

TOLERÂNCIA DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS A METAIS PESADOS EM MEIO DE CULTURA ADICIONADO DE SOLO CONTAMINADO⁽¹⁾

P. H. GRAZZIOTTI⁽²⁾, J. O. SIQUEIRA⁽³⁾,
F. M. MOREIRA⁽³⁾ & D. CARVALHO⁽⁴⁾

RESUMO

Os fungos ectomicorrízicos podem proteger a planta hospedeira da toxidez dos metais pesados. Contudo, a contaminação excessiva do solo por metais pode inibir o crescimento e a atividade destes, prejudicando a simbiose micorrízica. Avaliou-se o crescimento de nove isolados de *Pisolithus tinctorius*, dois de *Suillus bovinus* e um de *Scleroderma* sp. quanto ao efeito da adição de misturas de solo contaminado por Zn, Cd, Cu e Pb com areia em meio Melin-Norkrans modificado líquido, tendo sido a mistura testada em várias proporções. A adição de solo contaminado ao meio de cultura reduziu o crescimento de todos os isolados, exceto o PT-306 em meio que continha a mistura de solo-areia com baixas proporções de solo contaminado. Os isolados apresentaram grande variação intra e interespecífica em relação à tolerância à contaminação do meio via solo contaminado. Em geral, os isolados de *P. tinctorius* foram mais tolerantes que os de *S. bovinus* e o de *Scleroderma* sp., destacando-se o isolado PT-306, que foi considerado tolerante. Os demais isolados estudados apresentaram respostas variadas, mostrando-se os isolados de *S. bovinus* considerados, na literatura, como tolerantes a Zn, sensíveis à adição de solo contaminado ao meio. A produção de pigmentos extracelulares pelos isolados PT-306 e SB foi estimulada pela adição de solo contaminado ao meio de cultura e a maior produção de pigmentos do PT-306 pode estar envolvida com a maior tolerância deste à contaminação por metais pesados. O crescimento do isolado PT-306 aumentou com a adição da mistura solo-areia com pequenas proporções de solo contaminado ao meio de cultura. A adição de solo contaminado ao meio de cultura mostrou-se eficiente para avaliação do impacto da contaminação do solo por vários metais sobre os fungos ectomicorrízicos.

Termos de indexação: fungos ectomicorrízicos, metal pesado, tolerância, toxidez, pigmentos.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA. Trabalho financiado pelo convênio CMM/FAEPE e FAPEMIG e apresentado na FertBIO'98 em Caxambu. Recebido para publicação em agosto de 2000 e aprovado em maio de 2001.

⁽²⁾ Técnico da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Caixa Postal 007, CEP 44380-000 Cruz das Almas (BA). E-mail: grazziot@cnpmf.embrapa.br

⁽³⁾ Professores Titular e Adjunto do Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras – UFLA. CEP 37200-000 Lavras (MG). Bolsistas do CNPq.

⁽⁴⁾ Professora Adjunta do Departamento de Ciência Florestal, UFLA.

SUMMARY: TOLERANCE OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI TO HEAVY METAL IN CULTURE MEDIA ADDED OF CONTAMINATED SOIL

*Ectomycorrhizal symbiosis can play a crucial role in protecting plant roots from heavy metals. However, a high heavy metal contamination can inhibit ectomycorrhizal fungi growth and activity, negatively influencing mycorrhizal symbiosis. The growth of nine isolates of *Pisolithus tinctorius*, two of *Suillus bovinus* and one of *Scleroderma* sp. was assessed to evaluate the effect of Zn, Cd, Cu and Pb contaminated soil-sand mixes added to the liquid culture media, at different proportions. Addition of contaminated soil to the media reduced mycelial growth of all isolates, except of PT-306 at media with low proportion of contaminated soil mixes. The isolates showed inter and intra-specific variations in multiple contaminated soil. In general, *Pisolithus* isolates were more tolerant than those of *S. bovinus* or *Scleroderma* sp., with PT-306 being the most tolerant. *S. bovinus* isolates considered tolerant to Zn were sensitive to multiple soil contamination. Production of extracellular pigments by PT-306 and SB was enhanced by either addition of contaminated soil and a larger production of PT-306 pigments can be involved with its greater tolerance to heavy metals. PT-306 growth was favored by the addition of a low proportion of contaminated soil into the media. The addition of heavy metal contaminated soil into media was efficient to assess the impact of heavy metal multi contamination on ectomycorrhizal fungi.*

Index terms: ectomycorrhizal fungi, heavy metal, tolerance, toxicity, pigments.

INTRODUÇÃO

Os fungos que formam as ectomicorrizas são, em sua maioria, Basidiomicetos, que, pela ocorrência generalizada em florestas de plantas hospedeiras e pelos efeitos sobre estas, tornam-se componentes importantes dos ecossistemas naturais e florestas plantadas (Parke et al., 1983; Heinrich et al., 1988). Em solos com excesso de metais pesados, esses fungos em simbiose podem aumentar a absorção de nutrientes pelas raízes e imobilizar os metais pesados, reduzindo a translocação destes para a parte aérea da planta, conferindo à planta maior tolerância a estes elementos.

Jones et al. (1986) observaram que mudas de *Betula papyrifera* colonizadas por *Scleroderma flavidum*, na presença de 85×10^{-6} mol L⁻¹ de Ni, cresceram 54% mais que as plantas não colonizadas, sendo este efeito devido à retenção de metais no micélio. A inoculação com *Suillus luteus* reduziu a concentração de Cd, Ni, Pb e Zn em acículas de *Pinus banksiana* e *Picea glauca*, exceto na concentração mais elevada de metais no solo, as quais inibiram a colonização micorrízica (Dixon & Buschena, 1988). Entretanto, estes benefícios dependem dos fungos ou isolados e dos metais, conforme demonstrado por Jones & Hutchinson (1986). Estes autores observaram que, entre quatro fungos, somente *Scleroderma flavidum* foi capaz de aumentar a tolerância a Ni em *B. papyrifera* e nenhum dos fungos foi capaz de alterar a toxidez ao Cu.

Para obter benefícios dos fungos para as plantas hospedeiras em condições de toxidez de metais

pesados, é necessário avaliar o impacto dos metais sobre estes. Sabe-se que os fungos ectomicorrízicos apresentam variações intra e interespecíficas e de ecoadaptação a fatores abióticos diversos, como excesso de metais pesados. Variações intra-específicas foram demonstradas entre cinco isolados de *Paxillus involutus*, em que três apresentaram crescimento na concentração de Cu de até 4×10^{-3} mol L⁻¹ e foram considerados tolerantes (Howe et al., 1997). Já Denny & Wilkins (1987) observaram que 10 isolados de *P. involutus*, além de diferirem quanto à tolerância a Zn em meio de cultura, também diferiram quanto à habilidade de colonizar raízes de *Betula* sp. e de promover maior crescimento das plantas em substrato com 4×10^{-3} mol L⁻¹ de Zn.

O fungo *Lactarius rufus* exibiu menor sensibilidade ao excesso de Cd do que *Laccaria bicolor* e *Lactarius hepaticus* (Jongbloed & Borst-Pauwels, 1990), enquanto *S. bovinus* foi menos sensível ao excesso de Zn do que outras quatro espécies de fungos ectomicorrízicos (Colpaert & van Assche, 1987). Outro isolado de *S. bovinus*, considerado tolerante a Zn (Bücking & Heyser, 1994; Grazziotti et al., 2001), mostrou-se sensível ao Cu e Cd, sendo a concentração suficiente para inibir 50% do crescimento (CI₅₀) de $0,12 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, para o Cu, e de $7,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, para o Cd (Grazziotti et al., 2001). No entanto, os mesmos autores observaram que *Pisolithus tinctorius* foi capaz de tolerar os três metais (Zn, Cu e Cd) individualmente em meio de cultura. Isto demonstra que, além das variações intra e interespecíficas dos fungos ectomicorrízicos a tolerância também é dependente do metal.

Os mecanismos pelos quais os fungos podem tolerar os metais pesados são numerosos (Gadd, 1993), incluindo-se processos externos às hifas, como precipitação dos metais, ligação a polímeros da parede celular, tais como: quitina ou melanina, e processos internos nas células fúngicas, que resultam na complexação ou compartimentalização dos metais.

O efeito simultâneo dos metais pesados sobre o fungo, sobre a planta hospedeira e sobre a própria associação, dificulta a avaliação da tolerância destes aos metais pesados. Assim, estudos em cultura pura tornam-se uma ferramenta importante para se conhecer a relação fungo-metal, apesar da relação variável entre o comportamento em cultura e em simbiose (Jones & Hutchinson, 1988; Hartley, 1997a). Além disso, a maioria dos trabalhos realizados em cultura pura estuda a tolerância dos fungos ectomicorrízicos aos metais individualmente, sendo que na natureza raramente ocorre a contaminação por um único metal (Hunter et al., 1987).

Como demonstrado por Hartley et al. (1997b), as interações entre os metais pesados influenciam sua toxidez aos fungos ectomicorrízicos, não podendo a inibição do crescimento fúngico pela contaminação múltipla ser predita a partir da toxidez individual. Colpaert & van Assche (1992a) verificaram que a adição de $0,765 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Zn ao meio de cultura diminuiu a toxidez de Cd para dois isolados de *S. bovinus*. Em outro estudo, Hartley et al. (1997b) observaram que o antimônio reduziu a toxidez de Cd para *Lactarius deliciosus*, *S. variegatus* e *S. gramulatus* e que a toxidez causada pela mistura de metais (Cd + Pb + Zn + antimônio) foi semelhante àquela verificada para o Cd.

Portanto, esses resultados evidenciam que a contaminação do solo por uma mistura de metais pesados pode não ser tão tóxica quanto o predito para os mesmos metais avaliados individualmente. Apesar destes estudos, pouco se conhece sobre as interações de metais e suas conseqüências para o crescimento ou sobrevivência dos fungos ectomicorrízicos.

Diante disto e da dificuldade de determinar a biodisponibilidade dos metais pesados no solo por extrações químicas (Ribeiro-Filho et al., 1999), no presente trabalho, avaliou-se o comportamento de 12 isolados de fungos ectomicorrízicos pertencentes às espécies de *P. tinctorius*, *S. bovinus* e *Scleroderma* sp. em meio adicionado de solo contaminado por vários metais, coletado de uma área de rejeito de uma indústria de Zn.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em Laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA, de março a dezembro

de 1998, e constou de experimentos em que a fonte de contaminação por metais pesados foi uma amostra de solo misturada em diferentes proporções com areia. O solo foi coletado em área de rejeito industrial da Companhia Mineira de Metais (CMM), localizada em Três Marias (MG). Os teores totais extraídos por água régia, em mg dm^{-3} , foram de: Zn = 17.937, Cd = 202, Pb = 359, Cu = 1.843, Co = 65, Ni = 35, Fe = 30.800, Mn = 962 e Al = 500, e pH 6,6 (pH em água).

Para avaliar o comportamento de 12 isolados (Quadro 1) quanto à contaminação do solo por metais pesados, estes foram inoculados em meio Melin-Norkrans modificado (MNM) líquido (Marx, 1969) que continha três níveis de contaminação estabelecidos a partir de misturas solo-areia com as proporções de 0, 30 e 75% de solo contaminado. O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro repetições.

As amostras de solo e areia foram previamente secas ao ar e passadas em peneira com abertura de malha de 1 mm para o solo e 2 mm para a areia. Antes da mistura, a areia foi lavada em água corrente e seca em estufa a 180°C por duas horas; em seguida, foi lavada com $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e novamente com água corrente, com água destilada e, finalmente, seca em estufa.

Vinte gramas de cada mistura – solo contaminado + areia – foram colocados em Erlenmeyers de 125 ml e adicionados de 60 ml de meio MNM líquido, com pH 5,6. Em seguida, a suspensão foi autoclavada a 120°C por 20 min e deixada esfriar à temperatura ambiente. Em seguida, determinaram-se, por espectrofotometria de absorção atômica, os teores iniciais de Zn, Cd, Cu e Pb em solução no meio de cultura (Quadro 2). As misturas 0, 30 e 75% representaram, respectivamente, as seguintes situações: sem contaminação, contaminação moderada e contaminação elevada.

Os isolados estudados são colonizadores de raízes de *Eucalyptus* e *Pinus*, obtidos de várias origens (Quadro 1). Os isolados de *Pisolithus* foram aqui referidos como *P. tinctorius*, apesar de trabalhos recentes de caracterização genética (Gomes et al., 1999) indicarem não serem todos os isolados pertencentes a esta espécie. Os isolados foram mantidos em meio MNM sólido, pH 5,6. Os isolados de *S. bovinus* foram fornecidos pelo Dr. Heike Bücking, – Universidade de Bremen – Alemanha, onde o SB + Zn, uma subcultura do isolado SB considerado tolerante a Zn, tem sido mantido desde 1990 em meio MNM que continha $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Zn-EDTA. O inóculo utilizado constou de 10 discos por erlemnyer. Os discos com 5 mm de diâmetro, que continham micélio, foram retirados da borda de colônias crescidas por 20 dias, a 28°C , em placas de Petri com 20 ml de meio sólido MNM, em pH 5,6.

Quadro 1. Isolados de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch (PT-), *Suillus bovinus* (Fr.) O. Kuntze (SB) e *Scleroderma* sp. (Scl) empregados nos experimentos

Isolado	Origem	Fornecido ⁽¹⁾
PT-H6	- /Canadá	Universidade de Laval – Quebec
PT-H15	- /Canadá	Universidade de Laval – Quebec
PT-RV82	<i>Eucalyptus</i> / Brasil	Dep ^{ta} de Microbiologia – UFV
PT-90A	<i>Eucalyptus</i> / Brasil	Dep ^{ta} de Microbiologia – UFV
PT-441	<i>Eucalyptus</i> / Brasil/ESALQ	Dep ^{ta} de Ciência Florestal – UFLA
PT-185	<i>Pinus</i> /USA-Marx	Dep ^{ta} de Microbiologia – UFV
PT-270	<i>Pinus</i> /USA-Marx	Dep ^{ta} de Microbiologia – UFV
PT-303	<i>Pinus</i> /USA-Marx	Dep ^{ta} de Microbiologia – UFV
PT-306	<i>Pinus</i> /USA-Marx	Dep ^{ta} de Microbiologia – UFV
SB	<i>Pinus</i> / -	Dep ^{ta} de Ecologia Microbiana – UL
SB + Zn	<i>Pinus</i> / -	Dep ^{ta} de Ecologia Microbiana – UL
Scl D ⁽¹⁾	<i>Eucalyptus</i> /Brasil	Dep ^{ta} de Microbiologia – UFV

⁽¹⁾ UFV = Universidade Federal de Viçosa; ESALQ = Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; UL = Universidade de Lund, Suécia; Dep^{ta} = Departamento; UFLA = Universidade Federal de Lavras.

Quadro 2. Teores iniciais de metais pesados na solução do meio de cultura (MNM) que continha mistura de solo e areia com três proporções de solo contaminado (SC)

Proporção de SC	Metal pesado			
	Zn	Cd	Cu	Pb
	— x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ —		x 10 ⁻⁹ mol L ⁻¹	
0	0	0	0	0
30	142,9	1,7	8,1	195,2
75	415,2	6,9	7,2	327,8

Após a inoculação, os frascos foram incubados a 28°C até que o crescimento micelial de cada isolado cobrisse a superfície do meio no tratamento-controle. Os períodos foram: de 10 dias, para os PT-185, PT-303 e PT-306; de 15 dias, para os PT-270, PT-H6, PT-441, PT-90A e SB, e de 30 dias, para os PT-H15, PT-Rv82, SB + Zn e Scl D. Após estes períodos, o micélio foi coletado em peneira de 0,053 mm, lavado em água corrente, seco em estufa com ventilação forçada a 70°C, por 72 h, e a massa seca determinada.

Em outro estudo, dois isolados com comportamentos distintos, o PT-306, considerado tolerante, e o SB, como não-tolerante, foram avaliados quanto à

curva de inibição do crescimento de acordo com a proporção de solo contaminado na mistura solo-areia adicionada ao meio de cultura.

Os isolados foram inoculados e crescidos em meio MNM líquido (60 mL) com as seguintes misturas de solo-areia (20 g): para o PT-306, 0, 20, 40, 60, 80 e 100% (m/m) de solo contaminado; e, para o SB, 0, 5, 10, 15, 20 e 25% (m/m) de solo contaminado, sendo cada isolado testado separadamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições. Após a inoculação, os frascos (125 mL) foram incubados a 28°C no escuro.

Os teores iniciais de Zn, Cd, Cu e Pb em solução no meio de cultura foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica após a autoclavagem. A inoculação dos isolados foi realizada por meio de seis discos de 5 mm de diâmetro por frascos, e o experimento conduzido como descrito anteriormente. A solução sobrenadante, meio de cultura, foi filtrada em papel de filtro (Watman Nº 42) para a determinação dos teores finais de Zn, Cd, Cu e Pb. Absorbância a 350 nm foi avaliada, na solução sobrenadante, como medida da produção total de pigmentos extracelulares. Determinou-se também a produção de pigmentos extracelulares por grama de micélio (produção específica de pigmentos).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas SAEG 5.0-93 – UFV. No ensaio com todos os isolados em três níveis de contaminação, a produção da massa

seca de micélio de cada isolado foi comparada entre os tratamentos de contaminação (proporção de solo contaminado) pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), empregando-se também o SAEG 5.0-93 – UFV. Na comparação entre isolados, determinou-se o índice de tolerância (IT), obtido pela razão entre a produção de massa seca de micélio nas misturas com solo contaminado e a do controle, expressa em porcentagem.

Nos demais ensaios, após a análise de variância, os dados de massa seca de micélio e de produção total e específica de pigmentos foram submetidos à análise de regressão pelo programa TableCurve 3.01 (Jandel Corporation), e o valor de F foi calculado e testado pelo programa F Calc32 versão 1.1. A proporção de solo contaminado na mistura solo-areia suficiente para inibir o crescimento em 50% foi estimada pelas equações de regressão para produção de massa seca de micélio conforme a contaminação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição da mistura solo-areia, com 30% de solo contaminado, reduziu o crescimento da maioria dos isolados, exceto para os PT-306, PT-441 e PT-90A (Figura 1). O PT-306 foi o único que não teve seu crescimento reduzido no tratamento que recebeu mistura com 75% de solo contaminado, mostrando-se pouco sensível à contaminação do meio por vários metais pesados. Essa redução do crescimento da maioria dos isolados, mesmo na menor proporção de solo contaminado, evidencia o impacto que a contaminação dos ecossistemas por metais pesados pode causar a esses fungos e certamente ao meio ambiente.

Aumentando a proporção de solo contaminado de 30 para 75%, não houve efeito na produção de massa seca de micélio dos isolados PT-185, PT-303, PT-306, PT-441, SB, SB + Zn, Scl D e PT-Rv82 (Figura 1),

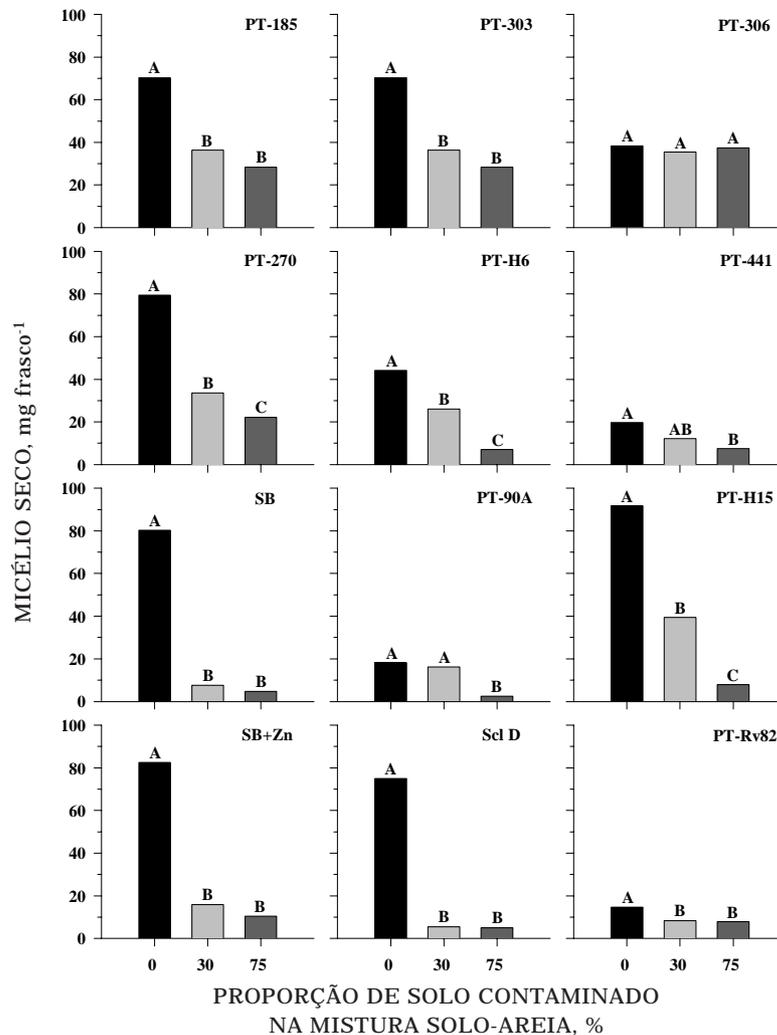


Figura 1. Produção de massa seca de micélio de isolados de *Pisolithus tinctorius*, *Suillus bovinus* e *Scleroderma* sp. em meio MNM que continha mistura de solo e areia com diferentes proporções de solo contaminado. Para cada isolado, as barras com letras diferentes diferem entre si, a 5% pelo teste de Tukey.

enquanto os isolados PT-270, PT-H6, PT-90A e PT-H15 tiveram menor crescimento na mistura com 75% de solo contaminado, demonstrando resposta diferenciada de acordo com a contaminação no meio.

Baseando nos índices de tolerância (IT), o PT-306 foi o único isolado que apresentou elevada tolerância à mais alta contaminação; sob contaminação moderada (30% de solo contaminado), além do PT-306, o PT-90A também apresentou elevada tolerância (Figura 2). Os isolados SB + Zn, SB e SclD foram os mais sensíveis, apresentando redução de crescimento superior a 80%. O PT-441, PT-H6, PT-Rv82 e PT-185 foram classificados como medianamente tolerantes e o PT-303, PT-270 e PT-H15 como pouco tolerantes. Já na mistura com 75% de solo contaminado, apenas o PT-306 foi tolerante, o PT-RV82 foi medianamente tolerante, PT-441, PT-185, PT-303 e PT-270 foram pouco tolerantes e PT-90A, PT-H6, PT-H15, SB + Zn, SB e Scl D foram não-tolerantes. Portanto, verifica-se um comportamento diferenciado entre isolados, fato já relatado em outros estudos que mostram variações intra-específicas para *P. involutus* (Denny & Wilkins, 1987), *P. tinctorius* (Egerton-Warburton & Griffin, 1995) e *Laccaria laccata* (Howe et al., 1997). Dentre cinco isolados de *P. involutus*, Howe et al. (1997) verificaram que três apresentaram crescimento na concentração de Cu de até $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e foram considerados tolerantes.

Dentre os isolados que apresentaram tolerância à contaminação moderada, somente o PT-306, PT-Rv82, PT-303 e PT-270 mantiveram o mesmo comportamento na contaminação elevada (Figura 2). Os demais isolados tiveram comportamento diferenciado nos dois níveis de contaminação, destacando o PT-90A, PT-H6 e PT-H15, que apresentaram redução no IT da ordem de seis vezes, para o PT-90A; de quatro vezes, para o PT-H6; e de cinco vezes, para o PT-H15.

É interessante observar que somente os isolados de *Pisolithus* apresentaram alguma tolerância à contaminação do solo por metais pesados (Figura 2). Este comportamento concorda com a grande distribuição geográfica do gênero e sua tolerância a uma variedade de ambientes adversos (Marx, 1991). Isolados desta espécie apresentam grande diversidade genética (Junghans et al., 1998) e plasticidade quanto à adaptação ecológica. Isto tem grande relevância prática, considerando que mudas de árvores colonizadas por isolados de *P. tinctorius* selecionados sobrevivem e se desenvolvem melhor em áreas degradadas que contêm excesso de metais (Marx, 1991; Cordell et al., 1987).

O isolado PT-306 apresentou elevada tolerância aos metais pesados (Figuras 2 e 3), sobrevivendo e crescendo satisfatoriamente no meio com solo contaminado simultaneamente por Zn, Cu, Cd e Pb. Resultado esse também observado por Grazziotti et al. (2001) para o Zn, Cu e Cd adicionados individualmente ao meio de cultura. Tais resultados

revelam que este isolado apresenta co-tolerância a estes metais, o que já foi relatado por Tam (1995), trabalhando com outro isolado de *P. tinctorius*. No entanto, isto não parece regra, pois alguns fungos apresentam tolerância a diversos metais, enquanto outros podem ser tolerantes a alguns metais e não tolerantes a outros. Apesar da presença simultânea de diversos metais no meio, o efeito inibitório no crescimento de algum isolado pode ter ocorrido pela ação de apenas um metal, o que explicaria o comportamento de alguns isolados considerados tolerantes a um metal específico, como: PT-RV82 e PT-185, tolerantes a concentrações de Al de até $55,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Vieira, 1984); e SB e SB + Zn, tolerantes a Zn (Bücking & Heyser, 1994) e que, no presente estudo, foram sensíveis ao solo multicontaminado.

Bücking & Heyser (1994) observaram que o SB e SB + Zn em simbiose com *Pinus sylvestris*, em meio com até $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Zn, foram capazes de proteger a planta hospedeira, sendo este efeito maior para a subcultura SB + Zn, a qual foi pré-cultivada em meio enriquecido com Zn-EDTA. No entanto, Grazziotti et al. (2001) observaram que o isolado SB apresentou tolerância a Zn ($CI_{50} = 2,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), mas foi sensível ao Cu ($CI_{50} = 0,12 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e ao Cd ($CI_{50} = 7,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Assim, a sensibilidade

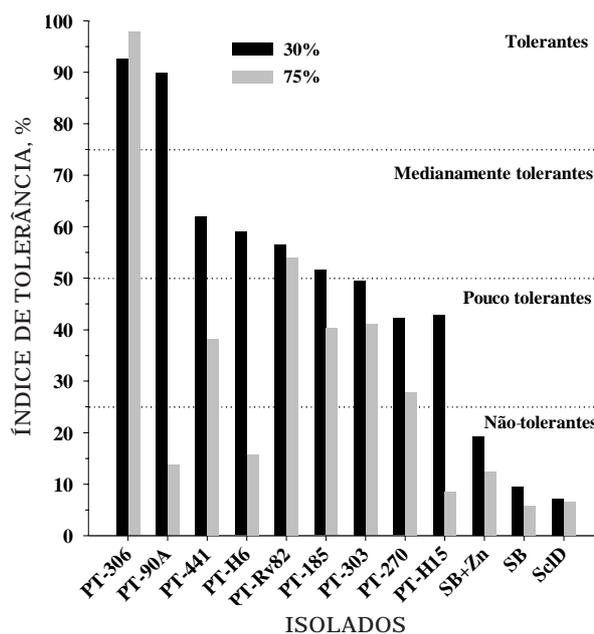


Figura 2. Índice de tolerância (IT%) e categorização de isolados de fungos ectomicorrízicos em meio MNM que continha mistura de solo e areia, com 30 e 75% de solo contaminado. IT% ≤ 25% = Não-tolerantes; 26 a 50% = Pouco tolerantes; 51 a 75% = Medianamente tolerantes; ≥ 76% = Tolerantes.

destes isolados observada no presente trabalho pode ser devida à presença de outros metais, Cu e Cd por exemplo. Isto demonstra a importância de se avaliar a co-tolerância de fungos ectomicorrízicos à contaminação múltipla do solo por metais pesados, pois, em geral, a contaminação por metais pesados no ambiente ocorre simultaneamente por mais de um metal.

Embora os isolados PT-306 e PT-RV82 tenham sido tolerantes e medianamente tolerantes, respectivamente (Figura 2), nenhum deles foi isolado de locais contaminados por metais pesados, indicando não existir relação entre a contaminação do solo de origem e a tolerância dos isolados aos metais pesados, corroborando com os resultados de Denny & Wilkins (1987) e com o verificado por Howe et al. (1997) para três isolados de *L. laccata*, cinco de *P. involutus* e um de *Scleroderma citrinum* cuja tolerância ao Cu não foi relacionada com a contaminação por Cu dos sítios de origem. No entanto, outros autores evidenciam a existência desta relação (Egerton-Warburton & Griffin, 1995; Colpaert & van Assche, 1992b, 1993).

No ensaio em que a proporção de solo contaminado na mistura solo-areia foi de até 100%, a produção de massa micelial do PT-306, considerado tolerante, não sofreu inibição com até 20% de solo contaminado na mistura, enquanto o SB, com adição de apenas 5,4% de solo contaminado, teve seu crescimento reduzido

em 50%, o que só aconteceu para o PT-306 com a adição de 65,4% de solo contaminado na mistura (Figura 3).

O PT-306 teve seu crescimento estimulado quando pequena proporção foi adicionada, só apresentando redução no crescimento a partir de 15,2% de solo contaminado. Grazziotti et al. (2001) demonstraram que esse mesmo isolado produziu mais massa micelial quando foi adicionado até $0,51 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu ao meio de cultura, mas não respondeu positivamente à adição de Zn e Cd. Assim, é provável que o Cu contido no solo contaminado adicionado tenha sido responsável pela maior produção de massa micelial. Já para o SB, apesar de ter sido submetido a proporções de solo contaminado muito inferiores (0 a 25%), a produção de biomassa foi sempre decrescente. Esses resultados confirmam a maior tolerância do PT-306 em relação ao SB nesta condição de contaminação.

A produção total de pigmentos extracelulares do PT-306 e SB aumentou com a elevação inicial da contaminação (Figura 3). A produção máxima no PT-306 ocorreu na mistura que recebeu 29,1% de solo contaminado e, no SB, quando a mistura apresentava 3,6% de solo contaminado, tendo sido a produção máxima para o SB próxima da metade da máxima do PT-306. Para o PT-306, a produção total de

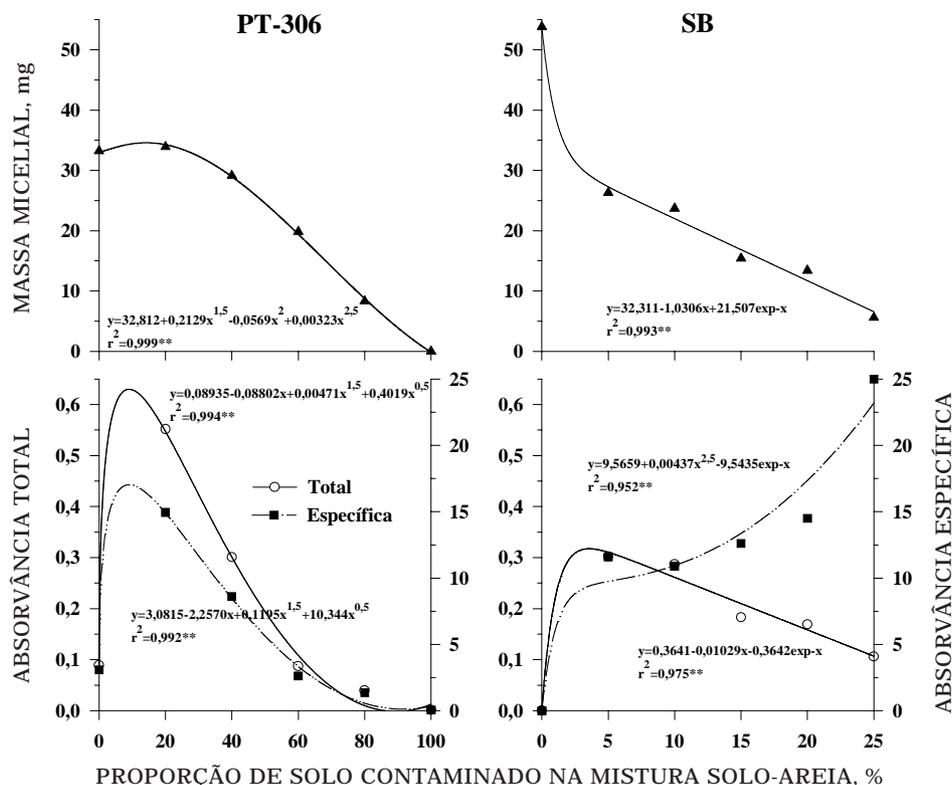


Figura 3. Crescimento (massa micelial), produção total de pigmentos extracelulares (Absorbância total a 350 nm) e produção específica de pigmentos extracelulares (Absorbância total/g de micélio seco) no meio de cultura do isolado PT-306 e do SB em meio MNM que continha mistura de solo e areia com diferentes proporções de solo com contaminação múltipla por metais pesados.

pigmentos extracelulares máxima foi observada na mistura próxima àquela em que ocorreu a produção máxima de micélio. Tal resultado mostra o envolvimento da produção de pigmentos extracelulares com a maior tolerância do isolado PT-306, uma vez que melaninas contêm grupos carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos e aminas, os quais fornecem muitos sítios potenciais para ligação ou bioadsorção dos metais e são consideradas um dos mecanismos de tolerância de fungos a metais pesados (Gadd & De Rome, 1988; Gadd, 1993; Fogarty & Tobin, 1996).

Para separar o efeito da quantidade de micélio na pigmentação, analisou-se a produção específica de pigmentos extracelulares. Para o isolado PT-306, observou-se o mesmo comportamento da produção total de pigmentos extracelulares, aumentando nas misturas com pequenas proporções de solo

contaminado e diminuindo nas mais elevadas (Figura 3). Para o isolado SB, a produção específica de pigmentos extracelulares foi induzida e aumentou progressivamente com a elevação da contaminação (Figura 3), enquanto a produção total de pigmentos foi reduzida.

Grazziotti et al. (2001) observaram que, somente na presença de Zn, a produção total e específica de pigmentos do isolado PT-303 aumentou nas doses iniciais, apesar de decrescer nas maiores doses. Além disso, os valores de absorvância foram entre 4,4 e 6,2, ou seja, resultados esses semelhantes ao observado no presente estudo. Isto mostra que no solo multicontaminado, o Zn foi o metal que, mais influenciou a produção de pigmentos deste isolado, provavelmente em razão dos maiores teores deste metal no solo.

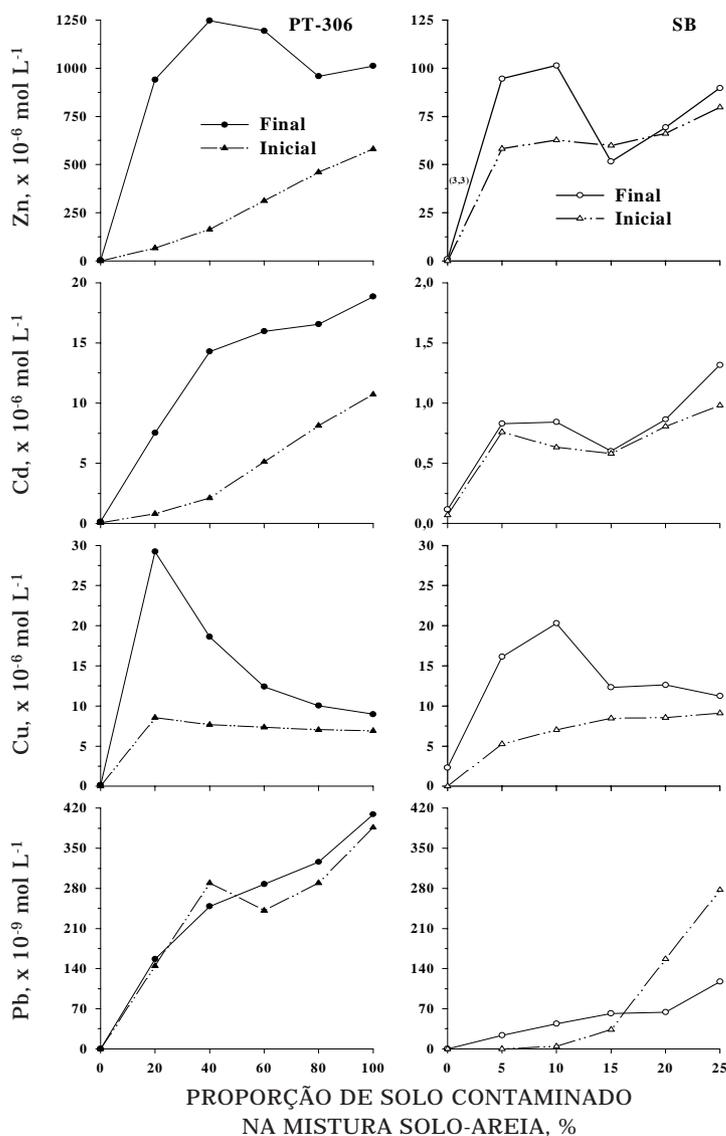


Figura 4. Teores iniciais e finais de metais pesados na solução do meio de cultura (MNM) que continha mistura de solo e areia com diferentes proporções de solo contaminado onde foram crescidos os isolados PT-306 e SB.

As concentrações dos metais no meio de cultura ao final do experimento com o Pt-306 atingiram valores de até $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, para o Zn, $0,029 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, para o Cu, e $18,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, para o Cd. Esses valores são inferiores a CI_{50} para Zn ($2,71 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e Cu ($1,18 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) observados para esse isolado por Graziotti et al. (2001); no entanto, para o Cd, as concentrações observadas foram até mesmo maiores do que a CI_{50} ($12,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Isto demonstra que o Cd foi o principal responsável pela redução de crescimento do Pt-306 na presença de solo contaminado. Para SB, as concentrações dos metais no meio de cultura, ao final do experimento, atingiram valores de até $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, para o Zn; $0,02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, para o Cu, e $1,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, para o Cd, também inferiores as CI_{50} (Zn = $2,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; Cu = $0,12 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; Cu = $7,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), obtidos por Graziotti et al. (2001).

Tal resultado revela ter sido a presença de vários metais simultaneamente no meio de cultura, promovendo um efeito somatório e sinérgico da toxidez, a principal causa da redução do crescimento do isolado SB. Tem sido demonstrado que a interação, sinérgica ou antagonica, entre os metais pesados quanto à toxidez para com os fungos ectomicorrízicos depende dos metais envolvidos e do isolado fúngico.

Hartley et al. (1997) observaram efeito somatório ou sinérgico, em que a adição de Cd + Zn + Pb + antimônio resultou numa maior redução do crescimento do que os metais isoladamente para *S. granulatus*, *S. variegatus* e *Lactarius deliciosus*, mas que nem sempre foi a mais tóxica entre as combinações testadas, por exemplo, para *S. granulatus*, a adição de Cd + Zn + antimônio foi a combinação que mais reduziu o crescimento. No entanto, efeito antagonico também tem sido demonstrado (Colpaert & van Assche, 1992; Hartley et al., 1997). A toxidez de Cd para *S. variegatus* foi reduzida pela adição de Zn ou antimônio, já para *S. granulatus* pela adição de Pb e, ou antimônio (Hartley et al., 1997). Portanto, para garantir a sobrevivência e estabelecimento de fungos ectomicorrízicos em áreas contaminadas por metais pesados, faz-se necessária a seleção de isolados em condições que melhor se aproximem da realidade da área contaminada, como proposto por Graziotti et al. (2000).

Em geral, os teores iniciais dos metais na solução do meio de cultura aumentaram com o incremento da proporção de solo contaminado na mistura solo-areia, exceto para o Cu no experimento com PT-306 (Figura 4). Neste caso, o maior teor foi observado na mistura com 20% de solo contaminado, sendo ligeiramente decrescente nas misturas subsequentes. Isto pode ser devido a interações com os demais metais presentes no solo. Os teores de Zn, Cd e Cu na solução do meio de cultivo ao final do experimento foram, em geral, maiores que os iniciais, em razão da elevação da acidez que mobiliza estes metais. Os maiores teores de Cu, Cd e Pb na solução do meio de

crescimento do PT-306 em relação ao SB devem-se às maiores proporções de solo contaminado nas misturas empregadas para este isolado e indicam a capacidade deste isolado de co-tolerar esses metais.

A adição de solo contaminado ao meio de cultura mostrou-se simples e útil para avaliar o impacto da contaminação sobre fungos ectomicorrízicos, que apresentam grande importância na revegetação de áreas contaminadas com plantas hospedeiras destes fungos, como eucaliptos e pinos. Também permite melhor avaliação do efeito simultâneo dos metais, pois considera as interações entre metais pesados e suas interações com o solo no crescimento dos fungos ectomicorrízicos, o que não é possível em estudos com metais em meio de cultura. Faz-se necessário, ainda, avaliar se tal método permitirá prever a tolerância de isolados a metais pesados quando em simbiose.

CONCLUSÕES

1. A adição de solo contaminado ao meio de cultura reduziu o crescimento da maioria dos isolados estudados, permitindo a categorização destes quanto à tolerância a metais pesados, mostrando-se eficiente na avaliação do impacto da contaminação do solo por metais pesados sobre fungos ectomicorrízicos.
2. Os isolados estudados apresentaram variações intra e interespecíficas quanto à tolerância à contaminação, sendo esta dependente do grau de contaminação do solo.
3. O isolado PT-306 foi o mais tolerante à contaminação múltipla do solo, indicando a co-tolerância deste isolado a Zn, Cu, Cd e Pb, principais metais contaminantes do solo em estudo.
4. Os isolados de *Suillus bovinus* tolerantes a Zn, SB e SB + Zn foram muito sensíveis ao solo contaminado por vários metais pesados, indicando a ausência de co-tolerância destes isolados.
5. A produção de pigmentos extracelulares nos isolados PT-306 e SB foi estimulada pela adição de solo contaminado ao meio de cultura, e a maior produção pelo PT-306 pode estar envolvida com a maior tolerância destes a metais pesados.

LITERATURA CITADA

- BÜCKING, H. & HEYSER, W. The effect of ectomycorrhizal on Zn uptake and distribution in seedlings of *Pinus sylvestris* L. *Plant Soil*, 167:203-212, 1994.
- COLPAERT, J.V. & van ASSCHE, J.A. Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. *Funct. Ecol.*, 1:415-421, 1987.
- COLPAERT, J.V. & van ASSCHE, J.A. The effects of cadmium and the cadmium-zinc interaction on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 145:237-243, 1992a.

- COLPAERT, J.V. & van ASSCHE, J.A. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant Soil*, 143:201-211, 1992b.
- COLPAERT, J.V. & van ASSCHE, J.A. The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L.. *New Phytol.*, 123:325-333, 1993.
- CORDELL, C.E.; OWEN, J.H.; MARX, D.H. & FARLEY, M.E. Ectomycorrhizal fungi - Beneficial for mineland reclamation. In: NATIONAL SYMPOSIUM ON MINING, SEDIMENTOLOGY, AND RECLAMATION, Kentucky, 1987. Proceedings. Kentucky, University of Kentucky, 1987. p.321-326.
- DENNY, H.J. & WILKINS, D.A. Zinc tolerance in *Betula* spp.. III. Variation in response to zinc among ectomycorrhizal associates. *New Phytol.*, 10:535-544, 1987.
- DIXON, R.K. & BUSCHENA, C.A. Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. *Plant Soil*, 105:256-271, 1988.
- EGERTON-WARBURTON, L.M. & GRIFFIN, B.J. Differential responses of *Pisolithus tinctorius* isolates to aluminum *in vitro*. *Can. J. Bot.*, 73:1229-1233, 1995.
- FOGARTY, R.V. & TOBIN, J.M. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 19:311-317, 1996.
- GADD, G.M. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.*, 124:25-60, 1993.
- GADD, G.M. & DE ROME, L. Biosorption of copper by fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29:610-617, 1988.
- GOMES, E.A.; BARROS, E.G.; KASWYA, M.C.M. & ARAÚJO, E.F. Molecular characterization of *Pisolithus* spp. isolates by rDNA PCR-RFLP. *Mycorrhiza*, 8:197-202, 1999.
- GRAZZIOTTI, P.H.; SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. Efeito de Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. *R. Bras. Ci. Solo*, 25:831-838, 2001.
- HARTLEY, J.; CAIRNEY, J.W.G. & MEHARG, A.A. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Plant Soil*, 189:303-319, 1997a.
- HARTLEY, J.; CAIRNEY, J.W.G.; SANDERS, F.E. & MEHARG, A.A. Toxic interactions of metal ions (Cd²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ and Sb³⁺) on *in vitro* biomass production of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 137:551-562, 1997b.
- HEINRICH, P.A.; MULLIGAN, D.C. & PATRICK, J.W. The effect of ectomycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition of *Eucalyptus* seedlings. *Plant Soil*, 109:147-149, 1988.
- HOWE, R.; EVANS, R.L. & KETTERIDGE, S.W. Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 135:123-131, 1997.
- HUNTER, B.A.; JOHNSON, M.S. & THOMPSON, D.J. Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem. I. Soil and vegetation contamination. *J. Appl. Ecol.*, 24:573-586, 1987.
- JONES, M.D. & HUTCHINSON, T.C. The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. *New Phytol.*, 102:429-442, 1986.
- JONES, M.D. & HUTCHINSON, T.C. The effects of nickel and copper on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 66:119-124, 1988.
- JONES, M.D.; BROWNING, M.H.R. & HUTCHINSON, T.C. The influence of mycorrhizal associations on paper birch and jack pine seedlings when exposed to elevated copper, nickel or aluminium. *Water Air Soil Poll.*, 31:441-448, 1986.
- JONGBLOED, R.H. & BORST-PAUWELS, G.W.F.H. Differential response of some ectomycorrhizal fungi to cadmium *in vitro*. *Acta Bot. Neerl.*, 39:241-246, 1990.
- JUNGHANS, D.T.; GOMES, E.A.; GUIMARÃES, W.V.; BARROS, E.G. & ARAÚJO, E.F. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. *Mycorrhiza*, 7:243-248, 1998.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59:153-163, 1969.
- MARX, D.H. The practical significance of ectomycorrhiza in forest establishment. In: MARCUS WALLENBERG PRIZE SYMPOSIUM IN STOCKHOLM, Sweden, 1991, Lectures... Sweden, The Marcus Wallenberg Foundation, 1991. p.54-90.
- PARKE, J.L.; LINDERMAN, R.G. & BLACK, C.H. The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of Douglas-fir seedlings. *New Phytol.*, 95:83-95, 1983.
- RIBEIRO-FILHO, M.R.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O. & MOTTA, P.E.F. Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:453-464, 1999.
- TAM, P.C.F. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza*, 5:181-187, 1995.
- VIEIRA, R.F. Efeito de fatores edáficos associados ao Cerrado no crescimento de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch em meio de cultura e na infecção micorrízica de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden em condições controladas. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1984. 84p. (Tese de Mestrado)