio CCB_1 em relação ao solo controle ela é constituída de microrganismos muito ativos. Neste sítio verificou-se alta contaminação, baixa biomassa e uma evolução de CO_2 semelhante daquela verificada no sítio controle. Os baixos valores de qCO_2 nos sítios CSv e CU, os quais foram, estatisticamente iguais ao sítio Sa, ocorreram devido à baixa biomassa e respiração do solo, decorrentes dos vários fatores estressantes verificados nestes sítios como a ausência de vegetação, elevada contaminação e aos baixos valores de pH, teores de nutrientes e carbono orgânico do solo. O baixo valor de qCO_2 verificado no sítio Sa ocorreu devido à alta biomassa e média evolução de CO_2, que apesar de apresentar baixo pH e teores de nutrientes, não constitui um ecossistema estressado pela contaminação com metais pesados.

Este parâmetro ecofisiológico tem se mostrado como um indicador mais sensível da contaminação dos solos com metais pesados do que valores de biomassa e respiração isolados. Entretanto, ele não se mostrou como um bom indicador do impacto de metais pesados pois apenas o sítio CCB_1 apresentou valores de qCO_2 estatisticamente diferente daquele verificado no sítio controle. Isto, provavelmente, se deve à heterogeneidade dos sítios estudados, uma vez que o uso

do qCO_2 como indicador da contaminação por metais tem sido recomendado em solos de características semelhantes (Anderson, 1994; Insan, Hutchinson e Reber, 1996).

Os efeitos da contaminação com metais pesados sobre a respiração específica da biomassa ou quociente metabólico, já foram relatados em vários trabalhos (Bardgett e Saggar, 1994; Brookes e McGrath, 1984; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Insan, Hutchinson e Reber, 1996; Leita et al, 1995, Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995). Solos contaminados têm apresentado maiores valores de qCO_2 em relação a solos não contaminados, mostrando que ocorreu um maior gasto de energia para a manutenção da população microbiana existente, ou seja, mais C orgânico adicionado através dos substratos evoluiu na forma CO_2 no solo contaminado e mais C orgânico foi convertido em uma nova biomassa no solo não contaminado (Bardgett e Saggar, 1994; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Leita et al, 1995, Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995). Isto sugere que microrganismos consomem mais substrato para sobreviver nessas condições de estresse devido a um processo de seleção e adaptação (Chander e Brookes, 1993). Entretanto, Insan, Hutchinson e Reber (1996) verificaram que o qCO_2 não se mostrou como um bom parâmetro para diferenciar a sítos contaminados por metais daqueles não contaminados, provavelmente, devido às diferenças químicas e físicas como textura, pH e teor de C orgânico ocorridas na área estudada.

4.4 Contagens de microrganismos

O número médio de unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos, bactérias e actinomicetos variou entre os sítios e o grupo de microrganismo estudado (Figura 3).

O número médio de propágulos viáveis por grama de solo seco, situou-se ao redor de 10^5 a 10^7 para as bactérias; 0 (zero) a 10^6 para actinomicetos e 10^3 a 10^4 para fungos. Esta grande variação no número de $UFC.g^{-1}$ de solo seco ocorreu devido, provavelmente, além da contaminação, da presença ou não de cobertura vegetal, do tipo dessa vegetação e às diferenças químicas e físicas verificadas entre os diversos sítios.

O número de bactérias, fungos e actinomicetos cultiváveis determinado através do método da inoculação de suspensões diluídas de solo em meios de cultura tem sido utilizado para avaliar os efeitos de diferentes sistemas de cultivo (Cattelan e Vidor, 1990b; Nuernberg, Vidor e Stammel, 1984; Silva Filho e Vidor, 1984) e da contaminação dos solos com metais pesados (Hattori, 1992; Hiroki, 1992; Yamamoto, Tatsuyama e Uchiwa, 1985) sobre a população de bactérias, fungos e actinomicetos, além de estudos de ecologia microbiana em solos de cerrado (Baldani et al., 1982; Coelho e Drozdowicz, 1978; Pereira, 1985).

Em solos de cerrado (LV e LE) de vegetação nativa e cultivado com soja, Pereira (1995) encontrou valores de $UFC.g^{-1}$ solo seco que variaram entre 10^4 a 10^6 para bactérias em geral e actinomicetos. Entretanto, Coelho e Drozdowicz (1978), observaram valores de $UFC.g^{-1}$ de solo de actinomicetos cultiváveis na ordem de 10^5 a 10^6 em Latossolo sob vegetação típica de cerrado. Baldani et al. (1982), estudando os efeitos da calagem e da presença de plantas sobre o número de bactérias e de actinomicetos em um Latossolo Vermelho-amarelo de cerrado, encontraram valores de $UFC.g^{-1}$ de solo, na ordem de 10^5 a 10^8. O número de UFC, em solo sujeito a diferentes tipos de cultivo, foi ao redor de 10^5 a 10^7 para as bactérias; 10^3 a 10^6 para actinomicetos e 10^4 a 10^5 para fungos (Cattelan e Vidor, 1990b; Nuernberg, Vidor e Stammel, 1984, Silva Filho e Vidor, 1984). Em área contaminada com metais pesados (Cd, Zn e Cu) pela aplicação de resíduos

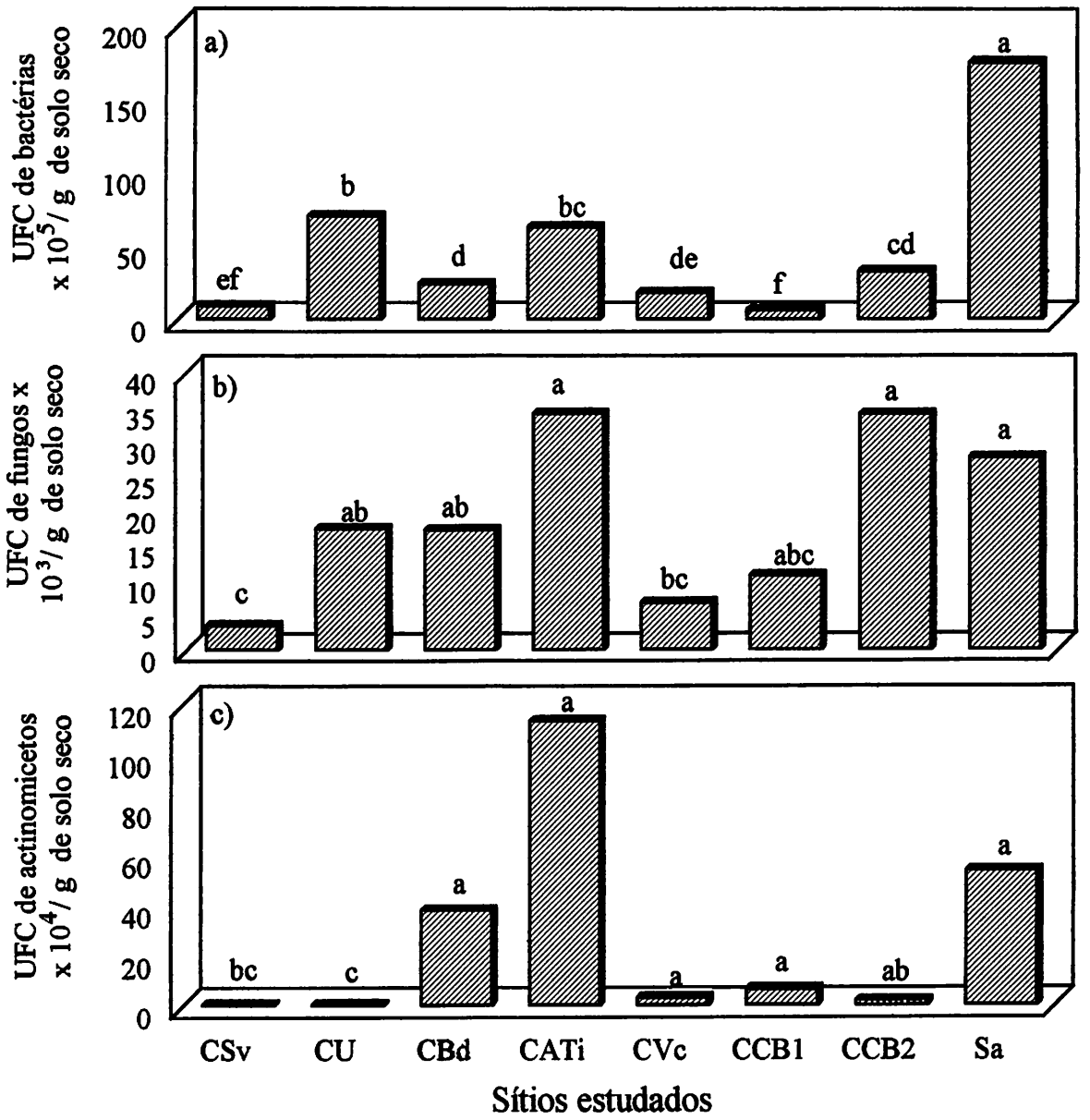

FIGURA 3: Número de UFC de bactérias (a), fungos(b) e actinomicetos cultiváveis (c) nos diferentes sítios estudados. Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade..

orgânicos, Hiroki (1992), encontrou valores de UFC.g^{-1} solo na ordem de 10^5 para fungos e 10^7 para bactérias e actinomicetos. Hattori (1992), obteve valores de UFC.g^{-1} de solo em dois solos contaminados com Cd, Zn, Pb, Cr, Ni ou Cu pela aplicação de lodo de esgoto que variaram de 10^4 a 10^7 para fungos e 10^7 e 10^9 para bactérias.

Para a população de bactérias cultiváveis em meio ágar nutriente, o número médio de UFC.g^{-1} de solo seco foi maior no sítio Sa, seguido pelo sítio CU, enquanto o sítio CCB_1 , apresentou menor número de UFC.g^{-1} de solo seco (Figura 3a).

O elevado número de UFC de bactérias cultiváveis no sítio CU não era esperado, pois este sítio encontra-se muito degradado, com baixos valores de pH e teor de C orgânico e elevada contaminação. Além disso, este grupo de microrganismo é altamente estimulado na região rizosférica, podendo atingir valores 100 vezes maior em relação ao solo não rizosférico (Rovira e Davey, 1974). Já o sítio CSv, apresentou um baixo número de UFC.g^{-1} de solo seco, possivelmente devido, além da ausência de vegetação, à elevada contaminação e aos baixos valores pH e teor de C orgânico. Uma provável explicação para este fato é que pode ter ocorrido a produção de endosporos na população bacteriana no sítio CU, como uma forma de resistência ao estresse causado pela contaminação e degradação deste sítio.

Resultados semelhantes foram obtidos por Cattelan e Vidor (1990b), que verificaram um menor número de bactérias e um maior número de endosporos em um solo sem cobertura vegetal em comparação ao mesmo solo sob sete diferentes tipos de cultivo. Silva Filho e Vidor (1984), também verificaram um maior número de endosporos em um solo erodido em relação a um solo em recuperação. Em área onde o pH foi reduzido em decorrência da deposição ácida com dióxido de enxofre (SO_2), o número total de bactérias e de bactérias amilolíferas decresceu, enquanto

houve um aumento no número de bactérias formadoras de esporos (Bewley e Parkinson, 1984). Estes fatos refletiram as condições adversas destes ambientes, pois os endosporos permitem as bactérias sobreviverem em condições desfavoráveis (Alexander, 1977).

O número médio de $UFC.g^{-1}$ de solo seco de fungos cultiváveis em meio Martin encontra-se na Figura 3b, sendo superior nos sítios CATi, CCB_2 e Sa, seguidos dos sítios CBd e CU. O menor valor de $UFC.g^{-1}$ de solo seco foi verificado no sítio CSv, sem vegetação. A população de fungos cultiváveis variou menos entre os diversos sítios quando comparada com a população de bactérias, sendo os sítios CATi, CBd, CU, CCB_1 e CCB_2 estatisticamente igual ao sítio controle se mostrando, portanto, mais tolerante à contaminação e efeitos adversos do solo, como baixo teor de nutrientes, C orgânico e pH.

Como observado para a população de fungos cultiváveis, o número médio de UFC g^{-1} de solo seco de actinomicetos cultiváveis em meio Waksman, também apresentou menor variação entre os sítios estudados, sendo os sítios CATi, CBd, CVc, CCB_1 e CCB_2 estatisticamente iguais ao sítio controle (Figura 3c). A presença de vegetação parece ser fundamental para o desenvolvimento deste grupo, pois nos dois sítios sem vegetação, ou o número de UFC foi baixo (sítio CSv), ou não foi verificada a presença de actinomicetos (sítio CU). Deste modo, a população bacteriana se mostrou como um indicador mais sensível da contaminação em relação às populações de actinomicetos e fungos.

Entretanto, deve-se salientar que este método de isolamento é altamente seletivo e apenas detecta uma pequena parte da população com determinadas características bioquímicas e formas de crescimento (Paul e Clark, 1989), como por exemplo, para o grupo de actinomicetos o gênero *Streptomyces* é o principal representante isolado variando de 70 a 90% (Siqueira e Franco, 1988),

o que pode limitar considerações mais generalizadas a respeito do impacto da contaminação sobre todo um grupo específico estudado.

Alguns trabalhos têm demonstrado maior tolerância de fungos (eucariotos) do que bactérias e actinomicetos (procariotos) à contaminação por metais pesados (Hattori, 1992; Hiroki, 1992). Actinomicetos, de modo geral, se mostraram mais tolerantes à Cd do que bactérias e bactérias gram-negativas mais tolerantes que as gram-positivas (Tyler, 1981).

Os resultados de contagem de microrganismos nitrificadores (oxidantes de amônio e oxidantes de nitrito) encontram-se na Tabela 8. Foram encontradas diferenças significativas entre os sítios estudados e entre os dois grupos de microrganismos. Os microrganismos oxidantes de amônio foram observados apenas nos sítios CATi e CBd, enquanto os oxidantes de nitrito foram encontrados em todos os sítios, com excessão do sítio CSv, onde além da elevada contaminação e ausência de vegetação, observou-se um baixo pH e baixo teor de carbono orgânico. Os maiores números de oxidantes de nitrito foram observados no sítio CATi, seguido do sítio Sa, enquanto que, os mais baixos valores foram verificados nos sítios CVc, CCB_1 , CCB_2 e CU. Pode ter ocorrido um efeito amenizador pela presença do capim *Andropogon* sp e da *Brachiaria decumbens* sobre a toxicidade dos metais nos sítios CATi e CBd, onde apesar da elevada contaminação, apresentaram elevado número de microrganismos oxidantes de nitrito, além dos microrganismos oxidantes de amônio serem verificados apenas nestes dois sítios.

Segundo Tyler (1981), o processo de nitrificação pode ser inibido ou estimulado por elementos metálicos, variando com o tipo, concentração e disponibilidade do metal ou metais em questão. Além disso, a inibição da nitrificação devido à contaminação por metais pesados é de difícil interpretação, principalmente, porque as propriedades dos solos que afetam a disponibilidade e, conseqüentemente, a toxicidade dos metais. Por outro lado, a acumulação de

TABELA 8: Número mais provável de microrganismos oxidantes de amônio, oxidantes de nitrito, *Azospirillum amazonense e A.* sp e amonificadores nos sítios estudados.

Parâmetros	Sítios							
	CBd	CCB_1	CATi	CVc	CCB_2	CSv	CU	Sa
Ox. de amônio (NMP. $10^1.g^{-1}$)	15,0	0	9,0	0	0	0	0	0
Ox. de nitrito (NMP. $10^4.g^{-1}$)	8,22 b	0,013 c	2500 a	0,093 c	0,064 c	0 d	0,009 c	30,10 b
Azospirillum sp [1] (NMP. $10^3.g^{-1}$)	0	0	0	0	0	0	0	17,30
A. amazonense (NMP. $10^3.g^{-1}$)	0	0	0	0	0	0	0	1,54
Amonificadores (NMP. $10^4.g^{-1}$)	30,1 a	4,2 a	1310 a	13,8 a	70,7 a	3 a	2,2 a	106 a

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade

[1] *Azospirillum. lipoferum e brasilense*

nitrogênio mineral no solo pode refletir efeitos adversos de íons metálicos sobre a imobilização.

O processo de nitrificação também é afetado por fatores do solo como pH, salinidade, teor de matéria orgânica, temperatura, umidade e aeração (Alexander, 1977; Paul e Clark, 1989; Tsai, Baraibar e Romani, 1992). A nitrificação torna-se negligível em valores de pH abaixo de 5,0, pois além de afetar o processo em si, reduz o número de microrganismos envolvidos (Alexander, 1977). Assim, os baixos valores de pH, juntamente com as altas concentrações de metais pesados,

podem ter sido os principais fatores que afetaram a presença de nitrificadores nos sítios CSv e CU, ambos sem cobertura vegetal.

A estimativa do número de microrganismos amonificadores encontram-se na Tabela 8. Não ocorreu diferenças significativas entre os oito sítios estudados, apesar dos resultados seguirem a tendência de alguns dados anteriores. Isto, provavelmente, ocorreu devido à grande diversidade de microrganismos envolvidos neste processo. A amonificação de compostos orgânicos é realizada por um grande número de microrganismos heterotróficos (Alef, 1995a; Tsai, Baraibar e Romani, 1992), o que facilitaria a presença de espécies tolerantes à contaminação com metais pesados.

A estimativa do número de diazotróficos de vida livre (*Azospirillum amazonense* e *A. lipoferum* e *A. brasilense*) encontra-se na Tabela 8. A população de diazotróficos de vida livre estudados foi altamente sensível à contaminação por metais pesados, estando presentes apenas no sítio Sa.

Quase todos os estudos sobre os efeitos adversos da contaminação de metais pesados sobre microrganismos fixadores de N_2 estão concentrados em trabalhos com bactérias do gênero *Rhizobium* (Chaudri, McGrath e Giller , 1992a, b; Chaudri et al., 1993a, b; Giller et al., 1993; Heggo, Angle e Chaney, 1990; Hirsch et al., 1993; McGrath, Brookes e Giller, 1988; Obbard, Sauerbecke Jones, 1993; Smith e Giller, 1992; Reddy, Cheng e Dunn, 1983; Smith e Giller, 1992). Todavia, poucos trabalhos estudaram estes efeitos sobre bactérias heterotróficas de vida livre, além de cianobactérias (Brookes, McGrath e Heijnen, 1986; Lorenz, McGrath e Giller, 1992). A contaminação com metais em concentrações próximas ou abaixo dos limites permitidos pela Comunidade Européia ocasionou reduções significativas na fixação de N_2 por bactérias

heterotróficas de vida livre (Brookes et al., 1984 citado Brookes, 1995; Lorenz, McGrath e Giller, 1992). A inibição da fixação biológica de N_2 foi completa em concentrações de Zn, Cu, Ni, Cd, Cr e Pb de 306; 92; 70; 9,8; 105 e 109 $mg.kg^{-1}$ que estão, exceto Cr, bem abaixo das concentrações encontradas nos sítios aqui estudados. Não se tem conhecimento de estudos sobre o impacto da contaminação com metais pesados sobre microrganismos do gênero *Azospirillum*. Entretanto, a produção de linhagens tolerantes à presença de metais pode ser uma forma viável de estimular o crescimento dessas espécies em solos contaminados. Isto foi observado, quando linhagens de *Azospirillum brasilense* tolerantes à Mn apresentaram maior crescimento e atividade da nitrogenase na presença de 10 mM $MnCl_2$ do que aquelas não tolerantes (Rai, 1985 citado por Foy, Scott e Fisher, 1988).

4.5 Inter-relações entre as variáveis biológicas avaliadas

As correlações simples entre médias gerais dos parâmetros avaliados encontram-se na Tabela 9.

A biomassa microbiana apresentou correlação significativa com a respiração do solo (r = 0,72), como observado por Cattelan e Vidor (1990a), que observaram uma alta correlação entre a o C da biomassa microbiana e a evolução de CO_2 em solo sujeito a diferentes tipos de cultivo e sob influências das variações climáticas ao longo do ano. Resultados semelhantes foram observados por Ross et al. (1980) e Sarathchandra, Perrott e Uspdell (1984), que encontraram estreita relação entre biomassa e atividade respiratória. Segundo Cattelan e Vidor (1990a), os fatores que estimulam a atividade microbiana, geralmente, favorecem a formação de sua biomassa.

Entretanto, Valsecchi, Gigliotti e Farini (1995), não encontraram correlação entre estas duas variáveis em uma área contaminada com metais pesados, provavelmente, devido à extrema variabilidade das características físico-químicas dos sítios estudados.

A biomassa também correlacionou-se significativamente com a população de amonificadores (r = 0,83), oxidantes nitrito (r = 0,89), actinomicetos (r = 0,63), bactérias (r = 0,79) e fungos cultiváveis (r = 0,75). Cattelan e Vidor (1990b), encontraram correlações significativas entre biomassa microbiana e a população de fungos e de actinomicetos. Segundo estes autores, nem sempre há correlação entre a biomassa e a simples contagem da população microbiana em placas, pois não se está levando em conta o tamanho e a densidade das células e hifas. Este aspecto também deve ser levado em conta para as populações de amonificadores e nitrificadores determinadas através de inoculações de suspensões de solo em meios líquidos e estimadas por tabelas do número mais provável.

O carbono da biomassa microbiana, a população bacteriana e de fungos apresentaram uma alta correlação com a % de C microbiano em relação ao C orgânico total do solo (r = 0,82; r = 0,97 e r = 0,85, respectivamente). Anderson e Domsch (1989) e Weigand, Auerswald e Beck (1995), também encontraram alta correlação entre C orgânico e C microbiano.

A evolução de CO_2 relacionou-se ainda com a população microbiana do solo, tendo sido encontradas correlações significativas com amonificadores (r = 0,91), oxidantes de nitrito (r = 0,91) e actinomicetos (0,78), indicando que a variação ocorrida entre os diversos sítios foi melhor explicada por estes microrganismos. Diferentes resultados têm sido obtidos em estudos sobre a contribuição de grupos específicos na respiração em solos contaminados com metais pesados. A população fúngica foi responsável por mais de 80% da respiração em 2 solos contaminados com diferentes concentrações de metais pela aplicação de lodo de esgoto (Flieβbach, Martens e Reber,

TABELA 9: Coeficientes de correlação entre as variáveis biológicas avaliadas e entre as variáveis e os teores de C orgânico nos sítios estudados

Variáveis	Biomass (1)	Respira (2)	Amonifi (3)	Bacteria	Actino (4)	Fungos	Ox.nitrito (5)	qCO_2	C mic/ C org(6)	C org (7)
Biomass	1,00									
Respira	0,72*	1,00								
Amonifi	0,83**	0,91**	1,00							
Bacteria	0,79*	0,27ns	0,06ns,	1,00						
Actino	0,63*	0,78**	0,83**	<0,01ns	1,00					
Fungos	0,75*	0,61ns	0,58n,s,	0,76*	< 0,01ns	1,00				
Ox. nitrito	0,89**	0,91**	0,91**	0,59ns	0,66*	0,75*	1,00			
qCO_2	-0,24ns	0,49ns	0,34n,s,·	-0,51ns	0,39ns	-0,11ns	0,20ns	1,00		
C mic/ C org	0,82*	0,36ns	0,39ns	0,97**	0,12ns	0,85**	0,63*	-0,45ns	1,00	
C org	0,54ns	0,75*	0,76*	-0,09ns	0,74*	0,03ns	0,66*	0,50ns	-0,10ns	1,00

* e **, significativo a 0,05 e 0,01, respectivamente pelo teste T.

(1) Biomassa C; (2) Respiração do solo; (3) amonificadores, (4) actinomicetos, (5) oxidantes de nitrito, (6) % de C biomassa em relação ao C orgânico total do solo e (7) C orgânico total do solo.

1994). Entretanto, em outro estudo, verificou-se que o aumento da população fúngica coincidia tanto com a redução da evolução de CO_2, quanto da população bacteriana em 2 solos contaminados com vários metais pesados, o que mostrou que o decréscimo da respiração dependeu, principalmente, do grau de toxicidade dos metais sobre a população bacteriana (Hattori, 1992).

A respiração do solo, a população de microrganismos amonificadores e de actinomicetos correlacionaram-se, significativamente, entre si, e com o teor de C orgânico do solo. O grupo de amonificadores do solo é composto de grande número de microrganismos heterotróficos (Alef,

1995a; Tsai, Baraibar e Romani, 1992), entre eles, fungos, bactérias e actinomicetos que atacam alguma forma complexa de nitrogênio orgânico, ocorrendo liberação de amônia, atuando diretamente no processo de decomposição da matéria orgânica do solo (Alexander, 1977). O suprimento de energia para estes microrganismos deriva da transformação, pelo processo de oxidação, de compostos orgânicos, tais como celulose, proteínas, nucleotídeos e compostos humificados. Os produtos finais deste processo são dióxido de carbono (CO_2) e água (Alef, 1995b). Valsecchi, Gigliotti e Farini (1995), também encontraram uma alta correlação entre respiração e carbono orgânico total em solos contaminados com diferentes metais pesados, sendo que nos solos que havia maior teor de C orgânico, ocorreu uma maior atividade medida pela evolução de CO_2.

Várias correlações foram obtidas entre diferentes microrganismos o que, entretanto, dependeu do comportamento de cada grupo nos sítios estudados. A população de fungos correlacionou-se significativamente com a de bactérias ($r = 0,76$), enquanto os microrganismos oxidantes de nitrito correlacionaram-se com actinomicetos ($r = 0,66$), com fungos ($r = 0,75$) e com microrganismos amonificadores ($r = 0,91$) e a população de actinomicetos correlacionou-se significativamente com amonificadores do solo ($r = 0,83$), demonstrando que estas populações estão associadas. As relações ecológicas entre as diferentes espécies ou grupos de microrganismos são de difícil caracterização. Isto ocorre devido aos efeitos de fatores abióticos e bióticos que causam grande variabilidade entre microssítios do solo influenciando direta e indiretamente a população microbiana e suas relações (Alexander, 1977; Cardoso, 1992; Pereira, 1995).

4.6 Inter-relações entre a concentração de metais e parâmetros biológicos

As correlações entre os parâmetros avaliados de todos os sítios e a concentração total média de todos os metais pesados encontram-se na Tabela 10. Poucas correlações foram verificadas entre as variáveis biológicas e a concentração total média de cada metal. Apenas a população bacteriana, qCO_2 e a relação C microbiano / C total do solo, apresentaram correlações significativas com os teores de metais pesados.

A população bacteriana correlacionou-se negativamente com Cu e Cd (e Zn à 10% de probabilidade) se mostrando como o parâmetro mais sensível à contaminação em relação às outras populações estudadas. As populações bacteriana e de actinomicetos são, geralmente, as mais afetadas pela contaminação dos solos com metais pesados quando comparada à população fúngica (Hattori, 1992; Hiroki, 1992). A % de C microbiano em relação ao C orgânico do solo foi afetada, significativamente, pelo Cd. O quociente metabólico (qCO_2) apresentou correlações positivas com Cu, Zn e Cd, ou seja, o aumento da concentração de metais devido à contaminação causou um aumento na quantidade de C-CO_2 por unidade de C-biomassa. Este comportamento confirma os resultados encontrados por diversos pesquisadores que verificaram um significativo aumento na quantidade de C-CO_2 por unidade de biomassa (Bardgett e Saggar, 1994; Brookes e McGrath, 1984; Flieβbach, Martens e Reber, 1994; Leita et al, 1995, Valsecchi, Gigliotti e Farini, 1995).

As poucas correlações significativas verificadas, provavelmente, ocorreram devido as análises serem realizadas com teores totais de metais, os quais variam sua biodisponibilidade de acordo com o tipo e concentração do metal e características dos solos (Malavolta, 1994; Msaky e Calvet, 1990; Tisdale, Nelson e Beaton, 1985). Além disso, quando a contaminação ocorre com

TABELA 10: Coeficientes de correlação entre as variáveis biológicas avaliadas e a concentração total média de todos os metais e sua somatória nos sítios estudados.

Parâmetros biológicos	Metais						
	Pb	Cd	Cr	Zn	Cu	Mn	Σ
Biomassa C	0,11ns	-0,25ns	-0,24ns	-0,17ns	-0,10ns	0,10ns	-0,13ns
Respiração	0,39ns	0,42ns	-0,24ns	0,42ns	0,49ns	0,46ns	0,43ns
C-mic / Corg[1]	-0,30ns	- 0,66*	-0,26ns	-0,57ns	-0,57ns	-0,30ns	-0,54ns
qCO_2	0,38ns	0,87**	0,10ns	0,76*	0,75*	0,50ns	0,73*
Amonificadores	0,19ns	0,06ns	-0,43ns	0,06ns	0,21ns	0,20ns	0,09ns
Bactérias	-0,29ns	-0,68*	-0,04ns	-0,59ns	-0,62*	-0,27ns	-0,56ns
Actinomicetos	0,46ns	0,38ns	-0,11ns	0,47ns	0,52ns	0,48ns	0,48ns
Fungos	0,14ns	-0,25ns	-0,37ns	-0,05ns	-0,08ns	0,16ns	-0,03ns
Oxidantes nitrito	0,12ns	-0,14ns	-0,03ns	-0,09ns	-012ns	0,21ns	-0,06ns

* e **, significativo 0,05 e 0,01, respectivamente pelo teste T
[1] % de C biomassa em relação ao C orgânico total do solo.

diversos metais (multicontaminação), como no caso deste estudo, torna-se difícil a determinação dos efeitos de cada metal separadamente uma vez que são aditivos (Chander e Brookes, 1993; Flieβbach, Martens e Reber, 1994).

Realizou-se ainda análises de regressão lineares múltiplas em backward (RLMB) entre os parâmetros avaliados e a concentração total média de todos os metais pesados (Tabela 11). Na segunda coluna desta Tabela estão os coeficientes de determinação quando todos os metais estão incluídos no modelo (Zn, Cu, Cr, Mn, Pb e Cd) e as colunas seguintes encontram- se estes

coeficientes após a retirada do modelo do metal pesado que menos se relacionou com cada uma das características avaliadas. Assim, o último metal da série foi aquele que mais se relacionou com cada parâmetro estudado.

Apenas qCO_2 apresentou coeficientes de determinação significativos em toda a série, sendo o Cd, último da série, o metal que mais influenciou este parâmetro. Os outros parâmetros avaliados não apresentaram boa relação com os modelos dos metais pesados. Embora tenham apresentados baixos coeficientes de determinação significativos a respiração e a população bacteriana foram afetadas por Cd ($R^2 = 0,22$) e Mn + Zn ($R^2 = 0,28$), respectivamente. Isto mostra a complexidade do sistema solo e a dificuldade de determinação dos efeitos de cada metal quando a contaminação ocorre com diversos deles (multicontaminação), e quando se trabalha com teores totais, como nos sítios estudados.

TABELA 11. Coeficientes de regressão linear múltipla em "backward" entre os parâmetros microbiológicos avaliados e a concentração total de metais pesados nas amostras de solos dos diferentes sítios estudados.

Parâmetro	Número de elementos participantes nos modelos						Elemento restante
	6	5	4	3	2	1	
Biomassa C	0,12ns	(-Mn) 0,11ns	(-Cd) 0,10ns	(-Cu) 0,09ns	(-Cr) 0,05ns	(-Zn)< 0,01ns	Pb
Respiração	0,33 ns	(-Zn) 0,33ns	(-Cu) 0,33ns	(-Cr) 0,30 ns	(-Mn) 0,25 ns	(-Pb) 0,22*	Cd
qCO_2	0,49*	(-Pb) 0,49*	(-Cr) 0,48**	(-Mn) 0,47**	(-Zn) 0,46**	(-Cu) 0,42**	Cd
Fungos	0,21ns	(-Cu) 0,21ns	(-Mn) 0,21ns	(-Zn) 0,20ns	(-Pb) 0,14ns	(-Cd) 0,10ns	Cr
Bactérias	0,32ns	(-Pb) 0,31ns	(-Cd) 0,31ns	(-Cr) 0,30 ns	(-Cu) 0,28 *	(-Mn) 0,17**	Zn
C-biomassa/C-orgânico	0,30ns	(-Cu) 0,30ns	(-Pb) 0,29ns	(-Cd) 0,26ns	(-Cr) 0,18ns	(-Mn) 0,10ns	Zn
Oxidantes de nitrito	0,16ns	(-Cd) 0,16ns	(-Cr) 0,16ns	(-Mn) 0,15ns	(-Cu) 0,11ns	(-Zn) 0,13ns	Pb
Actinomicetos	0,22ns	(-Cd) 0,21ns	(-Cr) 0,21ns	(-Mn) 0,18ns	(-Zn) 0,15ns	(-Pb) 0,14ns	Cu
Amonificadores	0,26 ns	(-Cr) 0,26ns	(-Cd) 0,26 ns	(-Mn) 0,26 ns	(-Cu) 0,18 ns	(-Zn) 0,15ns	Pb

5 CONCLUSÕES

Todos os parâmetros avaliados, exceto, a população de microrganismos amonificadores e qCO_2, foram afetados negativamente pela contaminação, variando, entretanto, com as características químicas, físicas e biológicas dos sítios estudados.

A respiração específica da biomassa ou quociente metabólico e a relação C microbiano/ C orgânico do solo não se mostraram como bons indicadores dos efeitos da contaminação por metais pesados sobre a população microbiana.

As concentrações totais dos metais não foram adequadas para avaliar o impacto da contaminação sobre as variáveis biológicas estudadas.

A presença de plantas amenizou o impacto negativo dos metais sobre a biomassa microbiana, respiração, população de actinomicetos e nitrificadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEF, K. Nitrogen mineralization in soils. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p.234-245a.

ALEF, K. Soil Respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p.214-219b.

ALEF, K.; BECK, T. H.; ZELLES, L.; KLEINER, D. A comparison of methods to estimate microbial biomass and N-mineralization in agricultural and grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.20, n.4, p.561-565, 1988.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology.** New York: John Wiley, 1977. 467p.

ALVAREZ, R.; DOAZ, R.A.; BARBERO, N.; SANTANATOGLIA, O.J.; BLOTTA, L. Soil organic carbon, microbial biomass and CO_2-C production from three tillage systems. **Soil & Tillage Research**, Amsterdan, v.33, n. 1, p.17-28, Jan. 1995.

ANDERSON, J.P.E. Soil respitration. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties, 2nd edn. Americam Society Agronomy, **Soil Science Society of American** , Madison, wis, 1982. p. 831-871.

ANDERSON, T.H. Physiological analysis of microbial communities in soil: Aplications and limitationns. In: RITZ, K.D.; GILLER, K.E. **Beyond the biomass**. British Society of Soil Science, London, 1994. p.67-76.

ANDERSON, T.H..; DOMSCH, K.H. Ratio of microbial biomass carbon in arable soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.21, n.4, p.471-479, 1989.

ANDERSON,J.M.;INGRAM,J.S.I. **Tropical soil biology and fertility:** handbook of methods. Wallinford: CAB Internacional, 1993. 221p.

ANDRADE, D. de S.; MIYAZAMA, M.; HAMAKAWA, P. J. Microrganismos amonificadores e nitrificadores. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (ed). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 355-367.

BAKER, A.J.M.; BROOKES, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements- A review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v.1, p.81-126, 1989.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; XAVIER, D.F.; BODDEY, R.M.; DOBEREINER, J. Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.13, n.3, p.250-263, 1982.

BARDGETT, R.D.; LEEMANS, D.K. The short-term effects of cessation of fertiliser applications, liming, and grazing on microbial biomass and activity in a reseeded upland grassland soil. **Biology and Fertility of Soils,** Berlin, v.19, n. 2-3, p.148-154, Feb. 1995.

BARDGETT, R.D.; SAGGAR, S. Effects of heavy metal contamination on the short-term decomposition of labelled [^{14}C]glucose in a pasture soil. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.26, n.6, p.727-733, June 1994.

BEWLEY, R. J. F.; PARKINSON, D. Bacterial and fungal activity in sulphur dioxide polluted soils. **Cannadian Journal of Microbiology,** Otawa, v.31, n.1, p.13-15, Jan. 1985.

BEWLEY, R. J. F.; PARKINSON, D. Effects of sulphur dioxide pollution on forest soil microorganisms. **Cannadian Journal of Microbiology,** Otawa, v.30, p.179-185, 1984.

BEWLEY, R. J. F.; PARKINSON, D. Sensitivity of certain soil microbial processes to acid deposition. **Pedobiologia,** Jena, v.29, n.2, p.73-84, 1986.

BIEDERBECK, V.O.; CAMPBELL, C.A.; SMITH, A.E. Effects of long-term 2,4-D field applications on soli biochemical processes. **Journal Enviroment Quality,** Madison, v.16, n.3, p.257-262, 1987.

BLACHAR, R. W.; REHM, G.; CALDWELL, A. C. Sulfur in plant material digestion with nitric and percloric acid. **Soil Science Society America Proceedings,** Madison, v.29, n. 1, p. 71-72, Jan. 1965.

BOLTON Jr., H.; FREDRICKSON, J. K.; ELLIOTT, L. F. Microbial ecology of the rhizosphere. In.: METTING, Jr., BLANE, F. (eds.) **Soil Microbial Ecology : application in agricultural and environmental management.** New York: M. Dekker, 1993. p. 27-63.

BRENDECKE, J.W.; AXELSON, R.D.; PEPPER, I.L. Soil microbial activity as an indicator of soil fertility: long-term effects of municipal sewage sludge on an arid soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.6, p.751-758, June 1993.

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

BROOKES, P.C. The use microbial parameters in soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertily of Soils,** Berlin, v.19, n.4, p. 269-279, Mar. 1995.

BROOKES, P.C.; HEIJNEN, C.E.; McGRATH, S.P.; VANCE, E.D. Soil microbial biomass estimates in soils contaminated with metals. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.18, n.4, p.383-388, 1986.

BROOKES, P.C.; McGRATH, S.P.; HEIJNEN, C.E. Metal residues in soils previously treated with sewage-sludge and their effects on growth and nitrogen fixation by blue-green algae. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.18, n.4, p.345-353, 1986.

BROOKES, P.C.; McGRATH, S.P. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. **Journal of Soil Science,** Oxford, v.35, n.2, p.341-346, June 1984.

CARDOSO, E. J. B. N. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. NEVES, M. C. P., ed. **Microbiologia do solo**, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 33-39.

CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Flutuções na biomassa, atividade e população microbiana do solo em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** , Campinas, v.14, n.2, p 133-142, maio/ago. 1990a.

CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** , Campinas, v.14, n.2, p 125-132, maio/ago. 1990b.

CHANDER. K.; BROOKES, P.C. Effects of heavy metals from past applications of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam U.K. soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, n.10, p.927-932, 1991a.

CHANDER. K.; BROOKES, P.C. Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, n.10, p.909-915, 1991b.

CHANDER. K.; BROOKES, P.C. Microbial biomass dynamics during the decomposition of glucose and maize in metal-contaminated and non-contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, n.10, p.917-925, 1991c.

CHANDER, K.; BROOKES, P.C. Plant inputs of carbon to metal-contaminated soil and effects on the soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, n.12, p.1169-1177, 1991d.

CHANDER. K.; BROOKES, P.C. Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.9, p.1231-1239, Sept. 1993.

CHANDER. K.; BROOKES, P.C. Syntesis of microbial biomass from added glucose in metal-contaminated and non-contaminated soils following repeated fumigation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, n.6, p.613-614, June 1992.

CHAUDRI, A. M.; McGRATH, S. P.; GILLER, K. E. Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminated by past applications of sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.24, n.2, p. 83-88, Feb. 1992a.

CHAUDRI, A. M.; McGRATH, S. P.; GILLER, K. E. Survival of the indigenous population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.24, n.7, p. 625-632, Jul. 1992b.

CHAUDRI, A. M.; McGRATH, S. P.; GILLER, K. E.; ANGLES, J.S.; CHANEY, R.L. Screening of isolates and strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* for heavy metal resistance using buffered media. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Oxford, v.22, p.1643-1651, 1993a.

CHAUDRI, A. M.; McGRATH, S. P.; GILLER, K. E.; RIETZ, E.; SAUERBECK, D. R. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil previously treated with metal-contaminated sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.25, n.3, p. 301-309, Mar. 1993b.

CHENG, W.; COLEMAN, D.C. Effects of living roots on soil organic matter decomposition. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, n..6, p.781-787,1990.

COELHO, R.R.R.; DROZDOWICZ, A. The occurence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. **Révue D Ecologie et de Biologie du sol**, Paris, v.15, n.4, p.459-473, 1978.

COSTA, E. D. **Adsorção e competição de alguns metais por ácidos húmicos extraídos de um Latossolo Húmico da região de Araponga, Minas Gerais.** Viçosa:UFV, 1991. 71p. (Dissertação - Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. NEVES, M. C. P., ed. **Microbiologia do solo**, Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 173-179.

DÖBEREINER, J. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p.134-141.

DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grass-bacteria associations in the tropics. In.: ISOTOPES in biological dinitrogen fixation; **Proceedings of an Advisory group meeting**. Vienna: IAEA, 1978. p. 51-69.

DOELMAN, P. Resistance of soil microbial communities to heavy metals. In.: JENSEN, V.; KJOLLER, A.; SORENSEN, L. H. (Eds.). **Microbial Communities in Soil.** London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p.369-393.

DOELMAN, P.; HAANSTRA, L. Short-term and long-term effects of cadmium, chromium, copper, nickel, lead and zinc on soil microbial respiration in relation to abiotic soil factors. **Plant and Soil**, The Hague, v.79, n.3, p.317-327, 1984.

DOELMAN, P.; JANSEN, E.; MICHELS, M.; TIL, M. van Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. **Biology and Fertility of Soils,** Berlin, v.17, n.3, p. 177-184, Mar. 1994.

DUMONTET, S.; MATHUR, S. P .Evaluation of respiration-based methods for measuring microbial biomass in metal-contaminated acidic mineral and organic soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.21, n.3, p.431-436,1989.

DUXBURY, T.; BICKNELL, B. Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.15, n.3, p. 243-250, 1983.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análise do solo.** Rio de Janeiro: EMBRAPA/SNLCS, 1979. n.p.

EUCLIDES, R. F. **Sistema para análises estatísticas e genéticas:** manual provisório. Viçosa: CPD/UFV, 1983. 74 p.

FLIEβBACH, A.; MARTENS, R.; REBER, H.H. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.26, n.9, p.1201-1205, Sept.1994.

FOSTER, J.C. Heavy metals. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p.101-104.

FOY, C.D. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.19, n.7/12, p.959-987, 1988.

FOY, C.D.; SCOTT, B.J.; FISHER, J.A. Genetic differences in plant tolerance to manganese toxicity. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J.; UREN, N.C. (eds.) **Manganese in soils and plants. Proceedings of the International Symposium on manganese in soil and plants**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988.

FRANZLUEBBERS, A.J.; ZUBERER, D.A.; HONS, F.M. Comparison of microbiological methods for evaluationg quality and fertility of soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.19, n.2-3, p.135-140, Mar. 1995.

FRITZE, H.; NIINI, S.; MIKKOLA, K.; MÄKINEN, A. Soli microbial effects of a Cu-Ni smelter in southwestern Finland. **Biology and Fertility of Soils,** Berlin, v.8, p.87-94, 1989.

GHOSHAL, N.; SINGH, K.P. Effects of farmyard manure and inorganic fertilizer on the dynamics of soil microbial biomass in a tropical dryland agroecosystem. **Biology and Fertility of Soils,** Berlin, v. 19, n. 2-3, p. 231-238, Mar. 1995.

GILLER, K.E.; NUSSBAUM, R.; CHAUDRI, A.M.; McGRATH, S.P. *Rhizobium meliloti* is less sensitive to heavy-metal contamination in soli than *R. leguminosarum* bv. *trifolii* or *R. loti.* **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.2, p.273-278, Feb. 1993.

GRISI, B. M.; GRAY, T. R. G. Comparação dos métodos de fumigação, taxa de respiração em resposta à adição de glicose e conteúdo de ATP para estimar a biomassa microbiana dos solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.10, n.2, p 109-115, maio/ago. 1986.

GUPTA, S.K. Mobilizable metal in anthropogenic contaminated soils and its ecological signicance. In: VERNET, J.P. **Impact of heavy metals on the environment**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., , 1992, p.299-310.

HARDEN, T.; JOERGENSEN, R.G.; MEYER, B.; WOLTERS, V. Soil microbial biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide-treated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.6, p. 679-683, June 1993.

HATTORI, H. Influence of heavy metals on soil microbial activities. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.38. n.1, p.93-100, 1992.

HEGGO, A.; ANGLE, J. S.; CHANEY, R. L. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, n.6, p. 865-869, 1990.

HIROKI, M. Effects of heavy metal contamination on soil microbial population. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.38. n..1, p.141-147, 1992.

HIRSCH, P.R.; JONES, M.J.; McGRATH, S.P.; GILLER, K.E. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii populations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.11, p. 1485-1490, Nov. 1993.

INSAN, H.; HUTCHINSON, T.C.; REBER, H.H. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soli microflora. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.28, n.4/5, p.691-694, Apr./May. 1996.

JENKINSON, D. S.; LADD, L. N. Microbial biomass in soil measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. (eds.). **Soil Biochemistry**, New York: Marcel Dekker, 1981.v. 5., p. 415-471.

JESUS, R.M. de. Revegetação: da teoria a prática- técnicas de implantação. In: Simpósio Sul-Americano, 1, e Simpósio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas, 2, Foz do Iguaçu 1994. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 1994. p.123-134.

JOERGENSEN, R. The fumigation extraction method. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p.382-387.

JORDAN, D.; KREMER, R.J.; BERGFIELD, W.A.; KIM, K.Y.; CACNIO, V.N.Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. **Biology and Fertility of Soils,** Berlin, v.19, n. 4, p. 297-302, Mar. 1995.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants.** Boca Raton: CRC Press, Inc., 1985. 315p.

KIEFT, T. L.; ROSACKER, L. L. Application of respiration- and adenylate-basead soil microbiological assay to deep subsurface terrestrial sediments. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, n.6 , p. 563-568, 1991.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1985. 492p.

KOZDRÓJ, J. Microbial responses to single or successive soil contamination with Cd or Cu. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, n.11, p.1459-1465, Nov. 1995.

KUREK, E.; CZABAN, J.; BOLLAG, J.M. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v.43, n.5, p. 1011-1015, 1982.

LANDMEYER, J.E.; BRADLEY, P.M.; CHAPELLE, F.H. Influence of Pb on microbial activity in Pb-contaminated soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.38. n.1, p.141-147. 1993.

LEITA, L.; De NOBILE, M.; MUHLBACHOVA, G.; MONDONI, C.; MARCHIOL, L.; ZERBI, G. Bioavailability and affects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. **Biology and Fertility of Soils,** Berlin, v.19, n. 2-3, p. 103-108, Feb. 1995.

LIMA, J. A. **Influência do lodo de esgoto e do fósforo nos microrganismos e suas atividades e no acúmulo de metais pesados em tomateiro.** Jaboticabal: UNESP, 1994. 164p. (Tese - Doutorado em Microbilogia Agrícola).

LO, K. L.S.; YANG, W. F.; LIN, Y. C. Effects of organic matter on the especific adsorption of heavy metals by soils. **Toxicological and Environmental Chemistry,** London, v.34, p.139-153, 1992.

LORCH, H.- J.; BENCKIESER, G.; OTTOW, J. C. G. Basic methods counting microorganisms in soil and water. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p.146-161.

LORENZ, S. E.; McGRATH, S. P.; GILLER, K. E. Assessment of free-living nitrogen fixation activity as a biological indicator of heavy metal toxicity in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, n.6, p.601-606, June 1992.

LOVELL, R.D.; JARVIS, S.C. Effect of cattle dung on soil microbial biomass C and N in a permanent pasture soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.28, n.3, p.291-299, Mar. 1996.

MADRID, L.; DIAZ-BARRIENTOS, E. Influence of carbonate on the reaction of heavy metals in soils. **Journal of Soil Science,** Oxford, v.43, p. 709-721, 1992.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** Rio de Janeiro, v.55, n. 4, p.417-430, 1983.

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

. MARTENS, R. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: Potentials and limitations. **Biology and Fertility of Soils,** Berlin, v.19,n.2-3, p.87-89, Feb. 1995.

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

McGRATH, S. P.; BROOKES, P. C.; GILLER, K. E. Effects of potentially toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford , v.20, n.4, p. 415-424, 1988.

MILLS, A. L. Acid mine waste drainage: microbial impact on the recovery of soli and water ecosystems. In: TATE, R. L.; KLEIN, D. A. (eds.) **Soil reclamation Processes,** New York: Marcel Dekker, Inc. 1985. p.35-81.

MSAKY, J. J.; CALVET, R. Adsorption behavior of copper and zinc in soils: influence of pH on adsorption characteristics. **Soil Science,** Baltimore, v.150, n.2, p.513-522, 1990.

MULLEN, M. D.; WOLF, D. C.; BEVERIDGE, T.J.; BAILEY, G. W. Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.24, n.2, p. 129-135, Feb. 1992.

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

OBBARD, J.P.; SAUERBECK, D.R.; JONES, K. *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolli in soils amended with heavy metal contaminated sewage sludges. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.25, n.2, p. 227-231, Feb. 1993.

OLSON, B.M.; McKERCHER, R.B.; GERMIDA, J.J. Microbial populations in trifluralin-treated soil. **Plant and Soil,** The Hague, v.76, n. 1-3, p.379-387, 1984.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry.** San Diego: Academic Press, 1989. 273p.

PEREIRA, J. C. **Ecologia da comunidade bacteriana em solos de cerrado.** Itaguaí: UFRRJ, 1995. 172 p. (Tese - Doutorado em Ciência do Solo).

PFENNING, L.; EDUARDO; B. de P.; CERRI, C. C. Os métodos da fumigação-incubação e fumigação-extração na estimativa da biomassa 0microbiana dos solos da amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Campinas, v.16, n.1, p 31-37, jan./abril 1992.

POMPÉIA, S. L. Procedimentos Técnicos para Recuperação de áreas degradadas por poluição. In: Simpósio Sul-Americano, 1, e Simpósio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas, 2, Foz do Iguaçu 1994. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 1994. p.63-74.

POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; CHRISTENSEN, B.T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.19, n.2, p.159-164, 1987.

QUAGGIO, J. A.; RAIJ, B. van; MALAVOLTA, E. Alternative use of the SMP-buffer solution to determine lime requeriment of soil. **Communications Soil Science Plant Analysis,** New York, v.16, p.245-260, 1985.

RAIJ, B. van; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H. **Análise química do solo para fins de fertilidade.** Campinas: Fundação Cargil, 1987. 170p.

REDDY, G. B.; CHENG, C. N.; DUNN, S. J. Survival of *Rhizobium japonicum* in soil-sludge environment. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.15, n.3, p. 343-345, 1983.

ROSS, D, J.;.TATE, K. R.; CAIRNS, A.; PANSIER, E. A. Microbial biomass estimations in soils from Tussock grasslands by three biochemical procedures. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.12, p.375-383, 1980.

ROVIRA, A. D.; DALEY, C. B. Biology of the rhizosphere. IN: CARSON, E.W., ed. **The plant root and its environment**. Charlottesville: University Press of Virginia, 1974. p.153-194.

SARATHCHANDRA, U. Nitrification activities and the changes in the populations of nitrifying bacteria in soil perfused at two different H-ion concentratios. **Plant and Soil,** The Hague, v.50, n.1, p.99-111, Aug. 1978.

SARATHCHANDRA, S. V.; PERROTT, K. W.; USPDELL, M. P. Microbiological and biochemical characteristics of a range of New Zealand soils under established pasture. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.16, n.2, p.177-183, 1984.

SCHMIDT, E. L.; BELSER, L. W. Nitrifying bacteria. In: MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties,** Madison: Soil Science Society of America, 1982. p. 1027-1041.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. As práticas de manejo de solo na população microbiana. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.8, n.2, p.291-296, maio/ago. 1984.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo:** fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 1988. 236p.

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.

SMITH, S. R.; GILLER, K. E. Effective *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolli* present in five soils contaminated with heavy metals from long-term applications of sewage sludge or metal mine spoil. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.24, n.8, p.781-788, Aug. 1992.

STEFFENS, J.C. The heavy metal-binding peptides of plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.553-575, 1990.

TATE, R. L. Microorganisms, ecosystem disturbance and soil-formation processes. In: TATE, R. L.; KLEIN, D. A. (eds.) **Soil reclamation Processes,** New York: Marcel Dekker, Inc. 1985. p. 1-33.

TISDALE, S. L.; NELSON, W. L.; BEATON, J. D. **Soil fertility and fertilizers**. New York: Macmillan Publishing Company, 1985. 754p.

TRINDADE, A.V.; TÓTOLA, M.G.; DIAS Jr., H.E. Atividade microbiana em área sob impacto de mineração de ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25, Viçosa, 1995. **Anais...** UFV: Viçosa, 1995. p.2376-2378.

TSAI, S. M.; BARAIBAR, A. V. L.; ROMANI, V. L. M. Efeitos de fatores fisicos e químicos sobre os microrganismos do solo. In CARDOSO, E. J. B. M.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. ed., **Microbiologia do solo**, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 59-72.

TYLER, G. Heavy metals in soil biology and biochemistry. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. (ed). **Soil Biochemistry**, New York: Marcel Dekker, 1981.v. 5, p. 371-414.

VALSECCHI, G.; GIGLIOTTI, C.; FARINI, A. Microbial biomass, activity, and organic matter accumulation in soils contamined with heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.20, n.4, p. 253-259, Sept. 1995.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v.19, n.6, p.703-707, June 1987.

VETTORI, L. **Métodos de análises de solo.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. 24p. (Boletim Técnico 7).

VICTORIA, R. L.; PICCOLO, M. C.; VARGAS, A. A. T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. NEVES, M. C. P., ed. **Microbiologia do solo,** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 105-119.

WAKSMAN, S. A. **The actinomycetes:** classification, identificantion and descriptions of genera and species. Batimore: The Willians & Wilkins, 1961.

WEIGAND, S.; AUERSWALD, K.; BECK, T. Microbial biomass in agricultural topsoils after 6 years of bare fallow. **Biology and Fertility of Soils,** Berlin, v.19, n.2-3, p.129-134, Feb. 1995.

WILLIAMS, S. T.; WELLINGTON, E. M. H. Actinomycetes. In: MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties,** Madison: Soil Science Society of American, 1982. p. 967-987.

WOLLUM II, A. G. Cultural methods for soil microorganisms. In: MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties,** Madison: Soil Science Society of American, 1982. p. 781-802.

YAMAMOTO, H.; TATSUYAMA, K.; UCHIWA, T.Fungal flora of soil polluted with copper. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, n.6, p.785-790, 1985.