



ISOLAMENTO DE FUNGOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO E CELULOLÍTICOS DE UMA PILHA DE REJEITO - EM PROCESSO DE RESTAURAÇÃO - E NO CERRADO, NO MUNICÍPIO DE PAPAGAIÓ, MG.

V.L.O.Freitas

F.S.S. Mello; K.V.C.N. Garcia; L.F. Jales

Laboratório de Restauração Ecológica da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais - CETEC/MG . Av. José Cândido da Silveira, 2000, Horto, 31170 - 000, Belo Horizonte, MG (Brasil). email: valeria.freitas@cetec

INTRODUÇÃO

O solo é o habitat de um conjunto de organismos que estão em constante interação e cujas atividades influenciam de diferentes formas nas suas propriedades físicas, químicas, e biológicas (EMBRAPA, 2002). De acordo com Gonzáles *et al.*, (2001) os microrganismos são os principais agentes da atividade bioquímica do solo, estando diretamente envolvidos em todos os processos biológicos e influenciando processos físicos e químicos. Além disso, contribui para o aumento da fertilidade do solo pela mineralização de nutrientes a partir da matéria orgânica ou pela fixação de nitrogênio no solo (EMBRAPA, 2002). Tótolá (2002) ressalta que a atividade microbiana no solo reflete influências de todos os fatores que regulam a degradação da matéria orgânica e a transformação dos nutrientes.

O conhecimento da diversidade dos fungos do solo é de extrema importância do ponto de vista biológico e ecológico, especialmente quando se trata de restauração de áreas degradadas. A microbiota do solo pode ser usada como indicador da qualidade do solo, uma vez que esses microrganismos são muito sensíveis a fatores bióticos e abióticos (Sautter, 1998; Vargas & Scholles, 2000).

Muitas espécies de plantas são capazes de desenvolver associações com outros organismos vivos que, quando isolados, apresentam capacidade específica e individual de tolerar estresses bióticos e abióticos. Entretanto, quando associados, adquirem novas características como otimização da tolerância das plantas a estresses ambientais mais extremos (Johnson & Pflieger, 1992), contribuição na agregação do solo (Miller & Jastrow, 1992), aumento da absorção de água e nutrientes do solo, como o fósforo, cobre e zinco, em virtude da maior absorção pelo micélio extrarradicular (Johnson & Pflieger, 1992; Smith & Read, 1997) e aumento da fixação biológica do nitrogênio das leguminosas (Johnson & Pflieger, 1992). Esta associação permite vantagens competitivas contribuindo para o estabelecimento e sucessão da vegetação, promovendo a sustentabilidade em áreas em processo de

restauração ecológica (Johnson & Pflieger, 1992; Melloni *et al.*, 2003).

As perturbações no solo e substrato devido aos impactos ambientais causam mudanças drásticas na diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas, e os efeitos dessa perturbação podem ser duradouros, possibilitando a utilização de tributos microbiológicos do solo como indicadores do processo de degradação (DeGroot, Claassen & Scow, 2005).

Ações que visam a recomposição da cobertura vegetal em uma área degradada e, conseqüentemente, os processos de sucessão decorrente da restauração ecológica podem reverter parcialmente os impactos da mineração sobre a comunidade fúngica (Melloni *et al.*, 2003). A diversidade destes organismos está intimamente relacionada à diversidade da vegetação (Heijden *et al.*, 1998), sua estruturação, desenvolvimento e sustentabilidade da área (Mehrotra, 1998).

O desenvolvimento e monitoramento da microbiota é uma ferramenta importante para avaliar o sucesso de trabalhos de restauração de áreas degradadas (Campelo, 1998) e para o estabelecimento de estratégias para a restauração de solos degradados (Sautter, 1998). Dados referentes a essas alterações no solo devem ser acompanhadas ao longo do tempo e devem ser avaliadas considerando as estações seca e chuvosa, pois, ocorrem alterações nas suas características químicas (Dias *et al.*, 1994) e biológicas (Oliveira, 1997; EMBRAPA, 2002). Apesar disto, ainda são incipientes os estudos que englobam estes parâmetros nos projetos de restauração de áreas degradadas. Contudo, os conceitos de qualidade de solo vêm sendo utilizados como indicadores de degradação e sustentabilidade de manejo de solo em áreas agrícolas (Campello *et al.*, 2000).

Contudo, o monitoramento de áreas degradadas em processo de recuperação ainda é muito pouco explorado e dá pouca ênfase a avaliação do desenvolvimento da microbiota do solo. Os dados gerados nessa etapa são importantes para o conhecimento da dinâmica das comunidades, as adaptações metodológicas para novos investimentos na

área, as melhorias econômicas e sociais para população local (Rodrigues & Gandolfi, 1998; Bell, 1998) e a importância das alterações físicas, químicas e biológicas que ocorrem no solo (Campello *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo entender o papel da microbiota do solo na estrutura e funcionamento das comunidades vegetais, assim como a sua importância em sítios em processo de restauração ecológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O sítio em estudo localiza-se no município de Papagaio (MG), na zona do Alto do São Francisco-maior pólo produtor de ardósia do Brasil (Oliveira, 2001). Este foi dividido em: pilhas de rejeitos, Mineração Capão das Pedras Ltda - MICAPEL (áreas 1 e 2) e Mineração Alto das Pedras Ltda-MAP (área 3)-constituídas por material de capeamento (solo e rocha alterada) e rejeitos de lavra (cacos de rocha fresca)-e área do cerrado (área 4)- fragmento típico preservado, área controle. As áreas amostradas encontram-se em diferentes estágios sucessionais, a área 1-implantado um projeto de recomposição da cobertura vegetal há um ano; 2-implantado um projeto de recomposição da cobertura vegetal há quatro anos; área 2 e área 3-onde foi implantado um modelo de recomposição da cobertura vegetal há um ano e que já apresentava um processo de sucessão natural, cuja comunidade de plantas é composta principalmente de espécies invasoras.

Coleta do Solo

Foram amostrados 16 pontos diferentes, selecionadas ao acaso, na profundidade de zero a 10 cm nos 4 sítios estudados. Na área 1, onde foi realizado o plantio de mudas, foram coletadas amostras do topo e do talude; na área 2 as coletadas foram realizadas em diferentes parcelas onde foram empregadas técnicas de semeadura direta e plantio de muda utilizando a técnica de nucleação (copo e muda); área 3 semelhante à área 2 e área 4 como controle. As amostras foram coletadas 24 horas antes do experimento e transportadas em sacos plásticos estéreis até o laboratório de Microbiologia da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais-CETEC. Foram realizadas duas coletas na estação seca e duas na chuvosa.

Preparação das amostras e isolamento dos fungos

Todo o material utilizado para o experimento foi embalado e previamente esterilizado em autoclave a 127°C, para evitar contaminação. Os meios de cultivo de Pikowiskaia (MP), próprio para fungos solubilizadores de fosfato, e meio de Agar simples posteriormente coberto com papel filtro (MC), próprio para fungos celulolíticos, também foram previamente preparados e autoclavados.

Para a preparação do meio celulolítico foi utilizado um meio base composto de 1,0g de K_2HPO_4 , 0,5g de $NaNO_3$, 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5g de KCl , 0,01g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 15g de Agar para 1000ml de H_2O destilada, com pH 6,8, acrescido de 1,5g de cloranfenicol (antibiótico) e após a distribuição

das diluições ele foi coberto com papel filtro. Para o estudo dos fungos solubilizadores de fosfato o meio foi composto de 5,0g de Ca_3PO_4 , 10,0g de Glicose, 0,5g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2g de $NaCl$, 0,2g de KCl , 0,1g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001g de $MnSO_4$, 0,001g de $FeSO_4$ e 15g de Agar para 1000ml de H_2O destilada, com pH 6,2 e acrescido de 1,5g de cloranfenicol.

As amostras de solo foram submetidas à técnica de diluição em série utilizando as diluições de 10^{-3} e 10^{-4} para o isolamento dos fungos. Nessa técnica 1 g de solo foi diluída em 9 mL de solução salina e homogeneizada em agitador tipo vórtex. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para uma série de tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina obtendo as diluições de 10^{-3} e 10^{-4} . Estas diluições foram distribuídas em placas de Petri com os meios de culturas descritos acima e incubados a 25°C em câmara de germinação, sendo utilizadas 4 repetições por amostra. Depois de uma semana de incubação os fungos foram quantificados, ocorrendo uma segunda quantificação 8 dias após a primeira.

Tratamento estatístico dos dados

Os resultados foram tratados estatisticamente pela Análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, conduzido o teste de Tukey (5%).

RESULTADOS

Para a avaliação da biodiversidade dos fungos do solo, foram utilizados dois meios de cultura para o isolamento dos fungos celulolíticos e solubilizadores de fosfato. As variáveis analisadas foram diferentes estágios sucessionais, topo e talude, copos e mudas em nucleação e sazonalidade (estação seca e chuvosa).

A diluição de 10^{-3} , utilizada para o isolamento dos fungos, mostrou-se adequada para o propósito de quantificação do presente trabalho e foi apropriada para obter culturas puras das morfoespécies proporcionando um número de colônias significativo e inferior a 30 UFC's (Unidades formadoras de colônias) por placa, facilitando o isolamento para a identificação taxonômica dos fungos. Diluições maiores são sugeridas para possibilitar a obtenção de colônias puras e posterior identificação (Garlipp,1995; Rodrigues, 2003).

A presença de vegetação influenciou o número de UFC's, tanto no meio fosfato ($F_{(3,176)} = 19,03$; $p < 0,0000$) quanto no celulolítico ($F_{(3,176)} = 5,60$; $p < 0,0011$). No meio fosfato, os maiores valores foram encontrados nas áreas em processo de restauração (Áreas 2 e 3), estágio avançado de sucessão, onde ocorre o predomínio de espécies pioneiras e de gramíneas aumentando a disponibilidade de matéria orgânica no solo. Além da contribuição da matéria orgânica, as áreas 2 e 3 apresentam valores elevados de fósforo, devido à presença do pó de ardósia e rochas em processo de degradação, o que favorece a ocorrência de fungos deste grupo ecológico. O cerrado, por sua vez, apresentou valores intermediários e a área 1, onde ainda existe pouca contribuição da flora para a formação de serapilheira, apresentou o menor valor. Contudo, no meio celulolítico, onde o fator limitante é representado pelo aporte de matéria orgânica, a área 3 apresentou maior número de UFC's, este fato provavelmente reflète a presença dominante de gramíneas nesta área.

A sazonalidade influenciou o número UFC's de apresentou resultados siO início do período chuvoso apresentou as maiores médias de UFC's dos funos solubilizadores de fosfato($F_{(3,176)} = 8,19$; $p < 0,0000$). Este fato pode ser explicado pelo acúmulo de matéria orgânica no solo, deposição de folhas e ramos, durante o período da seca, e pelo aumento da umidade que favorece o processo de degradação do material pela ação dos microrganismos do solo. A diminuição do número de UFC's na estação chuvosa pode ser explicada pela lixiviação dos esporos dos fungos para uma área mais profunda do solo e também pelo aumento de substâncias alelopáticas no solo. Estes resultados corroboram os apresentados por Carneiro (2000), que estudaram solo de cerrado e de áreas cultivadas no Distrito Federal, que confirmam a ocorrência de um maior número de UFC's no início da estação chuvosa seguido pelo seu declínio quando o índice pluviométrico atinge valores elevados.

Embora tenha sido evidenciado a influência dos meses de coleta no número de UFC's no meio celulolítico ($F_{(3,176)} = 8,11$; $p < 0,000$), este não apresentou o mesmo comportamento observado para o meio fosfato. As maiores médias foram alcançadas no período de maior deposição das folhas e ramos seguida de uma queda, no início da estação chuvosa, e voltando aos valores semelhantes ao encontrado na seca. Estes resultados corroboram os dados apresentados por Martins *et al.*, (1999) e Caproni *et al.*, (2003) que, embora utilizando meios de cultivos diferentes, afirmaram que na estação seca ocorre maior número de espécies e uma menor densidade das UFC das populações de fungos micorrízicos arbusculares. Também relatam que a estação seca apresenta maior riqueza e a estação chuvosa maior densidade, fato observado neste trabalho.

CONCLUSÃO

Todas as amostras apresentaram Unidades Formadoras de Colônias (UFC's), indicando provavelmente a recuperação do potencial produtivo dos solos.

A diluição 10^{-3} apresentou um número de UFC's significativo e inferior a 30 unidades por placa, possibilitando o isolamento de colônias puras, sendo considerada neste trabalho a melhor diluição para o isolamento e purificação das colônias.

A análise do número médio de UFC's dos fungos pertencentes ao grupo funcional fosfato foi capaz de separar as áreas em processo avançado de sucessão (áreas 2 e 3) e a área preservada (4-Cerrado), da área em início de sucessão ecológica (área 1), mostrando a importância da cobertura vegetal na comunidade dos microrganismos do solo.

A sazonalidade influenciou significativamente o número médio de UFC's, não sendo evidente a influência o local de coleta das amostras (topo/talude e copo/mudas), entretanto os dois grupos funcionais de fungos estudados apresentaram comportamento distinto. No meio fosfato o número de UFC's, no início da estação chuvosa foi superior aos encontrados na seca. Provavelmente devido à deposição de material vegetal no solo, o que favoreceu o crescimento dessas colônias.

Ainda faltam informações importantes para que se possa utilizar a diversidade dos fungos como parâmetro indica-

tivo das condições dos ambientes, pois ainda existem problemas relativos à identificação desses organismos, além do pouco conhecimento sobre a estrutura da comunidade microbiana do solo. Soma - se ainda descrever como utilizar dessa ferramenta para atestar a sua importância como indicador de sustentabilidade de um sistema. Contudo, devido à importância da diversidade microbiana e o avanço da biologia molecular, os conhecimentos atuais indicam a possibilidade da sua utilização como bioindicadora da qualidade do solo (Coutinho *et al.*, 1999; Rosado, 2000; Tiedje *et al.*, 2001). O principal argumento a favor da utilização desses bioindicadores é o fato da diversidade microbiana manter - se naturalmente inalterada ao longo do ano (Smith *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2003).

O estudo da diversidade microbiana do solo esta em fase de desenvolvimento e apresenta poucos dados. A interpretação desses resultados também deve levar em conta as limitações do método de contagem em placas, o qual seleciona as espécies que são capazes de formar colônias e se desenvolvem bem nos meios de culturas escolhidos, em detrimento de outras que não se adaptam ou simplesmente não crescem no mesmo meio (Kucey, 1983). Apenas pequena parte dos microrganismos do solo cresce em meios de cultura (Torsvik *et al.*, 1990). Deste modo, é possível que nas áreas estudadas ocorra um maior número de microrganismos que não crescem em meio de cultura.

Projeto financiado pela FAPEMIG. Nossos agradecimentos à FAPEMIG e ao CNPq pela concessão de bolsas de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

- Allen, E.B.; Allen, M.F. 1980. Natural re - establishment of vesicular - arbuscular mycorrhizae following stripmine reclamation in Wyoming. *Journal of Applied Ecology*, **17(1)**: 139 - 147.
- Bell, L.C. 1998. Management of soils and overburden for plant growth medium reconstruction after mining. In: Dias, L. E.; Mello, J. W. V. (Ed.) *Recuperação de áreas degradadas*. Viçosa, UFV. p.117 - 129.
- Campello, E.F.C.; Franco, A.A.; Dias, L.E. 2000. Monitoramento Ambiental. *Ação Ambiental*, **10**: 24 - 25.
- Caproni, A.L.; Franco, A.A.; Berbara, R.L.L.; Trufem, S.B.; Granha, J.R.D.O.; Monteiro, A.B. 2003. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em áreas revegetadas após mineração de bauxita em Porto Trombetas, Pará. *Pesq. agropec. bras.*, **38(12)**: 1409 - 1418.
- Carneiro, M.A.C. 2000. *Características bioquímicas do solo em duas cronosseqüências de reabilitação em áreas de mineração bauxita*. p.166. Tese (Doutorado)-Departamento Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras.
- Degroot, S.H.; Claassen, V.P.; Scow, K.M. 2005. Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **7(8)**: 1427 - 1435.
- Dias, L.E.; Franco, A.A.; Campello, E.F.C. 1994. Dinâmica de matéria orgânica e de nutrientes em solo

degradado pela extração de bauxita e cultivado com *Eucalyptus pellita* e *Acacia mangium*. In: Simpósio Sul - americano I e Simpósio Nacional II sobre Recuperação de Áreas Degradadas. Foz do Iguaçu - PR. FUPEF. *Anais*, p. 515 - 525.

EMBRAPA. 2002.Relações entre a diversidade da fauna do solo e o processo de decomposição e seus reflexos sobre a estabilidade dos ecossistemas. *Documentos 156*. Rio de Janeiro, p.07 - 08.

Garlipp, A.B. 1995.*Isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo do Banhado Grande, na Estação Ecológica de Juréia - Itatins, SP.* Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

González, G.; Ley, R.E.; Schmidt, S.K.; Zou, X.; Seastedt, T.R. 2001.Soil ecological interactions: comparisons between tropical and subalpine forests. *Oecologia*, **128**: 549 - 556.

Heijden, M.G.A.; Boller, T.; Wiemken, A.; Sanders, I.R. 1998. Different Arbuscular Mycorrhizal Fungal Species Are Potential Determinants of Plant Community Structure. *Ecology*, **79(6)**: 2082 - 2091.

Johnson, N.C.; Pfleger, F.L. 1992.Vesicular - Arbuscular Mycorrhizae and cultural stresses. In: BETHELEN-FALVAY, G. J.; LINDERMAN, R. G. (Ed.) *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Madson: American Society of Agronomy. p.71 - 77. 1992.

Kucey, R.M.N. 1983.Phosphatesolubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, **63(4)**: 671 - 678.

Mehrotra, V.S. 1998.Arbuscular mycorrhizal associations of plants colonizing coal mine spoil in India. *Journal of Agricultural Science*, **130**: 125 - 133.

Miller, R.M.; Jastrow, J.D. 1992.The application of VA mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. In: Allen, M.F. (Ed.) *Mycorrhizal functioning*. New York: Chapman and Hall. p.438 - 467.

Oliveira, E.P. 1997.Monitoramento da mesofauna do solo para a avaliação de áreas recuperadas com árvores nativas na Mineração Rio do Norte. In: III Simpósio Brasileiro de Recuperação de Áreas Degradadas. Ouro Preto, MG. *Anais...Trabalhos voluntários*. p.215 - 222.

Rodrigues, L. 2004.*Isolamento e Identificação de Fungos Mitospóricos do Solo de Quatro Formações Vegetais da Restinga do Parque Estadual Paulo César Vinha, Espírito Santo.* Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Dissertação de Mestrado. 41 - 43p.

Rodrigues, R.R.; Gandolfi, S. 1998.Restauração de florestas tropicais: subsídios para uma definição metodológica e indicadores de avaliação e monitoramento. In: Dias, L.E.; Mello, J.W.V. (Ed.) *Recuperação de áreas degradadas*.Viçosa, MG. UFV. p.203 - 215.

Sautter, K.D. 1998.Meso (Acari e Collembola) e macrofauna (Oligochaeta) na recuperação de solos degradados. In: *Recuperação de áreas degradadas*. Viçosa, MG. UFV. p.197 - 202.

Schoenlein - Crusius, I.H.; Milanez, A.I. 1998.Fungos zoospóricos (Mastigomycotina) da mata atlântica da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, município de Santo André, SP. *Rev. bras. Bot.*, **21(2)**.

Smith, S.E.; Read, D.J. 1997.*Mycorrhizal symbiosis*. London:Academic. 2ed. 605p.

Torsvik, V.; Gorsoyr, J.; Dae, F.L. 1990.High diversity in DNA soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 782 - 787.

Tótola, M.R. 2002.Bioindicadores de qualidade de solo. *Resumos 4º Encontro Nacional de Biólogos*. Ouro Preto, MG. p.28.

Walland, M.E.; Allen, E.B. 1987.Relationships between VA mycorrhizal fungi and plant cover following surface mining in Wyoming. *Journal of Range Management*, **40(3)**: 271 - 276.