UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

mestrado

BC/46183
IB/ 81679

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SARA ADRIÁN LÓPEZ DE ANDRADE

Interação de micorriza e chumbo no desenvolvimento da soja e seu efeito na atividade microbiana do solo

Esta exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Sara Adrián López de Andrade
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia.

Orientadora: **Profa. Dra. Adriana Parada Dias da Silveira**

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE IB/BI 679
N.º CHAMADA
T/UNICAMP
An24i
V. Ex.
TOMBO BC/ 46123
PROC. 16-392/01
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA 17-02-01
N.º CPD

CM00158825-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Andrade, Sara Adrián López de

An24i Interação de micorriza e chumbo no desenvolvimento da soja e seu efeito na atividade microbiana do solo/Sara Adrián López de Andrade. – Campinas, S.P. [s.n.], 2001.

151f: ilus.

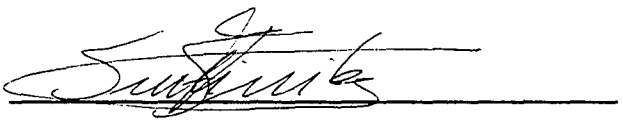
Orientadora: Adriana Parada Dias da Silveira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Micorriza. 2. Rizóbio. 3. Metais pesados. 4. Biomassa. 5. Solos. I. Silveira, Adriana Parada Dias da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

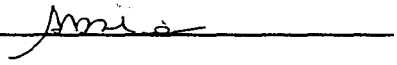
Campinas 28, de junho de 2001

BANCA EXAMINADORA

Dra. Sueli dos Santos Freitas 

Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

Dra. Cleide Aparecida de Abreu _____

Dra. Adriana Parada Dias da Silveira 

Aos meus pais pelos valores de vida transmitidos,

ofereço.

Ao meu filho Daniel e ao Edson, o meu marido,

dedico.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Adriana Parada Dias da Silveira pela orientação, amizade e confiança demonstradas.

Ao Centro de Solos e Recursos Agroambientais do Instituto Agronômico (IAC), pelas facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

Às pesquisadoras e aos colegas da Seção de Microbiologia do Solo do IAC, pela oportunidade de trabalho, companheirismo e bons momentos compartilhados.

À Dra. Cleide Aparecida de Abreu, do Centro de Solos e Recursos Agroambientais do IAC, pela participação e a colaboração na elaboração deste trabalho.

À Dra. Mónica F. de Abreu do Centro de Solos e Recursos Agroambientais do IAC, pela participação e ajuda prestadas.

À Dra. Rosa Frighetto, da Embrapa Meio Ambiente, pela orientação nos ensaios enzimáticos.

Às técnicas laboratoriais Teresa Bueno Mangussi e Rosana Gierts Gonçalves, pelos auxílios prestados.

Ao Edson, meu marido, pelo carinho, estimulo, apoio e ajuda prestados.

Ao Centro de Convivência Infantil do IAC, pelos cuidados oferecidos ao meu filho.

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado durante os dois primeiros anos do curso.

À Universidade Estadual de Campinas.

Índice

Índice....iv

Índice de figuras....vi

Resumo....viii

Abstract....xi

1. Introdução....1

2. Revisão da Literatura....4

2.1. Considerações gerais: Metais pesados....4

2.2. Microbiota edáfica....6

2.3. Micorrizas....13

2.4. Fixação biológica de nitrogênio....23

3. Material e Métodos....26

3.1. Delineamento experimental....26

3.2. Amostragem e tratamento do solo....27

3.3. Preparação do inóculo de fungo micorrízico....29

3.4. Preparação do inóculo de rizóbio....29

3.5. Plantio e condições de crescimento da planta....30

3.6. Variáveis analisadas....30

3.6.1. Massa da matéria seca da parte aérea da soja....31

3.6.2. Número e massa da matéria seca dos nódulos....31

3.6.3. Pb, macro e micronutrientes na parte aérea da soja....31

3.6.4. Colonização micorrízica....32

3.6.5. Esporulação....32

3.6.6. C-Biomassa microbiana do solo....32
3.6.7. Respiração do solo....33
3.6.8. Atividade da desidrogenase no solo....33
3.6.9. Atividade da arilsulfatase no solo....34
3.6.10. Atividade da fosfatase alcalina no solo....35
3.7. Análise estatística....36
4. Resultados....37
4.1. Experimento I....37
4.2. Experimento II....45
4.2.1. Crescimento da soja e associações simbióticas....45
4.2.2. Pb na parte aérea da soja....49
4.2.3. Macronutrientes na parte aérea da soja....51
4.2.4. Micronutrientes na parte aérea da soja....56
4.2.5. C-Biomassa microbiana e respiração do solo....61
4.2.6. Atividade enzimática do solo....64
5. Discussão....67
5.1. Experimento I....67
5.2. Experimento II....76
5.2.1. Estabelecimento das simbioses e resposta da planta....76
5.2.2. Biomassa e atividade microbiana do solo....95
6. Conclusão....108
7. Literatura citada....109
8. Apêndices....128

Índice de Figuras

EXPERIMENTO I:

Figura 1. Massa da matéria seca da parte aérea da soja em função da dose de Pb.....37

Figura 2. Colonização micorrízica em função da dose de Pb. 38

Figura 3. Teor de Pb (a) e acúmulo de Pb (b) na parte aérea da soja em função da dose de Pb.....39

Figura 4. Teor de P (a) e acúmulo de P na parte aérea da soja em função das dose de Pb.....40

Figura 5. Teor de Ca (a); Mg (c) e acúmulo de Ca (d) e Mg (e) na parte aérea da soja em função da dose de Pb.....42

Figura 6. Teor de Mn (a); Fe (c) e Zn (e) e acúmulo de Mn (b); Fe (d) e Zn (f) na parte aérea da soja em função da dose de Pb. 44

EXPERIMENTO II

Figura 7. Massa da matéria seca da parte aérea da soja (a); número (b) e matéria seca (c) das vagens e número (d) e matéria seca (e) dos nódulos em função da dose de Pb.....47

Figura 8. Colonização micorrízica (a) e esporulação do FMA (b) em função da dose de Pb.....48

Figura 9. Teor de Pb (a) e acúmulo de Pb (b) na parte aérea da soja em função da dose de Pb.....50

Figura 10. Teor de N (a); P (b); K (c); Ca(d); Mg (e) e S (f) na parte aérea da soja em função da dose de Pb.....52

Figura 11. Acúmulo de N (a); P (b); K (c); Ca(d); Mg (e) e S (f) na parte aérea da soja em função da dose de Pb.....55

Figura 12. Teor de Fe (a); Mn (b); Cu (c) e Zn (d) na parte aérea da soja em função da dose de Pb.....58

Figura 13. Acúmulo de Fe (a); Mn (b); Cu (c) e Zn (d) na parte aérea da soja em função da dose de Pb.....60

Figura 14. C-Biomassa microbiana (a); respiração do solo (b); quociente metabólico (c) e inibição da respiração (d) e do C-biomassa microbiana (e) do solo em função da dose de Pb.....63

Figura 15. Atividade da desidrogenase (a); fosfatase alcalina (b) e arilssulfatase (d) e redução da atividade fosfatase alcalina (c) e arilssulfatase no solo em função da dose de Pb.....66

Resumo

Realizaram-se dois experimentos em casa de vegetação, no Instituto Agrônomico (IAC), durante os anos de 1998 e 1999.

O primeiro experimento - experimento I - teve como finalidade avaliar o efeito da inoculação do FMA (*Glomus macrocarpum*) e da saturação por bases (V_1=90% e V_2 = 55%) do solo sobre o crescimento, nutrição e absorção de Pb pela soja, quando ao solo foram adicionadas doses crescentes de Pb (0; 7,5; 37,5; 150 e 300 mg dm^{-3}).

O segundo experimento - experimento II- teve como objetivos avaliar os efeitos da inoculação do FMA e da adição de Pb (0; 150; 300 e 600 mg dm^{-3}) sobre o desenvolvimento da planta, absorção de Pb e nodulação da soja pelo rizóbio e também sobre a biomassa e a atividade microbianas do solo, em dois estádios do ciclo da planta, florescimento e maturação do grão.

Os resultados obtidos no experimento I indicaram que a inoculação do FMA favoreceu a produção de matéria seca da parte aérea da soja, a qual apresentou maiores teores de P e maiores acúmulos de P, Ca, Mg, Mn, Fe e Zn. O crescimento da soja micorrizada reduziu-se com o aumento da concentração de Pb no solo, em ambas as saturações por bases estudadas. A colonização radicular pelo FMA diminuiu 40% em relação ao controle, na dose máxima de Pb, mas somente na saturação por bases de 63%. O teor de Pb na parte aérea da soja crescida no solo com V de 63% foi 5 vezes maior que no V de 82%. Somente

no solo com V de 63%, as plantas micorrizadas e as não micorizadas diferiram quanto ao teor de Pb, que foi 30% menor nas plantas micorrizadas.

Concluiu-se que a saturação por bases do solo teve efeito dominante sobre a disponibilidade do Pb para as plantas, sendo que o FMA teve papel relevante na diminuição da concentração desse elemento na parte aérea, no solo com saturação por bases de 63%, e que a adição de Pb afetou tanto o estabelecimento quanto o desempenho da simbiose.

No experimento II não foi observada redução significativa da produção de matéria seca da soja com o aumento da dose de Pb no solo. Quanto ao número de vagens houve diminuição significativa de 30% entre as doses mínima e máxima de Pb aplicadas. Assim mesmo, foi observada diminuição tanto da matéria seca dos nódulos de rizóbio quanto da colonização micorrízica da raiz e esporulação do FMA. A inoculação do FMA causou aumento significativo do crescimento da soja, da produção de vagens e do número e matéria seca dos nódulos de rizóbio.

Plantas micorrizadas apresentaram teores de Pb na parte aérea 30% menores do que plantas não micorrizadas, na dose de 600 mg dm^{-3} de Pb. Plantas micorrizadas tiveram também teores de P, K e S e quantidade acumulada de N, P, K, Ca, Mg e S maiores do que plantas NM. As plantas não micorrizadas tiveram os teores de Ca, Cu, Fe, Zn e o acúmulo de Mg na parte aérea reduzidos com o aumento do nível de Pb no solo.

A inoculação do FMA causou dessa forma maior crescimento e melhor nutrição mineral da planta e amenizou a absorção de Pb pelas plantas nas doses mais altas de Pb adicionadas ao solo. Entretanto, o FMA mostrou-se mais suscetível às altas concentrações de Pb no solo do que a planta.

No solo, a atividade da fosfatase alcalina foi a mais alterada pelos altos níveis de Pb adicionados ao solo, com redução de 60% na sua atividade, sugerindo que pode atuar como um indicador sensível do estresse metabólico da comunidade microbiana do solo causado pelo excesso de metal pesado.

Pode-se concluir que o Pb afetou importantes características biológicas do solo, como biomassa, respiração e atividade de enzimas ligadas à ciclagem de nutrientes no solo, como a fosfatase alcalina, desidrogenase e arilssulfatase. A microbiota do solo quando a adição de altas concentrações de Pb, apresentou, de forma geral, sintomas de estresse, os quais afetaram o bom funcionamento do sistema edáfico e o desenvolvimento adequado da planta.

ABSTRACT

Interaction between mycorrhiza and lead on soybean development and effect on soil microbial activity.

Two greenhouse experiments were conducted in the Instituto Agronômico, in Campinas, during 1998 and 1999. The aim of the first experiment (I), was to evaluate the influence of AMF, *Glomus macrocarpum*, inoculation and soil basic cation saturation ratio (BCSR) (55% and 90%) on soybean growth, nutrition and lead uptake, when increasing doses of lead were added to soil (0; 7,5; 37,5; 150; 300 mg dm^{-3}). The purpose of the second experiment (II) was to investigate the effects of lead addition to soil (0, 150, 300 and 600 mg dm^{-3}) and AMF inoculation on lead uptake and development of soybean plants and also on soil microbial biomass and activity, in two different periods of the plant life cycle, flowering and maturity.

In experiment I, AMF inoculation improved shoot dry weight, shoot P concentration and shoot P, Ca, Mg, Mn, Fe, and Zn contents. Increasing doses of Pb in soil caused reduction on mycorrhizal plants growth. Mycorrhizal colonisation of root decreased 40% at the maximum dose of Pb added to soil in relation to the control, but only in the 63% BCSR. Shoot of mycorrhizal soybean grown in soil with 63% BCSR showed 30% less concentration of Pb, than non-mycorrhizal soybean. Plants grown in the 63% BCSR had five fold higher Pb uptake than that grown in the 82% BCSR. Soil BCSR was determinant on Pb disponibility to plants, but AMF showed a relevant role on Pb concentration reduction in shoots, in the 63% BCSR.

So, Pb addition affected both establishment and functionality of the symbioses decreasing plants growth.

Whereas, in the experiment II it was not observed significant reduction on soybean shoot dry matter yield with increasing Pb levels in soil. However, the number of pod decreased significantly, about 30% between the maximum and minimum Pb added doses. It was also observed reduction on rhizobium nodules dry weight as much as on root mycorhizal colonisation and AMF sporulation. AMF inoculation enhanced plant growth and pod production as well as the number and weight of rhizobium nodules.

Mycorrhizal plant showed 30% less Pb concentration on shoots than non-mycorrhizal plants at 600 mg dm^{-3} of added Pb. Shoot P, K and S concentrations and N, P, K, Ca, Mg and S contents were highe rin mycorrhizal plants. Only non-mycorrhizal plants showed reduction of shoot Cu, Fe and Zn concentrations and Mg content when Pb was added to soil. Therefore, AMF inoculation caused higher plant growth and more balanced mineral nutrition and ameloriated Pb uptake by plants. However, the mycorrhizal fungus showed higher susceptibility to the Pb added to soil than the plant did.

Soil phosphatase activity was the most affected by Pb addition among the analysed enzymes, decreasing in about 60%. It suggests that its activity can be used as a sensitive marker of soil microbial community stress caused by the excess of Pb in soil.

In conclusion, lead affected important biological features such as soil microbial biomass C, soil respiration and activities of phosphatase, dehydrogenase and arylsulfase. Since soil microbiota showed stress symptoms due to the high Pb

doses added to soil, it is supposed that the soil system functioning and even appropriate plant development were negatively affected.

1. Introdução

A contaminação do solo por metais pesados (MPs) é hoje um tema bastante discutido, devido à sua presença em diversos materiais adicionados ao solo, tais como resíduos de mineração e siderurgias, impurezas de fertilizantes e agrotóxicos, na composição do lodo de esgoto e do composto de lixo urbano, procedentes da deposição atmosférica, dentre outros. A preocupação ambiental em relação às áreas onde esses elementos se acumulam tem aumentado, pois o problema é agravado quando os MPs são absorvidos pelas plantas e entram na cadeia alimentar (Abreu et al., 1995).

Está bem estabelecido o fato de que a assimilação de metais tem lugar no mundo microbiano, assim como em plantas, e de que esses elementos tendem a se concentrar conforme avançam na cadeia trófica, processo que é chamado de biomagnificação. Desta forma, níveis excessivos de MPs podem afetar seriamente processos biológicos de grande importância no meio edáfico. Decomposição da matéria orgânica, fixação biológica de nitrogênio, respiração e reciclagem de macro e micronutrientes, entre outros processos do solo, têm sido estudados em solos poluídos com MPs, constatando-se que tanto a diversidade microbiana

quanto a atividade biológica são muitas vezes alteradas, inclusive chegando a prejudicar a produção primária.

O chumbo além da sua importância como metal potencialmente tóxico, é pouco estudado em relação ao seu efeito na microbiota do solo, em condições de solos tropicais. Esse metal, não essencial para os seres vivos, pode ser acumulado nas camadas superficiais do solo e influenciar os microrganismos e, conseqüentemente, afetar o funcionamento normal do ecossistema. O Pb é adicionado ao solo junto com lodo de esgoto e lixo urbano que contêm esse metal, na formulação ou como impureza de fertilizantes e pesticidas, entre outras fontes. Normalmente, o Pb existe no solo em concentrações consideradas não tóxicas. Entretanto, em situação de adição constante do metal ao solo, o Pb pode tornar-se mais disponível e entrar na cadeia alimentar (Wallace e Wallace, 1994). A norma 4.230 da CETESB (1999), estabeleceu que, em solos agrícolas tratados com lodo originário de sistema de tratamento biológico, a taxa de aplicação anual máxima de Pb é de 7,5 mg kg^{-1} de solo, permitindo uma carga máxima acumulada no solo de 150 mg kg^{-1} de Pb. Mesmo que as áreas contaminadas com Pb sejam restritas às circunvizinhanças de centros industriais e siderúrgicos, estas poderiam ser reutilizadas para a agricultura ou recuperadas para outras atividades. Portanto, é importante aprofundar os conhecimentos sobre os efeitos de altas concentrações desse metal na microbiota edáfica assim como nas simbioses envolvendo fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de N_2.

O interesse nos estudos sobre o efeito do excesso de MPs na associação

micorrízica, nas bactérias fixadoras de nitrogênio e em outros microrganismos presentes no meio edáfico tem aumentado recentemente. El-Kerbawy et al. (1989) estudaram a associação rizóbio-fungo micorrízico arbuscular (FMA), em alfafa, em solos com altos níveis de metais (Zn e Cd), observando que tanto a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio quanto a colonização radicular foram reduzidas com o aumento da disponibilidade desses metais.

Considera-se o pH atributo de fundamental importância na disponibilidade de metais tanto para as plantas quanto para os microrganismos. O pH do solo influência a sorção de metais aos componentes do solo, afetando a sua disponibilidade e conseqüentemente a sua absorção pelos organismos (Chaney et al., 1978).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de Pb ao solo sobre a atividade microbiana do solo e as simbioses formadas por FMA e bactéria fixadora de N_2 (rizóbio) estabelecidas na soja, e avaliar como a interação do Pb com os microrganismos simbióticos afeta o crescimento, a nutrição mineral e a concentração do MP na planta.

2. Revisão de literatura:

2.1. Considerações gerais: metais pesados

Consideram-se metais pesados (MPs) cerca de 65 elementos metálicos, de densidade maior de 5 g cm^{-3}, capazes de formar sulfetos (Adriano, 1986). O termo metal traço seria mais correto, já que este termo está baseado na concentração em que é encontrado normalmente (< 0,1% no solo ou 100 mg kg^{-1} na matéria seca de amostras biológicas). Mesmo assim, será utilizado o termo metal pesado que é, no geral, utilizado e aceito em estudos ambientais. Os MPs de maior importância no habitat edáfico são Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Mg e Al (Stevenson, 1986). Muitos desses metais são essenciais ao metabolismo dos seres vivos, tais como o K, Na, Mg, Ca, Mn, Cu, Zn, Co ou o Ni, estimando-se que um terço das enzimas conhecidas contenham algum íon metálico como parte integral da molécula, a exemplo da nitrogenase, diferentes desidrogenases, oxigenases e oxidases. Outras moléculas importantes como os citocromos e as clorofilas também possuem metais na suas moléculas (Gadd, 1993 e 1992, Van Assche, 1990). Outros metais, como o Rb, Cs, Al, Cd, Ag, Au, Hg e Pb, não têm função essencial aparente, mas podem interagir com as células e ser acumulados por processos físico-químicos ou biológicos, como por exemplo, sistemas de transporte por especificidade e afinidade de moléculas celulares por cátions metálicos. Esses processos são de importância, pois fazem parte dos principais ciclos biogeoquímicos.

Hoje em dia a contaminação dos solos por MPs, causada por processos

naturais ou pela atividade humana, é um dos mais sérios problemas ambientais, devido à sua persistência e alto poder de toxicidade (Reddy e Prasad, 1990). Os MPs no solo podem se acumular de uma forma natural quando a rocha mãe, da qual se originam, possui minerais ricos nesses (Stevenson, 1986), ou pela ação antropogênica, ao serem adicionados como impurezas dos fertilizantes químicos e calcário, de pesticidas e de resíduos orgânicos como lodo de esgoto, composto de lixo urbano, entre outros. Resíduos de diferentes indústrias como a farmacêutica ou aquelas que produzem pigmentos, baterias elétricas, materiais plásticos, e de construção, assim como da mineração e siderurgia, podem introduzir MPs no solo. Também, a combustão de combustíveis fósseis ou de lixo urbano podem criar poluição de solos e águas pela deposição atmosférica de metais (Ross, 1994). Todo metal pode exibir toxicidade acima de um limite de concentração, o qual, para os elementos altamente tóxicos, pode ser extremamente baixo. A toxicidade dos metais depende da sua biodisponibilidade, definida como a capacidade de o metal ser transferido do compartimento do solo a um organismo vivo.

Se a contaminação do solo por MPs irá se tornar ambientalmente tóxica ou não depende de vários fatores: a) das condições físico-químicas que prevalecem, como acidez, umidade, presença de argilas, óxidos de Fe/Mn e matéria orgânica entre outras, as quais proporcionam superfícies de absorção e reação, b) do solo e hidrologia, que podem não só diluir o contaminante como também transportar o efeito poluente da sua origem para uma nova área e c) do componente microbiano e vegetal do ecossistema, que podem absorver e reciclar o metal (Stevenson, 1986).

2.2. Microbiota edáfica

A importância dos microrganismos do solo é resultado da sua atividade metabólica que, interferindo diretamente no comportamento das características e propriedades do solo, proporciona um ambiente adequado ao desenvolvimento das plantas e outros organismos. Bactérias, actinomicetos, fungos e algas compõem uma microcomunidade essencial ao ecossistema. Esses microrganismos estão invariavelmente presentes tanto no solo como na rizosfera, realizando atividades metabólicas de grande relevância ao crescimento vegetal, como fixação de N_2, secreção de fatores de crescimento, aumento da disponibilidade ou da imobilização de nutrientes essenciais, entre outras. Assim, vem incrementando-se o interesse da comunidade científica em relação à importância da utilidade de organismos do solo como indicadores da qualidade do solo e como determinantes de sua "saúde" (Doran e Zeiss, 2000). A saúde do solo tem valor economicamente quantificável já que o solo e sua biota realizam funções no ecossistema que beneficiam os homens. Esses serviços ao ecossistema podem ser de considerável valor e incluem funções de armazenamento de água, decomposição de resíduos animais e vegetais, transformação e reciclagem de nutrientes, seqüestro e detoxificação de substâncias tóxicas, além de promover a saúde das plantas suprimindo microorganismos patogênicos e fauna fitófaga (Costanza, 1997).

Mudanças na composição ou na atividade da comunidade microbiana do solo podem ter efeitos prejudiciais no funcionamento do ecossistema. A

contaminação por metais pode afetar a comunidade microbiana alterando o seu crescimento, morfologia e metabolismo, e influenciando a produção primária e a reciclagem de nutrientes. Têm sido sugeridos diferentes mecanismos para explicar a presença de íons metálicos no interior de células microbianas, os quais incluem a peroxidação lipídica, complexos de permeases, mediação por carregadores, canais iônicos e inclusive endocitose (Ford e Mitchel, 1992). Um processo de adsorção de metais por células microbianas metabolicamente independente seria aquele decorrente da afinidade de diferentes componentes da parede celular ou de outras estruturas externas dos microrganismos por cátions metálicos. Assim, quando metais sem função biológica ou outros essenciais em altas concentrações substituem ou competem com um metal funcional, resulta em toxicidade para a célula. Esses efeitos tóxicos podem ser devidos ao bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, como enzimas ou sistemas de transporte, à desnaturação de proteínas ou à perda de integridade de membranas celulares. Numa escala maior, os efeitos incluem redução das taxas de crescimento, extensão da fase exponencial e perturbações morfológicas (Blacwell et al., 1995).

Em termos gerais, considera-se que os MPs afetam os microrganismos em ambientes naturais, reduzindo tanto a biomassa como a diversidade, sendo possível a seleção de uma população resistente, o que significa que a comunidade microbiana pode ser afetada tanto quantitativa como qualitativamente pelos MPs (Kandeler et al., 1996)

Algumas características estruturais e bioquímicas intrínsecas aos

microrganismos, adaptações fisiológicas e/ou genéticas, conferem-lhes capacidade de sobreviver na presença de altas concentrações de MPs, entre elas a presença de paredes celulares impermeáveis a determinados elementos, pigmentação de parede celular, produção de polissacarídeos extracelulares ou excreção de outros metabólitos que imobilizam o metal potencialmente tóxico (Gadd, 1992).

A resposta dos microrganismos do solo às altas concentrações de metais pesados tem sido avaliada estimando o tamanho da biomassa microbiana (Brookes e MacGrath, 1984), a composição de fosfolipídeos dos ácidos graxos (Bääth et al., 1998), a estrutura da comunidade (Reber, 1992) e pela determinação da respiração e atividades enzimáticas (Dias-Júnior et al., 1998; Valsecchi et al., 1995; Perucci, 1992 e Ohya et al., 1988).

Vários trabalhos constataram a relação entre altas concentrações de MPs e diminuição da biomassa microbiana do solo. Fliеβbach et al. (1994) estimaram o carbono da biomassa microbiana de solo tratado com lodo de esgoto com diferentes conteúdos de metais. Observaram que geralmente, o lodo com baixas concentrações de metal tem um efeito benéfico tanto no carbono da biomassa como na atividade microbiana do solo. Cargas maiores de MP no lodo resultaram em uma diminuição substancial do C da biomassa. Recentemente, Barajas-Aceves et al. (1999) estimaram o carbono da biomassa microbiana do solo e sua atividade (respiração induzida em substrato-SIR e conteúdo de ATP) em um solo de Gipuzkoa (Espanha), contaminado com Zn, devido a atividade mineradora.

Esses autores concluíram que as medidas da biomassa e as de atividade foram bons indicadores do estresse ambiental causado por metais pesados, em locais não experimentais. A correlação entre o C-biomassa e a atividade microbiana resultou em um indicador mais sensível do estresse do que essas determinações consideradas separadamente.

Valsecchi et al. (1995) observaram correlações negativas entre concentração de MPs (Zn, Pb, Cu, Cd, Ni e Cr) , respiração do solo e atividade respiratória específica (relação entre o C-CO_2 liberado e o C-biomassa por unidade de tempo), o que foi explicado como efeito adverso dos MPs sobre a microbiota do solo. Observou-se também um aumento da matéria orgânica com o incremento do conteúdo de metais do solo, possivelmente devido à menor eficiência na mineralização da matéria orgânica do solo sob essas condições. Cotrufo et al. (1995) constataram que os estádios iniciais da decomposição da matéria orgânica e a respiração do solo, na presença de altos níveis de metais, tais como Zn, Cu, Cr, Pb e Ni, foram negativamente afetados.

Sabe-se que a biomassa microbiana de solos poluídos com MPs é menos eficiente na utilização de substratos para a própria síntese de constituintes celulares e que precisa de mais energia para as reações metabólicas. Isto foi demonstrado por Bardgett e Saggat (1994) trabalhando com solo de pasto poluído com Cr, Cu e As. Esses autores analisando a biomassa e decomposição de ^{14}C-glicose, observaram que o ^{14}C da biomassa microbiana formado após a adição de glicose marcada foi significativamente menor, apesar de a liberação do $^{14}CO_2$ do

solo contaminado ter sido maior do que no solo controle não poluído. Ohya et al. (1988) estudaram os efeitos dos MPs tanto na biomassa microbiana quanto na sua atividade, em 30 solos urbanos de diferentes características físico-químicas, contaminados principalmente por Pb e Zn. Encontraram que o efeito inibitório dos metais nos microrganismos do solo não só dependeu do conteúdo total de metais, mas também da quantidade disponível do metal, que por sua vez foi controlada pelas características físico-químicas do solo. O C da biomassa foi função da capacidade de troca de cátions (CTC), do C orgânico total e do número de colônias fúngicas. Os resultados indicaram que a biomassa microbiana foi principalmente influenciada pela CTC, mas foi pouco afetada pelo Zn e Pb prontamente solúvel. Doelman e Haanstra (1984) concluíram que atributos do solo como pH, teor de Fe ou fração argila foram responsáveis pela inibição da respiração de solos com altos níveis de MPs.

Nos ecossistemas edáficos, a biomassa microbiana e a atividade são parâmetros de particular importância na avaliação dos efeitos dos metais nos microrganismos. Do ponto de vista ecofisiológico, a biomassa microbiana compreende populações "metabolicamente ativas" e "em estado de dormência", sendo que o equilíbrio dinâmico entre elas parece ter um papel relevante no ecossistema. Os microrganismos em estado de dormência são células vegetativas com atividade metabólica reduzida. Em condições de campo, acredita-se que a maioria das populações esteja nesse estado durante a maior parte do ano. Segundo Ohya et al. (1988), a população dormente é menos sensível à inibição por metais que a metabolicamente ativa, pois a quantidade de metais absorvida é

determinante da toxicidade causada no microrganismo. Assim, a absorção de metais pelas células microbianas em dormência é sem duvida menor se comparada com as células metabolicamente ativas. Portanto, para organismos que não toleram altas concentrações de metais, o estado de dormência pode significar a sua sobrevivência nos habitats poluídos, evitando a toxicidade (Ohya et al., 1988).

Frostergard et al. (1993) utilizaram um novo método para demonstrar o efeito adverso de diferentes metais na biomassa microbiana, no qual a composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos (PLFA) foi analisada. Esse estudo revelou uma diminuição em PLFA característicos de populações Gram positivas, o que concorda com outros trabalhos que indicaram uma predominância de bactérias Gram negativas em solos contaminados por metais (Duxbury, 1983). Já a comunidade fúngica do solo, tanto em relação à biomassa quanto à composição de espécies, foi fortemente afetada ao longo de um gradiente de Cu e Zn no solo (Nordgreen et al., 1983). Cotrufo et al. (1995) observaram que a quantidade de micélio fúngico foi significativamente menor em solo contaminado do que no solo controle, sem contaminação por metais.

A determinação da atividade de várias enzimas no solo é uma maneira de se medir a atividade microbiana, dando uma indicação da mudança ocorrida na biota do solo, sem entretanto relacioná-la a algum grupo específico de organismo. Reber (1992) estimou o impacto do estresse por MP sobre a diversidade e a capacidade de degradação de compostos orgânicos pela comunidade bacteriana

do solo. Os estudos foram baseados na habilidade de certas bactérias do solo em utilizarem substâncias aromáticas como fonte de C, limitando o teste somente a esses organismos. Os dados obtidos revelaram que, após a contaminação dos solos com MPs, algumas das capacidades bioquímicas da biota bacteriana se perderam.

Kandeler et al. (1996) avaliaram diferentes propriedades da microbiota do solo, como a biomassa, a respiração, a mineralização de N e 13 enzimas envolvidas nos ciclos do C, N, P e S, em solos que receberam altas doses de metais. Os resultados revelaram que solos contaminados com 300, 100, 50, 50 e 3 mg kg^{-1} de Zn, Cu, Ni, V e Cd respectivamente, reduziram significativamente a biomassa microbiana e as atividades enzimáticas envolvidas na reciclagem do N, P e S (mineralização de N, nitrificação atual e potencial, protease, deaminase da arginina, urease, redutase do nitrato, fosfatase alcalina e arilssulfatase). Em contraste, a respiração e a atividade das enzimas relacionadas ao ciclo do C (celulase, xilanase e β-glucosidase) não foram tão afetadas, o que poderia significar que a contaminação por metais produziu uma mudança na comunidade microbiana do solo, favorecendo as populações fúngicas sobre as bacterianas. A alta atividade dessas enzimas estaria relacionada a um maior requerimento de C para funções de reparo e manutenção metabólica (Flieβbach et al. 1994, Bardgett e Saggat, 1994).

2.3. Micorrizas

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) constituem uma ponte para o transporte de nutrientes do solo às raízes das plantas e são considerados como o grupo de microrganismos que tem importância direta na absorção de nutrientes pelas plantas superiores (Kling e Jakobsen, 1998). Na avaliação da qualidade do solo, deve-se, sempre que possível, incluir tanto medidas qualitativas como quantitativas desse importante recurso biológico.

A micorriza arbuscular é a mais abundante: Nicolson (1967) descreveu-a como "uma simbiose universal das plantas". Os FMAs colonizam a maioria das plantas, desde Briófitas e Pteridófitas até Gimnospermas e Angiospermas, de praticamente todas as famílias, com exceção de algumas monocotiledôneas como Commelinaceae, Cyparaceae e Juncaceae e dicotiledôneas como Brassicaceae, Fumariaceae e Urticaceae (Silveira, 1992). Os FMAs pertencem à ordem Glomales dos Zigomicetos, distribuídos em seis gêneros *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Sclerocystis*, *Scutellospora* e *Entrophospora*.

A associação micorrízica proporciona benefícios à planta hospedeira (Fitter, 1991), sendo maior a contribuição na absorção e na translocação de nutrientes, especialmente o P. Esta maior absorção de nutrientes é atribuída ao micélio extramatricial que proporciona exploração de maior volume de solo (Rhodes e Gendemann, 1975). Esse aumento na superfície de absorção, chegando a explorar microambientes normalmente não atingidos pela raiz, é de importância no caso de nutrientes de baixa mobilidade no solo, como P, Zn e Cu (Mosse, 1973). Nutrientes como o P, N, Zn, Cu e S podem ser absorvidos e translocados ao

hospedeiro pelo fungo micorrízico (Faber, 1990; Barea, 1987 Rhodes e Gendemann, 1980). Além disso, as plantas micorrizadas são, em princípio, mais resistentes à seca e à alta salinidade (Alkari et al., 1998). Outros benefícios associados à colonização micorrízica referem-se à proteção da planta a patógenos fúngicos que causam doenças no sistema radicular, conferida pela competição com o patógeno pelos nutrientes disponíveis no solo ou pelo maior desenvolvimento de uma microbiota antagônica na "micorrizosfera". Assim, a presença de FMA pode reduzir os efeitos negativos causados pela perda de nutrientes ou matéria orgânica, pela estrutura adversa do solo, valores extremos de pH ou pela presença de patógenos (Sylvia e Williams, 1992).

Um fato importante é o possível papel protetor contra o estresse induzido por altas concentrações de MPs (Galli et al., 1994), observando-se resultados controvertidos no que se refere ao efeito do fungo micorrízico na proteção da planta a altas concentrações de MPs. Esses estudos mostram que as micorrizas podem tanto aumentar como diminuir a absorção de MPs pelas plantas. Isso depende da concentração de metal presente no solo, das propriedades físico-químicas do solo e da espécie de planta e de fungo micorrízico. Nesse contexto, Heggo et al., (1990) observaram que em solos com baixas concentrações de Zn, Cd e Mn a soja micorrizada apresentou maior concentração desses elementos nas folhas do que a soja não micorrizada, e que na presença de altas concentrações de MPs a sua concentração no tecido foliar foi diminuída. Trinidade et al. (1996) constataram uma diminuição dos teores de Cd e de Mn em milho colonizado por FMA, em solo com aplicação de composto de lixo urbano com altos níveis de

metais. Bethenfalvay et al. (1989) observaram que plantas de soja, noduladas com *Bradyrhizobium japonicum* e colonizadas por *Glomus mosseae*, quando cultivadas em solo com alto teor de Mn apresentavam teores menores desse elemento do que plantas não micorrizadas. Entretanto, plantas micorrizadas e não micorrizadas mostraram correlação negativa entre a massa da matéria seca da parte aérea e a concentração de Mn na folha. Pouco depois, Kothari et al., (1991) sugeriram que o FMA proporciona certa tolerância da planta à toxicidade do Mn, pois raízes das plantas não colonizadas produziram maior quantidade de exsudatos que podem reduzir o MnO_2 a Mn^{2+}, forma disponível para a planta, e dessa forma aumentar a absorção do metal. Já raízes de plantas colonizadas produziriam menor quantidade de exsudatos, evitando a redução de óxidos de Mn e com isto diminuindo a absorção pela planta.

Dueck et al. (1986), estudando o efeito dos FMAs sobre o crescimento de duas espécies de gramíneas, *Festuca rubra* e *Camalogrostis epijeos*, em solo com altos níveis de Zn, mostraram que a colonização radicular reduziu os efeitos tóxicos do Zn no desenvolvimento de ambas as espécies. Outros estudos com micorrizas ericóides constataram um claro benefício à planta hospedeira devido ao estabelecimento do fungo micorrízico, em solos com altos níveis de MP e elevada acidez, relacionando esse benefício à alta afinidade do fungo por cátions metálicos (Denny, 1995 e Bradley et al., 1981).

Nem sempre há uma redução na absorção de MP por plantas micorrizadas. Killham e Firestone (1983) observaram que a colonização micorrízica levou a um

aumento da toxicidade por metais na gramínea *Ehrarta calycina* colonizada por *Glomus fasciculatum*, quando cultivada em solo com pH 3, apresentando maior absorção de Cu, Ni, Pb e Zn, presentes no solo em altas concentrações. Isso causou uma diminuição no crescimento em relação às plantas não colonizadas. A absorção de Cu, Zn e Cd, mas não de Ni, também foi incrementada em *Phaseolus vulgaris* e *Zea mays* micorrizados e cultivados em solos com altas concentrações desses metais (Guo et al., 1996). Chao e Wang (1990) verificaram que o crescimento de milho micorrizado foi inibido quando cultivado em solo com altas concentrações de Cd, indicando a baixa eficiência da colonização na promoção do crescimento da planta.

A eficiência na proteção contra MPs difere entre isolados de fungos micorrízicos, sendo que ecotipos tolerantes podem ser de grande importância na revegetação de áreas com solos contaminados com metais, já que podem alterar significativamente a capacidade competitiva da planta, por meio de seus efeitos no fornecimento extra de P (Diaz et al., 1996). Gildon e Tinker (1981, 1983a) encontraram endófitos tolerantes ao Cd em solos contaminados com este metal, que se mostraram eficientes na absorção de P. Esses resultados são confirmados por Leyval et al. (1991) e Weissenhorn et al. (1995), que demostraram que solos poluídos por aplicações de lodo de esgoto com forte carga de metais e pela deposição atmosférica de metais de origem industrial, respectivamente, continham ecotipos de FMAs mais tolerantes ao Cd do que isolados oriundos de solos não contaminados. Já Enkhtuya et al. (2000) observaram uma alta infetividade de FMAs nativos de solo degradado, com altos níveis de MPs e alta acidificação, mas

com pouco efeito sobre o crescimento da planta, quando comparados com FMAs não nativos. Shetty et al. (1995) mostraram que FMAs de solo contaminado com Zn foram mais eficientes, no que se refere à resposta positiva no crescimento da planta, quando esta foi cultivada em solos com altos teores de Zn, enquanto que em solos não poluídos foram os FMAs não nativos os que mostraram maior eficiência. Griffioen et al. (1994) examinaram plantas de *Agrostis capillaris* de áreas não contaminadas e de áreas contaminadas com Cu, Zn e Cd, encontrando isolados tolerantes nas áreas poluídas com Zn e Cd, sem, no entanto, encontrar isolados tolerantes no solo poluído com Cu, o que indica um maior poder de seleção do Cu em relação ao Cd e Zn.

Em recente publicação, Leyval et al. (1997) salientam que para a obtenção de informações concludentes sobre o efeito da micorriza na absorção de MPs se faz necessário considerar e estimar a absorção do metal por unidade de biomassa ou comprimento radicular, a intensidade de colonização radicular e sua atividade, a interação entre metais e outros cátions, o nível de disponibilidade dos metais, assim como a diferença no tamanho de plantas micorrizadas e não micorrizadas. Haselwandter (1994) e Diaz e Honrubia (1995) propõem que a maior tolerância das plantas micorrizadas a altas doses de MPs no solo deve-se à melhor nutrição de P e maior produção de biomassa. A menor concentração de metais em plantas micorrizadas pode ser conseqüência do efeito de diluição causado pelo maior crescimento (Plenchette et al., 1983). Não obstante as diferenças na eficiência de FMAs na absorção de metais, é evidente que a associação entre planta e fungo é

crucial para o benefício micorrízico em solos poluídos com metais (Medeiros et al., 1994).

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a proteção que o fungo micorrízico oferece à planta hospedeira em uma situação de estresse por MPs. Joner e Leyval (1997) pesquisaram a contribuição do FMA *Glomus mosseae* à absorção do isótopo ^{109}Cd em *Trifolium subterraneum* e sugeriram que hifas extrarradiculares do fungo podem transferir o Cd presente no solo às plantas, mas que essa transferência estaria restrita à imobilização fúngica do metal. Mais recentemente, Turneau (1998) observou um elevado conteúdo de Zn no micélio intrarradicular de *Euphorbia cyparissias* obtido de solo poluído com Cd, na Polônia. Também observou Pb nas paredes celulares epidérmicas, nos pelos radiculares e no micélio micorrízico.

Componentes da parede celular do fungo, como celulose e quitina ou pigmentos como a melanina localizados na parede ou na parte exterior da parede, atuam como biossorventes de MPs, aumentando a sobrevivência em ambientes sob estresse de metais (Gadd, 1993). Bradley et al. (1981) constataram que a parede celular de *Pezizella*, fungo da clase Ascomycotina que forma micorrizas em plantas ericáceas, tem uma forte afinidade por cátions metálicos, o que, junto com a maior densidade de material fúngico na raiz, característico deste tipo de micorriza, pode explicar o relativo sucesso das plantas ericáceas em terras ácidas de clima temperado poluídas com MPs. Colpaert e Van Asche (1993) já sugeriram que o total da biomassa fúngica produzida por FM, incluindo esporos, micélio

extramatricial e inclusive biomassa morta, podem complexar metais e reduzir a disponibilidade e toxicidade à planta hospedeira.

Outra hipótese que explica a menor absorção de MPs por plantas micorrrizadas é que no interior celular do FM pode ocorrer uma compartimentação do metal, ou seja, os grânulos de polifosfato atuariam como forma de armazenamento de cátions divalentes (Galli et al., 1994). Assim, Turnau et al. (1993) localizaram Cd associado a grânulos de polifosfato nas raízes micorrizadas de *Pteridium aquilinum* obtidas em solo tratado com pó de Cd. Esse seqüestro do elemento tóxico poderia atuar como mecanismo de filtro, já que a concentração de Cd nas células do endófito era maior que nas células do hospedeiro. Mecanismos envolvendo interação de metais com compostos fosfatados têm sido descritos também em plantas não micorrizadas (Heuwinkel et al., 1992).

Complexação de MPs no interior celular por compostos ricos em grupos sulfidrilos foi observado por Morselt et al. (1986), em fungos ectomicorrízicos (FEM). Esses autores utilizaram um método de coloração histoquímico específico para ligações dissulfídricas (SH=SH), evidenciando que a tolerância a MP em FEM (fungo ectomicorrízico) estaria baseada na presença de proteínas do tipo das metalotioneínas. Observaram que a adição de Cu aumentou a expressão dos genes que codificavam essas proteínas. Essas proteínas são pequenos polipeptídeos com alto conteúdo do aminoácido cisteína, ausência de aminoácidos aromáticos e histidina e com alta afinidade por metais, concentrando-os em forma de tiolatos (Gadd, 1993). Este tipo de proteína tem sido encontrado em diferentes espécies fúngicas, como em *Saccharomyces cerevisieae*, *Neurospora crassa* e

Agaricus bisporus, além de FEM (Galli et al., 1994), assim como em algas e plantas.

Em relação ao estabelecimento da associação micorrízica em solos poluídos com MPs, observa-se uma tendência geral de diminuição da colonização micorrízica. Gildon e Tinker (1983a) observaram que a colonização por FMA diminuiu com o aumento da concentração de metais no solo, ocorrendo também mudança na morfologia do micélio interno, que se mostrou menos denso, com hifas mais curtas e irregulares, sem ou com poucas vesículas e arbúsculos. O estabelecimento da associação foi totalmente anulado em solos com pesadas aplicações de metais como Cu, Zn, Ni e Cd (Gildon e Tinker, 1983 a). Del Val et al. (1999) observaram que FMAs foram afetados pelas altas concentrações de metais, os quais interferiram principalmente com o crescimento do micélio externo além de reduzir a produção de arbúsculos. Recentemente, Enkhtuya et al. (2000) observaram que o crescimento do micélio extrarradicular e a atividade NADH-diaforase do mesmo mostraram-se indicadores altamente sensíveis do estresse causado por altas doses de metais e acidificação do solo. Outros estudos utilizando solos artificialmente poluídos com metais, seja com sais ou lodo, mostram redução ou completa inibição da colonização por FMAs na presença de altas doses de metais (Graham et al., 1986; McGee 1987 e Vidal et al., 1996). Mesmo assim, têm sido constatadas altas porcentagens de colonização micorrízica em plantas de solos naturalmente poluídos com metais pesados (Gildon e Tinker, 1981; Griffioen et al., 1994). Duek et al. (1986) confirmaram a presença de *Festuca rubra* e *Calamograstis epijeos* micorrizadas em dunas

litorâneas contaminadas pela deposição atmosférica de metais. Weissenhorn et al. (1995) observaram que não houve correlação entre disponibilidade de metais e abundância de FMA e que tanto a colonização como o número de esporos de FMA eram relativamente altos em solo com deposição atmosférica de Cd e Pb de uma fundição de Pb-Zn.

O fato de ocorrer colonização micorrízica nas plantas, na maior parte das observações "in situ", sugere uma tolerância do FMA à contaminação por MPs. Assim, diferentes autores já mostraram a maior tolerância de isolados de FMA originados de locais contaminados. Del Val et al. (1999) observaram que *Glomus claroideum*, isolado de parcelas de solo tratadas com lodo com altos níveis de MPs, possui adaptação potencial ao aumento da concentração de metais no solo. Quanto à germinação de esporos de FMA em solo com altas concentrações de Cd, Weisenhorn et al. (1994, 1993) observaram que o isolado de local contaminado foi mais tolerante às altas doses de Cd do que o isolado de local não contaminado. Nesses experimentos o Cd diminuiu mais a germinação de esporos do que o crescimento das hifas, uma vez germinado o esporo. A esporulação do FMA e a germinação de esporos foram mais afetadas pelo Cd do que o crescimento das hifas, sugerindo que se deve diferenciar as concentrações que inibem a germinação do esporo daquelas que inibem o crescimento do fungo (Babich e Stotzky, 1977 ; Ross 1982)

Atualmente a remediação de solos contaminados por MPs utilizando métodos de fitorremediação está assumindo grande importância (Salt et al., 1995).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Entre esses métodos encontra-se a fitoestabilização, que tem como princípio promover o crescimento da planta para reduzir a biodisponibilidade de metais (Leyval et al., 1997). Pode-se considerar, então, a fitoestabilização como solução temporária para o problema de contaminação de solos por MPs, devido ao risco de ocorrer com o tempo uma imobilização de metais na rizosfera e de transferência dos metais das plantas aos animais. Por essas razões as plantas utilizadas nesse tipo de métodos devem imobilizar os metais nas raízes e ter baixo acúmulo na parte aérea. Por isso, plantas micorrizadas são de grande interesse na remediação de áreas degradadas com altos níveis de MP, já que a micorriza seqüestra o metal e diminui a sua translocação à parte aérea (Leyval et al., 1997). Portanto, mais trabalhos sobre interação dos metais com microorganismos do solo são necessários para que haja uma melhor e global compreensão do problema. A importância dos fungos micorrízicos no crescimento vegetal pode ser de relevância na revegetação de áreas poluídas e degradadas, fazendo com que a recuperação do ecossistema se restabeleça com maior rapidez, dando espaço a outras espécies vegetais e animais. O possível acúmulo de metais por plantas micorrizadas torna interessante o estudo com diferentes plantas e FMAs em diferentes condições climáticas e tipos de solo, já que os efeitos físico-químicos sobre o sistema são complexos.

2.4. Fixação de nitrogênio

Dos processos biológicos de maior relevância no meio edáfico destaca-se a fixação biológica de N_2 (FBN) por bactérias que formam associações simbióticas com leguminosas e com outras famílias de plantas, sendo esta de grande importância na agricultura mundial. A FBN por leguminosas estabelece-se entre espécies da família Leguminosae e microrganismos do solo dos gêneros *Rhizobium* e *Brahyrhizobium*, entre outros.

A FBN pode ser negativamente afetada por níveis excessivos de diversos MPs, sendo que a intensidade do efeito do metal pesado depende das características físico-químicas do solo, da estirpe ou isolado de rizóbio e do tempo de exposição ao solo contaminado (Giller et al., 1989). Esses autores mostraram que rizóbios eficientes inoculados em solos contaminados com MP não sobreviveram 8 semanas após a inoculação, quando o inóculo inicialmente colocado tinha no máximo 10^7 células. Maior concentração de células no inóculo permitiram uma nodulação eficiente do trevo, presumivelmente porque um número suficiente de células sobreviveram. Sugere-se que uma vez formados os nódulos, os tecidos do hospedeiro protegem os bacteróides da toxicidade metálica (Giller et al., 1989; MacGrath et al., 1988 e Rother et al., 1983). Angle et al. (1993) observaram que *Bradyrhizobium japonicum* foi mais tolerante a altas concentrações de Cd, Cu, Ni e Zn no meio de cultura do que espécies de *Rhizobium*, o que levou a uma maior eficiência da simbiose *B. japonicum*-soja, em solo contaminado com esses metais. Nesse contexto, Nannipiere et al. (1990)

ressaltam que o crescimento de microorganismos "in vitro" ou no solo difere mesmo adicionando concentrações iguais de metais em ambos os meios de crescimento.

Ibekwe et al. (1996) estudaram o efeito de altas concentrações de Zn e Cd na alfafa e seus microssimbiontes, concluindo que todos os nódulos formados foram eficientes na FBN, sendo que o Cd foi mais tóxico do que o Zn para o rizóbio e ambos tiveram maior toxicidade para a planta do que para o microssimbionte. Ibekwe et al. (1995) mostraram a importância do pH no efeito dos MPs sobre o rizóbio, observando que, quando o pH se mantinha igual ou maior que 6, a nodulação, a FBN e o crescimento da planta não eram prejudicados, enquanto que em pHs menores havia redução na nodulação, a simbiose era ineficiente e a planta mostrava sintomas de toxicidade.

No que se refere a cepas tolerantes de *Rhizobium*, Chaudry et al. (1992) obtiveram isolados de solos contaminados, que apresentaram maior tolerância ao Zn, Cd, Cu e Ni quando comparados com as estirpes de referência do laboratório, sugerindo que os isolados que sobrevivem em solos poluídos com MP possuem algum mecanismo não especifico de tolerância, como, por exemplo, uma maior excreção de polissacarideos extracelulares, e não um mecanismo específico, como uma bomba de efluxo de cátions metálicos.

Já desde o século passado conhece-se a associação simbiótica tripartite formada por leguminosas-rizóbio-fungo micorrízico e já está bem estabelecido o papel das micorrizas no crescimento, nodulação e fixação de N_2 por leguminosas.

Nutrientes minerais como o P, Zn, Cu e Mo, que podem limitar o crescimento do rizóbio, podem ser fornecidos pelo parceiro micorrízico (Barea e Azcón-Aguilar, 1983). Esses mesmos autores mostraram em *Hedysarum coronarium* que os FMAs aumentaram a fixação biológica de N_2 na mesma proporção que a aplicação de fertilizante fosfatado em 100 kg ha^{-1}, sendo que tanto as plantas micorrizadas como as fertilizadas apresentaram concentrações similares de P na parte aérea. Estudando essa interação FMA-rizóbio-leguminosa, El-Kherawy et al. (1989), em solo com altos níveis de MPs (Zn e Cd), concluíram que a absorção de MPs foi função, em parte, do seu conteúdo disponível no solo, que por sua vez é dependente do pH, e que a inoculação com FMA melhorou o estado nutricional da planta permitindo uma maior fixação de N_2, o que se refletiu no conteúdo de N foliar, que foi maior que em plantas não colonizadas pelo FMA.

Altas concentrações de Cd, Cu, e Cr têm sido relacionadas à perda espontânea de plasmídeos simbióticos (pSym) em *Rhizobium leguminosarum*, o que pode resultar na perda da capacidade de nodular, já que genes necessários à nodulação estão presentes nesse tipo de plasmídeo (Casella et al., 1988). Esses autores propõem que rizóbios sem esse tipo de plasmídeos, perdendo a capacidade simbiótica ganham resistência aos MPs, sugerindo a possibilidade de uma escolha ecológica entre um estado livre não reversível e resistente a metais e um estado simbiótico que proporciona uma resistência dependente da planta.

3. Material e Métodos

Foram realizados, em condições de casa de vegetação, dois experimentos:

Experimento I:

Teve como objetivo a observação do efeito do pH e da inoculação do FMA no crescimento e na absorção de Pb pela soja, com adição de doses crescentes de Pb ao solo.

Experimento II:

Teve como objetivos avaliar o efeito da adição de Pb ao solo e da inoculação de FMA 1- no crescimento, nodulação e micorrização da soja, nutrição mineral e absorção de Pb em dois estádios do ciclo da planta, florescimento e maturação do grão, e 2 - na biomassa, atividade microbiana e atividade enzimática do solo.

3.1. Delineamento experimental

Experimento I:

Delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2 x 5, consistindo da inoculação ou não de *Glomus macrocarpum*, 2 porcentagens de saturação por bases (V_1=55% e V_2=90%) e 5 doses de Pb (0; 7,5; 37,5; 150 e 300 mg dm^{-3}). Consideraram-se oito repetições, totalizando 160 vasos.

Experimento II:

Delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 4, sendo 2 estádios do ciclo da planta (florescimento e enchimento da vagem), inoculação ou não de *G. macrocarpum* e 4 doses de Pb (0, 150, 300 e 600 mg dm^{-3}), com quatro repetições, totalizando 64 vasos.

3.2. Amostragem e tratamento do solo

O solo utilizado em ambos os experimentos foi coletado na camada superficial (0 – 20 cm), sendo classificado como um latossolo vermelho-amarelo (Embrapa, 1999), com textura média, procedente do Núcleo Experimental de Campinas do Instituto Agronômico (IAC).

Após análise do solo quanto à fertilidade, o pH do solo foi corrigido com uma mistura de hidróxido de cálcio e carbonato de magnésio (P.A), com o objetivo de atingir porcentagens de saturação por bases de 55 e 90% da CTC do solo, permanecendo incubado por 15 dias. Uma adubação básica com K, S, B, Cu, Mn e Zn foi também realizada para permitir um crescimento adequado da planta. Adicionaram-se as seguintes quantidades dos nutrientes: K 100; S 41; B 0,4; Cu 1; Mn 8 e Zn 3 $mg.dm^{-3}$. O solo adubado foi incubado por vinte dias. Como fonte dos nutrientes utilizaram-se K_2SO_4 como fonte de K e S, H_3BO_3 para o B, $MnCl_2.4H_2O$ para o Mn, $CuCl_2.2H_2O$ para o Cu e Zn $SO_4.7H_2O$ como fonte de Zn e S.

O solo foi desinfestado com brometo de metila na dose de 100 mL m^{-3}, por 3 dias consecutivos, com o objetivo de eliminar qualquer estrutura de fungo micorrízico nativo. A cada vaso (com capacidade de 2 L) foram adicionados 25 mg dm^{-3} de P, na forma de superfosfato simples. A concentração de Pb, adicionado na forma de solução aquosa de nitrato de chumbo, variou com o experimento. No experimento I foram adicionados 0; 7,5; 37,5; 150 e 300 mg dm^{-3} de Pb, enquanto que no experimento II, as doses foram 0, 150, 300 e 600 mg dm^{-3} de Pb. As doses de Pb adicionadas foram baseadas na norma P4.230 da CETESB (1999). Uma

amostra de cada vaso foi retirada, depois de 10 dias de incubação, para análise da fertilidade do solo e teor de Pb (Tabelas 1 e 2).

Foi realizada uma adubação nitrogenada em cobertura, na forma de nitrato de cálcio, com 3 aplicações de 25, 50 e 50 mg de N por vaso, no desbaste e após 15 e 30 dias. Levou-se em consideração o N já adicionado ao solo em cada dose de Pb, com o fim de equiparar a quantidade de N em cada tratamento.

Tabela 1. Características químicas do solo utilizado no experimento I, antes do plantio da soja.

Tratamento		V	pH	P	Ca	Mg	Pb	Cu	Fe	Mn	Zn
			$CaCl_2$	Resina			DTPA				
Pb	V										
mg dm^{-3}	%	%		$mmol_c$ dm^{-3}			mg dm^{-3}				
0	V_1	61	5.4	24	27,5	6,4	1	1,8	22,3	5,2	1,4
7,5	V_1	63	5.4	24	28,9	6,7	5	2,2	23,5	5,2	1,5
37,5	V_1	63	5.4	23	28,4	6,7	24	2,0	22,1	5,0	1,4
150	V_1	63	5.4	23	28,3	6,8	107	1,8	22,0	4,8	1,3
300	V_1	62	5.4	22	28,0	6,5	232	2,0	23,2	5,0	1,3
0	V_2	82	6.5	29	48,7	10,5	1	1,7	12,4	3,0	1,4
7,5	V_2	82	6.6	28	47,8	10,4	5	2,2	12,6	3,1	1,5
37,5	V_2	82	6.6	27	48,4	10,5	24	1,8	12,7	3,2	1,3
150	V_2	82	6.6	28	47,4	10,2	107	1,9	13,0	3,1	1,6
300	V_2	82	6.4	25	48,0	10,2	222	1,7	13,3	3,0	1,4

Tabela 2. Características químicas do solo utilizado no experimento II.

Tratamento	pH	V	CTC	P	Ca	Mg	K	Pb	Fe	Zn	Cu
Pb	$CaCl_2$			resina				DTPA			
mg dm^{-3}		%	$mmol_c$ dm^{-3}					mg dm^{-3}			
0	5,7	73	67,2	24	37	9	3,2	1	21	2	1,6
150	5,5	68	63,1	14	32	8	3,1	102	24	1,7	1,7
300	5,5	67	61,9	11	31	8	2,9	215	25	1,5	1,8
600	5,3	67	62,3	17	31	8	3,3	495	26	1,5	1,7

3.3. Preparação do inóculo do fungo micorrízico

O inóculo do fungo micorrízico empregado foi obtido pela multiplicação de esporos do FMA *Glomus. macrocarpum* em vaso de cultivo com *Brachiaria* sp., por um período de 6 meses. Os clamidosporos de *G. macrocarpum* utilizados procederam da coleção de FMA do setor de Microbiologia do Solo do Centro de Solos e Recursos Agroambientais (IAC). O inóculo constou do substrato (areia:solo, na relação 9:1) com esporos, pedaços de raiz colonizada e micélio. A quantidade de esporos no inóculo foi de 115 esporos por cm^3 de solo.

Com a intenção de equilibrar a microbiota entre os tratamentos, o inóculo foi lavado, peneirado (0,045mm) e filtrado em papel filtro Whatman 42 e 20 mL da suspensão assim obtida foram dispersos nos vasos dos tratamentos sem FMA.

3.4. Preparação do inóculo de rizóbio

O inóculo de rizóbio utilizado no Experimento II foi constituído das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e 5080 procedentes da coleção do setor de Microbiologia do Solo do Centro de Solos e Recursos Agroambientais (IAC). As estirpes foram cultivadas em meio líquido YMB ("Yeast Manitol Broth"), a temperatura ambiente por 6 dias.

As sementes, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio 25%, foram imersas no meio de cultura com o rizóbio (mistura de ambas as estirpes), 10 minutos antes da semeadura. Após a semeadura, foram adicionados 10 mL do meio de cultura com rizóbio em cada vaso.

3.5. Plantio e condições de crescimento da planta

- **Experimento I:**

Foram postas 5 sementes de soja, *Glycine max* (L.) Merril variedade IAC-14, por vaso, fornecidas pelo Centro de Leguminosas do IAC. Procedeu-se ao desbaste, 10 dias após a germinação, deixando-se apenas uma planta por vaso. Os vasos foram irrigados com água filtrada e a umidade mantida em torno de 60% da capacidade de retenção de água do solo. As plantas foram cultivadas por um período de 60 dias.

- **Experimento II:**

Foram postas por vaso 6 sementes da mesma variedade e procedência utilizada no experimento I, para posterior desbaste deixando duas plantas por vaso. As condições de irrigação foram as mesmas do experimento I. Metade das plantas foram cultivadas até o florescimento por 60 dias, sendo a outra metade mantida até o enchimento das vagens (maturação do grão), o que correspondeu a 100 dias de cultivo após a semeadura.

3.6. Variáveis analisadas:

No experimento I foram analisadas as seguintes variáveis: massa da matéria seca da parte aérea da soja, o teor de Pb, P, Ca, Mg, Mn, Fe, e Zn na parte aérea da soja e colonização micorrízica da raiz.

No experimento II foram determinadas: massa da matéria seca da parte aérea da soja, o teor de Pb, Ca, Mg, K, N, P, S, Mn, Cu, Fe, e Zn na parte aérea da soja e colonização micorrízica da raiz, esporulação do FMA, C-biomassa

microbiana do solo, respiração do solo e atividade da desidrogenase, da fosfatase alcalina e da arilssulfatase no solo.

3.6.1. Massa da matéria seca da parte aérea

Experimento I: Após 60 dias de cultivo da soja, parte aérea e raiz foram separadas, sendo a raiz lavada e conservada em etanol 50%. A parte aérea da soja foi cortada a 1 cm da superfície e seca em estufa com circulação forçada de ar a 60°C, por um período de 48 horas, para posterior pesagem.

Experimento II: Decorridos 60 dias da semeadura, a parte aérea da soja, previamente separada da raiz, foi seca em estufa e pesada. As plantas que foram coletadas ao final de um período de cultivo de 100 dias receberam o mesmo tratamento que as anteriores após a separação das vagens. Essas foram contadas, secas e pesadas.

3.6.2. Número e massa da matéria seca dos nódulos

Os nódulos das raízes das plantas do experimento II foram destacados, contados e secos em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C por 48 horas, e pesados.

3.6.3. Pb, macro e micronutrientes na parte aérea da soja

Experimento I: Após a pesagem da parte aérea, esta foi moída e submetida a digestão nítrico perclórica. Nos extratos foram determinados os teores de P, Ca, Mg, Mn, Zn e Pb. Todos os elementos foram determinados por

espectrofotometria de emissão em plasma, induzido em argônio (ICP/AES), nos laboratórios do Centro de Solos e Recursos Agroambientais do IAC.

Experimento II: As determinações de Ca, Mg, K, P, Mn, S, Cu, Zn e Pb foram realizadas seguindo a metodologia utilizada no experimento I. O N total foi determinado, pelo método Kjeldahl, após digestão sulfúrica.

3.6.4. Determinação da colonização das raízes pelo FMA

A porcentagem do comprimento da raiz colonizada pelo fungo micorrízico foi estimada pelo método da placa quadriculada sob microscópio esteroscópico (Giovanetti e Mosse, 1980), após a despigmentação da raiz com KOH (25 g L^{-1}) e coloração com azul tripano (Phyllips e Hayman, 1970). O resultado foi expresso em porcentagem do comprimento de raiz colonizada pelo FMA.

3.6.5. Esporulação

O número de clamidosporos do FMA produzidos foi determinado no final do ciclo da planta pelo método de lavagens sucessivas e peneiramento úmido (Gerderman e Nicolson, 1963) e centrifugação em solução de sacarose 70%. A contagem foi expressa em número de esporos por 50 g de solo.

3.6.6. C-Biomassa microbiana

O carbono da biomassa microbiana foi determinado pelo método da fumigação-extração (Vance et al., 1987). As amostras de solo fumigadas com clorofórmio livre de etanol foram incubadas por um período de 5 dias a uma

temperatura de 27 ± 2°C. A extração do C orgânico do solo com K_2SO_4 0,5 M (proporção solo:solução 1:4) foi realizada por agitação por 30 minutos em agitador horizontal, com posterior filtração em papel filtro Whatman No. 42. Após a extração os filtrados foram congelados a –15°C para posterior determinação do carbono. O C orgânico foi quantificado pela oxidação ácida com dicromato de potássio (Joergensen, 1995). Para cálculo do C da biomassa microbiana foi usado um fator de correção, K_c, de 0,38. Assim, C-Biomassa = C amostra fumigada – C amostra não fumigada x 0,38, expresso em μg C g^{-1} de solo seco.

3.6.7. Respiração do solo

O dióxido de carbono liberado de amostras de 50 g de solo reagiu com NaOH 0,1 N e foi determinado por titulação com HCl 0,1 mol L^{-1}, após 5 – 6 dias de incubação a temperatura de 27 ± 2°C, conforme Alef (1995). O CO_2 liberado foi expresso em μg CO_2 g^{-1} de solo dia^{-1}. O quociente metabólico, q-CO_2, que representa a quantidade de C – CO_2 liberada por unidade de C – biomassa microbiana, foi calculado segundo Anderson (1994), baseado na relação μg h^{-1} de C-CO^2 / μg g^{-1} de C-biomassa no solo seco.

3.6.8. Atividade da desidrogenase no solo

A atividade da desidrogenase no solo foi determinada segundo Casida et al. (1964), com algumas modificações. Foram pesados 5 g de solo, previamente peneirado em peneira de malha de 2 mm, em tubo de ensaio rosqueável de 20 mL. Adicionaram-se 5 mL de solução 20 g L^{-1} de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

(TTC) em água. Foi preparado um controle contendo solo e água destilada com o objetivo de excluir possíveis interferências de compostos extraíveis do solo, e um branco contendo metanol. A mistura reatora foi agitada com agitador Vortex e incubada em banho-maria a 37°C no escuro, por um período de 24 horas. A absorbância foi determinada por espectrofotometria a 485 nm de comprimento de onda. Transcorrido esse tempo o TTF, formado pela redução do TTC, foi extraído com 20 mL de metanol. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para uma cubeta e realizada a leitura em espectofotômetro (Micronal B342II) a 485 nm de comprimento de onda. Realizou-se uma curva padrão usando-se as seguintes concentrações de trifenil formazan (TTF): 0, 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 mg L^{-1}. Os resultados foram expressos em μg trifenil formazan g^{-1} de solo 24 $horas^{-1}$.

3.6.9. Atividade da arilssulfatase no solo

A determinação da atividade da arilssulfatase foi feita conforme Tabatabai e Bremner (1970). Pesou-se em erlenmeyer de 50 mL 1 g de solo previamente peneirado em peneira de 2 mm, ao qual foram adicionados 250 μL de tolueno, 4 mL de tampão acetato 0,5 mol L^{-1} pH 5,8 e 1 mL do substrato da reação enzimática, o sal p-nitrofenil sulfato de K a 0,025 mol L^{-1}. Após incubação a 37°C por 1 hora, adicionaram-se 1 mL de $CaCl_2$ a 0,5 mol L^{-1} e 4 mL de NaOH 0,5 mol L^{-1}. Depois de filtrada a solução em papel Whatman nº 2v, foi lida em espectrofotômetro (Micronal B342II) com comprimento de onda de 410 nm. Realizou-se uma curva de calibração contendo 0, 10, 20, 30, 40 e 50 μg de p-nitrofenol. Utilizou-se um controle seguindo o mesmo procedimento que para as

amostras de solo mas adicionando-se o p-nitrofenol sulfato de K após a adição de $CaCl_2$ e de NaOH, e imediatamente antes de filtrar a suspensão. Os resultados foram expressos em μg de p-nitrofenol g^{-1} de solo $hora^{-1}$.

3.6.10. Atividade da fosfatase alcalina no solo

Esse ensaio enzimático foi realizado segundo Eivazi e Tabatabai (1977). Pesou-se 1 g de solo peneirado em peneira de 2mm, e colocou-se em erlenmeyer de 50 mL, adicionando-se 200 μL de tolueno, 4 mL de tampão universal modificado pH 11 (contendo 12,1 g de tris, hidroximetil aminometano (THAM) (11,6 g de ácido maléico, 14 g de ácido cítrico, 6,3 g de ácido bórico em 488 mL de NaOH 1 mol L^{-1} e diluído posteriormente a 1 L com água deionizada, com o pH ajustado com NaOH 0,1 mol L^{-1}), e 1 mL de solução 0,025 M de p-nitrofenil fosfato como substrato da enzima. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora no escuro. Transcorrido esse tempo, adicionou-se 1 mL de $CaCl_2$ 0,5 mol L^{-1} e 4 mL de NaOH 0,5 mol L^{-1}. Utilizou-se um controle segundo o mesmo procedimento que para as amostras de solo mas adicionando o p-nitrofenol fosfato após a adição de $CaCl_2$ e de NaOH e imediatamente antes de filtrar a suspensão. A formação de p-nitrofenol foi determinada por espectrofotometria na região do espectro de 410 nm, sendo o resultado expresso em μg de p-nitrofenol g^{-1} de solo $hora^{-1}$. Realizou-se uma curva de calibração contendo 0, 10, 20, 30, 40 e 50 μg de p-nitrofenol.

3.7. **Análise estatística**:

Todos os dados foram submetidos à analise de variância, teste de Tukey de comparação de médias e análise da regressão, utilizando-se o programa estatístico SANEST (Zonta et al., 1984). Os dados referentes à colonização micorrízica foram transformados para arc sen $(x/100)^{1/2}$. Os dados correspondentes a contagens (número de vagens, de esporos e de nódulos) foram transformados para log (x +1). Os resultados do teste de médias através do Tukey a 5% constam nos Apêndices.

4. Resultados

4.1. Experimento I

Após a aplicação de calcário para a elevação da saturação por bases do solo a 55% (V_1) e 90% (V_2), o solo apresentou valores de V% de 63 e 82% respectivamente (Tabela 1), sendo a discussão referente a esses valores.

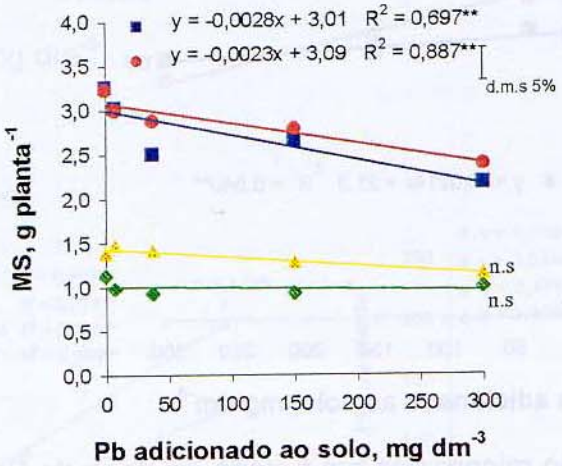


Figura 1. Massa da matéria seca da parte aérea da soja em função da dose de Pb (● com FMA e V_1=55%; ▲ sem FMA e V_1=55%; ■ com FMA e V_2=90%; ◆ sem FMA e V_2=90%). Valor do d.m.s. a 5% comparando os fatores FMA e V% dentro de cada dose (n.s: não significativo; ** p<0,01).

O efeito do aumento na concentração de Pb do solo sobre a massa da matéria seca da parte aérea (MS) da soja foi altamente significativo para a soja micorrizada (M) (Figura 1). Na soja M a produção de MS diminuiu linearmente com o aumento da dose de Pb, ocorrendo redução de 27% no solo com V_2, e 22% no

com V_1, comparando a dose 0 e a dose de 300 mg dm^{-3} de Pb.

A produção de MS da soja foi afetada significativamente pela inoculação do FMA, causando um incremento de 2,3 vezes em relação às plantas não micorrizadas (NM) (Figura 1). Plantas cultivadas no solo com V_1 apresentaram, no geral, um aumento de 12% na produção de MS em relação àquelas crescidas no solo com V_2.

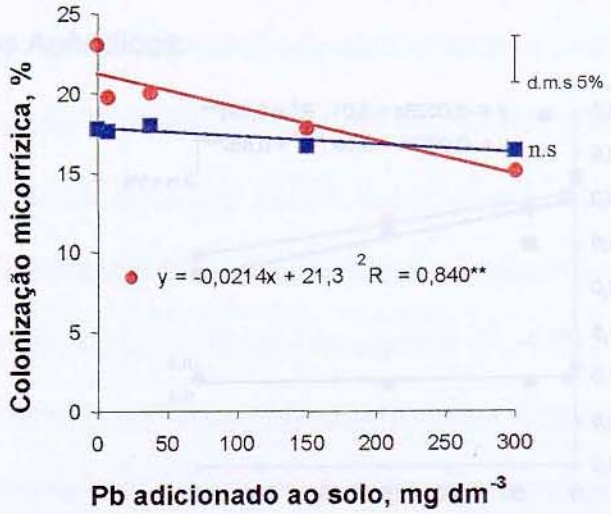


Figura 2. Colonização micorrízica em função da dose de Pb (● com FMA e V_1=55%; ■ com FMA e V_2=90%). Valor do d.m.s. a 5% comparando os fatores FMA e V% dentro de cada dose (n.s: não significativo; ** p<0,01).

A colonização da raiz pelo FMA, *Glomus macrocarpum*, foi influenciada significativamente pela saturação por bases do solo e pela dose de Pb adicionada ao solo (Figura 2). Assim, a colonização radicular diminuiu linearmente com a elevação do nível de Pb no solo com V_1 (63%), ocorrendo uma diminuição de 30% se for comparado a dose 0 e a maior dose de Pb aplicada. No solo com o V_2 (82%) a colonização radicular não se alterou com a dose de Pb. No geral, plantas

que cresceram no solo com V_1 apresentaram colonização 17% maior do que as plantas no solo com V_2.

Os fatores estudados influenciaram significativamente o teor de Pb da parte aérea da planta (Figura 3.a). Tanto o teor de Pb como o Pb acumulado na parte aérea da planta apresentaram ajustes lineares ascendentes em relação à dose de Pb adicionada ao solo (Figuras 3.a e 3.b), em ambas as saturações por bases estudadas. Entretanto, esse efeito foi acentuado no V_1 de 63%. Somente foi observada diferença significativa entre plantas M e NM, nas doses mais elevadas de Pb (150 e 300 mg dm^{-3}).

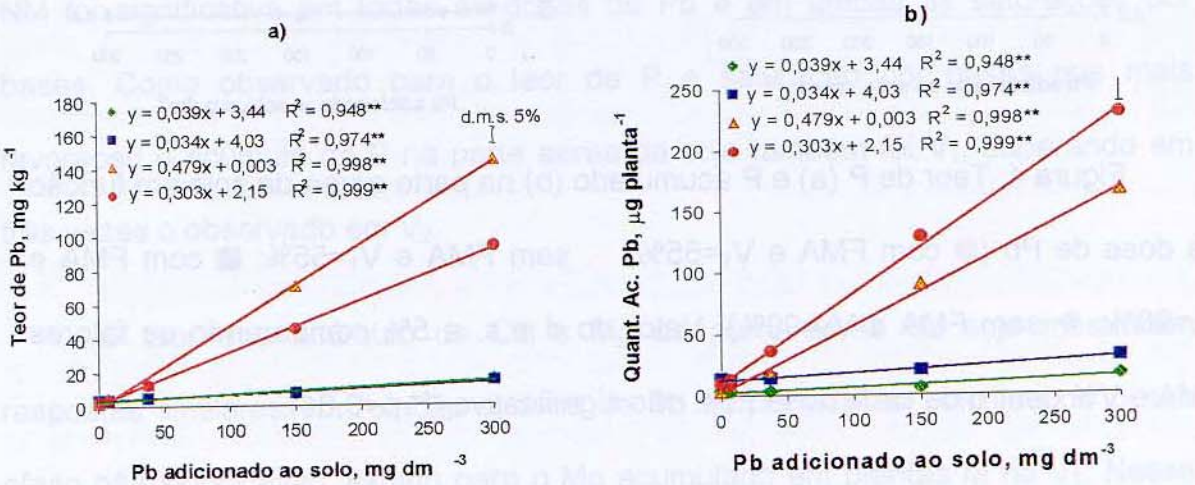


Figura 3. Teor de Pb (a) e Pb acumulado (b) na parte aérea da soja em função da dose de Pb (● com FMA e V_1=55%; ▲ sem FMA e V_1=55%; ■ com FMA e V_2=90%; ◆ sem FMA e V_2=90%). Valor do d.m.s. a 5% comparando os fatores FMA e V% dentro de cada dose (n.s: não significativo; ** p<0,01).

De forma geral, os teores de Pb na parte aérea de plantas M foram 30%

menores do que aqueles observados em plantas NM. Não houve diferenças significativas entre os teores de Pb observados em plantas M e NM no solo com V_2, enquanto no solo com V_1 tais diferenças foram altamente significativas. No solo com V_1 o teor de Pb na parte aérea da planta foi 5 vezes maior que no com V_2 (Figura 3.a).

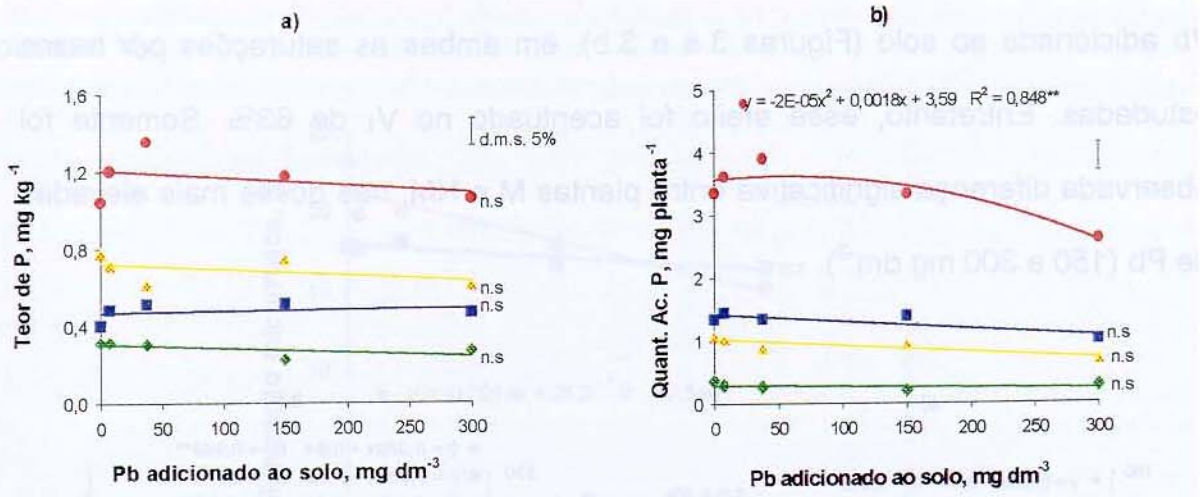


Figura 4. Teor de P (a) e P acumulado (b) na parte aérea da soja em função da dose de Pb (● com FMA e V_1=55%; ▲ sem FMA e V_1=55%; ■ com FMA e V_2=90%; ◆ sem FMA e V_2=90%). Valor do d.m.s. a 5% comparando os fatores FMA e V% dentro de cada dose (n.s: não significativo; ** $p<0,01$).

As doses de Pb adicionadas ao solo não afetaram significativamente o teor de P em nenhum dos tratamentos (Figura 4.a). De forma geral, as plantas M mostraram valores de P 41% maiores do que aqueles observados em plantas NM em ambas as saturações por bases. Dentro de cada V% as plantas M superaram significativamente as NM (Figura 4.a). Os resultados indicam que a saturação por bases do solo foi o fator que teve maior influência no teor de P da parte aérea da planta, sendo que plantas cultivadas no solo com V_1 apresentaram, tanto na

ausência como na presença do FMA, 2,4 vezes maior teor de P do que aquele observado em plantas cultivadas no solo com V_2. Somente para plantas M que cresceram no solo com V_1 houve efeito significativo do Pb adicionado sobre a quantidade acumulada de P na parte aérea, com efeito de tipo quadrático (Figura 4.b). Observou-se que a quantidade acumulada de P se manteve relativamente constante até a concentração de 150 mg dm^{-3} de Pb no solo, a partir daí houve tendência à diminuição, o que causou uma redução de 27% no P acumulado na parte aérea. O P acumulado na parte aérea da soja, mostrou-se significativamente maior para plantas M, sendo, 3,5 vezes maior no solo com V_1, e 4,4 vezes maior no solo com V_2 (Figura 4.b). Essa diferença entre o P acumulado em plantas M e NM foi significativa em todas as doses de Pb e em ambas as saturações por bases. Como observado para o teor de P a saturação por bases que mais favoreceu o acúmulo de P na parte aérea da soja também foi V_1, superando em três vezes o observado em V_2.

O teor e o acúmulo de Ca e Mg da parte aérea da soja mostraram respostas similares em relação a dose de Pb adicionada ao solo, sendo o seu efeito não significativo, exceto para o Mg acumulado em plantas M na V_1. Nesse caso, o ajuste foi linear descendente, mostrando que com o aumento na dose de Pb adicionada ao solo houve uma redução no Mg acumulado, que foi de 14% entre a dose 0 e a dose máxima (Figura 5). O Ca e Mg acumulados na parte aérea da soja foram 80 e 47% maiores, respectivamente, em plantas M. As plantas cultivadas no solo com o V_1 apresentaram quantidades e teores de Ca e Mg em torno de 2,5 vezes maiores do que em V_2 (Figura 5).

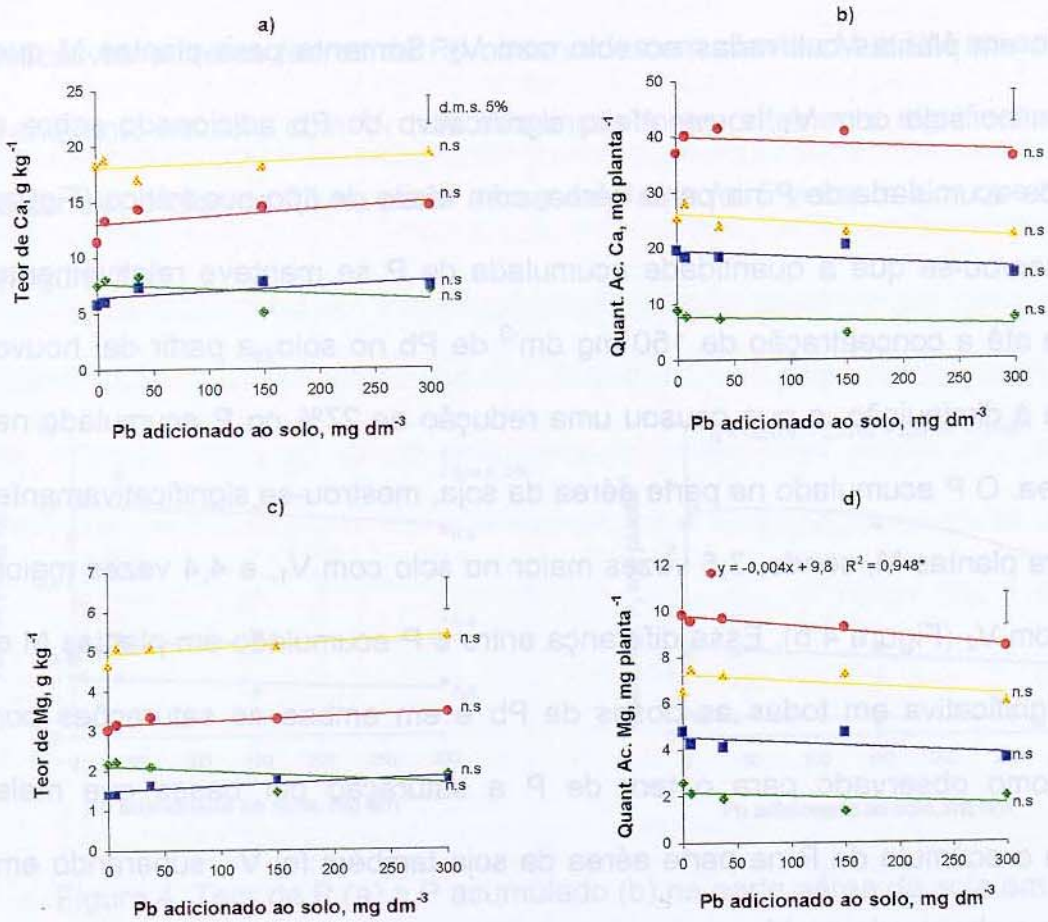


Figura 5. Teor de Ca (a) e Mg (c) e Ca (b) e Mg acumulado (c) na parte aérea da soja em função da dose de Pb (● com FMA e V_1=55%; ▲ sem FMA e V_1=55%; ■ com FMA e V_2=90%; ◆ sem FMA e V_2=90%). Valor do d.m.s. a 5% comparando os fatores FMA e V% dentro de cada dose (n.s: não significativo; ** p<0,01).

Quanto ao Mn (Figura 6.a) observou-se que plantas que cresceram no solo com V_2 não tiveram o seu teor afetado pelo incremento na dose de Pb adicionado ao solo. No entanto, plantas que cresceram no solo com V_1 apresentaram aumento do teor de Mn com o incremento da dose de Pb adicionada ao solo

(Figura 6.a). Para plantas NM o ajuste foi linear ascendente enquanto que para plantas M, foi quadrático ascendente. Em ambos os casos o teor de Mn na parte aérea observado na dose de 300 mg dm^{-3} de Pb duplicou em relação à dose 0. De forma geral, observou-se que o teor de Mn na parte aérea de plantas NM foi 54% maior. A saturação por bases do solo onde cresceram as plantas influenciou significativamente o teor de Mn da parte aérea das plantas, sendo três vezes maior no solo com V_1.

O aumento na dose de Pb adicionada ao solo afetou significativamente o Mn acumulado na parte aérea da soja M, seguindo modelo de ajuste quadrático ascendente para plantas M e linear ascendente para plantas NM (Figura 6.b). No geral, plantas M apresentaram um acúmulo de Mn de 26% maior que as NM. Plantas cultivadas no solo com V_1 quadruplicaram a quantidade acumulada de Mn observada nas plantas no solo com V_2.

As doses crescentes de Pb adicionadas ao solo não tiveram efeito sobre os teores e acúmulo de Fe e Zn na parte aérea da soja (Figura 6.c; 6.d; 6.e; e 6.f). Observou-se que nas plantas M o teor de Fe e o seu acúmulo foram de 12 e 250% maiores que nas plantas NM, respectivamente (Figura 6.c e 6.d). As plantas cultivadas no solo com V_1 apresentaram significativamente maior acúmulo de Fe, superando em 170% as cultivadas em V_2 (Figura 6.d). Quanto ao teor de Zn na parte aérea, as plantas M diferiram significativamente das NM, e de forma geral apresentaram uma diminuição de 24% no teor de Zn em relação às plantas NM (Figura 6.d). Nesse caso, as plantas cultivadas em V_1 também apresentaram teores de Zn 3,3 vezes maiores do que as cultivadas em V_2.

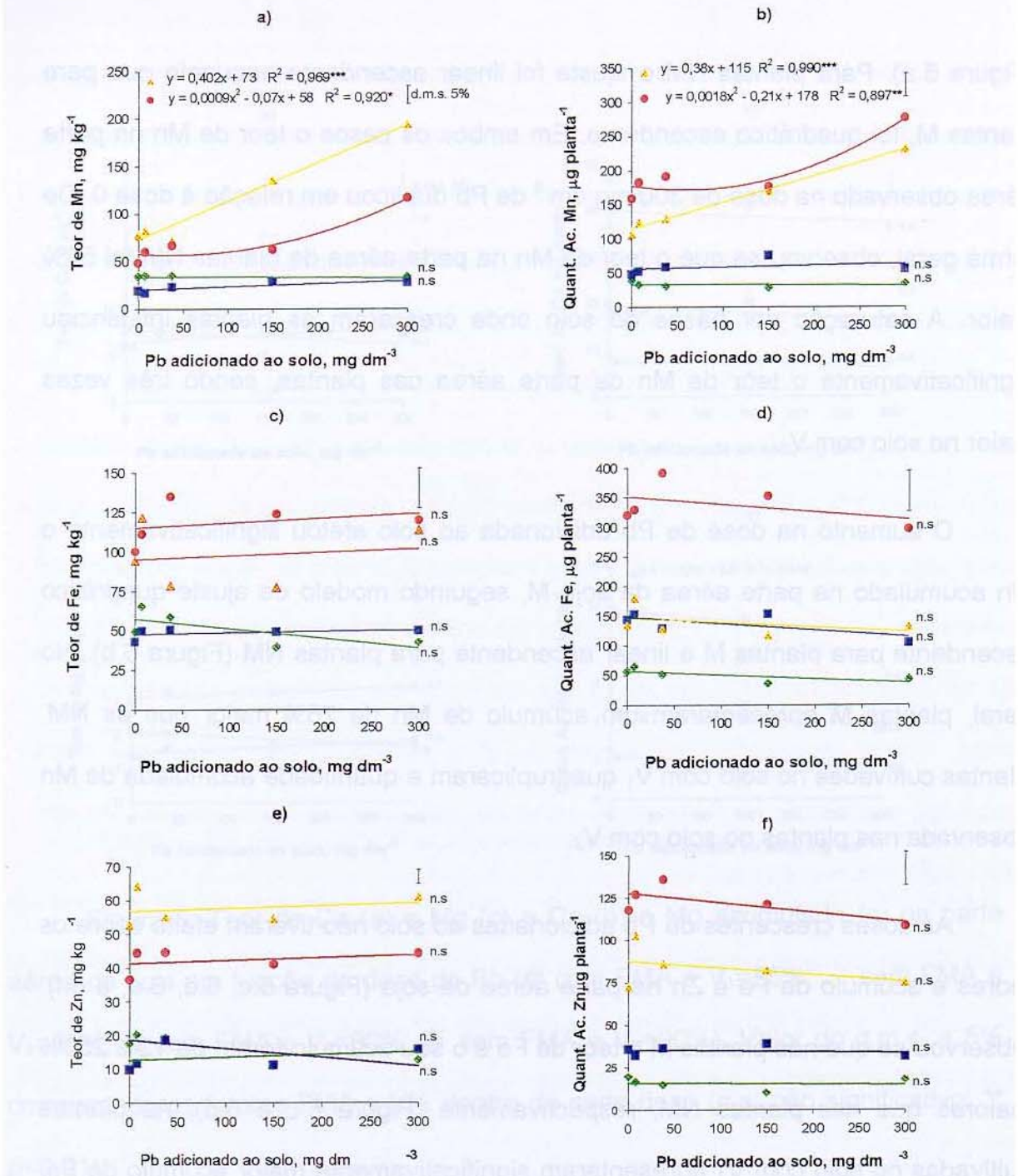


Figura 6. Teor de Mn (a); Fe (c) e Zn (e) e Mn (b); Fe (d) e Zn (f) acumulados na parte aérea da soja em função da dose de Pb (● com FMA e V_1=55%; ▲ sem FMA e V_1=55%; ■ com FMA e V_2=90%; ◆ sem FMA e V_2=90%). Valor do d.m.s. a 5% comparando os fatores FMA e V% dentro de cada dose (n.s: não significativo; * p< 0,05; ** p<0,01 e ***p<0,001).

4.2. Experimento II

4.2.1. Crescimento da soja e associações simbióticas:

A adição de doses crescentes de Pb ao solo não afetou significativamente a produção de MS da soja, em nenhum dos tratamentos realizados (Figura 7.a). Entretanto, observou-se que foi influenciada significativamente tanto pela inoculação do FMA como pela época de colheita das plantas. Assim, a inoculação do FMA favoreceu a produção de MS da planta, sendo que as plantas M diferiram significativamente das NM e tiveram uma MS 93% maior. A diferença entre soja M e NM foi maior nas plantas colhidas na fase de maturação do grão, com produção de MS 250% maior nas plantas M (Figura 7.a). No florescimento essa diferença foi de 32%. Até o florescimento as plantas M e NM somente diferiram nos solos com 300 e 600 mg dm^{-3} de Pb. Já na fase de maturação do grão, as plantas M apresentaram maior crescimento em todas as doses de Pb adicionadas ao solo (Figura 7.a). Plantas cultivadas até a maturação do grão mostraram, de forma geral, 80% maior produção de MS do que plantas cultivadas até o florescimento. Para plantas NM não houve diferenças significativas entre a produção de MS no florescimento e na maturação do grão. Já as plantas M mostraram o dobro de produção de MS na maturação do grão (Figura 7.a).

O número de vagens somente foi afetado significativamente pelas doses crescentes de Pb adicionadas ao solo, nas plantas M (Figura 7.b), ocorrendo uma diminuição linear, que foi de 36% na maior dose de Pb adicionada ao solo. O número de vagens produzidas pela soja diferiu significativamente entre plantas M e NM, sendo 150% maior em plantas M.

A massa da matéria seca das vagens (MSV) de plantas M e NM não foi afetada pelo aumento da dose de Pb. Entretanto, a produção de MSV foi afetada pela inoculação do FMA, sendo que nas plantas M foi 400% maior que nas plantas NM (Figura 7.c).

O número de nódulos não foi alterado significativamente com o incremento de Pb no solo (Figura 7.d). Entretanto, a adição de doses crescentes de Pb afetou significativamente a massa da matéria seca dos nódulos (MSN) somente das plantas M, ocorrendo uma diminuição de 53% entre a dose 0 e a dose de 600 mg dm^{-3} (Figura 7.e). Ambas as variáveis foram afetadas pela micorrização, sendo que plantas M superaram significativamente as NM, em todas as doses de Pb. Os números de nódulos e MSN de plantas M foram 4 e 15 vezes maiores, respectivamente, do que o observado em plantas NM (Figuras 7.d e 7.e).

Em relação à colonização radicular, a figura 8.a mostra que o incremento das doses de Pb no solo afetou de forma linear e negativamente a colonização da raiz pelo FMA em ambos os estádios do ciclo da planta. No florescimento, houve uma redução de 32% da colonização radicular, enquanto que na maturação do grão foi de 40%, entre as dose 0 e 600 mg dm^{-3} de Pb. A colonização da raiz não diferiu significativamente entre plantas colhidas no florescimento e na maturação do grão (Figura 8.a).

A esporulação do fungo, avaliada na maturação do grão, foi afetada significativamente pelo aumento das doses de Pb no solo, ocorrendo uma resposta linear e negativa, com redução de 67% entre a dose 0 e de 600 mg dm^{-3} de Pb (Figura 8.b).

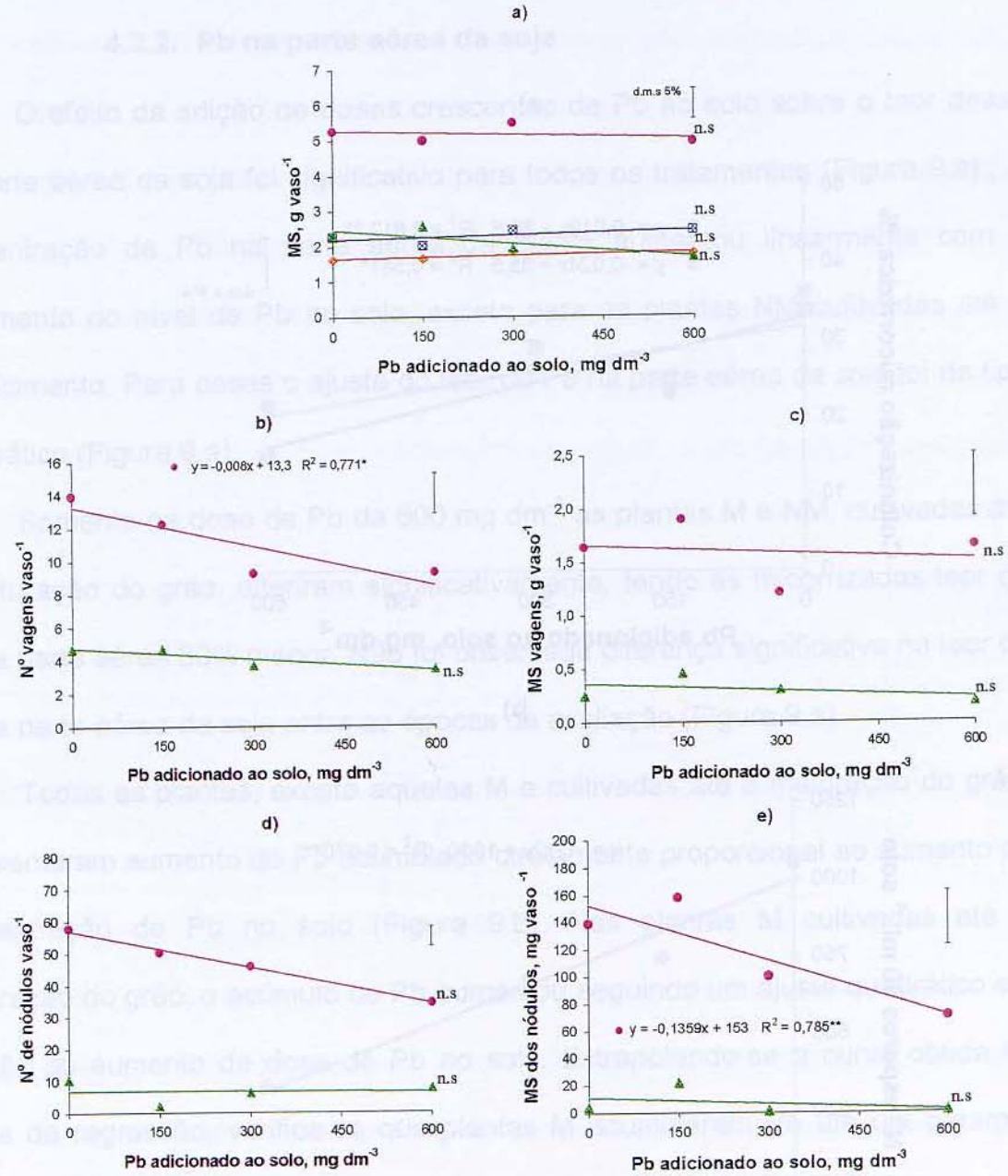
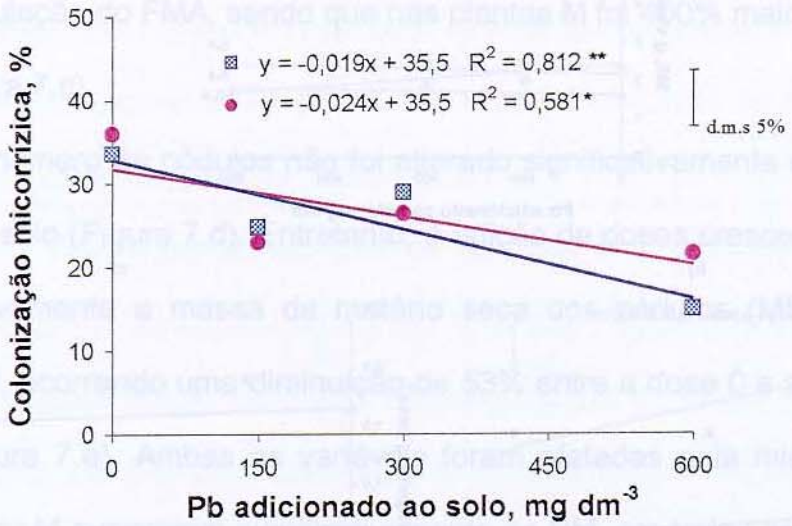


Figura 7. Massa da matéria seca da parte aérea da soja (a); número (b) e massa da matéria seca (c) das vagens; número (d) e massa da matéria seca (e) dos nódulos (■ com FMA, no florescimento; ◆ sem FMA, no florescimento; ● com FMA, na maturação do grão; ▲ sem FMA, na maturação do grão). Valor do d.m.s. a 5% comparando os fatores FMA e época dentro de cada dose (n.s: não significativo; * p< 0,05; e ** p<0,01).

a)



b)

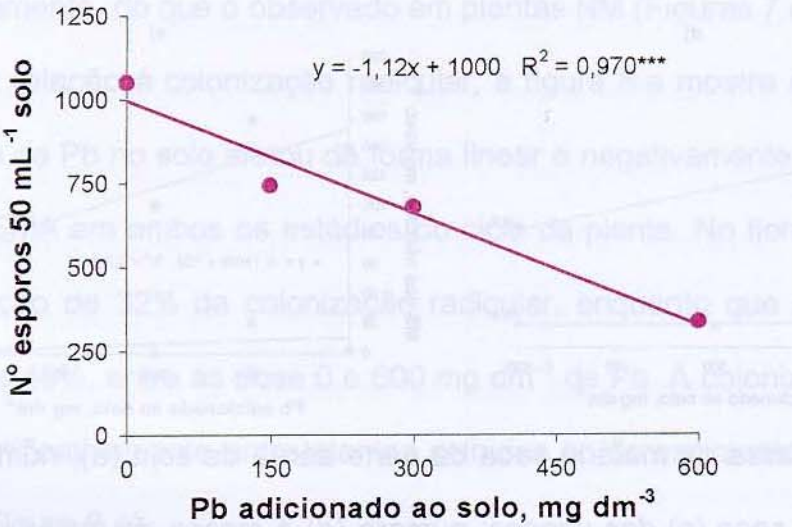


Figura 8. Colonização micorrízica (a) e esporulação do FMA (■ com FMA, no florescimento; ● com FMA, na maturação do grão). Valor do d.m.s. a 5% comparando os fatores FMA e época dentro de cada dose (* p< 0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001).

4.2.2. Pb na parte aérea da soja

O efeito da adição de doses crescentes de Pb ao solo sobre o teor desse na parte aérea da soja foi significativo para todos os tratamentos (Figura 9.a)., A concentração de Pb na parte aérea da planta aumentou linearmente com o incremento do nível de Pb no solo, exceto para as plantas NM cultivadas até o florescimento. Para essas o ajuste do teor de Pb na parte aérea da soja foi de tipo quadrático (Figura 9.a).

Somente na dose de Pb de 600 mg dm^{-3} as plantas M e NM, cultivadas até a maturação do grão, diferiram significativamente, tendo as micorrizadas teor de Pb na parte aérea 30% menor. Não foi observada diferença significativa no teor de Pb da parte aérea da soja entre as épocas de avaliação (Figura 9.a).

Todas as plantas, exceto aquelas M e cultivadas até a maturação do grão, apresentaram aumento do Pb acumulado diretamente proporcional ao aumento da concentração de Pb no solo (Figura 9.b). Nas plantas M cultivadas até a maturação do grão, o acúmulo de Pb aumentou seguindo um ajuste quadrático em relação ao aumento da dose de Pb no solo. Extrapolando-se a curva obtida do ajuste da regressão, verifica-se que plantas M acumularam Pb até um patamar obtido na concentração de 700 mg dm^{-3} de Pb no solo, mantendo-se constante até uma dose de 900 mg dm^{-3}, a partir da qual o acúmulo de Pb começaria a decrescer (Figura 9.b).

De forma geral, observou-se que o acúmulo de Pb na parte aérea de plantas NM foi 43% menor que nas plantas M. No florescimento, as plantas M e NM não diferiram entre si significativamente, mas na maturação do grão diferiram, constatando-se que o acúmulo de Pb nas plantas NM foi 53% menor. Plantas M e

NM, em ambas as épocas, não mostraram diferenças quanto ao Pb acumulado na parte aérea, na dose 0. Nas demais doses de Pb adicionadas ao solo, entretanto, as plantas M e NM mostraram diferenças significativas, havendo, no geral, acúmulo de Pb em plantas NM até 60% menor, na dose de 300 mg dm^{-3} de Pb no solo (Figura 9.b). Plantas coletadas na maturação do grão apresentaram, no geral, acúmulo de Pb na parte aérea 80% maior do que plantas cultivadas até o florescimento (Figura 9.b).

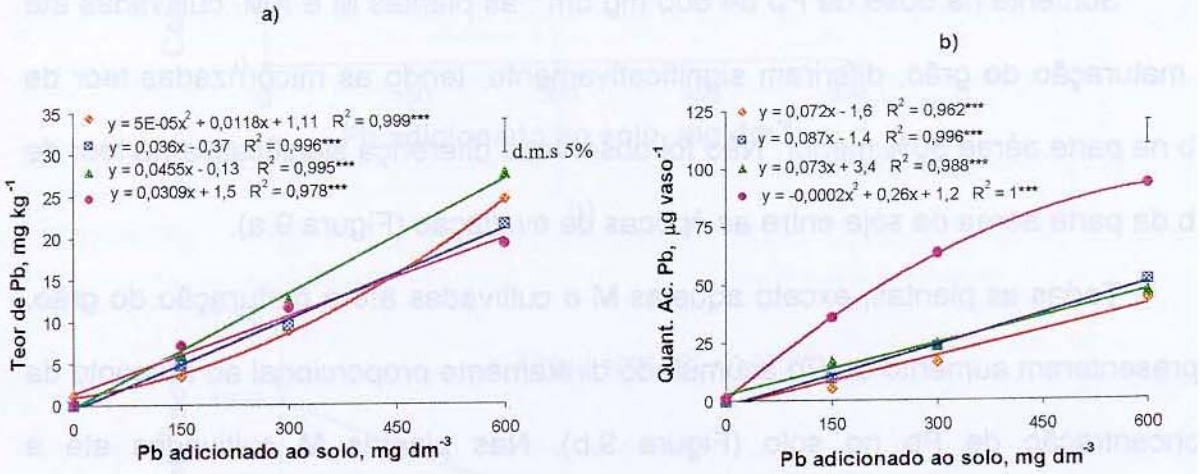


Figura 9. Teor de Pb (a) e Pb acumulado na parte aérea da soja (a) em função da dose de Pb (■ com FMA, no florescimento; ◆ sem FMA, no florescimento; ● com FMA, na maturação do grão; ▲ sem FMA, na maturação do grão). Valor do d.m.s. a 5% comparando os fatores FMA e época dentro de cada dose (***p<0,001).

4.2.3. Macronutrientes:

Não houve efeito das doses de Pb adicionadas ao solo no teor e quantidade acumulada de N na parte aérea da planta, (Figuras 10.a e 11.a). As plantas M tiveram menor teor de N na parte aérea do que as NM. As plantas M diferiram significativamente das NM na maturação do grão, quando a soja apresentou teor de N na parte aérea 38% menor (Figura 10.a). Entretanto, as plantas M apresentaram acúmulo de N significativamente maior, principalmente no estádio de maturação do grão (Figura 11.a). De modo geral, as plantas cultivadas até a maturação do grão mostraram teor de N 10% menor e acúmulo de N 47% maior do que plantas colhidas no florescimento (Figuras 10.a e 11.a).

Observou-se que a adição de doses crescentes de Pb ao solo somente afetou significativamente o teor e o acúmulo de P na parte aérea da soja M na fase do florescimento (Figuras 10.b e 11.b), os quais tiveram ajuste de tipo quadrático, com um pico de acúmulo de P em torno de 300 mg dm^{-3} de Pb no solo. O teor de P na parte aérea da soja foi de forma geral 2,5 vezes maior em plantas M do que nas NM, em ambas as épocas do ciclo da planta (Figura 10.b). Essa diferença foi significativa em todas as doses de Pb adicionadas ao solo. Das duas épocas avaliadas, foi no florescimento que as plantas apresentaram significativamente os maiores teores de P, com teor 71% maior do que o observado em plantas cultivadas até a maturação do grão. O acúmulo de P das plantas M também foi significativamente maior que em plantas NM, sendo 400% maior no florescimento e 250% na maturação do grão. De forma geral não houve diferenças significativas entre o acúmulo de P de plantas cultivadas até o florescimento e até a maturação do grão (Figura 11.b).

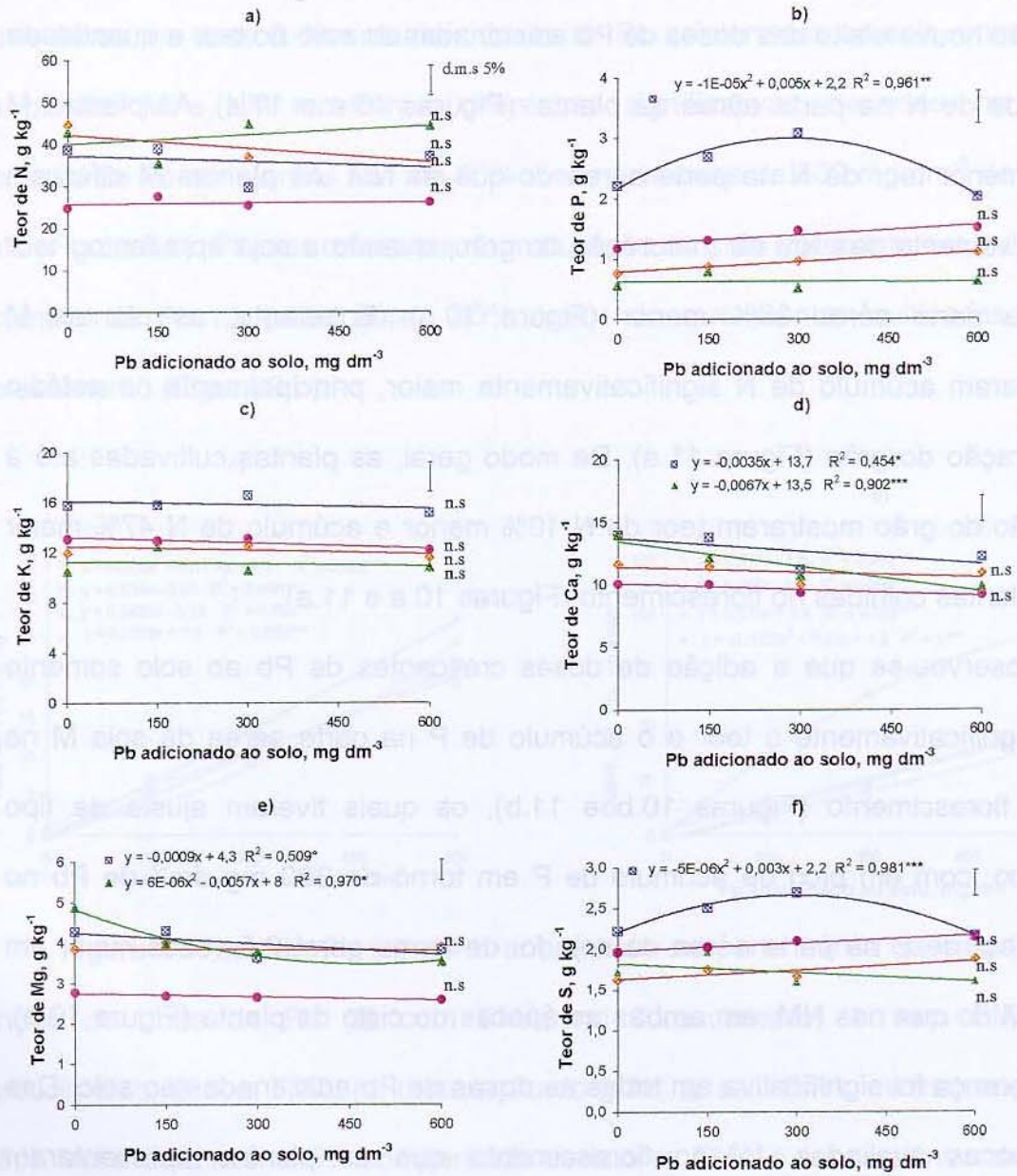


Figura 10. Teor de N (a); P (b); K (c); Ca (d); Mg (e) e S (f) na parte aérea da soja em função da dose de Pb (■ com FMA, no florescimento; ◆ sem FMA, no florescimento; ● com FMA, na maturação do grão; ▲ sem FMA, na maturação do grão). Valores de d.m.s. calculados a 5% comparando os fatores FMA e época dentro de cada dose. (n.s: não significativo; * p< 0,05; ** p<0,01 e ***p<0,001).

O teor e a quantidade acumulada de K da parte aérea das plantas não foram influenciados significativamente pelo aumento da concentração de Pb do solo (Figuras 10.c e 11.c). Para o teor de K, as plantas M colhidas no florescimento superaram significativamente as NM (Figura 10.c). Já para o acúmulo de K, (Figura 11.c), as plantas M colhidas na maturação do grão diferiram significativamente das NM, apresentando K acumulado 150% maior. O teor de K mostrou-se, de forma geral, 15% maior em plantas colhidas no florescimento, enquanto o K acumulado foi 57% maior na maturação do grão (Figura 10.c).

Plantas NM no estádio de maturação do grão, tiveram o teor e a quantidade acumulada de Ca na parte aérea da soja afetados significativamente pela adição de doses crescentes de Pb ao solo (Figuras 10.d e 11.d), sendo o ajuste linear descendente, com redução, entre a dose 0 e a de 600 mg dm^{-3} de Pb, de 30% no teor e de 52% no Ca acumulado. O teor de Ca de plantas M no florescimento também diminuiu significativamente com o aumento da dose de Pb. O Ca acumulado na parte aérea de plantas M foi, no geral, 54 e 98% maior que em plantas NM, no florescimento e maturação do grão, respectivamente. As plantas colhidas na fase de maturação do grão apresentaram um acúmulo de Ca 56% maior do que plantas colhidas no florescimento (Figura 11.d).

No que se refere ao efeito da elevação da concentração de Pb sobre o teor de Mg na parte aérea da soja, observou-se que no florescimento somente foram afetadas as plantas M, com tendência linear significativa, diminuindo 13% com o aumento da concentração de Pb no solo (Figura 10.e). Já na maturação do grão, constatou-se que o efeito do Pb foi significativo só para plantas NM, sendo quadrático com ponto de mínimo na concentração de 480 mg dm^{-3} de Pb,

mantendo-se relativamente constante a partir deste ponto (Figura 10.e). Entre a dose 0 e o ponto de mínima houve um decréscimo de 30%. As doses crescentes de Pb adicionadas ao solo afetaram significativamente o Mg acumulado na parte aérea somente nas plantas NM cultivadas até a maturação, apresentando ajuste linear descendente, reduzindo-se 50% na maior dose de Pb adicionada ao solo (Figura 11.e).

No florescimento, o teor de Mg de plantas M e NM não diferiu entre si; entretanto, na fase de maturação do grão, as plantas M diferiram significativamente das NM, apresentando teor de Mg na parte aérea 50% menor (Figura 10.e). As plantas M apresentaram, de forma geral, acúmulo de Mg 52% maior do que plantas NM. As plantas M diferiram significativamente das NM, de forma mais acentuada na maturação do grão, quando as plantas M tiveram acúmulo de Mg na parte aérea 60% maior (Figura 11.e). No florescimento, as plantas tiveram teor de Mg 20% maior do que plantas na fase de maturação do grão (Figura 10.e). Entretanto o acúmulo de Mg na parte aérea foi 40% maior na fase de maturação do grão do que no florescimento (Figura 11.e).

A análise da regressão para o teor de S na parte aérea com o aumento da dose de Pb no solo somente foi significativa para as plantas M cultivadas até o florescimento (Figura 10.f). O ajuste da curva foi do tipo quadrático ascendente, com pico de absorção na dose de 300 mg dm^{-3} de Pb. Já o acúmulo de S de plantas NM cultivadas até o maturação do grão diminuiu proporcionalmente com o aumento da dose de Pb no solo (Figura 11.f), ocorrendo uma redução de 40% entre a dose 0 e de 600 mg dm^{-3} de Pb.

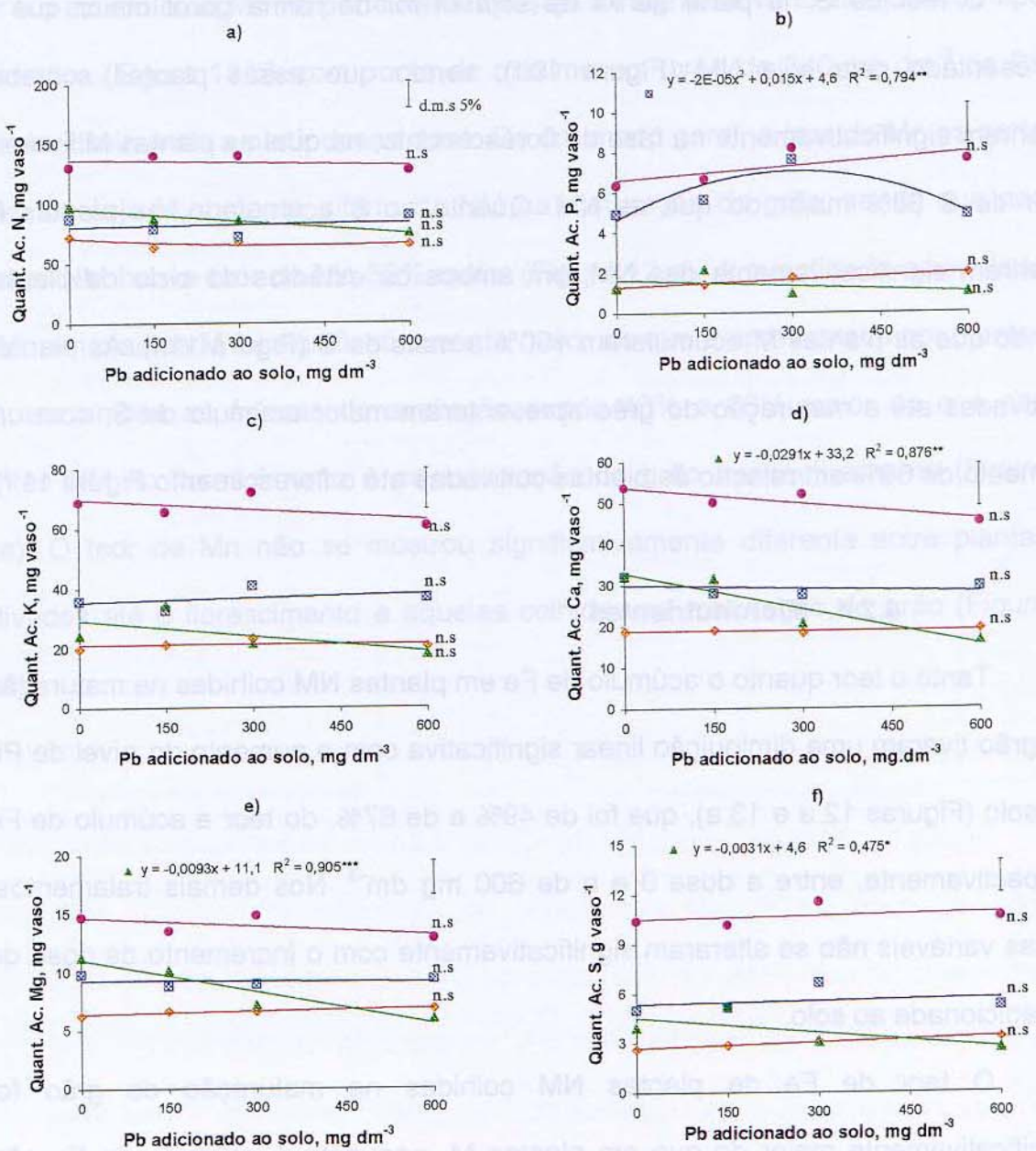


Figura 11. Acúmulo de N (a); P (b); K (c); Ca (d); Mg (e) e S (f) na parte aérea da soja em função da dose de Pb (■ com FMA, no florescimento; ◆ sem FMA, no florescimento; ● com FMA, na maturação do grão; ▲ sem FMA, na maturação do grão). Valores de d.m.s calculados a 5% comparando os fatores FMA e época dentro de cada dose. (n.s: não significativo; * p< 0,05; ** p<0,01 e ***p<0,001).

O teor de S na parte aérea da soja M foi de forma geral maior que o apresentado pela soja NM (Figura 10.f), sendo que essas plantas somente diferiram significativamente na fase de florescimento, na qual as plantas M tiveram teor de S 38% maior do que as NM. Quanto ao S acumulado, as plantas M diferiram significativamente das NM, em ambos os estádios do ciclo da planta, sendo que as plantas M acumularam 150% a mais de S (Figura 11.f). As plantas cultivadas até a maturação do grão apresentaram maior acúmulo de S, com um aumento de 69% em relação às plantas cultivadas até o florescimento Figura 11.f).

4.2.4. Micronutrientes

Tanto o teor quanto o acúmulo de Fe em plantas NM colhidas na maturação do grão tiveram uma diminuição linear significativa com o aumento do nível de Pb do solo (Figuras 12.a e 13.a), que foi de 49% e de 67%, do teor e acúmulo de Fe respectivamente, entre a dose 0 e a de 600 mg dm^{-3}. Nos demais tratamentos, essas variáveis não se alteraram significativamente com o incremento da dose de Pb adicionada ao solo.

O teor de Fe de plantas NM colhidas na maturação do grão foi significativamente maior do que em plantas M, enquanto o acúmulo de Fe não mostrou diferenças significativas entre plantas M e NM em nenhum dos estádios do ciclo da planta avaliados (Figura 12.a). A diferença de médias para o fator época somente foi significativa para plantas NM, as quais apresentaram teor de Fe na maturação do grão 67% maior. O acúmulo de Fe duplicou na fase de maturação do grão tanto para plantas M quanto NM (Figura 12.a).

Para todos os tratamentos o efeito do incremento do nível de Pb sobre o

teor e o acúmulo de Mn na parte aérea da soja foi significativo, com ajuste do tipo quadrático (Figura 13.b), com ponto de máximo em torno de 340 mg dm^{-3} de Pb no solo, diminuindo a partir dessa dose. De um modo geral, a teor de Mn na parte aérea da soja M somente diferiu da NM na maturação do grão, sendo que nas plantas NM houve teor de Mn 53% maior (Figura 12.a). A quantidade acumulada de Mn em plantas M foi significativamente maior do que a apresentada por plantas NM, em ambas as épocas de avaliação sendo 48% e 60% maior do que nas plantas NM no florescimento e na maturação do grão, respectivamente (Figura 13.a). O teor de Mn não se mostrou significativamente diferente entre plantas cultivadas até o florescimento e aquelas colhidas na maturação do grão (Figura 12.a).

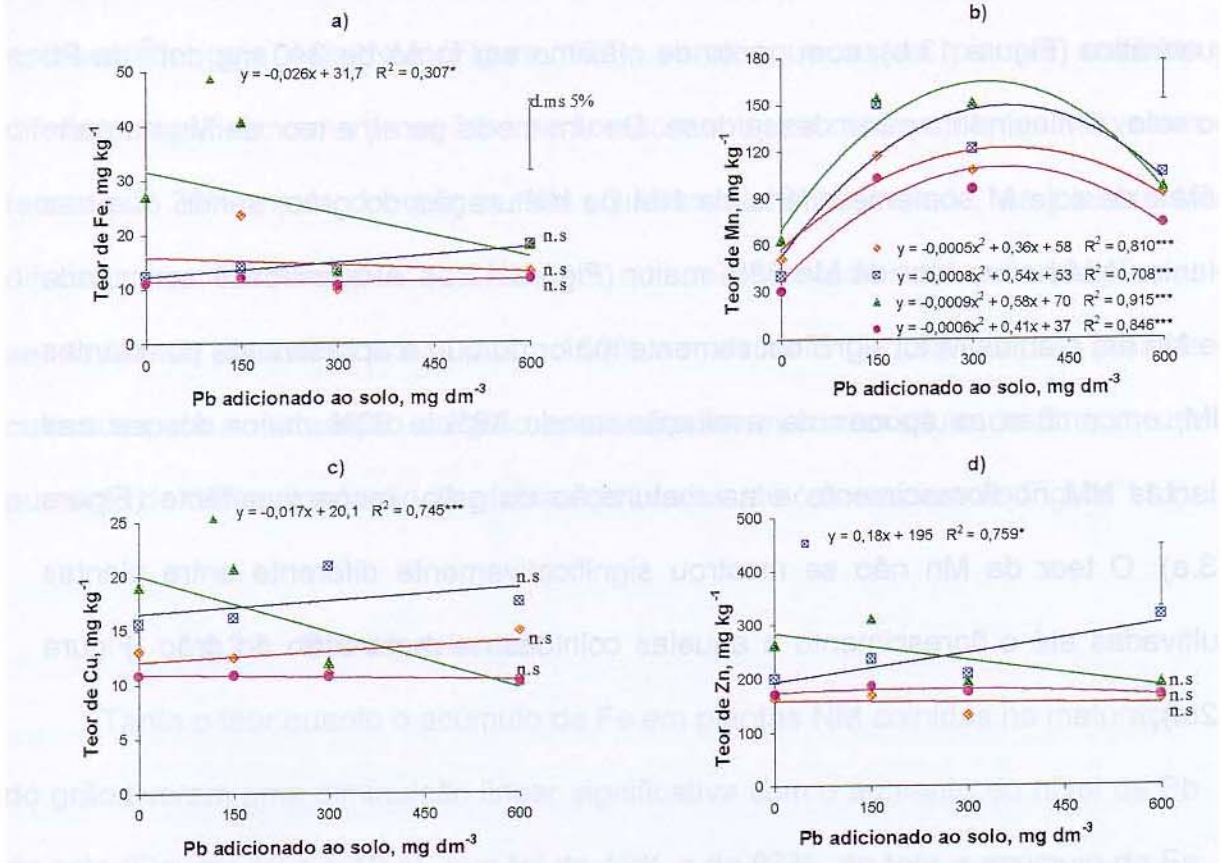


Figura 12. Teor de Fe (a); Mn (b); Cu (c) e Zn (d) na parte aérea da soja em função da dose de Pb (■ com FMA, no florescimento; ◆ sem FMA, no florescimento; ● com FMA, na maturação do grão; ▲ sem FMA, na maturação do grão). Valores de d.m.s. calculados a 5% comparando os fatores FMA e época dentro de cada dose (n.s: não significativo; * p< 0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001).

Entre a dose 0 e a máxima de Pb adicionada houve diminuição linear e significativa de 51 e 67% no teor e no acúmulo de Cu na parte aérea das plantas NM na fase de maturação do grão. Plantas M cultivadas até o florescimento tiveram o acúmulo de Cu da parte aérea afetado pelo aumento da dose de Pb. O ajuste foi de tipo quadrático com ponto de máxima na concentração de 367 mg

dm^{-3} de Pb (Figura 12.c). O teor de Cu de plantas NM foi maior na maturação do grão, enquanto que o de plantas M foi significativamente maior no florescimento, com uma diferença de 56% em relação à maturação do grão (Figura 12.c). O acúmulo de Cu foi de forma geral 78% maior em plantas M do que nas NM, sendo 36% maior na fase de maturação do grão (Figura 13.c).

Observou-se que o incremento de Pb no solo afetou significativamente o teor de Zn da parte aérea somente em plantas M colhidas no florescimento, de forma linear ascendente, com um incremento de 55% entre a dose 0 e a dose de 600 mg dm^{-3} de Pb no solo (Figura 12.d). Plantas M na fase do florescimento e plantas NM na maturação do grão tiveram o acúmulo de Zn alterado pelo incremento das doses de Pb no solo (Figura 13.d). Por um lado, plantas M no florescimento apresentaram um aumento significativo e linear do Zn acumulado na parte aérea, que foi de 63% entre a dose 0 e a de 600 mg dm^{-3} de Pb. Por outro lado, o Zn acumulado em plantas NM crescidas até a fase de maturação do grão diminuiu, significativa e linearmente, 55% entre a dose 0 e a máxima aplicadas (Figura 13.d). A diferença entre o teor de Zn da parte aérea de plantas M e NM cultivadas até o florescimento somente foi significativa na dose de Pb mais alta, com teor desse metal duas vezes maior em plantas M. Na maturação do grão não foram encontradas diferenças significativas entre elas (Figura 12.d). Já o acúmulo de Zn da parte aérea foi afetado significativamente pela inoculação do FMA, principalmente na fase de maturação do grão, quando a soja M teve acúmulo de Zn 72% maior do que soja NM. A quantidade acumulada de Zn foi maior em plantas colhidas na maturação do grão, havendo, no geral, quantidade do elemento 75% maior (Figura 13.d).

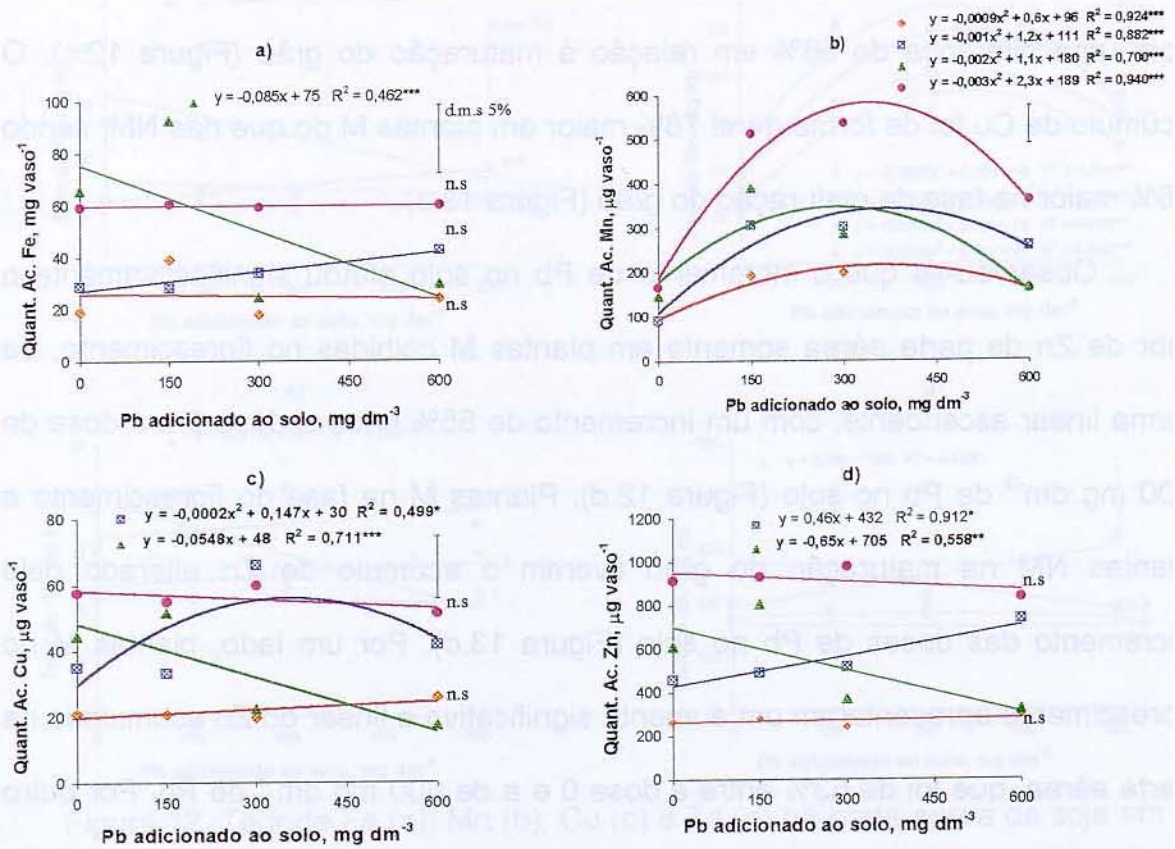


Figura 13. Acúmulo de Fe (a); Mn (b); Cu (c) e Zn (d) na parte aérea da soja em função da dose de Pb (■ com FMA, no florescimento; ◆ sem FMA, no florescimento; ● com FMA, na maturação do grão; ▲ sem FMA, na maturação do grão). Valores de d.m.s. calculados a 5% comparando os fatores FMA e época dentro de cada dose (n.s: não significativo; * p< 0,05; ** p<0,01 e ***p<0,001).

4.2.5. C-Biomassa microbiana e respiração do solo

O carbono da biomassa microbiana do solo foi influenciado negativamente pelo aumento na concentração de Pb no solo somente nos tratamentos com inoculação do FMA, independentemente da época de avaliação (Figura 14.a) O solo com inóculo do fungo obtido no florescimento da soja, teve o C-biomassa reduzido significativamente e de forma linear com o aumento da dose de Pb no solo, com uma diminuição de quase 60% entre a dose 0 e de 600 mg dm^{-3} de Pb. Solo com inóculo do FMA e coletado na maturação do grão também teve diminuição significativa desta variável, sendo que o melhor ajuste foi o tipo exponencial, diminuindo drasticamente de 326,2 na dose 0 a 51,4 μg de C g^{-1} de solo na dose de 600 mg dm^{-3} de Pb . Nos solos onde não houve inoculação do FMA, o C-biomassa não se alterou significativamente com a adição de Pb ao solo (Figura 14.a).

O carbono da biomassa microbiana do solo com FMA coletado no florescimento da planta, não diferiu significativamente do solo sem FMA amostrado nesta mesma fase do ciclo da planta. No estádio da maturação do grão, o solo com inóculo do FMA diferiu significativamente do solo sem FMA somente no solo sem adição de Pb (Figura 14.a). Observou-se, também, que o solo coletado no florescimento da planta teve C-biomassa microbiana 32% maior do que o solo coletado na maturação do grão (Figura 14.a).

Quanto à respiração do solo, avaliada pela liberação de CO_2, foi observada influência significativa dos três fatores em estudo, inoculação do FMA, época de colheita da planta e da adição de Pb ao solo (Figura 14.b). O efeito do aumento do

nível de Pb no solo sobre a respiração do solo foi significativa no solo sem FMA coletado no florescimento e no solo com FMA coletado na maturação do grão da soja (Figura 14.b). A análise da regressão indicou que a liberação de CO_2 do solo diminuiu linearmente com o aumento da concentração de Pb no solo, com redução de 30% no solo sem FMA e no florescimento, e de 49% no solo com FMA e na maturação do grão, comparando-se a dose 0 e a de 600 mg dm^{-3} de Pb. No solo com inóculo de FMA amostrado no florescimento e sem inóculo de FMA, coletado na maturação do grão, a respiração do solo não variou significativamente com o aumento da dose de Pb no solo (Figura 14.b). O solo que teve inoculação do FMA mostrou no geral 37% maior liberação de CO_2 do que o solo no qual não foi inoculado o fungo. A liberação de CO_2 do solo foi significativamente maior (50%) no florescimento do que na maturação do grão (Figura 14.b).

A análise da variância dos dados obtidos para o quociente metabólico, q-CO_2, indicou que não houve efeito significativo nem da época de coleta do solo nem da inoculação do FMA. O efeito do Pb, entretanto, mostrou-se altamente significativo (Figura 14.c). Assim, a análise da regressão mostrou que os tratamentos com e sem inóculo do FMA coletado na maturação do grão da planta tiveram ajuste quadrático ascendente, com um pico ao redor da dose de 300 mg dm^{-3} de Pb (Figura 14.c), diminuindo a partir desse ponto. Essa diminuição foi mais acentuada para o solo sem inóculo de FMA. Nos solos com e sem inóculo de FMA coletados no florescimento não houve efeito significativo do incremento das doses de Pb adicionadas ao solo.

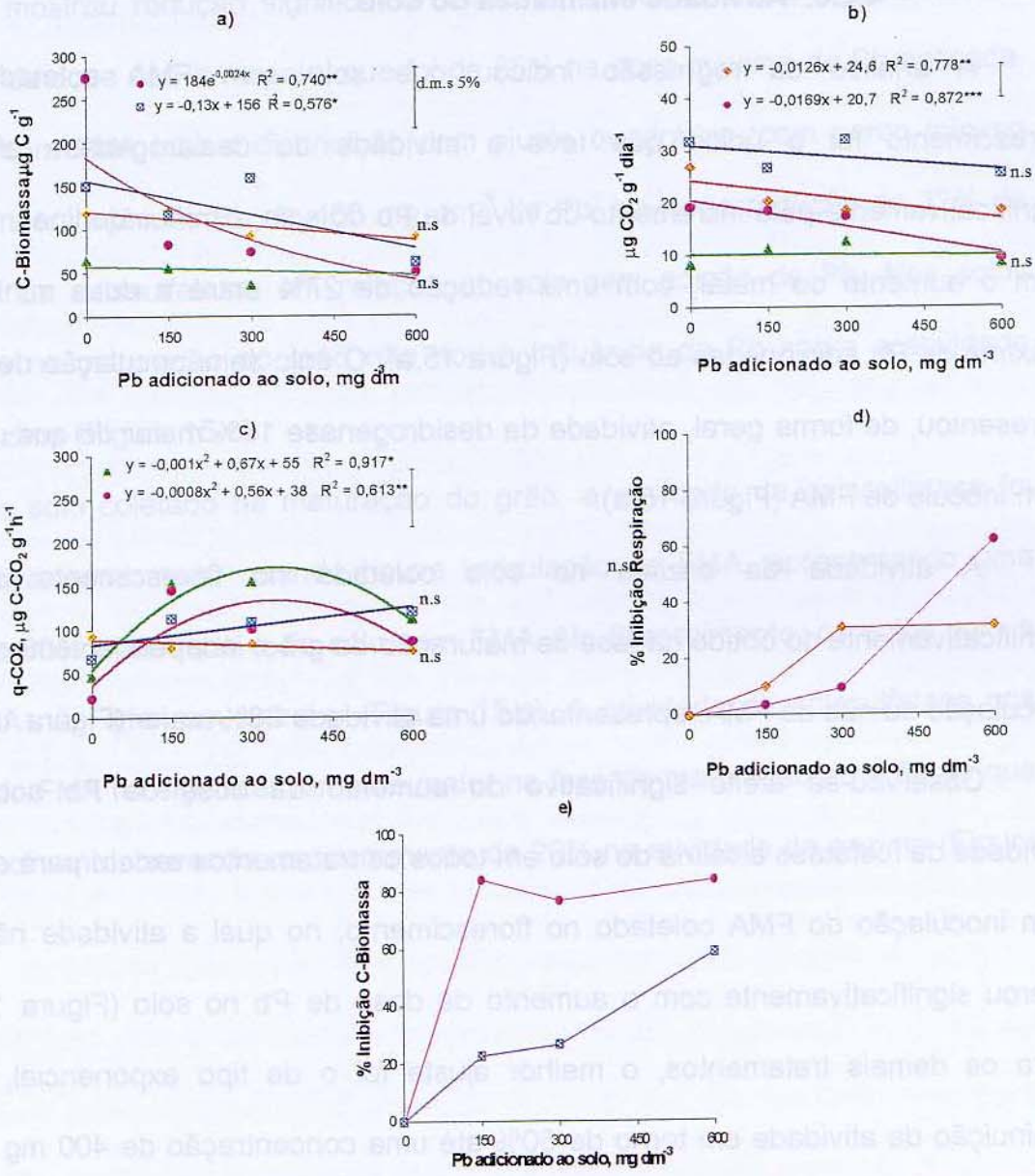


Figura 14. C-biomassa microbiana (a); respiração do solo (b); quociente metabólico (c); inibição da respiração (d) e do C-biomassa microbiana (e), em função da dose de Pb (■ com FMA, no florescimento; ◆ sem FMA, no florescimento; ● com FMA, na maturação do grão; ▲ sem FMA, na maturação do grão). Valores de d.m.s. calculados a 5% comparando os fatores FMA e época dentro de cada dose (n.s: não significativo; * p< 0,05; ** p<0,01 e ***p<0,001).

4.2.6. Atividade enzimática do solo:

A análise da regressão indicou que solo com FMA coletado no florescimento foi o único que teve a atividade da desidrogenase afetada significativamente pelo incremento do nível de Pb do solo, diminuindo linearmente com o aumento do metal, com uma redução de 27% entre a dose mínima e máxima de Pb adicionadas ao solo (Figura 15.a). O solo sem inoculação de FMA apresentou, de forma geral, atividade da desidrogenase 15% maior do que o solo com inóculo de FMA (Figura 15.a).

A atividade da enzima no solo coletado no florescimento diferiu significativamente do obtido na fase de maturação do grão, independentemente da inoculação ou não do FMA, apresentando uma atividade 38% maior (Figura 15.a).

Observou-se efeito significativo do aumento da dose de Pb sobre a atividade da fosfatase alcalina do solo em todos os tratamentos exceto para o solo sem inoculação do FMA coletado no florescimento, no qual a atividade não se alterou significativamente com o aumento da dose de Pb no solo (Figura 15.b). Para os demais tratamentos, o melhor ajuste foi o de tipo exponencial, com diminuição da atividade em torno de 50% até uma concentração de 400 mg dm^{-3} de Pb, mantendo-se constante a partir deste ponto (Figura 15.b). A atividade da fosfatase foi significativamente maior no solo com FMA coletado no florescimento, nas doses 0 e 150 mg dm^{-3} de Pb, com atividade 27% maior do que no solo sem FMA. Na fase de maturação do grão, não houve diferença significativa entre o solo com e sem inóculo do FMA (Figura 15.b).

O incremento da dose de Pb no solo causou diminuição da atividade da arilssulfatase no solo coletado no florescimento (Figura 15.c). O solo sem inóculo

de FMA mostrou redução significativa linear da atividade desta enzima com o aumento da dose de Pb no solo, que foi de 25% na dose máxima de Pb aplicada. No solo com FMA houve diminuição com ajuste quadrático, com ponto mínimo numa concentração de Pb de 400 mg dm^{-3} de Pb, havendo redução de 32% da atividade da arilssulfatase, em relação ao solo sem adição de Pb. Nos solos coletados na maturação do grão não houve influência do Pb sobre a atividade desta enzima (Figura 15.c).

No solo coletado na maturação do grão, a atividade da arilssulfatase foi significativamente maior quando houve inoculação do FMA, apresentando uma atividade 30% maior que a do solo sem FMA. No florescimento, os solos com e sem FMA não diferiram entre si (Figura 15.c). A atividade da arilssulfatase nos solos com FMA foi significativamente maior na fase de maturação do grão do que no florescimento, havendo um incremento de 20% na atividade da enzima (Figura 15.c).

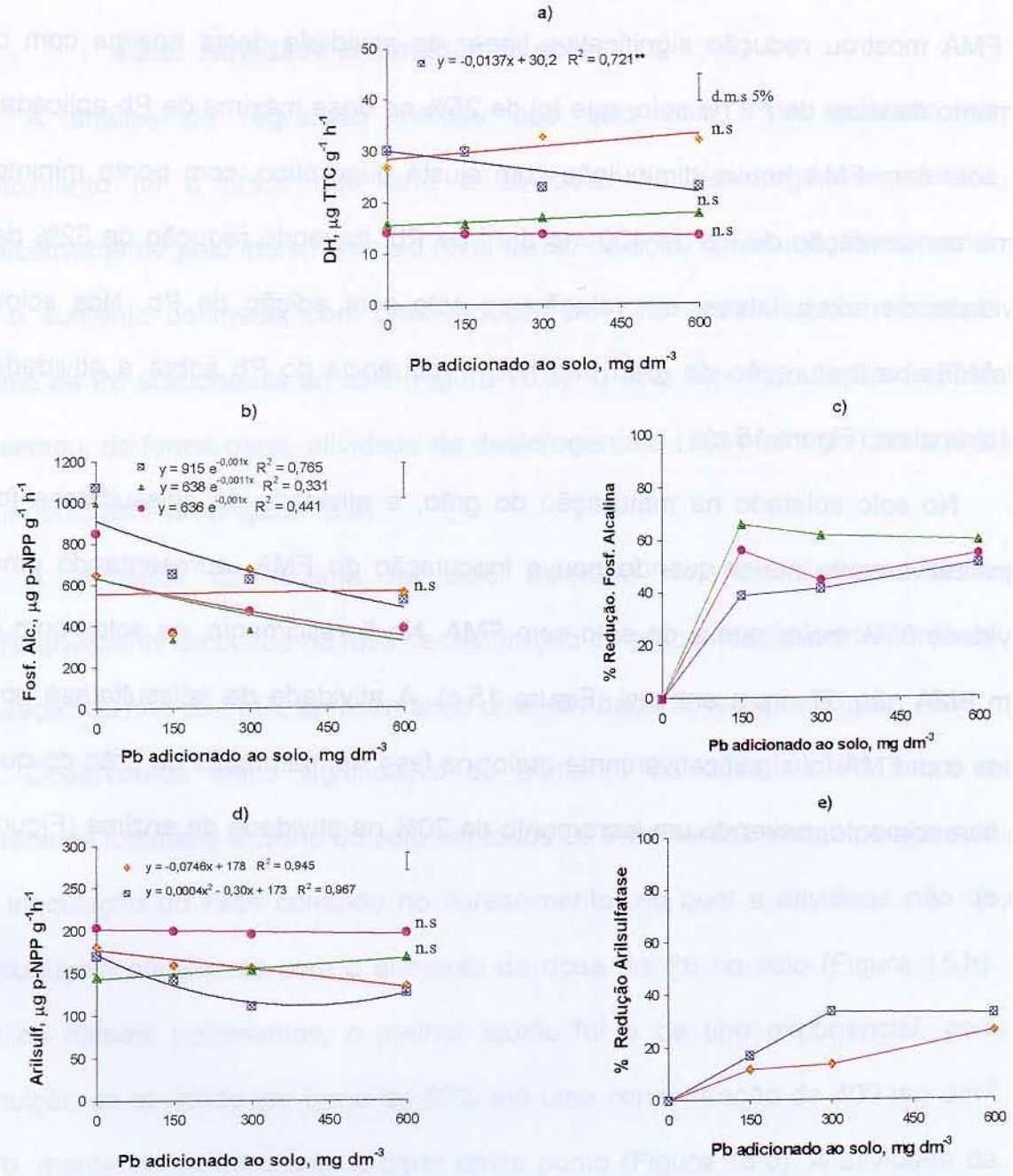


Figura 15. Atividade de desidrogenase (a); fosfatase alcalina (b) e arilssulfatase (d) e redução das atividades de fosfatase alcalina (c) e arilssulfatase (e) no solo (■ com FMA, no florescimento; ◆ sem FMA, no florescimento; ● com FMA, na maturação do grão; ▲ sem FMA, na maturação do grão). Valores de d.m.s. calculados a 5% comparando os fatores FMA e época dentro de cada dose (n.s: não significativo; * p< 0,05; ** p<0,01 e ***p<0,001).

5. Discussão

5.1. Experimento I

O fato de os FMA estarem associados à maioria dos cultivos de importância econômica beneficiando o crescimento e a produção das plantas, já é bastante conhecido. Os resultados obtidos permitiram mais uma vez, constatar os efeitos altamente significativos da inoculação de FMA sobre o crescimento da soja (Figura 1), que é uma planta micotrófica (Cardoso, 1985). Dessa forma, a soja M mesmo na presença de doses elevadas de Pb, apresentou teores de P (Figura 4) e quantidades acumuladas de Ca, Mn, Fe e Zn superiores às da soja NM (Figuras 5.b; 6.b; 6.d e 6.f). Tal fato pode ser devido à maior exploração do solo pelo sistema radicular colonizado por FMA que aumenta a absorção de nutrientes (Buwalda et al., 1983), o que pode ter se refletido no maior crescimento da planta M. A produção de MS correlacionou-se significativamente ($p<0,05$) e positivamente com a colonização micorrízica ($r=0.67$), o que pode explicar, pelo menos em parte, o aumento na absorção de nutrientes. Os resultados mostraram que houve correlação significativa ($p<0,05$) e positiva entre a produção de MS e o teor de P ($r=0,49$) e a quantidade acumulada de P ($r=0,77$), Ca ($r=0,65$), Mg ($r=0,58$), Fe ($r=0,68$) e Zn ($r=0,56$), e correlação negativa com a quantidade acumulada de Cu ($r=-0,85$).

O efeito da adição de doses crescentes de Pb sobre a produção de MS da soja foi significativo somente nos tratamentos que receberam inoculação do FMA, ocorrendo interação negativa entre concentração de Pb no solo e inoculação do

fungo micorrízico (Figura 1). Observou-se, assim mesmo, correlação significativa ($p<0,05$) e negativa ($r=-0,42$) entre o teor de Pb na parte aérea e a produção de MS. Heggo et al. (1990) observaram que a produção de MS da soja foi afetada negativamente pela concentração de Zn, Cd e Mn no solo, e positivamente pela inoculação de FMA. Diaz et al. (1996) observaram inibição da produção de MS em *Anthyllis cytisoides* micorrizada, quando da adição de altas concentrações de Pb e Zn ao solo (até 1000 mg dm^{-3}), enquanto que nas plantas NM não foi observado este efeito inibitório, apesar de estas terem crescido consideravelmente menos do que as plantas M. Siqueira et al. (1999), estudando o efeito da micorrização de mudas de espécies arbóreas em solo contaminado com Pb, Cd, Cu e Zn, observaram que houve uma forte redução do crescimento com o aumento da contaminação, tanto de plantas M quanto de NM. Entretanto, Enkhtuya et al.(2000) observaram que vários isolados de FMA, nativos e não nativos de solos degradados com altos níveis de metais e alta acidificação, não estimularam o crescimento das plantas, quando comparado com o controle sem micorriza. Os autores explicam que isto poderia ser atribuído ao desequilíbrio custo-benefício da simbiose micorrízica nos solos contaminados estudados ou à maior absorção de metais pesados por plantas M.

Apesar de a colonização da raiz pelo FMA não ter sido alta, em torno de 20%, o que pode ter ocorrido em conseqüência de certa compactação do solo no vaso, os resultados de nutrição da planta e de produção de MS foram afetados significativamente pelo estabelecimento da micorriza, o que confirma o fato, já bem estabelecido, de falta de correlação entre abundância de colonização e efeito

da simbiose.

Nas condições experimentais específicas do presente trabalho ficou evidente o efeito benéfico da micorriza sobre o crescimento da planta, mas também a sensibilidade da simbiose micorrízica ao excesso de Pb no solo. Concentrações maiores de Pb no solo provavelmente provocariam reduções importantes no crescimento da planta, assim como um maior custo para a manutenção da simbiose podendo, inclusive, alterar seu caráter mutualístico.

A saturação por bases de 63% (V_1) foi a que mais favoreceu o estabelecimento do fungo na raiz e a produção de matéria seca da soja (Figura 2), o que, provavelmente, esteja relacionado às melhores condições rizosféricas da soja nessa saturação por bases. Essa saturação por bases é a recomendada para a cultura da soja (van Raij et al. 1996). Ao contrário, El-Kerbawy et al. (1989) obtiveram aumento significativo da colonização micorrízica da leguminosa *Medicago sativa* com a elevação do pH (de 6,0 a 7,2) de solo contaminado com Zn e Cd. No solo com V_1 (63%) a colonização sofreu uma forte redução com o incremento da dose de Pb adicionada ao solo (Figura 2), o que pode estar relacionado a uma maior disponibilidade do Pb, devido ao menor pH do solo, mesmo que o extrator DTPA não tenha refletido diferença na disponibilidade do Pb no solo (Tabela 1). Geralmente, o efeito maléfico do metal é mais intenso em solos com baixos valores de pH, devido à sua maior solubilidade.

A redução na colonização relacionada a níveis excessivos de metais pesados no solo tem sido amplamente relatada na literatura (Gildon e Tinker,

1983; El-Kerbawy et al., 1989 e Siqueira et al., 1999). Não se constatou, entretanto, correlação significativa entre o teor e acúmulo de Pb na parte aérea da soja com a colonização micorrízica. Isto pode significar que houve um efeito direto do Pb sobre os propágulos infectivos do FMA e/ou que o Pb absorvido e acumulado no sistema radicular interferiu negativamente no estabelecimento da associação. Nesse aspecto, Nogueira (1996) explica que vários metais mostraram efeito fungitóxico, reduzindo a germinação de esporos, o crescimento micelial, a abundância de arbúsculos e conseqüentemente a colonização da raiz de plantas crescendo em solos com excesso de metais. Dessa forma, a diminuição da colonização pode acarretar prejuízos para a simbiose, que tanta relevância tem na nutrição de plantas, especialmente em condições de estresse.

Tem sido observado que diferentes ecotipos de FMAs mostram diferentes graus de tolerância ao excesso de metais no solo (Gildon e Tinker, 1983, Del Val et al. 1996; Weissenhorn et al., 1993; Shetty et al., 1995). Portanto, a presença de alta colonização micorrízica em plantas de área poluída com metais poderia indicar a tolerância dos fungos micorrízicos, assim como funcionalidade da simbiose em condições de estresse metálico. Ecotipos isolados de locais contaminados com metais têm se mostrado mais eficientes na colonização de plantas de solos com esse tipo de estresse do que isolados de referência obtidos de solos não contaminados (Nogueira, 1996).

Enkhtuya et al. (2000) sugerem outros indicadores para a avaliação do efeito de solos poluídos com metais pesados sobre a micorrização, como o crescimento do micélio extramatricial e a atividade NADH diaforase, os quais

poderiam refletir melhor o efeito das altas concentrações de metais sobre o estabelecimento e funcionamento da micorriza do que a avaliação da colonização intrarradicular pelo FMA.

Apesar do crescente interesse em se determinar o papel de FMAs em ambientes com concentrações potencialmente tóxicas de elementos metálicos, os resultados da literatura mostram grande divergência, evidenciando-se tanto a diminuição quanto o aumento na absorção de metais, ocorrendo ou não proteção da planta do efeito prejudicial desses metais. Estudos ecofisiológicos sobre o mecanismo de tolerância e adaptação de FMAs a esse tipo de estresse são de grande importância devido ao potencial de uso da inoculação de FMA na prática de revegetação de solos degradados, assim como a contribuição desse tipo de estudo ao entendimento da ecologia e funcionalidade dessa importante simbiose em ecossistemas degradados.

Quanto à absorção de Pb pela planta, observou-se que a saturação por bases foi o fator que mais afetou o teor de Pb na parte aérea da soja, provavelmente devido à influência sobre o pH do solo, o qual influenciou a disponibilidade de Pb para as plantas. O teor de Pb na parte aérea da planta foi maior no V_1 de 63%,e pH em torno de 5,4, do que no V_2 de 82%, pH de 6,5 (Tabela 1).

Os teores de Pb na parte aérea da soja estiveram diretamente relacionados com o aumento da dose de Pb adicionada ao solo. Nas doses de 150 e 300 mg dm^{-3} de Pb e no solo com V_1, os teores de Pb na parte aérea da soja excederam

substancialmente valores considerados fitotóxicos (10-20 mg kg^{-1}) e zootóxicos (10-30 mg kg^{-1}) (Sauerberk, 1982), ultrapassando os limites máximos permitidos em alimentos de origem vegetal (0,5 mg kg^{-1}) (ABIA, 1998). Os resultados sugerem que a colonização micorrízica não protegeu a planta da acumulação de Pb, já que soja M crescendo no solo com as doses mais altas de Pb apresentou teores tóxicos de Pb na parte aérea. Entretanto, observou-se que o teor de Pb da parte aérea da soja M foi menor (32%) do que observado em soja NM, no V de 63%, não ocorrendo, em nenhum dos casos, efeito visual de toxicidade de Pb. Esses resultados, corroboram os de El-Kerbawy et al. (1989) e Heggo et al. (1990) que observaram que a colonização da soja por FMAs reduziu a concentração de metais na planta em solo com altos níveis de metais e sugeriram que o efeito do FMA na absorção de metais depende da sua disponibilidade no solo. Bradley et al. (1982) também observaram diminuição do teor de metais pesados causada pela colonização micorrízica, e propuseram que o conjunto de hifas do fungo fornece superfícies adsortivas dentro das células corticais do hospedeiro, evitando dessa forma a translocação para a parte aérea.

Leyval et al. (1991) observaram que o conteúdo de Zn, Cu e Pb do milho diminuiu com a colonização micorrízica nos solos mais fortemente poluídos, mas não nos solos com menor índice de poluição metálica; fungos indígenas de local poluído com lodo foram menos sensíveis em relação aos de local não poluído, sugerindo que FMAs de solos poluídos por lodo com excesso de metais adquirem tolerância ao excesso de metais. Diaz e Honrubia (1995), da mesma forma, utilizando populações de FMA nativos observaram que o Pb foliar de *Anthyllis*

cytisoide micorrizada diminuiu em relação às plantas NM, crescendo em solo contaminado com Pb. Entretanto, Killham e Firestone (1983) observaram um aumento no teor de Pb de plantas M, em solos com altos níveis desse metal e em condições ácidas.

Os resultados obtidos para o P na parte aérea corroboram o importante papel dos fungos micorrízicos na absorção deste elemento pela planta. O P foi o único macronutriente avaliado que não sofreu efeito de diluição causado pelo maior crescimento da planta M (Figura 4), apresentando maior teor e acúmulo de P. A redução do P acumulado na parte aérea de plantas M, na menor das V%, com o incremento do nível de Pb, poderia sugerir uma perda de eficiência da associação micorrízica nas mais altas doses de Pb adicionadas ao solo, diminuindo a absorção de P e reduzindo a produção de MS do hospedeiro (Figura 4.b). Isso foi confirmado pela correlação positiva entre produção de MS e o teor e acúmulo de P, como já discutido.

Apesar disso, as plantas M mantiveram relações P/Pb maiores, em torno de 30%, do que as observadas em plantas NM. A diminuição da relação P/Pb com a adição de doses crescentes de Pb no solo foi menor em plantas M, e na maior das saturações por bases estudadas. Assim, no V_1 (63%) a redução da relação P/Pb com o aumento do Pb no solo foi 60 e 30 vezes menor, em plantas M e NM, respectivamente, comparando-se a dose máxima de Pb e a dose 0. Isso pode indicar certa proteção da associação micorrízica à planta, em condições de estresse por excesso de metal no solo. A planta M apresentou maior acúmulo de P além de um menor teor de Pb na parte aérea Figura 4.a e 3.a). Assim, a soja M,

devido à melhor nutrição fosfatada, cresceu mais do que a soja NM, diluindo a concentração de Pb nos tecidos, o que reduziu os possíveis efeitos tóxicos desse elemento na planta, principalmente na V de 63%.

Diaz et al. (1996) sugeriram que o melhor estado nutricional, sobretudo no que se refere ao acúmulo de P na parte aérea da planta M, alivia os sintomas de toxicidade causada pelo excesso de metais nos tecidos. Isso tem como conseqüência maiores relações P/metal em plantas com o microssimbionte. Shetty et al. (1995) observaram, também, que plantas M eram capazes de manter uma relação P/Zn, maior do que plantas NM, em solo com altos níveis de Zn (500 mg kg^{-1}), sugerindo que o P fornecido pelo FMA atenuou a toxicidade do Zn e aumentou a tolerância da planta. Van Stevenick et al. (1987) propõem um envolvimento direto do P na neutralização de Zn, formando fitato de Zn, ou indiretamente fornecendo energia metabólica, na forma de ATP, para a compartimentalização do Zn em vacúolos celulares (Davis et al., 1991). No presente experimento um mecanismo semelhante pode ter sido responsável pela diminuição dos efeitos tóxicos do excesso de Pb nas plantas M.

Tanto o teor quanto o acúmulo de Ca, Mg, Fe, Zn, e Mn na parte aérea da soja foram afetados pela inoculação do FMA e pela V% do solo. Entretanto, esses resultados foram pouco úteis na explicação do efeito do incremento do nível de Pb no solo sobre a planta, tendo ocorrido aumentos significativos na menor das saturações por bases (Figuras 5 e 6). O teor e o acúmulo de Mn na parte aérea da planta foram afetados pelo aumento do Pb no solo, aumentando significativamente com o incremento da dose de Pb adicionada ao solo na V_1 de 63% (Figuras 6.a e

6.b). O Mn extraível pelo DTPA não variou com o aumento do teor de Pb no solo (Tabela 1), sugerindo que o aumento de Mn na parte aérea pode ter sido devido a uma mudança no padrão de translocação do Mn da raiz para a parte aérea. O teor e o Mn acumulado na parte aérea da soja correlacionaram-se com o teor e o acúmulo de Pb, de forma positiva ($r = 0,79$ e $0,71$, respectivamente) e significativa ($p<0,01$), confirmando esse possível efeito do Pb na absorção do Mn.

Vários trabalhos têm constatado aumento no teor de nutrientes, além do P, como conseqüência da colonização micorrízica (Pacovsky, 1986, Kothari et al., 1990, Thomson, 1990). Tal fato não foi constatado no presente experimento. Em termos gerais, plantas M tiveram menores teores de Ca, Mg e Zn do que plantas NM, sendo que somente o Fe mostrou maiores teores em plantas M. Já foi sugerido por Plenchette et al. (1983) que o aumento do teor de um nutriente pode estar simplesmente relacionado com o requerimento específico dele pela planta. Também sugerem que a queda no teor de vários elementos minerais em plantas M pode ser devido ao efeito de diluição causado pelo maior crescimento, o que pode se refletir em quantidades acumuladas de um determinado elemento similares em plantas M e NM.

Os resultados mostraram que os efeitos do estresse causados pelo excesso de Pb no solo podem ser parcialmente amenizados pela inoculação de FMA ou pelo aumento da V% do solo, para a soja. O papel da micorriza mostrou-se de especial relevância na menor V%, reduzindo significativamente os teores de Pb na parte aérea da soja. Sugere-se que o melhor estado nutricional, assim como a possível imobilização do metal no micélio e raízes colonizadas pelo FMA

reduziram as concentrações de Pb na planta quando comparadas com plantas NM. A maior relação P/Pb de plantas M pode estar relacionada também com uma maior tolerância das plantas ao excesso do metal. O efeito direto do metal no micossimbionte poderia reduzir a eficiência da simbiose, provocando diminuição do crescimento e/ou sintomas de fitotoxicidade. O incremento do pH do solo reduziu a disponibilidade de Pb no solo, enquanto que a inoculação do FMA, provavelmente, causou imobilização do metal na parede celular das hifas, reduzindo a quantidade translocada para a parte aérea da planta. A maior quantidade de P absorvida por plantas M estimulou o crescimento da planta, protegendo-a indiretamente da toxicidade do Pb. Mesmo assim, a redução do crescimento de plantas colonizadas por FMA pode estar relacionada com o efeito deletério do Pb diretamente sobre o fungo, afetando o bom funcionamento da simbiose e resultando em uma diminuição do crescimento do hospedeiro, devido, possivelmente, ao desequilíbrio na relação custo - benefício entre os simbiontes.

5.2. Experimento II

5.2.1. Estabelecimento das simbioses e resposta da planta

A produção de MS da soja nas condições do experimento não foi afetada pela adição de Pb ao solo. Nem mesmo nas mais altas concentrações de Pb no solo foram observados sintomas de toxicidade devido ao excesso de Pb (Figura 7.a). Esses resultados contrariam o esperado, pois sabe-se que o excesso de metal pesado pode afetar o desenvolvimento da planta (Dueck et al., 1986, Bethenfalvay et al., 1989). No presente experimento, o aumento no nível de Pb no

solo afetou somente o número de vagens produzidas mas não sua massa (Figura 7.b e 7.c).

A inoculação do FMA, nas plantas colhidas tanto na época do florescimento como na maturação do grão, causou maior crescimento das plantas, sendo a diferença mais acentuada na maturação do grão, quando as plantas M mostraram-se 100% maiores do que as NM. O efeito benéfico da inoculação do FMA também refletiu-se no número e produção de MS das vagens (Figura 7.b e 7.c). As maiores quantidades acumuladas de P, Ca, S, N, Mg e K e os teores mais altos de P, K, S e N apresentados por plantas M podem ter contribuído para o maior crescimento e produção de vagens. Schenck e Hinson (1973) já tinham observado que, como outras espécies vegetais, a soja encontra-se entre as que respondem à inoculação de FMA, aumentando tanto o crescimento quanto a produção de grãos, mesmo em condições de campo. Posteriormente, outros autores mostraram tal efeito micotrófico da soja, nas mais diversas condições de solo, com diferentes culltivares e espécies de FMA (Cardoso, 1985, Pacovski, 1986). Conforme Hayman (1983), o efeito positivo das micorrizas na absorção de P, em solos deficientes neste elemento, parece ser uma das principais causas do maior crescimento de plantas colonizadas por fungos micorrízicos. Como o P é um elemento de baixa difusão no solo, os FMAs por meio das hifas extrarradiculares aumentam o volume de solo explorado, aumentando a área de absorção da raiz, o que contribui para o maior crescimento das plantas M (Rhodes e Gerdemann, 1975).

O número e MS dos nódulos somente foram considerados na fase de maturação do grão, já que no florescimento a nodulação ainda era incipiente e não

houve diferença significativa entre os tratamentos. Assim, a nodulação da soja foi significativamente maior nas plantas M, fato já constatado por outros autores (Barea e Azcón-Aguilar, 1987). A MS dos nódulos de plantas M mostrou uma redução significativa com o aumento na concentração de Pb no solo, o que não ocorreu com o número de nódulos, isto é, o Pb somente afetou o desenvolvimento dos mesmos, reduzindo o seu crescimento (Figura 7.d e 7.f). Como o teor e o acumúlo de N na parte aérea não foram afetados pelo aumento de Pb no solo (Figuras 10.a e 11.a), torna-se difícil dizer se a simbiose soja-rizóbio sofreu algum efeito negativo devido aos altos níveis de Pb adicionados ao solo. No entanto, pode-se afirmar que na presença de ambos os microssimbiontes o acúmulo de N foi significativamente maior, o que concorda com os resultados de Barea e Azcón-Aguilar (1987). Ibekwe et al. (1996) observaram que o rizóbio que nodulou a alfafa foi menos sensível do que a planta ao excesso de Zn e Cd no solo, sendo que até nas mais altas doses desses metais houve fixação de N_2. Casella et al. (1988) sugerem que as células de rizóbio têm duas opções ecológicas para situações de excesso de metais no solo, um estado livre irreversível, no qual perderiam o plasmídeo que lhes permite nodular, resistente a metais, ou podem optar por um estado simbiótico em que estariam protegidos dos metais existentes, no interior da raiz do hospedeiro, adquirindo uma resistência aos metais dependente da planta. Portanto, sugere-se que o interior do nódulo proporcionou proteção ao rizóbio e a sua atividade fixadora, do excesso de Pb no solo, e que o crescimento nodular foi afetado devido possivelmente a um maior estresse metabólico nas raízes causado pelo possível acúmulo de Pb nesse local. Entretanto, Heggo et al. (1990), trabalhando com soja M nodulada por *Rhizobium japonicum* em solos com

diferentes níveis de Zn e Cd, obtiveram resultados diferentes, pois o excesso de metais reduziu, além do crescimento da planta, o número de nódulos.

Constatou-se que a adição de 600 mg dm^{-3} de Pb no solo não foi suficiente para causar diminuição no crescimento da soja. Entretanto, possivelmente, no nível fisiológico a planta sofreu estresse já que a produção de vagens de plantas M e o crescimento nodular foram afetados negativamente pelo incremento do Pb no solo, devido, provavelmente, ao alto teor de Pb apresentado na parte aérea na dose mais alta (20-28 mg kg^{-1}), o qual já é considerado por Sauerberck (1982) como fitotóxico.

Quanto à colonização da raiz pelo FMA e ao número de esporos produzidos no final do ciclo da planta observou-se que ambos foram reduzidos significativamente pela adição de Pb ao solo (Figura 8). A diminuição na colonização micorrízica chegou a ser de 56% na época do florescimento, mas não alcançou valores tão baixos como os observados por Siqueira et al. (1999), os quais registraram valores próximos a 0 em solos com altos níveis de Zn, Cd, Pb e Cu. Esses resultados concordam com os obtidos por outros autores com outras espécies vegetais e metais (Gildon & Tinker, 1983; Roldan & Albadalejo, 1993; Vidal et al., 1993). Em soja, Heggo et al. (1990) também constataram que a colonização da raiz foi afetada negativamente pela alta concentração de Zn e Cd no solo. McGee (1987) também observou redução da colonização micorrízica em solo com alta concentração de Mn. Da mesma forma, Del Val et al. (1999) constataram redução significativa da colonização de raízes de *Allium porrum* e *Sorghum bicolor* por diferentes espécies de *Glomus* em solo com adição de lodo de esgoto contendo altos teores de Zn, Cd, Ni e Pb, além de forte diminuição na

formação de arbúsculos e na extensão do micélio externo. Diminuição na formação de estruturas típicas da simbiose micorrízica, como arbúsculos e vesículas, e mudanças na morfologia do micélio interno foram também observados por Vidal et al. (1996). Esses autores verificaram que, em milho colonizado por *Glomus mosseae*, que, houve uma redução na colonização causada por altas concentrações de Zn, Cd e Cu no solo, além de ter ocorrido uma diminuição da presença de arbúsculos devido às altas concentrações de Zn.

Em contraste com esses resultados, Shetty et al. (1994) não observaram efeitos significativos de excesso de Zn (1000 mg kg^{-1}) na colonização micorrízica de *Andropogon gerardii*. Griffioen et al (1994) observaram que *Agrostis capillaris* estava fortemente colonizada por FMAs em locais próximos a refinaria de Zn. Ietswaart et al. (1992) verificaram que não houve diferença na colonização da raízes de *Agrostis capillaris* crescida em solo arenoso poluído e solo argiloso-calcário com e sem adição de metais.

No que se refere à produção de clamidosporos pelo FMA, os resultados obtidos indicam que o número de esporos produzidos por grama de solo foi significativamente reduzido tanto em função da dose de Pb adicionada ao solo quanto ao Pb extraído pelo DTPA. Essa redução da esporulação foi de 70% na dose de 600 mg dm^{-3} de Pb. Seguindo a tendência linear da análise de regressão, uma adição de 800 mg dm^{-3} de Pb no solo teria eliminado por completo a produção de esporos do fungo nas condições específicas do solo utilizado neste experimento. Diaz et al. (1996) mostraram que, apesar de a colonização micorrízica de *Medicago sativa* manter-se constante, em solos de área de mineração contendo Zn e Pb (240 e 450 mg dm^{-3} de Zn e Pb extraídos pelo DTPA,

respetivamente), o número de esporos de FMA foi menor que o encontrado em solo adjacente sem excesso de metais. Em estudos anteriores, Diaz e Honrubia (1995) verificaram uma diminuição da germinação de esporos de FM e menor colonização de espécies nativas da Espanha em solo de área minerada por Zn e Pb. Dessa forma, a redução observada no número de esporos pode ter sido conseqüência direta da menor colonização observada nos altos níveis de Pb no solo, que por sua vez pode ser reflexo de uma menor taxa de germinação dos esporos presentes no inóculo utilizado, ou como também de outros efeitos na fisiologia do fungo e da planta.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, os quais mostraram que doses de Pb entre 300 e 600 mg dm^{-3} causaram redução na colonização da raiz pelo FMA que não foi acompanhada de redução significativa de produção de MS pela planta, pode-se dizer que a redução da colonização ocorre em doses de Pb abaixo das doses necessárias para diminuir o crescimento da planta. Essa sensibilidade do fungo ao excesso de Pb no solo pode ter um efeito prejudicial ao bom funcionamento da simbiose, pois se além da redução na colonização da raiz, estruturas de crucial importância para o bom funcionamento da simbiose, como o micélio externo e os arbúsculos podem ter sido reduzidos, comprometendo a planta hospedeira, afetando tanto o balanço nutricional como o fisiológico, de forma a eliminar até mesmo o caráter mutualista da simbiose.

Apesar dos resultados geralmente negativos, outros trabalhos indicam que pode ocorrer uma adaptação do fungo micorrízico ao excesso de metais no solo. Assim, Weissenhorn et al. (1995 a, b) encontraram um alto índice de colonização em solos agrícolas contaminados com MPs de diferentes origens, incluindo a

deposição atmosférica de uma siderurgia e aplicação de lodo, indicando um alto potencial do inóculo. Turnau et al. (1996) observaram que a colonização de *Oxalas acotovela* foi alta mesmo em solos com altos níveis de Zn e Cd. A colonização micorrízica nessas observações "in situ" sugere uma tolerância dos FMAs ao excesso de alguns metais no solo.

A importância de fungos micorrízicos em ecossistemas naturais e na revegetação de áreas degradadas que possuem altos níveis de metais enfatiza a necessidade de empregar ecotipos de FMA tolerantes ao excesso de metais, garantindo a eficiência da simbiose. Dessa forma diferentes autores têm mostrado a adaptação de FMAs isolados de solos com altas concentrações de metais, sendo que estes mostram-se mais tolerantes ao excesso de metais que outros ecotipos provenientes de solos não contaminados (Del Val et al. 1999; Weisenhorn et al., 1999; Diaz e Honrubia, 1995 e Gildon & Tinker,1983). A alta plasticidade fenotípica desse tipo de fungo explica, em parte, a rápida adaptação ao excesso de certos metais no solo.

Mais pesquisa é necessária para elucidar os mecanismos pelos quais o Pb interfere com as células fúngicas diminuindo o seu potencial de infecção radicular e produção de esporos. Devido às diferenças entre os resultados observados na literatura, conclui-se que as interações entre diferentes espécies/ecotipos de FMA, espécies vegetais e diferentes tipos de solos mostram-se especialmente complexas no que se refere ao efeito de excesso de metais no solo, merecendo cada caso uma avaliação particular.

Apesar de existir muita informação sobre o efeito de fungos micorrízicos na absorção de nutrientes, há muito pouca sobre elementos não essenciais, como o

Pb, e, principalmente, resultados obtidos em condições de solos tropicais. Um dos objetivos deste trabalho foi questionar se plantas de M seriam de alguma forma protegidas ou prejudicadas pelo excesso de Pb no solo.

Os resultados obtidos mostraram, para todos os tratamentos, uma correlação significativa positiva entre a dose de Pb adicionada ao solo e o teor de Pb na parte aérea da planta (Figura 9.a). Houve alta correlação tanto entre a dose de Pb adicionada e o Pb extraído pelo DTPA quanto entre a concentração de Pb na planta e o disponível no solo. Assim, quanto maior o teor de Pb disponível no solo maiores concentrações desse elemento foram encontradas na parte aérea da planta, o que sugere que o teor encontrado na planta pode ser um bom indicador da toxicidade potencial de um determinado metal no solo (Saueberck, 1982). Embora o crescimento da planta não tenha sido significativamente afetado pelos altos níveis de Pb disponíveis no solo, as plantas apresentaram teores que ultrapassaram os valores normalmente encontrados em plantas (< 0,5 mg. kg^{-1}) e chegaram aos limites considerados fitotóxicos e zootóxicos (Sauerberk, 1982), para aplicações de Pb no solo maiores de 300 mg dm^{-3}.

Heggo et al. (1990) também constataram uma redução, de cerca de 25%, na concentração de metais na parte aérea de soja M e NM crescendo em solos com excesso de Zn e Cd (862 e 8,71 μg g^{-1} de Zn-DTPA e Cd-DTPA, respectivamente). Diaz e Honrubia (1995), estudando o efeito da simbiose *A. cytisoides*-fungo micorrízico na absorção de Zn e Pb em altas concentrações no solo (370 e 240 mg kg^{-1} de Pb e Zn DTPA), observaram uma redução na concentração desses metais em plantas M em relação às plantas NM. Entretanto,

Killham e Firestone (1983) encontraram que *Erharta calycina* colonizada por FMA mostrava uma maior absorção de metais pesados, entre eles o Pb, em condições de solo ácido, em relação a plantas NM. Já Diaz et al. (1996) observaram diferenças na absorção de Pb e Zn de plantas M e NM em função da tolerância do endófito ao excesso de metais no solo. Dessa forma, plantas colonizadas com isolado proveniente de solo contaminado apresentaram teores mais baixos de metais que plantas NM. Entretanto, plantas com o isolado de área não contaminada por metais pesados mostraram teores similares aos das plantas NM.

O teor mais baixo da maioria dos nutrientes observado em plantas M pode ser visto como uma conseqüência do maior crescimento destas em relação às NM, devido ao efeito de diluição causado pelo maior crescimento das plantas, como sugerido por Plenchette et al. (1983). Observou-se, no entanto, que na época de maturação do grão a soja M apresentou uma produção de MS 140% maior que soja NM, e o acúmulo de Pb foi de até duas vezes maior nas plantas M em relação às NM (Figura 9.b). Portanto, sugere-se que esses resultados devam ser interpretados com cautela já que o efeito considerável na acumulação de Pb foi devido à grande diferença no crescimento da planta coletada no final do ciclo.

Um dos mecanismos de proteção ou de barreira à translocação de Pb da raiz à parte aérea nas plantas com raízes colonizadas por fungos micorrízicos é a adsorção de Pb na raiz e/ou no micélio intra e extrarradicular, evitando a sua movimentação aos órgãos superiores da planta, como foi sugerido por Galli et al. (1994). Além disso, sugeriram uma possível retenção de metais pesados no micélio fúngico, adsorvidos aos sítios eletronegativos da parede celular e na cápsula glicoproteinácea no exterior da hifa. Dessa forma, Denny e Ridge (1995)

mostraram, por meio de estudos com microscopia eletrônica, uma proporcionalidade direta entre a quantidade de Zn adsorvida pelos diferentes isolados de FMAs e sua capacidade de minimizar a toxicidade pelo excesso de Zn em *Calluna vulgaris*. Esses autores observaram que o microssimbionte tolerante possuía maior quantidade de cápsula que o não tolerante. Também foi sugerido que o endófito proporciona superfícies adsortivas dentro das células corticais do hospedeiro, excluindo o metal da parte aérea.

Haselwandter et al. (1994) ressaltam que os estudos realizados até o momento sobre o efeito de micorriza em solos poluídos com metais não utilizam nenhum tipo de corante específico para células vivas na estimativa da colonização da raiz. Portanto, existe dúvida sobre a viabilidade do fungo fora e dentro da raiz. Isso limita a importância ecológica dos dados na avaliação do papel dos fungos micorrízicos em habitats contaminados com metais. O micélio extrarradicular de fungos micorrízicos é de grande importância não só na fixação de metais à parede celular, independente do metabolismo, mas também, e provavelmente de maior relevância, na absorção intracelular de metais, dependente do metabolismo, e seu transporte à planta hospedeira (Leyval et al. 1997). Devido à variedade de fatores que influenciam a resposta do FMA à maior ou menor absorção de metais e a sua translocação à planta hospedeira, outros estudos devem ser realizados. Neste contexto, mostram-se promissores os experimentos em vasos compartimentalizados, nos quais separa-se o volume de solo explorado pela raiz e pelas hifas extrarradiculares. Além disso, são importantes pesquisas que utilizam elementos marcados proporcionando uma diferenciação entre o absorvido pela planta e pelas hifas, assim como o uso de outros corantes específicos para células

vivas para determinar o grau de colonização. Devem ser melhor elucidadas as relações da simbiose com os fatores físicos e químicos do solo e os mecanismos de tolerância de isolados de FMA tolerantes a metais, plasticidade fenotípica e variabilidade do material genético.

O fungo micorrízico *Glomus macrocarpum* não protegeu a planta do excesso de Pb presente no solo, já que as plantas acumularam níveis considerados fitotóxicos quando o Pb foi adicionado ao solo em concentrações maiores que 300 mg dm^{-3}. Devido provavelmente à maior absorção de P, o crescimento foi estimulado e as plantas M apresentaram concentrações menores de Pb na dose mais alta de Pb adicionada. Portanto, mesmo que o FMA não tenha conferido proteção ao excesso de Pb no solo, a planta foi beneficiada pela presença do endófito devido ao melhor estado nutricional que este lhe conferiu.

Com relação à absorção de N, P, K, Ca, Mg e S pode-se dizer que, de maneira geral, as plantas M tiveram concentrações e quantidades acumuladas maiores que as encontradas em plantas NM. Devido ao maior crescimento de plantas M ocorreu efeito de diluição de alguns elementos na fase de maturação do grão, onde houve maior produção de MS em relação ao florescimento. O efeito do Pb apareceu de forma mais notável na absorção de Ca, Mg e S; no entanto, não afetou o teor e acúmulo de N e K (Figuras 10 e 11).

O N foi um dos elementos que sofreram grande efeito de diluição na planta (Figuras 10.a e 11.a). O teor de N foi influenciado tanto pelo FMA quanto pela época de avaliação, não sendo observado efeito significativo do incremento do Pb no solo. Já o acúmulo de N na parte aérea, foi, em geral, maior nas plantas M,

principalmente na fase de maturação do grão. O N acumulado na parte aérea não foi afetado pelo incremento na dose de Pb adicionada ao solo. Esses resultados concordam com Barea e Azcón-Aguilar (1987), que trabalhando com a técnica de ^{15}N, observaram que plantas da leguminosa *Hedysarium coronarium*, noduladas por *Rhizobium* sp. e colonizadas com FMA apresentaram maiores acúmulos de N na parte aérea do que equivalentes sem colonização de FMA. Tal resultado foi devido a uma maior absorção de N presente no solo; além disso houve estimulação da fixação biológica de N_2 em plantas M, favorecidas pela melhor nutrição fosfatada, que favoreceria a simbiose rizóbio-leguminosa. Heggo e Angle (1990) observaram maiores acúmulos de N foliar em soja M, o que foi atribuído à maior exploração radicular dessas plantas e a um subseqüente aumento na absorção do N do solo e à maior fixação de N_2 de plantas com FMA. Esses autores também observaram variação no acúmulo de N das folhas com o tipo de solo, o qual diferia com maior ou menor disponibilidade de metais pesados (Zn e Cd) e com o pH. Os resultados do presente experimento não mostraram efeito significativo do Pb na absorção de N, e/ou fixação de N_2. Como o N é um dos nutrientes que mais influencia o crescimento da planta, o fato de não ter sido afetado pelo excesso de Pb no solo pode explicar, em parte, a falta de redução na MS produzida pela soja com a elevação do teor de chumbo no solo. O excesso de N fornecido como nitrato com a fonte de Pb (nitrato de Pb), principalmente nas doses mais altas aplicadas, não afetou a absorção de N pela planta e nem a fixação do N_2 pelo rizóbio.

O maior teor e acúmulo de P em plantas M indicou que esse elemento não

mostrou efeito de diluição, em relação às plantas NM, porque apesar de plantas M terem tido uma maior produção de MS, tiveram maiores teores do elemento nos tecidos (Figura 10.b). O maior teor de P encontrado em plantas colonizadas na época do florescimento em relação à fase de maturação do grão, provavelmente, foi devido a um efeito de diluição causado pela maior MS produzida pela soja nesse estádio. Hayman (1983) também mostrou efeito positivo na absorção de P em plantas colonizadas por FMA em solos com baixa disponibilidade desse nutriente, como resultado da capacidade dos FMAs em explorar microssítios adicionais no solo. Ambos, teor e acúmulo de P na parte aérea da soja, não foram afetados significativamente pelo aumento do Pb no solo, exceto no tratamento com inoculação do FMA no florescimento, no qual o acúmulo de P mostrou efeito quadrático (Figura 11.b). Estes resultados foram diferentes dos obtidos por Diaz et al.(1996), que verificaram que o teor de P foliar de plantas colonizadas por FMAs foi logaritmicamente reduzido pelas altas concentrações de Zn e Pb no solo. Além disso, as altas concentrações de MPs afetaram de certa forma a simbiose, decrescendo conseqüentemente a absorção de P. El-Kherbawy et al. (1989) constataram diminuição dos teores de P na parte aérea com o aumento da disponibilidade de MPs e a diminuição do pH. Já Medeiros et al. (1994) não encontraram mudanças no teor e no acúmulo de P em raízes e na parte aérea de sorgo devidas ao excesso de Mn no solo.

Apesar do fungo micorrízico não ter sido afetado pela adição de Pb ao solo, da falta de correlação entre o percentual de raiz colonizada e a absorção de P pode-se inferir que a simbiose de certa forma forneceu P ao hospedeiro,

mantendo-se funcional no que se refere ao aporte de P. Sugere-se também que o P possa estar envolvido na desintoxicação de Pb nas plantas, já que moléculas de ácido fítico podem estar envolvidas no seqüestro de Pb em algumas espécies de plantas, ou o P pode proporcionar energia metabólica, na forma de ATP, para uma possível compartimentalizaçao do Pb em vacúolos (Van Stevenick et al., 1987; Davies te al.,1991). Dessa forma plantas M foram favorecidas em ambientes com excesso de metais, devido à maior absorção de P. É interessante observar que a razão P/Pb mostrou uma tendência de diminuição com o incremento de Pb no solo, e que plantas M foram capazes de manter maiores relações P/Pb nos mais altos níveis de Pb do que plantas NM. Isso concorda com os resultados obtidos por Shetty et al. (1994), para *A. gerardii* em solo com excesso de Zn. Assim, sugere-se que se a nutrição de P é fator crítico para a tolerância da planta ao excesso de metais pesados, entre eles o Pb: as plantas M têm melhor condição de sobreviver em solos com excesso de Pb.

O teor de S foi, em geral, maior em plantas M, principalmente no florescimento (Figura 10.f). Já a quantidade acumulada de S pelas plantas M foi significativamente maior do que as plantas NM, sendo este efeito maior na fase de maturação do grão (Figura 11.f). Siqueira et al. (1999) trabalhando com espécies arbóreas crescidas na presença de excesso de MPs, comentam que as plantas M mostraram maiores teores de S que as NM. Já Medeiros et al.(1994) não observaram variações significativas no teor e acúmulo de S da parte aérea do sorgo devida ao excesso de Mn. O enxofre tem sido associado a processos de desintoxicação de metais ou à proteção das plantas ao excesso de metais. Os

resultados deste experimento podem sugerir que plantas NM sofreram redução no acúmulo de S nas mais altas doses de Pb no solo e que plantas M foram capazes de manter o acúmulo de S constante ao longo das diferentes doses de Pb adicionadas ao solo. A micorriza pode estar conferindo à planta uma maior capacidade de sobreviver ao estresse causado pelos altos teores de Pb. O S em quantidade maior nas plantas M pode estar seqüestrando o metal, evitando efeitos prejudiciais a enzimas ou outros componentes celulares. Reddy e Prassad (1990) constataram que a soja é uma das espécies vegetais capazes de produzir metaloproteínas, proteínas com alto conteúdo em cisteínas, que ligam cátions divalentes. Soja M devido ao maior acúmulo de S pode estar em condições de manter altas concentrações desse tipo de proteína amenizando o estresse pelo excesso de Pb no solo.

Em resumo, pode-se concluir que plantas M tiveram maiores acúmulos dos principais macronutrientes, N, P, K, Ca, Mg, e S, assim como teores mais altos de P, K e S, e foram menos influenciadas pelo excesso de Pb no solo em relação às homólogas NM. A maior absorção de elementos móveis como o K, Ca, Mg e S por plantas M já foi observada em outros trabalhos (Kothari et al., 1991; Stribley, 1987). Nas plantas NM os acúmulos de Ca, Mg e S diminuíram com a elevação da dose de Pb no solo, não havendo, entretanto, efeito nos teores e acúmulos de N, P e K. Isso pode ter evitado uma redução significativa do crescimento de plantas NM com o aumento de Pb no solo. O fato de os acúmulos de Ca, Mg e S terem tido tendência à redução em função do aumento do nível de Pb no solo, poderia, em parte, explicar a queda na produção de MS da soja, pois os baixos valores de

tais elementos seriam limitantes ao crescimento da planta, além de indicar um possível desbalanço nutricional.

De forma geral pode-se concluir que os teores dos micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn foram mais influenciados pelo aumento do nível de Pb do solo do que os de macronutrientes. Nesse caso as plantas NM avaliadas na fase de maturação do grão foram as mais afetadas. Analisando as diferentes interações entre os tratamentos e seus efeitos nos teores de micronutrientes, constatou-se que o efeito do fungo foi pouco significativo para o Mn e Fe, tendo maior importância para o Cu e Zn. O teor de Cu na parte aérea da planta M sofreu efeito de diluição devido à maior MS produzida. El-Kherbawy et al. (1989) observaram que *Medicago sativa* M apresentou menor teor de Cu que a NM. Já o efeito da inoculação do FMA na quantidade acumulada de Cu na parte aérea da planta foi notável, com acréscimos de até 100% no acúmulo de Cu maior en relação às plantas NM. Gidon e Tinker (1983) demostraram que plantas M absorveram mais eficientemente o Cu presente em baixas concentrações no solo do que plantas NM. Maior absorção de Cu por parte de plantas M também foi relatada por Trinidade et al. (1996), os quais observaram que a absorção de Cu aumentou em mais do 100% devido à inoculação de fungos micorrízicos.

O teor e o acúmulo de Cu na parte aérea da soja tiveram respostas similares em relação ao efeito do Pb. Plantas NM sofreram uma redução de 60% na dose de 600 mg dm^{-3} de Pb, em relação à dose 0. Tanto o teor quanto o acúmulo de Cu e Pb na parte aérea de plantas NM apresentaram correlação significativa e negativa ($r = -0.739$ e $r= -0.551$, respectivamente) o que sugere que

a absorção de Cu foi de alguma forma prejudicada pela maior absorção de Pb e conseqüentemente pelas altas concentrações de Pb no solo.

O teor de Fe na parte aérea da soja NM na fase de maturação do grão foi influenciado negativamente pelo aumento do Pb no solo, com redução de 54% entre a dose mínima e a máxima. Tanto o teor quanto o acúmulo de Fe na soja NM foram negativamente correlacionados com o teor e o acúmulo de Pb na parte aérea, sugerindo um efeito antagônico do Pb na absorção do Fe.

O teor de Mn na parte aérea não diferiu significativamente entre plantas M e NM no florescimento; somente na fase de maturação do grão observou-se maior teor de Mn em plantas NM (Figura 12.b). Pacovsky (1986) verificou que plantas M moderaram a absorção de Mn, mantendo a sua concentração em níveis mais baixos do crítico necessário para atingir toxicidade. Já o acúmulo de Mn na parte aérea, de maneira geral, foi maior em plantas M do que em plantas NM. O teor e o acúmulo de Mn foram afetados significativamente pelo incremento de Pb no solo, em todos os tratamentos realizados, apresentando um ajuste quadrático com acúmulo de Mn em torno de 300 mg de Pb dm^{-3} de solo (Figuras 12.b e 13.b). A absorção de Mn pela planta pode ser considerada um indicador do estresse causado pelo Pb no solo, pois o teor e o acúmulo desse nutriente na parte aérea foram igualmente sensíveis ao Pb adicionado, mostrando o mesmo padrão de resposta.

Com relação ao Zn, que também é um dos nutrientes mais favorecidos pela micorriza, devido à sua baixa mobilidade no solo, observou-se que seu acúmulo

na parte aérea de plantas M foi maior do que em plantas NM, tanto no florescimento como na maturidade. As plantas M, na dose de 600 mg dm^{-3} apresentaram uma relação Zn/Pb na parte aérea maior do que as homologas NM. Isso sugere que a micorrização propiciou a absorção de Zn pela soja, mesmo sob condição de alta disponibilidade de Pb no solo, o que não ocorreu com a planta NM.

Em resumo, constata-se que as plantas M avaliadas no florescimento tiveram os teores de Ca, P, K e S e Cu e Zn maiores do que plantas NM, enquanto que para o Mg, N, Fe e Mn não houve diferença. Na fase de maturação do grão, devido provavelmente ao maior incremento na produção de MS da parte aérea, as plantas M apresentaram menores teores de Ca, Mg, N, Cu, Fe, Mn e Zn em relação às plantas NM. Os teores de P, K e S foram maiores nas plantas M, tanto no florescimento quanto no fase de maturação do grão. Vários estudos têm mostrado o incremento da concentração de nutrientes diferentes do P como conseqüência da formação de micorriza (Pacovsky, 1986, Kothari et al. 1990, Thompson, 1990). O incremento no crescimento ocorrido do florescimento até o final do ciclo foi de 54% em plantas M e de 13% nas plantas NM. Ou seja, dependendo da época de avaliação observaram-se teores mais altos ou mais baixos de nutrientes em plantas M em relação às NM. A queda no teor dos nutrientes em soja M pode ter sido devido simplesmente ao acentuado efeito de diluição causado pelo crescimento, ou seja, como a planta aumentou em tamanho, os teores de nutrientes diminuíram a níveis inferiores aos da soja NM, de forma que a quantidade total do elemento foi maior nas M do que nas NM.

Em razão do efeito da micorrização na absorção e na translocação de nutrientes pode-se concluir que a planta M teve uma nutrição mineral mais balanceada em solos com altos níveis de Pb, provocando maior crescimento da planta, e de maneira indireta, aliviando o estresse causado pelo excesso de Pb, por meio da manutenção de maiores relações P/Pb na parte aérea da planta. Apesar da diminuição na colonização radicular em função do aumento na dose de Pb adicionada, os teores e os acúmulos de alguns nutrientes na parte aérea da soja não se alteraram ou até mesmo aumentaram. Isso confirma a observação de que não há necessariamente relação entre a colonização micorrízica (medida do micélio intrarradicular) e seu efeito na absorção e no transporte de nutrientes para a célula do hospedeiro (Diaz et al., 1996). Assim, com uma menor colonização radicular, as plantas foram igualmente beneficiadas pela micorrização em altas e baixas concentrações de Pb no solo. Os resultados obtidos mostram que apesar de o Pb não ter afetado o crescimento da soja NM, houve redução na absorção de muitos nutrientes essenciais para a planta, sugerindo que, embora a planta não tenha mostrado sintomas visuais de toxicidade de Pb, de alguma forma o seu estado fisiológico está sendo afetado pelo excesso de Pb nos tecidos vegetais.

5.2.2. Biomassa e atividade microbianas do solo:

A medida do C da biomassa tem sido usada como indicador de mudanças na comunidade microbiana do solo sob estresse por excesso de metais pesados. No presente trabalho escolheu-se esta variável para estudar possíveis alterações na microbiota do solo devido principalmente à elevação da concentração de Pb no solo e ao cultivo da soja sob influência do fungo micorrízico, em dois estádios do desenvolvimento da planta.

Observou-se que o C da biomassa microbiana foi, em geral, maior para o solo que recebeu inóculo do FMA (Figura 14.a), sendo que no florescimento não diferiu significativamente entre os tratamentos com e sem inoculação do FMA. Esperava-se, entretanto, que o micélio externo do FMA contribuísse de forma significativa ao C da biomassa neste estádio de desenvolvimento da planta. Sugere-se que tenha ocorrido uma mudança no padrão de exsudação das raízes após a colonização, pois sabe-se que a exsudação radicular de carboidratos, de açúcares redutores e de aminoácidos decresce após o estabelecimento do FMA na raiz (Graham et al., 1981; Dixon et al.,1988). Em conseqüência, pode-se esperar algum efeito seletivo sobre os microrganismos, de forma que no solo ao redor das raízes não colonizadas, haverá maior quantidade de exsudatos, o que favoreceria a comunidade microbiana heterotrófica, refletindo-se no C da biomassa. Como resultado observaram-se valores parecidos ao tratamento que recebeu inoculação, no qual o micélio extrarradicular faz parte da biomassa. Entretanto, no final do ciclo da soja, sem levar em consideração as doses de Pb adicionadas ao solo, o tratamento com inóculo do FMA apresentou o conteúdo de C da biomassa 2,3 vezes maior do que o tratamento sem inóculo, sendo que só na

dose 0 esta diferença foi significativa. Atribui-se essa maior biomassa obviamente à produção de quantidades consideráveis de clamidosporos (Figura 8.b), já que essa é a época na qual começa a esporulação do fungo, aos esporos remanescentes do inóculo e micélio e hifas extrarradiculares.

No que se refere ao efeito da época de avaliação no C da biomassa observou-se que no florescimento, devido provavelmente ao estimulo dado pela maior exsudação radicular ao crescimento da comunidade microbiana, houve biomassa 30% maior que na fase de maturação do grão, período no qual as raízes começariam a senescer e se reduziria a quantidade de exsudatos liberados.

O efeito da adição do Pb ocorreu em ambas as épocas de avaliação nos tratamentos que receberam inoculação do FMA. No florescimento da planta, o C da biomassa microbiana do solo diminuiu significativamente com o aumento da dose de Pb adicionada ao solo (Figura 14.a). Entre a dose 0 e a máxima adicionada houve uma diminuição de 60 % no C da biomassa, parte da qual deve ser devida a uma redução na quantidade de hifas externas do fungo causada pelo efeito prejudicial do Pb. Na fase de maturação do grão, no entanto, a diminuição no C da biomassa foi muito mais drástica caindo em mais de 80% entre a dose 0 e máxima de Pb adicionada. Nesse tratamento, inoculação do FMA e maturação do grão, o C da biomassa correlacionou-se positivamente com o número de esporos (r^2=0,699) e com a porcentagem de colonização da raiz pelo FMA (r^2=0,631). De maneira geral, o Pb disponível e a dose de Pb adicionada estiveram negativamente correlacionados com o C-biomassa, sendo a correlação mais alta no florescimento, e nos tratamentos com inoculação. Isso sugere que o efeito do Pb foi deletéria para o fungo micorrízico presente no solo, e que o grande número

de esporos produzidos pelo FMA, *G. macrocarpum*, contribuiu de forma considerável ao C-biomassa no solo coletado na fase de maturação do grão, quando a esporulação do fungo ocorreu. Como a esporulação reduziu-se 70% entre a dose 0 e a máxima de Pb (Figura 8.b), sugere-se que a significativa diminuição no C da biomassa do solo ocorreu, parcialmente, devido a esta redução no número de esporos nas doses mais altas de Pb aplicadas ao solo. O fato de os solos sem adição do inóculo do FMA não terem sido afetados significativamente pela elevação do nível de Pb do solo sugere que a comunidade microbiana do solo não foi tão afetada pelas altas concentrações deste elemento no solo. Pelos resultados já relatados na literatura, a comunidade fúngica do solo é mais tolerante ou resistente ao excesso de metais do que a comunidade de procariotos, sendo que esta tem menor contribuição ao C da biomassa microbiana de solos com esse tipo de contaminação (Dias-Junior et al., 1998; Kandeler et al., 1996; Flieβbach et al., 1994). Nordgreen et al. (1983) observaram que, em solo contaminado com Cu e Zn, a biomassa fúngica era reduzida e acontecia uma marcante mudança na estrutura da comunidade fúngica ao longo do gradiente de metais pesados. Cotrufo et al. (1995) também encontraram, em solo poluído com metais (Fe, Zn, Cu, Cr, Ni e Pb), que a biomassa fúngica total, determinada por microscopia, era menor que em solo não poluído, e encontraram correlação negativa entre a abundância de fungos do solo e a concentração de Pb, Zn e Cr no solo. Da mesma forma, Biesessar (1982) obteve correlações altamente significativas entre quantidade de fungos e os níveis de Pb e Cd do solo. Os resultados do presente experimento concordam com esses dois últimos trabalhos,

pois constataram grande sensibilidade do fungo, neste caso micorrízico, às altas concentrações de Pb aplicadas ao solo. Portanto, pode-se afirmar que o Pb exerceu, nas condições deste experimento, um efeito negativo sobre o C da biomassa microbiana do solo no qual foi inoculado fungo micorrízico.

Quanto à mineralização do C ou respiração do solo, os resultados também mostraram que os solos que receberam inoculação do FMA apresentaram maior liberação de CO_2 do que o solo sem inoculação (Figura 14.b). Isso pode ser explicado pela contribuição da atividade metabólica das hifas extrarradiculares e outras estruturas do FMA e pelo estímulo causado pelo FMA à comunidade heterotrófica do solo, por exemplo na região chamada de hifosfera micorrízica. No florescimento foi observada a maior atividade respiratória, 50 % maior do que no solo avaliado na fase de maturação do grão. Isso pode ter sido devido à maior atividade metabólica das raízes, na época do florescimento, e maior exsudação radicular o que provocou uma maior atividade microbiana que se traduziu em uma maior liberação de CO_2, produto da respiração e das atividades metabólicas.

No tratamento sem inoculação de FMA avaliado no florescimento, a respiração do solo diminuiu linearmente com o aumento da dose de Pb adicionada. Nesse mesmo tratamento o C da biomassa não foi afetado pelo incremento do Pb. Isto sugere que a comunidade microbiana pode entrar em estado de dormência ou reduzir sua atividade metabólica quando a concentração de Pb aumenta no solo. A passagem de um estado metabolicamente ativo a um estado de dormência pode ter um significado de sobrevivência, já que ajudaria o microrganismo a evitar a toxicidade por metais pesados. No florescimento da soja, o tratamento com inoculação de FMA não mostrou influência do Pb na liberação

de CO_2 do solo. Se a biomassa se reduziu nesse tratamento e a respiração se manteve constante, pode-se afirmar que houve uma menor eficiência de utilização do C, isto é, uma pequena comunidade microbiana heterotrófica está respirando com muita intensidade. Como indicado por Insam et al. (1996), solos poluídos por metais pesados estão sob estresse, o que causa uma menor eficiência de utilização do C, resultando em uma maior liberação de CO_2 por unidade de substrato. Portanto, nos solos com presença de fungo micorrízico houve maior estresse pelo excesso de Pb adicionado.

No solo avaliado na fase de maturação do grão com inoculação do FMA a respiração do solo diminuiu linearmente com o aumento do Pb no solo (Figura 14.b), sendo que a redução foi de 62% entre a dose 0 e a de 600 mg dm^{-3} de Pb. A biomassa microbiana e a atividade respiratória diminuíram neste tratamento com o incremento do Pb no solo, o que também foi verificado com a esporulação do FMA, o que pode explicar, pelo menos em parte, tal efeito na biomassa e respiração. A diminuição da respiração obtida neste trabalho concorda com os resultados obtidos por Doelman e Haanstra (1979), os quais obtiveram uma forte inibição da respiração em solo arenoso com altas concentrações de Pb. Aceves et al. (1999) também observaram maior liberação de CO_2 por unidade de biomassa, em solo com alta concentração de Zn, e portanto, uma menor eficiência na assimilação do C. O qCO_2 ou taxa respiratória específica, revelou que a comunidade microbiana deste solo sofreu, em torno da dose de 300 mg dm^{-3} de Pb, um grande estresse, aumentando em 3 vezes em relação ao controle. Isto é, segundo vários autores (Anderson e Domsch, 1992; Odum, 1985) um indicador do desbalanço energético que sofre a comunidade microbiana como causa de

distúrbios ambientais, como a poluição do solo por metais pesados. Nessas situações a energia do crescimento e a produção são desviadas para a manutenção celular.

É curioso que o C da biomassa e a respiração do solo dos tratamentos sem inoculação avaliados na fase de maturação do grão não tenham sido afetados significativamente pelo aumento da dose de Pb adicionada no solo, e que o quociente metabólico tenha revelado uma forte influência da elevação da concentração de Pb no solo.

Ohya et al. (1988) utilizaram solos que foram incubados com e sem substratos promotores do crescimento microbiano para observar a liberação de CO_2 de solos urbanos poluídos com Zn e Pb. Eles relataram que a respiração foi negativamente correlacionada com a concentração de metais e que o efeito inibitório dos metais nos solos incubados com substratos foi maior que nos solos sem adição de substratos. Explicaram que a chamada respiração basal, ou liberação de CO_2 sem adição de substratos, é muitas vezes relacionada com o C da biomassa e com a comunidade que está metabolicamente inativa ou em estado de dormência. Quando se adicionam substratos, atribui-se o CO_2 liberado, principalmente, às populações metabolicamente ativas que são as mais afetadas pelo excesso de metais no solo. Dessa forma, como o solo utilizado no presente trabalho possuía uma baixa concentração de C orgânico (15 g dm^{-3}), provavelmente havia pequena comunidade microbiana e uma baixa atividade respiratória, sugerindo que era constituído por uma microbiota metabolicamente pouco ativa e que, de certa forma, não sofreu diretamente o efeito do Pb. Já o fungo micorrízico, como depende dos carboidratos fornecidos pela planta,

encontra-se metabolicamente mais ativo do que o resto da microbiota do solo, estando vulnerável ao efeito do Pb.

Provavelmente, devido à grande variabilidade entre os microssítios do solo, que proporcionam diversos microhabitats com diferentes tipos e intensidade de atividades metabólicas, a biomassa e a respiração do solo nem sempre se mostraram bons indicadores do efeito do Pb no solo. As poucas correlações significativas entre as características biológicas e a dose de Pb adicionada ao solo evidenciam a complexidade do sistema solo-planta-metal, o que já foi verificado também por outros autores (Insam et al., 1996; Dias-Junior et al.,1998).

A atividade enzimática do solo é uma característica que reflete processos bioquímicos que são de grande importância para a ciclagem de nutrientes, para a nutrição mineral de plantas e a manutenção da fertilidade do solo (Perucci, 1992, Frankenberger e Dick, 1983).

A informação obtida dos ensaios enzimáticos juntamente com a atividade respiratória e a biomassa microbiana pode ajudar na elucidação dos efeitos de diferentes tipos de contaminação no solo, que possam alterar o ecossistema do solo. A atividade enzimática do solo é considerada por muitos autores como um bom indicador do estado metabólico de um determinado solo (Garcia et al., 1997).

A desidrogenasse é um enzima capaz de indicar a atividade microbiana dos solos e portanto seu grau de degradação (Garcia et al., 1997). Esta enzima reflete a atividade oxidativa total da microbiota do solo; como é uma enzima intracelular de baixa atividade quando em estado livre no solo, pode atuar como um bom indicador da atividade microbiana do solo (Garcia et al., 1997; Reddy e Faza, 1989). No entanto, Beyer et al. (1993) mostraram o contrário, ou seja, a atividade

da desidrogenasse não é bom indicador da atividade total da microbiota do solo, pois está relacionada a reações específicas do solo, como potencial redox, fluxo de água, fornecimento de ar, as quais não refletem o nível geral da atividade microbiana no solo. Confirmaram que a atividade da desidrogenase pode diferir consideravelmente em solos com as mesmas propriedades principais (tipo de solo, textura, pH, C orgânico total, argilas, etc.). Da mesma forma, outros também questionam o uso da desidrogenase como indicador geral da atividade microbiana do solo (Nannipieri et al. 1990; Perucci, 1992).

No presente experimento, o efeito do Pb só foi significativo no solo com inoculação e na fase de florescimento da soja, no qual a atividade da desidrogenase diminuiu com a adição de Pb ao solo (Figura 15.a). Da mesma forma, Doelman e Haanstra (1979), estudando o efeito do Pb sobre a atividade desta enzima, observaram redução na atividade com aumento do Pb no solo. Mesmo em solo argiloso, observaram que as concentrações de Pb nas quais a respiração foi seriamente retardada não se observou inibição da enzima, sugerindo portanto, que a respiração foi mais sensível para a caracterização do efeito inibitório do Pb sobre a microbiota do solo do que a atividade da desidrogenase do solo. Isto também foi observado na presente pesquisa já que, apesar de ter havido correlação entre respiração e atividade da desidrogenase, esta não se correlacionou com a concentração de Pb no solo mas a respiração sim. Isto indicou que a atividade da desidrogenase não foi um bom indicador do efeito do Pb. Mais recentemente, também foi observado por Perucci (1992) redução na atividade da desidrogenase em solo com adição de lodo, atribuindo esse efeito inibitório à toxicidade das altas concentrações de MPs presentes no

lodo, especialmente ao Pb. Assim mesmo Kandeler et al. (1996) observaram que a atividade da desidrogenase era dramaticamente afetada pelos altos níveis de Zn, Cu, Ni e Cd no solo.

A atividade da desidrogenase foi duas vezes maior no solo avaliado no florescimento da soja do que na fase de maturação do grão, provavelmente devido à maior atividade metabólica das raízes, as quais liberariam maior quantidade de exsudatos favorecendo a comunidade heterotrófica do solo, o que se refletiu, dessa forma, em maior atividade da enzima.

Portanto, nas condições do solo utilizado no trabalho, a atividade da desidrogenase não refletiu satisfatoriamente o efeito de altas concentrações de Pb no solo. Mesmo assim, como a correlação com a respiração do solo foi positiva, de alguma forma essa característica foi indicadora da atividade metabólica do solo.

Outro ensaio enzimático realizado foi a atividade da fosfatase alcalina, fosfomonoesterase de importância na mineralização do P orgânico do solo, e portanto na nutrição da planta. Essa enzima não é produzida por plantas, sendo sua atividade no solo inteiramente derivada dos microrganismos, podendo ser, portanto, um bom indicador dos efeitos que os metais pesados ou outros poluentes exercem na microbiota edáfica. Tyler (1974) observou que elementos-traço inibem as fosfomonoesterases no solo.

Os resultados indicaram um importante efeito inibitório do Pb na atividade da fosfatase alcalina (Figuras 15.b e 15.c). Todos os tratamentos realizados, com exceção do solo que não recebeu inóculo de FMA e avaliado no florescimento da soja, tiveram a atividade da fosfatase alcalina diminuída significativamente pelo Pb

adicionado ao solo, observando-se um mínimo na atividade em torno dos 400 mg dm^{-3} de Pb no solo. Essa variável correlacionou-se negativamente tanto com o Pb adicionado ao solo quanto com o extraível pelo DTPA, sugerindo que essa enzima é sensível a contaminação por Pb e que pode ser considerada como bom indicador da atividade microbiana no solo. Observando a figura 15.c, constata-se que houve 60% de inibição da enzima devido ao aumento da dose de Pb, o que, possivelmente, afetou a mineralização do P orgânico do solo, podendo ter diminuído a disponibilidade do elemento para as plantas e para a comunidade microbiana do solo. Como não houve correlação entre a atividade da fosfatase alcalina e a biomassa microbiana, a redução na atividade da enzima está relacionada à inibição exercida pelo metal, e não a uma diminuição na biomassa microbiana do solo. Redução da atividade da fosfatase alcalina no solo também foi observada por Redy et al.(1987), os quais constataram que a aplicação de lodo de esgoto, com altos níveis de metais, inibia essa enzima. Kandeler et al. (1996) também observaram que a atividade de várias enzimas, entre elas a fosfatase alcalina, foi significativamente diminuída pela poluição por Cu, Zn, Ni, V e Cd.

Da mesma forma que o observado para a atividade da desidrogenase, foi registrada maior atividade da fosfatase alcalina no florescimento em relação à fase de maturação do grão, confirmando-se, mais uma vez, a importância do metabolismo da raiz no solo circundante, influenciando significativamente a atividade microbiana. A atividade da enzima também foi estimulada pela presença do FMA, no florescimento.

A enzima arilssulfatase hidrolisa, por fissão da ponte O-S, ânions de arilssulfato, tendo sido detectada tanto em animais quanto em plantas e

microrganismos. No solo a arilssulfatase é responsável parcialmente pela mineralização do S orgânico na forma de ésteres de sulfato. Ao contrário do ocorrido com os demais enzimas, a atividade da arilssulfatase foi maior no solo avaliado na fase de maturação do grão do que no florescimento da planta, fase em que houve também maior atividade respiratória (Figura 15.d). Nessa fase do ciclo da planta, a presença do FMA também estimulou, em 30%, a atividade da enzima. Entretanto, nessa mesma fase do ciclo da planta, essa não foi alterada pelas altas concentrações do Pb no solo colhido na maturidade da planta. Isto ocorreu no florescimento, quando a atividade da enzima no solo com presença do FMA foi de 33%, na dose de 300, e de 26% na dose de 600 mg dm^{-3} de Pb no solo sem inóculo do FMA (Figura 15.b). No solo com inoculação do FMA, a redução da atividade em função do aumento na dose de Pb foi quadrática atingindo um máximo em torno de 450 $mg.dm^{-3}$ de Pb. No solo que não recebeu inóculo do FMA a redução foi linear com o aumento do nível de Pb do solo. A atividade da arilssulfatase no solo com presença do FMA foi mais fortemente influenciada pelo excesso de Pb do que no solo sem FMA, embora neste último maiores concentrações de Pb tinham levado a reduções muito mais acentuadas.

Assim como aqui observado, Kandeler et al.(1996) também relataram uma diminuição na atividade de várias enzimas, entre elas a arilssulfatase, urease, fosfatase, desidrogenase e outras relacionadas com a ciclagem do C devido à contaminação por metais pesados. A arilssulfatase e a desidrogenase foram as mais afetadas pelos altos níveis de metais pesados, sugerindo que os solos contaminados com metais pesados perdem propriedades bioquímicas muito comuns que são necessárias para o funcionamento do ecossistema. Os

resultados do presente estudo, de certa forma confirmam essa hipótese, porque as três enzimas analisadas, em maior ou menor grau, foram afetadas pela alta disponibilidade de Pb no solo.

Speir et al. (1999) alertaram sobre a diminuição da atividade da sulfatase e da fosfatase, especificamente, como resultado da diminuição do pH causado pela aplicação de sais formados por MPs e nitrato. Observaram que a redução da sulfatase foi devida, principalmente, ao efeito de acidificação do solo provocado pelo NO^{-3} e não à presença do metal. Explicam que a exposição dos solos por vários dias à acidez ou a sais metálicos teriam um efeito inibitório dessas enzimas devido, provavelmente, à desnaturação da enzima. No presente experimento, a acidificação devida à quantidade de nitrato adicionada junto com o Pb não tenha sido a causa da redução na atividade das enzimas, porque essa foi mais de três vezes menor do que a dose mínima aplicada no experimento de Speir et al. (1999), além de não ter sido observada diminuição do Ph com o aumento da dose de Pb. Portanto, atribui-se ao Pb o fato de ter havido redução na atividade das enzimas.

A atividade das enzimas arilssulfatase e desidrogenase não se correlacionou significativamente com a biomassa microbiana. Entretanto, no caso da fosfatase houve correlação positiva entre C-biomassa e atividade da enzima, sugerindo que, pelo menos parcialmente, a diminuição observada na atividade da enzima foi devida a uma diminuição na biomassa e não somente ao efeito direto do metal. Os resultados indicaram que variáveis de importância na determinação da atividade microbiana do solo foram afetadas negativamente pela quantidade de Pb adicionada ao solo, indicando a necessidade de mais estudos sobre o efeito de

metais pesados no ecossistema edáfico. Atividades relacionadas com a ciclagem de nutrientes poderiam estar seriamente prejudicadas pela contaminação por metais pesados. Tais metais são de pouca mobilidade no solo, de difícil remoção e sua permanência no solo pode acarretar diminuição na mineralização de compostos orgânicos. Estudos como o apresentado nesta dissertação, mesmo que não representem fielmente as condições em solos naturais contaminados por metais, permitem separar o efeito de um determinado metal, já que em solos poluídos muitas vezes há uma contaminação por diversos metais sendo difícil determinar qual deles é o responsável pelos efeitos produzidos no ecossistema, já que pode ocorrer sinergismo ou antagonismo entre os diferentes metais, dificultando a explicação dos resultados. Pelo fato de se empregar um meio tão complexo como o solo, em que há uma grande diversidade de microhabitats com diferentes condições físico-químicas e biológicas, já são esperados, muitas vezes, resultados contraditórios e de difícil interpretação.

6. Conclusões

- Concentrações de Pb no solo na faixa de 150 a 600 mg dm^{-3} interferem no estabelecimento da dupla simbiose, com FMA e rizóbio com soja, e na perpetuação do fungo no solo.

- O FMA *G. macrocarpum*, não protege a planta do acúmulo fitotóxico de Pb na parte aérea da soja, mas confere tolerância.

- Plantas colonizadas pelo FMA apresentam menores teores de Pb na parte aérea na doses mais altas de Pb adicionadas.

- O papel do FMA na proteção da planta ao excesso de Pb no solo é mais importante em condições de baixa saturação por bases (V% de 63).

- O Pb afeta negativamente o C-biomassa e a atividade microbiana do solo, ocorrendo interação entre a inoculação do FMA e o estádio de desenvolvimento da planta.

- A atividade da fosfatase alcalina é um indicador adequado na avaliação do estresse causado pelo Pb no solo, o que já não ocorre com a atividade da desidrogenase e da arilssulfatase.

7. LITERATURA CITADA

Adriano, D. C (1986) (ed.) Trace elements in the terrestrial environment. Springer, Berlin Heidelberg New York.

ABIA (Associação Brasileira das Industrias da Alimentação) Portaria nº 685-SVS/MS de 27 de agosto de 1998. Regulamento Técnico princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos. pag. 3174.

Abreu, C.A; Abreu, M.F; Raij B. van & Santos, W. R. (1995) Comparação de métodos de análise para avaliar a disponibilidade de metais pesados em solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas**, 19: 463-468.

Alef, K. (1995) Soil respiration. In: Alef, K. & Nannipieri, P., eds. Methods in applied soil microbiology and biochemestry. London, Academic Press. p.214-219.

Alkari, G.N. & Clarck, R.B. (1998) Growth, mineral acquisition and water use by mycorrhizal wheat grown under water stress. **Journal of Plant Nutrition, 21**:263-276.

Anderson, T.H. (1989) Physilogical analysis of microbial communities in soil: applications and limitations. In: Ritz, K.D. & Giller, K.E., eds. Beyond the biomass. London, British Society of Soil Science, p.67-76.

Anderson, T.H. & Domsch, K.H. (1993) The metabolic quotient for CO2 (qCO2) as the especific activity parameter to asses the effects of environmetal conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry, 25**: 393-395.

Angle, J.S.; Mcgrath, S.P.; Chaudry, A.M.; Chaney, R.L. & Giller, K.E. (1993) Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry, 25**: 575-580.

Bääth, E.; Frostergärd, A.; Diaz-Raviňa, M. & Tunlid, A. (1998) Microbial community-based measurements to estimate heavy metal effects in soil: The use of phospholipid fatty acid patterns and bacterial comunity tolerance. **Ambio, 27**: 58-61.

Babich, H. & Stotzky, G. (1977) Sensitivity of various bacteria, including actinomycetes, and fungi to Cadmium and the influence of pH on sensivity. **Applied Environmental Microbiology, 33**: 681-695.

Barajas-Aceves, M.; Grace, C.; Ansorena, J.; Dendooven, L. & Brookes, P.C. (1999) Soil microbial biomass and organic C in a gradient of zinc concentrations in soils around a mine spoil tip. **Soil Biology and Biochemistry, 31**:867-876.

Barea, J.M. & Azcon-Aguilar, C. (1983) Mycorrhizas and their significance in nodulated nitrogen-fixing plants. **Advances in Agronomy, 36**: 1-54.

Barea, J.M. & Azcon-Aguilar, C. (1987) Vesicular-arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N2 fixation and N uptake from soil assesed with a ^{15}N technique under field conditions. **New Phytologist, 106**: 717-725.

Bargett, R.D. & Saggar, S. (1994) Effects of heavy metal contamination on the short-term decomposition of labelled [^{14}C] Glucose in a pasture soil. **Soil Biology and Biochemistry, 26**: 727-733.

Bethlenfalvay, G.J. & Franson, R.L. (1989) Manganes toxicity alleviated by mycorrhizae in soybeans. **Journal of Plant Nutrition, 12**: 953-970.

Beyer, L.; Wackendorf, C.; Balzen, F.M. & Balzen-Graf, V.R. (1992) The effect of soil texture and soil management on microbial biomass and soil enzymes activities in arable soils of Northwest Germany. **Agrobiological Research, 45**: 276-283.

Bisessar, S. (1982) Effect of heavy metals on microrganism in soil near a secondary lead smelter. **Water Air and Soil Pollution, 17**: 333-346.

Blacwell, K.J; Singleton, I & Tobin, J.M. (1995) Metal cation uptake by yeast: a review. **Applied Microbiology Biotechnology, 43**: 579-584.

Bradley, R.; Burt, A.J. & Read, D.I. (1981) Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in Calluna vulgaris. **Nature, 292**: 335-337.

Brookes, P.C. & MacGrath, S.P. (1984) Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. **Journal of Soil Science, 35**: 341-346.

Buwalda, J.G, Stribley, D. P. & Tinker, P.B. (1983) Increasd uptake of bromide and chloride by plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist, 93**: 217-225.

Casella, S.; Frassinetti, S.; Lupi, F. & Squartini, A. (1988) Effect of cadmium, chromium and copper on symbiotic and free living *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. **FEMS Microbiology Letters, 49**: 343-349.

Casida L.E.; Klein, D.A. & Santoro, T. (1964) Soil dehydrogenase activity. **Soil Science, 98**: 371-376.

Cardoso, J.B.N.E. (1985) Efeito de micorriza vesículo arbuscular e fosfato de rocha na simbiose da soja-Rhizobium. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, 9**: 125-130.

CETESB (1999) Norma 4.230 ago/99. Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas – critérios para projeto e operação (Manual Técnico).

Chaney, R.L.; Hundeman, P.T.; Palmer, W.T.; Small, R.J.; White, M.C. & Decker, A.M. (1978) Accumulation of heavy metals and phytotoxicity resulting from utilization of sewage sludge and sludge composts on cropland. In Proc 1977 Nat Conf Composting of municipal residues and sludges. Information Transfer Inc, Maryland, pp.86-97.

Chaudry, A.M; McGrath, S.P & Giller, K.E. (1992) Metal survival of the indigenous population *of Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. **Soil Biology and Biochemistry, 24**: 625-632.

Costanza, R.; D`Argue, R., De Groot, Faber, S.; Grasso, M., Hannon, B.; Limburg, K; Naeem, S.; O`Neill, R.V.; Paruelo, J.; Raskin, R.G.; Sutton, P. & Van Den Belt, M. (1997) The value of the world ecosystem services and natural capital. **Nature, 387**: 253-259.

Chao, C.C. & Wang, Y.P. (1993) Effects of heavy metals on vesicular-arbuscular mycorrhizae and nitrogen fixation of soybean in major soils groups of Taiwan. **Journal of China Agricultural Chemestry Society, 29**: 290-300.

Colpaert, J.V. & Van Assche, J.A. (1993) The efffects of cadmium on ectomycorrhizal Pinus silvestris L. **New Phytologist, 123**: 325-333.

Cotrufo, M.F.; Virzo De Santo, A.; Alfani, A.; Bartoli, G; De Cristofaro, A. (1995) Effect of urban heavy metal pollution on organic matter decomposition in Quercux ilex L. woods. **Environmental Pollution, 89**: 81-87.

Davies, K.L.; Davies, M.S. & Francis, D. (1991) Zinc-induced vacuolation in root meristematic cells of *Festuca rubra* L. **Plant Cell Environment, 29**: 399-406.

Del Val, C.; Barea, J.M. & Azcón-Aguilar, C. (1999) Assesing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. **Applied Soil Ecology, 11**:261-269.

Denny, H.J. & Ridge, I. (1995) Fungal slime and its role in the mycorrhizal ameloriation of zinc toxicity to higher plants. **New Phytologist, 130**: 251-257.

Dias-Junior, H.E.; Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. & Silva, R. (1998) Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, 22**: 631-640.

Diaz, G.; Azcón-Aguilar, C. E. & Honrubia, M. (1996) Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake growth of *Ligneum spartum* and *Anthyllis cystisoides*. **Plant and Soil, 180**: 241-249.

Diaz, G. & Honrubia, M. (1995) Effect of native and introduced arbuscular mycorrhizal fungi and nutrient uptake of *Ligneum spartum* and *Anhyllis cytisoides*. **Biologia Plantarum, 37**: 121-129.

Dixon, R.K. & Buschena, C.A. (1988) Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soils. **Plant and Soil, 105**: 265-271.

Doelman, P. & Haanstra, L. (1984) 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, 79**: 317-327.

Doelman, P. & Haanstra, L. (1979) Effect of lead on soil respiration and dehydrogenasse activity. **Soil Biology and Biochemistry, 11**: 475-479.

Doran, J.W. & Zeiss, M.R. (2000) Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology, 15**: 3-11.

Dueck, A. T.; Visser, P.; Ernst, W.H.O. & Schat, H. (1986) Vesicular arbuscular mycorhizal decrease zinc toxicity to grasses growing in Zn polluted soil. **Soil Biology and Biochemistry, 18**: 331-333.

Duxbury, T. & Bicknell, B. (1983) Metal tolerant bacterial populations from natural and metal polluted soils. **Soil Biology and Biochemistry, 15**: 43-250.

Eivazi, F. & Tabatabai, M.A. (1977) Phosphatases in soil. Soil Biology and Biochemistry 9: 167-172.

El-Kherbawy, M.; Angle, J.S.; Heggo, A.E. &Chaney, R.L. (1989) Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Biology and Fertility of Soils, 8**: 61-65.

EMBRAPA. (1999) Sistema Brasileiro de classificação de solos Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ).- Produção de informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos.

Enkhtuya, B.; Rydlová, J. E Vosatka, M. (2000) Effectiveness of indigenous and non-indigineous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystem and man-made habitats. **Applied Soil Ecology, 14**: 201-211.

Faber, B.A.; Zasoski, R.J; Burau, G. & Uriu, K. (1990) Zinc uptake by corn as affected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. **Plant and Soil, 129**: 121-130.

Fitter, A.H. (1991) Cost and benefits of mycorrhizas: Implications for functioning under natural conditions. **Experentia, 47**: 350-355.

FlieβBach, A.; Martens, A. & Reber, H.H. (1994) Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage-sludge. **Soil Biology and Biochemistry, 26**: 1201-1205.

Ford, T. & Mitchell, R. (1992) Microbial transport of toxic metals. In: Environ Microbiology, Wiley-Liss, New York, pp. 83-101.

Frankenberger, J.R.; W.T. & Dick, W.A. (1983) Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. **Soil Science Society of American Journal, 47**: 945-951.

Frostergard, A.; Tunlid, A. & Baath, E. (1993) Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. **Applied Environmental Microbiology, 59**: 3065-3617.

Gadd, G.M. (1992) Metals and microorganisms: A problem of definition. **FEMS Microbiology Letters, 100**: 197-204.

Gadd, G.M.(1993) Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist, 124**: 25-60.

Galli, U.; Schuepp, H. & Brunold, C. (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. **Phisiologia Plantarum, 92**: 364-368.

Garcia, T.C; Hernandez, T. & Costa, F. (1997) Potential use of dehydrogenase activity as index of microbial activity in degraded soils. **Communications of Science and Plant Analysis, 28**: 123-134.

Genderman, J.W. & Nicolson, T.H. (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. **Transactions of the British Micologycal Society, 46**: 235-244.

Gildon, A. & Tinker, P.B. (1981) A heavy metal tolerant strain of a mycorrhizal fungus. **Transactions of the British Mycological Siociety, 77**: 648-649.

Gildon, A. & Tinker, P.B. (1983a) Interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants: I. The effect of heavy metals on the deverlopment of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist, 95**: 247-261.

Gildon, A. & Tinker, P.B. (1983b) Interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. II. The effects of infection on uptake of copper. **New Phytologist, 95**: 263-268.

Giller, K.E.; McGrath, S.P. & Hirsch, P.R. (1989) Absence of nitrogen-fixation in clover grown on soil subject to long term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry, 21**: 841-848.

Giovanetti, M.E. & Mosse B. (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrrhizal infection in roots. **New Phytologist, 84**: 482-500.

Graham, J.H.; Timmer, L.H & Fardelmann, D. (1986) Toxicity of fungicidal copper in soil to citrus seedlings and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Phytopathology, 76**: 66-70.

Griffioen, W.A.J.; Ietswaart, J.H. & Ernst, W.H.O. (1994) Mycorrhizal infection of an *Agrostis capillaris* population on a copper contaminated soil. **Plant and Soil, 158**: 83-89.

Guo, Y.; George, E. & Marschner, H. (1996) Contribution of an arbuscular mycorrhizal fungus to the uptake of Cd and Ni in bean and maize plants. **Plant and Soil, 184**: 195-205.

Haselwandter, K.; Leyval, C. E & Sanders, F.E. (1994) Impact of arbuscular mycorrhizal fungi upon plant uptake of heavy metals and radionucleides from soils. In: Gianinazzi S., Schuepp H (eds) Impacts of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Birkhäuser, Basel pp 179-190.

Hayman, D.S. (1983) The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. **Canadian Journal of Botany, 61**: 944-963.

Heggo, A. & Angle, J.S. (1990) Effect of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. **Soil Biology and Biochemistry, 22**: 865-869.

Heuwinkel, H, Kirkby, E.A.; Le Bot J. & Marschner, H. (1992) Phosphorus deficiency enhances molybdenum uptake by tomato plants. **Journal of Plant Nutrition, 15**: 549-568.

Ibekwe, A.M.; Angle, J.S.; Chaney, R.L. & Van Berkum, P. (1995) Sewage sludge and heavy metals effects on nodulation and N_2 fixation of legumes. **Journal of Environmental Quality, 24**: 1199-1204.

Ibekwe, A.M.; Angle, J.S.; Chaney, R.L. & Van Berkum, P. (1998) Zinc and Cadmium effects on rizobia and white clover using chelator-buffered nutrient Solution. **Soil Science Society American Journal, 62**: 204-211.

Ietswaart, J.H.; Griffioen, W.A.J.; Ernst, W.H.O. (1992) Seasonality of VAM infection on three populations of *Agrostis capillaris* (Gramineae) on soil with or without heavy metal enrichment. **Plant and Soil, 139**: 67-73.

Insam, H.; Hutchinson, T.C & Reber, H.H. (1996) Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. **Soil Biology and Biochemistry, 28**: 291-694.

Joergensen, R. (1995) The fumigation extraction method. In: Alef, K. & Nannipieri, P., eds. Methods in applied soil microbiology and biochemestry. London, Academic Press. p.382-387.

Joner, E.J. & Leyval, C. (1997) Uptake of 109 Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae/Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of Cadmium. **New Phytologist, 135**: 353-360.

Kandeler, E.; Kampilcher, C. & Horak, O. (1996) Influence of heavy metal on the functional diversity of soil microbial communities. **Biology and Fertility of Soils, 23**: 299-306.

Killham, K. & Firestone, M.K. (1983) Vesicular-arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acid and heavy metal deposition and metal content. **Plant and Soil, 72**: 39-48.

Kling, M. & Jakobsen, I. (1998) Arbuscular mycorrhiza in soil quality assesment. **Ambio, 27**: 29-34.

Kothari, S.K.; Marschner, H. & Romheld, V. (1991) Effect of vesicular arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere microorganisms on manganes reduction in the rizosphere and manganes concentrations in maize Zea mays L.). **New Phytologist, 117**: 649-655.

Leyval, C.; Berthelin, J.; Schontz, D; Weissenhorn, I. & Morel, J.L. (1991) Influence of endomycorrhizas on maize uptake of Pb, Cu, Zn and Cd applied as mineral salts or sewage sludges. In: Farmer J.G.(ed.) Heavy metal in the environment. CEP Consultants Ltd., Edinburgh pp. 204 - 207.

Leyval, C.; Turnau, K. & Haselwandter, K. (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza, 7**: 139-153.

McGrath S.P.; Brookes, P.C. & Giller, K.E. (1988) Effects of potencially toxic elements in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. **Soil Biology and Biochemistry, 20**: 415-424.

McGee, P.A. (1987) Alteration of growth of *Solanum opacum* and *Plantago drudmondii* and inhibition of regrowth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi from dried root pieces by manganese. **Plant and Soil, 101**: 227-233.

Medeiros, C.A.B.; Clark, R.B. & Ellis, J.R. (1994) Effects of excess manganese on mineral uptake in mycorrhizal sorghum. **Journal of Plant Nutrition, 17**: 2203-2219.

Morslet, A.F.W.; Smits, W.T.M & Limonard, T. (1986) Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil, 96**: 417-420.

Mosse, B. (1973) Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Annual Review of Phytopathology, 11**: 171-196.

Nannipieri, P.; Greco, S. & Ceccanti, B. (1990) Ecological significance of biological activities in soils. In: BOLLANG, J.M. & STOTZKY, G. eds. Soil Biochemestry, New York, Marcel Dekker, 1990. p.293-356.

Nicolson, T.H. (1967) Vesicular-arbuscular mycorrhiza a universal simbiosis. **Science Progress, 55**: 561-581, 1967.

Nogueira, A.V. (1996) As micorrizas e o excesso de metais. In: SIQUEIRA, J.O. ed. Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas. Lavras, Universidade Federal de Lavras, p.135-174.

Nordgreen, A.; Bääth, E. & Soderstrom, B (1983) Microfungi and microbial activity along a heavy metal gradient. **Applied Environmental Microbology, 45**: 1829-1837.

Odum E. (1985) Trends expected in stressed ecosystems. **BioScience, 35**: 419-422.

Ohya, H.; Fujiwara, S.; Komai, Y. & Yamaguchi, M. (1988) Microbial biomass and activity in urban soils contaminated with Zn and Pb. **Biology and Fertility of Soils, 6**: 9-13.

Pacovski, R.S. (1986) Micronutrient uptake and distribution in mycorrhizal or phosphorus fertilized soybeans. **Plant and Soil, 95**: 379-388.

Perucci, P. (1992) Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. **Biology and Fertility of Soils, 14**: 54-60.

Phillips, J.M. & Hayman, D.S. (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. **Transactions of the British Mycological Society, 55**: 158-161.

Plenchette, C., Furlan, V. & Fortin, J.A. (1983) Responses of endomycorryzal plants grown in a calcined montmollironite clay to different levels of soluble phosphorus. II. Effect on nutrient uptake. **Canadian Journal of Botany, 61**: 1384-1391.

Raij, B. van.; Cantarella, H.; Quaggio, J.A & Furlani, A.M.C, eds. (1996) (Boletim Técnico 100). Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo, 2.ed. Campinas, Instituto Agronômico & Fundação IAC, 285p.

Reber, H.H. (1992) Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. **Biology and Fertility of Soils, 23**: 299-306.

Reddy, G.B & Faza, A. (1989) Dehidrogenase activity in sludge amended soil. **Soil Biology and Biochemistry, 21**: 327-331.

Reddy, G.B.; Faza, A. & Bennett, Jr. (1987) Activity of enzymes in rhizosphere and non-rhizoxphere soils amended with sludge. **Soil Biology and Biochemistry, 19**: 203-205.

Reedy G.N. & Prasad M.N.V. (1990) Heavy metal binding proteins/peptides: Ocurrence, structure, synthesis and functions. A review. **Environmental Exp. Botany, 30**: 251-264.

Rhodes, L.H.; Gerdemann. (1975) Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. **New Phytologist, 75**: 55-561.

Roldan, A. & Albaladejo, J. (1993) Vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) fungal populations in a xeric torriorthent recieving urban refuse. **Soil Biology and Biochemistry, 25**: 451-456.

Ross I. S. (1982) Effect of copper, cadmium and zinc on germination and mycelial growth in candida albicans. **Trans Britain Mycology Society, 78**: 543-545.

Ross S. M. (1994) In. Toxic metals in soil-plant systems. J. Wiley. Chischester. 469p.

Rother, J.A., Millbank, J.W & Thornton, I. (1983) Nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens*) in glasslands on soils contaminated with Cd, Pb and Zn. **Journal of Soil Science, 34**: 127-136, 1983.

Salt, D.E.; Blaylock, M. Kumar, N.P.B.A. Dushenkov, V.; Ensley, B.D; Chet, I. & Raskin, I. (1995) Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Biotechnology, 13**: 468-474.

Sauerbeck, D. (1982) Welche Schermetallgehalte in Pflanzen dürfen micht überschitten werden, um Wachstumsbeeinträchtigungen zu vermeiden?. **Landwirtschaftl Forsch Sonderheft, 39**: 105-129.

Schenck, N.C. & Hinson, K. (1973) Response of nodulating an non-nodulating soybeans to a species of Endogone mycorrhiza. **Agronomy Journal, 65**: 849-850.

Shetty, K.G., Hetrick, B.A.D. & Schwab, A.P. (1995) Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc toelrance of plants. **Environmental Polllution, 88**: 307-314.

Shetty, K.G., Hetrick B.A.D.; Fiffe, D.A.H & Schwab, A.P. (1994) Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mined spoil. **Environmental Pollution, 86**: 181-188.

Speir, T.W; Kettles, H.A. Percival, H.J. & Parshotam, A. (1999) Is soil acidification the cause of biochemical responses when soils are amended with heavy metal salts? **Soil Biology and Biochemistry, 31**:1953-1961.

Sylvia, D.M. & Williams, S.E. (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stresses. In: Bethlenfalvay, G.J.; Linderman, R.G. (Eds) Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. ASA No 54, Madison, WI, USA, pp. 101-124.

Siqueira, J.O; Pouyú, E.E & Moreira, F.M.S. (1999) Micorrizas arbusculares no crescimento pos-transplantio de mudas de árvores em solo com excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, 23**: 569-580.

Silveira, A.P.D. (1992) Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, H.C.P. Ed, Microbiologia do solo, Campinas: SBCS, p:258-282.

Stevenson F.J. (1986) In: Cycles of Soil. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulphur, micronutrients. John Wiley & Sons, Inc.380p.

Tabatabai, M.A & Bremner, J.M. (1970) Arylsulphatese activity in soils **Soil Science American Procedures, 34**: 225-229.

Thompson, J.P. (1990) Soil sterilization method to show VA-mycorrizae aid P and Zn nutrition of wheat in vertisols. **Soil Biology and Biochemistry, 22**: 229-240.

Trinidade, A.V.; Vildoso, C.I.A.; Muchovej, R.M.C & Costa, L.M. (1996) Interação de composto de lixo urbano e fungos micorrízicos na nutrição e crescimento do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, 20**:199-208.

Turnau, K.; Kottke, I.; Oberwinkler, F. (1993) Element localization in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn collected from experimental plots treated with cadmium dust. **New Phytologist, 123**: 313-324.

Turnau, K. (1998) Heavy metal content and localization in mycorhizal *Euphorbia cyparissias* from Zn wastes in Southern Poland. **Acta Soc. Bot. Pol. 67**: 105-113.

Tyler, G. (1974) Heavy metal pollutionand soil enzyme activity. **Plant and Soil, 41**:303-311

Valsecchi, G.; Gigliotti, C. & Farini, A. (1995) Microbial biomass, activity and organic matter accumulation in soils contaminated with heavy metals. **Biology and Fertillity of Soils, 20**: 253-259.

Van Assche F. & Clijsters H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell and Environment, 13**:195-206.

Van Steveninck, R.F.M.; Van Stevenick, M.E.; Fernando, D.R. Horst, W.J. & Marshner, H. (1987) Deposition of zinc phytate in globular bodies in roots of *Deschampsia caespitose* ecotypes: A detoxification mechanism? **Journal of Plant Physiology, 131**: 247-257.

Vance, E.D; Brookes, P.C. & Jenkinson, d. (1987) An extraction method for measuring microbial biomass carbon. **Soil Biology and Biochemistry, 19**: 703-707.

Vidal, M.T; Azcon-Aguilar, C. & Barea, J.M. (1996) Effects of heavy metals (Zn, Cd and Cu) on arbuscular mycorrhiza formation. In: Azcon-Aguilar, C.; Barea, J.M. (eds) Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development. European comission, EUR 16728, Luxembourg, pp487-490.

Wallace G. A. & Wallace A. (1994) lead and other potentially toxic heavy metals in soil. **Communications on Soil Science and Plant Anlysis, 25**: 137-141.

Weissenhorn, I.; Leyval, C. & Berthelin, J. (1995a) Bioavailability of heavy metals and abundance of arbuscular mycorrhiza in soil polluted by atmospheric deposition from a smelter, **Biology and Fertility of Soils, 19**: 22-28.

Weissenhorn, I.; Mench, M. & Leyval, C. (1995b) Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhiza in sewage sludge-amended sandy soil. **Soil Biology and Biochemistry, 27**: 287-296.

Weissenhorn, I.; Leyval, C; Berthelin, J. (1993) Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils**. Pant and Soil, 157**: 247-256.

Zonta, E. P.; Machado, A. A & Silveira Jr. P. (1984) Sistemas de análises estatística para microcomputadores (SANEST). Pelotas, Universidade Federal de Pelotas. 151p.

Apêndice

Experimento I

Apêndice 1. Comparação das médias, pelo teste de Tukey a 5%, entre os fatores FMA e V% para as variáveis analisadas. a, b- compara médias dos tratamentos com e sem FMA dentro da mesma V%; x, y- compara médias de V%, dentro do fator FMA. (CF- com inoculação FMA; SF- sem inoculação FMA; n.d.- não determinado; d.m.s.- diferença mínima significativa).

Pb adicionado	V 90%		V 55%	
	SF	CF	SF	CF
mg dm^{-3}				
		Matéria seca, g $planta^{-1}$		
0	1,14 b x	3,27 a x	1,40 b x	3,24 a x
7,5	0,99 b y	3,04 a x	1,49 b x	3,01 a x
37,5	0,94 b y	2,52 a x	1,43 b x	2,89 a x
150	0,94 b x	2,67 a x	1,30 b x	2,80 a x
300	1,01 b x	2,18 a x	1,16 b x	2,40 a x
d.m.s. 5% = 0,37				
		Teor de Pb na MS, mg kg^{-1}		
0	3,95 a x	4,52 a x	2,62 a x	3,31 a x
7,5	4,19 a x	4,16 a x	5,17 a x	4,60 a x
37,5	4,95 a x	5,57 a x	13,77 a x	12,91 a x
150	7,31 a y	7,99 a y	70,98 a x	46,02 b x
300	16,12 a y	14,83 a y	144,77 a x	93,92 b x
d.m.s 5% = 9,17				
		Pb acumulado na MS, μg $planta^{-1}$		
0	4,57 a x	14,43 a x	3,83 a x	10,36 a x
7,5	4,12 a x	12,64 a x	7,82 a x	13,78 a x
37,5	4,46 a y	14,68 a y	19,43 a x	37,37 a x
150	7,05 a y	21,17 a y	91,58 b x	129,79 a x
300	16,80 a y	31,71 a y	166,42 b x	229,44 a x
d.m.s 5% = 18,00				
		Teor de P na MS, g kg^{-1}		
0	0,32 a y	0,41 a y	0,78 b x	1,05 a x
7,5	0,32 b y	0,49 a y	0,72 b x	1,21 a x
37,5	0,31 b y	0,52 a y	0,62 b x	1,36 a x
150	0,23 b y	0,52 a y	0,75 b x	1,18 a x
300	0,27 b y	0,47 a y	0,61 b x	1,06 a x
d.m.s 5% = 0,14				

continuação

Pb adicionado	V 90%		V 55%	
	SF	CF	SF	CF
mg dm^{-3}				
	P acumulado na MS, mg $planta^{-1}$			
0	0,38 b y	1,37 a y	1,11 b x	3,37 a x
7,5	0,31 b y	1,46 a y	1,08 b x	3,64 a x
37,5	0,28 b y	1,37 a y	0,89 b x	3,91 a x
150	0,22 b y	1,40 a y	0,96 b x	3,35 a x
300	0,29 b y	1,01 a y	0,70 b x	2,61 a x
d.m.s 5% = 0,45				
	Teor de Ca na MS, g kg^{-1}			
0	7,56 a y	5,90 a y	18,47 a x	11,53 b x
7,5	8,09 a y	6,13 a y	18,95 a x	13,39 b x
37,5	8,34 a y	7,42 a y	17,19 a x	14,45 b x
150	5,11 b y	7,89 a y	18,26 a x	14,57 b x
300	7,07 a y	7,53 a y	19,34 a x	14,66 b x
d.m.s 5% = 2,53				
	Ca acumulado na MS, mg $planta^{-1}$			
0	9,08 b y	19,90 a y	25,83 b x	37,27 a x
7,5	8,01 b y	18,66 a y	28,35 b x	40,36 a x
37,5	7,48 b y	18,71 a y	24,29 b x	41,60 a x
150	4,92 b y	20,72 a y	23,17 b x	40,96 a x
300	7,43 b y	15,43 a y	22,50 b x	36,23 a x
d.m.s 5% = 5,65				
	Teor de Mg, g kg^{-1}			
0	2,20 a y	1,42 a y	4,70 a x	3,04 b x
7,5	2,24 a y	1,42 a y	5,12 a x	3,18 b x
37,5	2,11 a y	1,66 a y	5,10 a x	3,35 b x
150	1,46 a y	1,79 a y	5,14 a x	3,31 b x
300	1,90 a y	1,77 a y	5,39 a x	3,46 b x
d.m.s 5% = 0,80				
	Mg acumulado na MS, mg $planta^{-1}$			
0	2,64 b y	4,86 a y	6,60 b x	9,89 a x
7,5	2,19 b y	4,32 a y	7,57 b x	9,60 a x
37,5	1,93 b y	4,17 a y	7,28 b x	9,71 a x
150	1,39 b y	4,78 a y	7,33 b x	9,30 a x
300	1,99 b y	3,61 a y	6,10 b x	8,43 a x
d.m.s 5% = 0,46				
	Teor de Mn, mg kg^{-1}			
0	35,3 a y	20,0 a y	78,1 a x	49,6 b x
7,5	35,9 a y	17,9 a y	83,9 a x	61,0 b x
37,5	36,2 a y	23,9 a y	72,8 a x	67,9 a x
150	30,9 a y	29,4 a y	136,1 a x	63,5 b x
300	35,1 a y	28,4 a y	194,4 a x	117,5 b x
d.m.s 5% = 19,55				

continuação

Pb adicionado	V 90%		V 55%	
	SF	CF	SF	CF
mg dm^{-3}				
	Mn acumulado na MS, μg planta^{-1}			
0	41,1 a y	50,3 a y	109,1 b x	160,0 a x
7,5	34,8 a y	54,3 a y	125,5 b x	183,9 a x
37,5	32,2 a y	60,4 a y	131,9 b x	192,9 a x
150	29,5 b y	76,9 a y	171,5 a x	178,2 a x
300	36,4 a y	57,6 a y	232,3 b x	278,0 a x
d.m.s 5% = 33,79				
	Teor de Fe na MS, mg kg^{-1}			
0	50,17 a y	43,64 a y	95,1 a x	100,7 a x
7,5	66,20 a y	50,55 a y	122,3 a x	111,9 a x
37,5	59,21 a x	51,09 a y	79,3 b x	135,6 a x
150	39,92 a y	49,95 a y	78,0 b x	124,4 a x
300	42,87 a y	50,35 a y	114,2 a x	120,3 a x
d.m.s 5% = 25,4				
	Fe acumulado na MS, μg planta^{-1}			
0	58,9 b x	146,3 a y	137,2 b x	322 a x
7,5	66,5 b x	154,9 a y	182,0 b x	331 a x
37,5	52,7 b x	130,9 a y	129,9 b x	394 a x
150	37,8 b y	154,8 a y	119,3 b x	354 a x
300	44,6 a y	106,7 a y	134,1 b x	298 a x
d.m.s 5% = 68,4				
	Teor de Zn na MS, mg kg^{-1}			
0	17,88 a y	10,33 b y	53,01 a x	36,86 b x
7,5	20,47 a y	12,01 b y	64,51 a x	44,76b x
37,5	19,45 a y	19,00 a y	55,23 a x	44,81 b x
150	11,23 a y	11,50 a y	54,76 a x	41,36 b x
300	12,93 a y	16,18 a y	61,16 a x	44,48 b x
d.m.s 5% = 4,27				
	Zn acumulado na MS, μg planta^{-1}			
0	20 b y	72 a y	36 b x	120 a x
7,5	16 b y	103 a y	32 b x	132 a x
37,5	15 b y	86 a y	37 b x	118 a x
150	10 b y	82 a y	39 b x	116 a x
300	18 b y	101 a y	32 b x	95 a x
d.m.s 5% = 19,86				

Experimento II

Apêndice 2. Comparação das médias, pelo teste de Tukey a 5%, entre os fatores FMA e época para as variáveis analisadas. a, b- compara médias dos tratamentos com e sem FMA dentro da mesma V%; x, y- compara médias de época, dentro do fator FMA. (CF- com inoculação FMA; SF- sem inoculação FMA; n.d.- não determinado; d.m.s.- diferença mínima significativa).

Pb adicionado	FLORESCIMENTO		MATURAÇÃO DO GRÃO	
	SF	CF	SF	CF
mg dm^{-3}				
	C-biomassa microbiana, μg de C g^{-1} de solo			
0	120,3 a x	150,9 a y	65,3 b x	276,1 a x
150	121,7 a x	116,6 a x	56,5 a x	83,2 a x
300	93,1 a x	159,5 a x	37,3 a x	74,4 a y
600	90,8 a x	62,1 a x	54,9 a x	51,4 a y
d.m.s 5%= 70,10				
	Respiração do solo, μg de CO_2 g^{-1} dia^{-1}			
0	27,27 a x	31,95 a x	8,53 b y	19,40 a y
150	20,64 a x	26,88 a x	11,44 b y	18,71 a y
300	18,73 b x	32,22 a x	12,85 a x	17,55 a y
600	18,64 b x	25,61 a x	8,60 a y	9,50 a y
d.m.s 5% = 6,51				
	Quociente metabólico,μg de C-CO_2 h-1			
0	94,78 a x	68,22 a x	48,69 a x	23,01 a x
150	80,74 a y	113,60 a x	154,44 a x	146,47 a x
300	85,23 a y	109,44 a x	156,27 a x	102,08 a x
600	76,28 a x	120,22 a x	112,18 a x	86,60 a x
d.m.s 5% = 65,85				
	Atividade desidrogenase, μg de TTC g^{-1} h^{-1}			
0	27,05 a x	30,39 a x	15,81 a y	14,30 a y
150	30,62 a x	29,96 a x	15,74 a y	13,95 a y
300	32,82 b x	22,96 a x	17,09 a y	13,84 a y
600	32,17 b x	23,07 a x	17,80 a y	13,55 a y
d.m.s 5% = 5,19				
	Atividade fosfatase alcalina, μg de p-nitrofenolfosfato g^{-1} h^{-1}			
0	650,9 b y	1076,7 a x	997,9 a x	853,5 a y
150	365,2 b x	656,2 a x	336,1 a x	372,1 a y
300	678,2 a x	626,8 a x	380,4 a y	470,8 a x
600	561,1 a x	525,1 a x	401,6 a x	387,1 a x
d.m.s 5% = 172,4				

continuação

Pb adicionado	FLORESCIMENTO		MATURAÇÃO DO GRÃO	
	SF	CF	SF	CF
mg dm^{-3}				
	Atividade arilssulfatase, μg de p-nitrofenolfosfato g^{-1} h^{-1}			
0	182,3 a x	171,1 a y	146,5 b y	204,4 a x
150	160,4 a x	142,1 a y	145,7 b x	199,8 a x
300	157,1 a x	111,3 b y	154,3 b x	195,9 a x
600	134,3 a y	127,2 a y	168,8 b x	197,6 a x
d.m.s 5% = 20,61				
	Esporulação, número de esporos/50 mL de solo			
0	n.d	n.d	n.d	1055
150	n.d	n.d	n.d	747
300	n.d	n.d	n.d	682
600	n.d	n.d	n.d	339
	Colonização micorrízica, %			
0	n.d	33,66 x	n.d	36,11 x
150	n.d	24,89 x	n.d	23,14 x
300	n.d	29,02 x	n.d	26,44 x
600	n.d	15,04 x	n.d	21,62 x
d.m.s 5% = 6,72				
	Numero de nódulos, nódulos $vaso^{-1}$			
0	12,3 b	58,8 a	n.d	n.d
150	33,8 b	52,3 a	n.d	n.d
300	7,3 b	47,0 a	n.d	n.d
600	8,8 b	34,5 a	n.d	n.d
d.m.s 5% = 0,78				
	Matéria seca dos nódulos, mg $vaso^{-1}$			
0	5,0 b	139,8 a	n.d	n.d
150	22,8 b	158,8 a	n.d	n.d
300	2,1 b	100,8 a	n.d	n.d
600	2,0 b	71,2 a	n.d	n.d
d.m.s 5% = 39,87				
	Número de vagens, vagens $vaso^{-1}$			
0	n.d	n.d	4,8 b	14,0 a
150	n.d	n.d	4,8 b	12,3 a
300	n.d	n.d	3,8 b	9,3 a
600	n.d	n.d	3,5 b	9,3 a
d.m.s 5% = 0,39				

continuação

Pb adicionado	FLORESCIMENTO		MATURAÇÃO DO GRÃO	
	SF	CF	SF	CF
mg dm^{-3}				
	Matéria seca das vagens, **g $vaso^{-1}$**			
0	n.d	n.d	0,3 b	1,7 a
150	n.d	n.d	0,5 b	1,9 a
300	n.d	n.d	0,3 b	1,2 a
600	n.d	n.d	0,2 b	1,4 a
d.m.s 5% = 0,607				
	Matéria seca da parte aérea da soja, g $vaso^{-1}$			
0	1,66 a x	2,30 a y	2,32 b x	5,29 a x
150	1,68 a y	2,05 a y	2,60 b x	5,03 a x
300	1,88 a x	2,48 a y	1,95 b x	5,52 a x
600	1,79 a x	2,45 a y	1,71 b x	4,96 a x
d.m.s 5% = 0,86				
	Teor de N na MS, g kg^{-1}			
0	44,93 a x	38,80 a x	43,13 a x	25,00 b y
150	38,75 a x	39,05 a x	35,73 a x	27,73 b y
300	37,05 a y	29,88 b x	44,98 a x	25,58 b x
600	37,45 a y	37,08 a x	44,58 a x	26,25 b y
d.m.s 5% = 7,08				
	Teor de P na MS, g kg^{-1}			
0	0,79 b x	2,23 a x	0,58 b x	1,20 a y
150	0,89 b x	2,71 a x	0,81 a x	1,33 a y
300	0,98 b x	3,10 a x	0,53 b x	1,49 a y
600	1,12 b x	2,04 a x	0,64 b x	1,53 a x
d.m.s 5% = 0,54				
	Teor de K na MS, g kg^{-1}			
0	12,05 b x	15,85 a x	10,60 b x	13,15 a y
150	12,83 b x	15,85 a x	12,58 a x	13,03 a y
300	12,60 b x	16,63 a x	10,63 b x	13,15 a y
600	11,65 b x	15,20 a x	10,75 a x	12,23 a y
d.m.s 5% = 2,31				
	Teor de Ca na MS, g kg^{-1}			
0	11,74 b y	14,03 a x	14,06 a x	10,15 b y
150	11,52 b x	13,82 a x	12,24 a x	10,10 a y
300	10,08 a x	11,18 a x	10,84 a x	9,40 a x
600	11,00 a x	12,25 a x	9,88 a x	9,25 a y
d.m.s 5% = 2,03				

continuação

Pb adicionado	FLORESCIMENTO		MATURAÇÃO DO GRÃO	
	SF	CF	SF	CF
mg dm^{-3}				
		Teor de Mg na MS, g kg^{-1}		
0	3,87 a x	4,31 a x	4,09 a x	2,79 b y
150	4,03 a x	4,31 a x	3,35 a y	2,71 b y
300	3,63 a x	3,66 a x	3,22 a y	2,67 b y
600	3,90 a x	3,84 a x	3,55 a y	2,60 b y
d.m.s 5% = 0,51				
		Teor de S na MS, g kg^{-1}		
0	1,64 b x	2,23 a x	1,73 a x	1,97 a x
150	1,76 b x	2,52 a x	1,98 a x	2,04 a y
300	1,68 b x	2,70 a x	1,61 a x	2,11 a y
600	1,89 a x	2,17 a x	1,61 a x	2,16 a x
d.m.s 5% = 0,31				
		N acumulado na MS, g $vaso^{-1}$		
0	73,12 a y	87,78 a y	98,22 b x	131,27 a x
150	64,39 a y	79,59 a y	88,13 b x	140,48 a x
300	68,61 a x	72,55 a y	86,42 b x	140,39 a x
600	66,49 b x	90,04 a y	75,92 b x	128,13 a x
d.m.s 5% = 22,5				
		P acumulado na MS, g $vaso^{-1}$		
0	1,30 b x	4,97 a x	1,33 b x	6,42 a x
150	1,48 b x	5,67 a x	2,25 b x	6,71 a x
300	1,82 b x	7,67 a x	1,04 b x	8,26 a x
600	2,01 b x	4,91 a y	1,08 b x	7,66 a x
d.m.s 5% = 1,97				
		K acumulado na MS, g $vaso^{-1}$		
0	20,23 b x	35,99 a y	24,74 b x	69,14 a x
150	21,58 a x	32,84 a y	34,77 b x	65,79 a x
300	23,64 b x	41,13 a y	21,96 b x	72,28 a x
600	20,83 b x	36,97 a y	18,30 b x	60,92 a x
d.m.s 5% = 13,6				
		Ca acumulado na MS, g. $vaso^{-1}$		
0	19,20 b y	32,39 a y	32,68 b x	54,10 a x
150	19,30 a y	28,29 a y	31,93 b x	50,46 a x
300	18,67 a x	27,82 a y	20,90 b x	52,29 a x
600	19,48 a x	29,70 a y	16,74 b x	45,37 a x
d.m.s 5% = 10,30				

continuação

Pb adicionado	FLORESCIMENTO		MATURAÇÃO DO GRÃO	
	SF	CF	SF	CF
mg dm^{-3}				
	Mg acumulado na MS, g $vaso^{-1}$			
0	6,33 b y	9,87 a y	11,35 b x	14,79 a x
150	6,74 a y	8,83 a y	10,22 b x	13,59 a x
300	6,69 a x	9,03 a y	7,22 b x	14,90 a x
600	6,91 a x	9,37 a y	6,03 b x	12,91 a x
d.m.s 5% = 2,93				
	S acumulado na MS, g $vaso^{-1}$			
0	2,70 b x	5,09 a y	4,00 b x	10,48 a x
150	2,94 b y	5,21 a y	5,34 b x	10,22 a x
300	3,14 b x	6,71 a y	3,13 b x	11,59 a x
600	3,37 a x	5,27 a y	2,74 b x	10,66 a x
d.m.s 5% =1.95				
	Teor de Cu na MS, mg kg^{-1}			
0	13,26 a y	15,69 a x	19,09 a x	10,95 b x
150	12,65 a y	16,25 a x	20,78 a x	10,99 b y
300	11,17 b x	18,00 a x	12,10 a x	10,86 a y
600	15,05 a x	17,67 a x	10,38 a x	10,47 a y
d.m.s 5% = 4,93				
	Teor de Fe na MS, mg kg^{-1}			
0	11,90 a y	12,61 a x	27,28 a x	11,21 b x
150	23,88 a y	14,10 a x	40,90 a x	12,28 b x
300	10,10 a x	13,81 a x	13,33 a x	10,79 a x
600	13,37 a x	18,16 a x	18,07 a x	11,98 a x
d.m.s 5% = 12,82				
	Teor de Mn na MS, mg kg^{-1}			
0	52,3 a x	41,1 a x	64,3 a x	31,6 a x
150	118,1 b y	151,1 a x	154,9 a x	103,8 a x
300	108,7 a y	122,5 a x	151,9 a x	96,4 a x
600	93,5 a x	106,7 a x	97,9 a x	74,3 a y
d.m.s 5% = 24,95				
	Teor de Zn na MS, mg kg^{-1}			
0	165 a x	202 a x	266 a x	173 a x
150	171 a y	239 a x	314 a x	188 a x
300	134 a x	211 a x	197 a x	177 a x
600	163 b x	319 a x	193 a x	170 a y
d.m.s 5% = 114,6				

continuação

Pb adicionado	FLORESCIMENTO		MATURAÇÃO DO GRÃO	
	SF	CF	SF	CF
mg dm^{-3}				
	Teor de Pb na MS, mg kg^{-1}			
0	1,26 a x	0,10 a x	0,60 a x	0,27 a x
150	3,54 a x	4,89 a x	6,27 a x	7,25 a x
300	9,06 a x	9,64 a x	12,66 a x	11,71 a x
600	24,61 a x	21,61 a x	27,68 a x	19,37 b x
d.m.s 5% = 3,98				
	Cu acumulado na MS, μg $vaso^{-1}$			
0	21,43 a y	35,42 a y	44,70 a x	57,91 a x
150	21,15 a y	33,47 a y	51,86 a x	55,18 a x
300	20,08 a x	66,16 a x	22,74 b x	60,02 a x
600	26,09 a x	41,97 a x	1,.59 b x	51,47 a x
d.m.s 5% =18,9				
	Fe acumulado na MS, μg $vaso^{-1}$			
0	19,50 a y	29,17 a y	66,01 a x	59,65 a x
150	39,53 a y	28,48 a y	92,96 a x	60,78 b x
300	18,25 a x	34,23 a x	24,79 b x	59,50 a x
600	24,22 a x	42,69 a x	29,78 b x	60,11 a x
d.m.s 5% = 26,30				
	Mn acumulado na MS, μg $vaso^{-1}$			
0	89,5 a x	94,0 a x	150,0 a x	168,6 a x
150	195,1 b y	308,5 a y	393,0 b x	515,3 a x
300	200,5 b y	303,2 a y	288,1 b x	538,0 a x
600	165,8 b x	259,7 a y	166,2 b x	364,5 a x
d.m.s 5% = 85,74				
	Zn acumulado na MS, μg $vaso^{-1}$			
0	271 a y	463 a y	618 b x	919 a x
150	285 a y	494 a y	811 a x	937 a x
300	246 a x	523 a y	375 b x	983 a x
600	297 b x	737 a x	326 b x	839 a x
d.m.s 5% = 291				
	Pb acumulado na MS, μg $vaso^{-1}$			
0	2,33 a x	0,23 a x	1,39 a x	1,35 a x
150	5,78 a y	10,08 a y	17,42 b x	36,35 a x
300	17,14 a x	23,98 a y	25,18 b x	64,00 a x
600	43,87 a x	51,84 a y	47,03 b x	93,34 a x
d.m.s 5% = 10,78				