

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIAS DO SOLO

TESE

Potencialidades de Ecossistema Cubano
Contaminado com Metais Pesados para uma
Proposta Estratégica de recuperação

Sael Sànchez Elias

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**POTENCIALIDADES DE ECOSSISTEMA CUBANO CONTAMINADO
COM METAIS PESADOS PARA UMA PROPOSTA ESTRATÉGICA DE
RECUPERAÇÃO**

SAEL SÀNCHEZ ELIAS

Sob a Orientação do Professor
Ricardo Luis Louro Berbara

e Co-orientação do Professor
Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutor**, no Curso de Pós-
Graduação em Agronomia, Área de
Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Setembro de 2013

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

E42p Elias, Sael Sàncchez, 1979-
Potencialidades de um ecossistema cubano
contaminado com metais pesados para uma proposta
estratégica de recuperação / Sael Sàncchez Elías. -
Seropédica, 2013.
69 f.: il.

Orientador: Ricardo Luiz Louro Berbara.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia -
Ciência do Solo, 2013.

1. Fitorremediação. 2. Metais pesados. 3.
Brachiaria decumbens. 4. Fungos micorrízicos
arbusculares. 5. Bioindicadores. I. Berbara, Ricardo
Luiz Louro, 1957-, orient. II Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia - Ciência do Solo III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

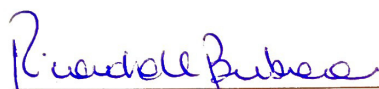
**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

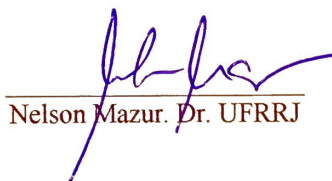
SAEL SÁNCHEZ ELÍAS

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** em Agronomia.

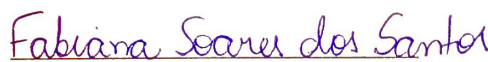
TESE APROVADA EM 28/02/2013.



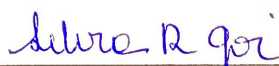
Ricardo Luis Louro Berbara. Dr. UFRRJ
(Orientador)



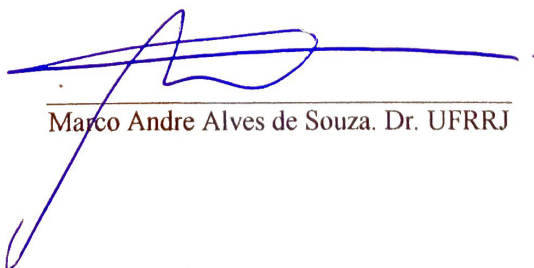
Nelson Mazur. Dr. UFRRJ



Fabiana Soares dos Santos. Dra. UFF



Silvia Regina Goi. Dra. UFRRJ



Marco Andre Alves de Souza. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

À minha família e muito em especial ao meu avô José Elías Geara por ter me levado ao mundo mágico da pesquisa.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Juan Ramón Sánchez Durand e Josefina Elias Armas, sem muitas palavras, simplesmente por tudo.

Aos meus avós paternos, Helena Durand e Pedro Valdivia, e muito especial aos maternos, Cira Armas Acosta e José Elias Geara, por me apoiarem sempre incondicionalmente e por estarem sempre ao meu lado: Pelos primeiros passos para andar, falar, escrever, fazer esporte e descobrir o mundo, pela confiança e incentivo.

Aos meus tios Carol Armas e Ceren Armas e à família Armas Acosta, em geral, por estar sempre presente quando precisei.

A Amaya, Aintzane, Yabay, Abey, Lourdes, Rita, José Emilio, Carmencita, pelo apoio de sempre, às sábias palavras, e os momentos felizes.

A Ambar Rosa Guzmán, pela amizade incondicional, colaboração e sábias palavras.

Ao professor orientador Ricardo Luis Louro Berbara, pela amizade, confiança, atenção e orientação.

Ao professor co-orientador Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho pela amizade, confiança, atenção e orientação.

À co-orientadora e professora Reitora da Universidade Agraria de la Habana-UNAH, María Irene Balbín Arias, pelo apoio, por todos os conselhos e momentos divididos.

Ao professor e coordenador do grupo de pesquisa FITOPLANT, Ramiro Valdés Carmenate, da Universidade Agraria de la Habana-UNAH, pelos primeiros passos nesta pesquisa, aporte de ideias e pelo apoio dado.

À pesquisadora da Embrapa Agrobiologia Vera Baldani, pela ajuda e apoio sempre prestado e a toda a equipe do Laboratório de gramíneas em geral.

À minha mãe brasileira, Teresinha Pasielo, pelo apoio e carinho dados.

Ao professor Marcos Gervasio Pereira pelos conselhos e apoio brindados.

Aos amigos Jair do Nascimento Guedes e Marcio O. L. Magalhães, pelo apoio nas coletas e análises de dados e pelas muitas gargalhadas.

Aos colegas, companheiros de trabalho e amigos Mayra Echemendia, Saturnina Arrebató, Fernando Guridi, Maria Margarita, René Novo e María Aurora Mesa (Aurorita) pelo apoio incondicional.

Aos amigos, companheiros de turma e de trabalho Ana Paula, Erica Souto, Leilane Lima, Michel Miranda e Eloisa Benazzi pela contribuição e ajuda até no português.

Aos amigos, companheiros de trabalho de laboratório Camila Nobre, Luiz Gilberto Ambrosio (Beto), Thiago Farllon, Thaís Souza por todos os dias de trabalho sem parar, pela dedicação ao trabalho e ajuda na pesquisa.

Aos meus compatriotas e amigos: Andrés Calderín, Liane Farias, Dariellys Balmori, Narovis Rives, pela amizade, recomendações e muitos momentos divididos.

A Yusimí Pérez, minha amiga e colega, pela amizade e por todas as horas que passou me ajudando e apoiando, que fizeram a diferença.

Ao vagner Rangel, pelos conselhos de sempre e pela amizade.

Aos meus muito queridos Luiz Filipe e Eduardo Miranda, mais que amigos, irmãos, família, meu carinho e agradecimento eterno!

A todos os professores do curso, com os que pude ter contato, pelos ensinamentos, atenção e orientação.

Aos laboratoristas e funcionários (Marquinho, Irani, Ancelmo, Elizabete, Moraes, Roberto, Cristiane, Pedro), pela paciência e ajuda.

Ao Programa Estudante Convênio de Pós-graduação (PEC-PG) da CAPES pela bolsa de estudos, chave para poder realizar este sonho.

Ao Departamento de Solos e ao Curso de Pósgraduação (CPGA-CS) – UFRRJ como estrutura física e social.

À UFRRJ, por fazer parte de minha história e permitir que eu faça da sua.

Ao Brasil e ao Rio de Janeiro, pela calorosa acolhida.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram, o meu muito obrigado!!!

BIOGRAFIA

Sael Sánchez Elías, filho de Juan Ramón Sánchez Durand e Josefina Elías Armas, nasceu na cidade de La Habana (Havana) – República de Cuba, em 13 de fevereiro de 1979. Formado no Instituto Pré-Universitário de Ciências Exatas Vladimir Ilich Lenin, iniciou em 1998 os estudos agrônômicos na Universidade Agraria de la Habana, atualmente situada na província Mayabeque-Cuba, diplomando-se em julho de 2003. Passou a trabalhar como professor de Microbiologia do Solo na Faculdade de Agronomia da mesma instituição, estando atualmente na categoria de professor Auxiliar. Fez mestrado em Agroecologia e Agricultura Sustentável no período de 2006 a 2008 sob orientação da Dr^aC. Maria Irene Balbín Arias, participando simultaneamente de vários projetos de pesquisas, dentre eles o projeto CAPES-MES, onde trabalhou sob a orientação dos professores Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho e Vera L. Baldani. A partir dos resultados alcançados no projeto, iniciou em março de 2009, sob orientação do professor Ricardo Luis Louro Berbara, seus estudos para obter o grau de Doutor em Ciências, pelo Curso de Pós-Graduação em Agronomia- Ciência do Solo, na UFRRJ.

RESUMO

SANCHEZ, Sael Elías. **Potencialidades de um ecossistema cubano contaminado com metais pesados para uma proposta estratégica de recuperação**. 2013. 69f. Doutorado (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Atualmente, observa-se cada vez mais o aumento pela procura de ferramentas que possam ser usadas na recuperação de áreas contaminadas. Uma dessas ferramentas é o monitoramento da estrutura da comunidade microbiana e a fauna do solo. Assim sendo, bactérias e fungos formadores de micorrizas (FMAs) podem contribuir no desenvolvimento de mecanismos em busca de soluções para minimizar os impactos em diversos ecossistemas degradados, sempre procurando reduzir os custos envolvidos nessas atividades. O ecossistema estudado apresenta níveis elevados de contaminação por metais pesados. Por tal motivo, os objetivos da pesquisa visam a identificar as potencialidades biológicas e químicas que existem no ecossistema contaminado para que sirva como ponto de partida para a proposta de uma estratégia de recuperação. Estes foram: a determinação dos teores pseudototais e da especiação dos metais; levantamento das espécies vegetais e dos teores acumulados nas estruturas; identificação da ocorrência de fungos micorrízicos e diversidade morfológica; isolamento de bactérias diazotróficas tolerantes aos metais pesados; caracterização do impacto dos metais na comunidade microbiana através de bioindicadores de qualidade de solos, Cmic, respiração, qCO₂ e qMic. Os metais pesados foram determinados mediante digestão nitroperclórica e a especiação mediante extração sequencial. Cada ponto foi georeferenciado e logo usou-se o inverso da distância ao quadrado (IQW) integrados em ArcGis para gerar mapas de distribuição geoespacial com os teores pseudototais dos metais pesados. No levantamento de espécies usou-se o método do quadrado. A densidade de FMAs foi feita segundo a metodologia de Gederman e Nicholson e identificados fazendo o uso da taxonomia tradicional. Como resultados, foram gerados mapas de distribuição espacial dos principais metais pesados (Pb, Zn, Co), que servem para monitoramento do processo de acumulação e mobilidade destes no solo. As espécies de maior abundância na área continuam sendo *Cynodon dactylon* e *Cyperus giganteus*, e são capazes de acumular elevados teores de metais pesados. Mediante o crescimento de *Brachiaria decumbens* num sistema de microcosmo foi possível isolar 66 colônias puras, das quais 78,78% formaram películas características para diazotróficas e destas, 25 estirpes resultaram promissoras para outros estudos por apresentar os maiores resultados de ARA, totalizando 37,87% do total. A partir do estudo da contaminação na comunidade microbiana, mediante a análise dos bioindicadores, foi determinado que os contaminantes exercem um impacto negativo na comunidade microbiana, havendo perdas do carbono orgânico no solo. Além disso, a diversidade de FMAs mais abundantes foram: *Paraglomus occultum* > *Glomus* sp > *Glomus* sp3 > *Glomus intraradices* > *Diversispora spurca*. A existência de vários gêneros de FMAs e de bactérias diazotróficas que constituem um componente funcional importante dos sistemas solo-planta neste ecossistema degradado; são fundamentais para uma produtividade sustentável, e um recurso com potencialidades para serem aprofundadas em próximos estudos, podendo usar-se conjuntamente com as gramíneas em estratégias de recuperação.

Palavras-chave: Fitorremediação. Metais pesados. *Brachiaria decumbens*. Fungos micorrízicos arbusculares. Bioindicadores.

ABSTRACT

SANCHÉZ, Sael Elías. **Potential of a Cuban ecosystem contaminated with heavy metals to a strategic proposal recovery.** 2013. 69p. Thesis (Doctor Science in Agronomy-Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Currently, it has been observed ever more increasing the search for tools that can be used in the recovery of contaminated areas. One such tool is the monitoring of microbial community structure and soil fauna. Therefore, bacteria and fungi forming mycorrhizae (VAM) can contribute to the development of mechanisms for solutions to minimize impacts on many in degraded ecosystems, always seeking to reduce the costs involved. The studied ecosystem presents high levels of heavy metal contamination. For this reason, the research objectives are used to identify the biological and chemical potential that exist in the contaminated ecosystem to serve as the starting point for a proposed recovery strategy. These were: the determination of pseudototal content and speciation of metals; survey of plant species and the levels accumulated in the structures; identify the occurrence of mycorrhizal fungi and morphological diversity; isolation of diazotrophic bacteria tolerant to heavy metals; characterizing the impact of metals on microbial community through soil quality bioindicators, Cmic, breathing, and qCO₂ QMIC. Heavy metals were determined by nitroperchloric digestion and speciation by sequential extraction. Each point was georeferenced and then we used the inverse distance squared (IQW) integrated into ArcGIS to generate geospatial distribution maps with pseudototal levels of heavy metals. Species used in lifting up the square method. The AMF density was performed according to Gerdeman methodology and Nicholson identified and have been using traditional taxonomy. The results were generated maps of spatial distribution of the main heavy metals (Pb, Zn, Co) that are used to monitor the process of accumulation and mobility of the soil. The species of highest abundance in the area remain *Cynodon nlemfuensis* and *Cyperus giganteus*, and are able to accumulate high levels of heavy metals. By the growth of *Brachiaria decumbens* in a microcosm system was isolated 66 pure colonies, of which 78.78 % formed features films diazotrophic and of these 25 strains resulted promising for further studies to present the greatest results of ARA, totaling 37.87 % of the total. From the study of contamination in the microbial community, through the analysis of the biomarkers was determined that contaminants have a negative impact on the microbial community, with losses of soil organic carbon. Moreover, the diversity of AMF were most abundant: *Paraglomus occultum* > *Glomus sp* > *Glomus sp3* > *Glomus intraradices* > *Diversispora spurca*. The existence of various kinds of AMF and diazotrophic bacteria that are an important functional component of the soil-plant systems in this degraded ecosystem; are key to sustainable productivity, and a resource with potential to be further developed in future studies, may be used together with grasses in recovery strategies.

Keywords: Phytoremediation. Heavy metal. *Brachiaria decumbens*. Arbuscular mycorrhizal fungi. Bioindicators.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), visão através de um corte transversal da raiz mostrando partes dos fungos, como formação do arbúsculo, apressório, vesícula.....	4
Figura 2. Mapa do município de San José de Las Lajas, com os focos de contaminação segundo o CEDAR (2004). Seguido de área de trabalho frente à indústria de Cerâmica Branca, pode-se observar o despejo do esgoto da indústria espalhado em uma área agrícola perto de um assentamento rural.	16
Figura 3. Matriz de dados usada para a interpolação dos 20 pontos que permitiu a geração dos mapas de distribuição espacial dos elementos traços.	18
Figura 4. Microcosmos com <i>Brachiaria decumbens</i> e solo contaminando com metais pesados.	20
Figura 5. Mapa da distribuição espacial dos valores pseudototais dos metais pesados Co, Cu, Ni, Zn e Pb, na área de despejo da Cerâmica Branca.	23
Figura 6. Área de despejo, Empresa Cerâmica Branca (posição indicada pela seta) Adalberto Vidal, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba; pontos de amostragem (pontos em azul no espaço traçado).	24
Figura 7. Distribuição espacial da concentração pseudototal do Pb; teores médios nos pontos amostrados. Conteúdo biodisponível; fração F3 da extração sequencial.	24
Figura 8. Especificação de Pb, porcentagens das frações (mgkg^{-1}), x (pontos de amostragem). F1 (solúvel em água), F2 (troçável), F3 (ácido solúvel), F4(ligado aos óxidos de Fe e Mn), F5 (matéria orgânica), F6 (residual).	25
Figura 9. Distribuição espacial da concentração pseudototal do Zn, teores médios nos pontos amostrados. Área de despejo, Empresa Cerâmica Branca Adalberto Vidal, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.....	26
Figura 10. Especificação de Zn, porcentagem das frações (mgkg^{-1}) x (pontos de amostragem). F1 (solúvel em água), F2 (troçável), F3 (ácido solúvel), F4 (ligado aos óxidos de Fe e Mn), F5 (matéria orgânica), F6 (Residual).	27
Figura 11. Distribuição espacial da concentração pseudototal do Co, teores médios nos pontos amostrados. Teores biodisponíveis e índice de biodisponibilidade (IB) nos pontos onde os teores pseudototais resultaram máximos. Área de despejo, Empresa Cerâmica Branca Adalberto Vidal, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.	28
Figura 12. Especificação de Co, porcentagem das frações (mgkg^{-1}), x (pontos de amostragem). F1 (solúvel em água), F2 (troçável), F3(ácido solúvel), F4 (ligado aos óxidos de Fe e Mn), F5 (matéria orgânica), F6 (Residual).	29
Figura 13. Análise de correlação de componentes principais ACP entre os teores pseudototais dos metais pesados.....	31
Figura 14. Processos de escoamento superficial e fenômenos cárlicos, na região onde se encontra situado o ecossistema estudado. Esquema de transporte dos resíduos que são despejados da empresa contaminadora, modificada de Febles (2006) com licença do autor.	33
Figura 15. Relação entre o incremento de qCO_2 e a biomassa microbiana. Descrito através de uma curva exponencial com a função $y=0,0498e^{0,0113x}$, onde debaixo da curva são	

indicados os três terços que está dividida área de amostragem (Terço inferior, médio e superior. Observe-se como há uma redução da biomassa microbiana em relação ao aumento do qCO ₂ (%)).	36
Figura 16. Distribuição porcentual de cada espécie por m ² dentro da área estudada.	38
Figura 17. Matriz de correlação da análise de componentes principais entre a vegetação ruderal avaliada e a concentração de metais pesados associada em cada ponto de amostragem.	40
Figura 18. a) Microcosmos com <i>Brachiaria decumbens</i> e solo contaminado; a fileira da esquerda são as testemunhas e as tres fileiras da direita os diferentes pontos de coleta de solo onde a variação dos metais (Pb, Zn, Co) é diferente. b) Figura 18b, mostra bem detalhado o desenvolvimento da planta com solo contaminado e a testemunha em areia aos 60 dias.	41
Figura 19. Concentração de pigmentos fotossintéticos (log10 dos valores mgg ⁻¹) na <i>Brachiaria decumbens</i> . T1-T9 Brachiarias no microcosmos com solo contaminado.	42
Figura 20. Teores de metais determinados na solução de extração dos pigmentos fotossintéticos.	43
Figura 21. Densidade dos isolados obtidos nos meios JNFb e NFb, Log (NMP) e medição da redução de acetileno (ARA).	45
Figura 22. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificados no ecossistema contaminado.	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Alguns autores estudaram a influência de certo metal aos FMs.....	7
Tabela 2. Principais efeitos dos metais pesados sobre as diferentes fases do ciclo de vida dos FMAs que podem influenciar os processos de formação e efeitos da micorriza (Klausberg-Filho et al., 2005).....	8
Tabela 3. Relação de FMA e interação com metais pesados e plantas hospedeiras.....	10
Tabela 4. Características químicas do solo contaminado.	19
Tabela 5. Procedimento da extração sequencial usada para o fracionamento dos metais no solo.....	19
Tabela 6. Teores totais e parâmetros de qualidade no despejo líquido e teores pseudototais no despejo sólido do canal e do substrato contaminado da área em estudo. (mg.kg^{-1} solo seco).....	32
Tabela 7. Análises microbiológicas do efluente despejado no canal e na armadilha, assim como do solo contaminado próximo da zona de saída do efluente.	34
Tabela 8. Indicadores biológicos do solo.	35
Tabela 9. Classificação de espécies ruderais identificadas nos pontos geo-referenciados.....	38
Tabela 10. Teores totais de Pb, Co e Zn (mgKg^{-1} de massa seca) presentes nas partes aéreas e radical nas espécies predominantes na área contaminada.	39
Tabela 12. Densidade de isolados bacterianos obtidos em meios seletivos para bactérias diazotróficas pelo NMP/mL, a partir do microcosmos.....	44
Tabela 13. Abundancia de espécies de fungos micorrízcos arbusculares (FMAs) identificadas no ecossistema contaminado comparadas com um ecossistema não perturbado.	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Fungos Micorrízicos Arbusculares	3
2.1.1. Resposta das gramíneas à micorrização	5
2.1.2. Associação da <i>Brachiaria decumbens</i> com fungos micorrízicos arbusculares.....	6
2.1.3. Micorrizas arbusculares e metais pesados.....	7
2.1.4. Principais benefícios dos FMAs e seu uso na fitorremediação.....	9
2.2. Metais Pesados	12
2.2.1. Conceito de metais pesados	12
2.2.2. Metais e bactérias	12
2.2.3. Especificações dos metais pesados	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Descrição do Solo Contaminado.....	17
3.2. Amostragem do Solo	17
3.3. Análises Laboratoriais	18
3.3.1. Extração sequencial dos metais pesados	19
3.3.2. Análises químicas e microbiológicas dos efluentes líquidos	19
3.4. Levantamento de Espécies Vegetais.....	20
3.5. Microcosmos.....	20
3.5.1. Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos	21
3.5.2. Isolamento de bactérias diazotróficas e atividade da nitrogenase.....	21
3.5.2. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares.....	22
3.5.3. Identificação de espécies.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Análises do Solo	23
4.1.1. Distribuição espacial de metais pesados	23
4.1.2. Análise de correlação e componentes principais dos metais pesados.....	30
4.1.3. Análises dos efluentes que são despejados na área.....	31
4.2. Impacto dos Metais Pesados na Microbiota do Solo	34
4.2.1. Bioindicadores de qualidade: Cmic, C-CO ₂ , qCO ₂ e qMIC	34
4.3. Vegetação Ruderal	37
4.3.1. Análise de correlação entre as espécies vegetais e os metais pesados.....	40
4.4. Microcosmos.....	41
4.4.1. Pigmentos fotossintéticos.....	41
4.4.2. Bactérias diazotróficas	43
4.4.3. Atividade da nitrogenase por método da redução do acetileno.....	45
4.5. Fungos Micorrízicos Arbusculares	46
5. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

A poluição do solo por metais pesados, promovida por atividades industriais, tem levado uma situação de risco ao ambiente envolvido. Exemplo disso é a Cia Mercantil e Industrial Ingá, que teve sua atividade operacional iniciada em julho de 1965 e encerrada em 1998 em função de seu passivo ambiental estimado em 2 milhões de m³ de resíduo contaminado com metais pesados. O Porto de Itaguaí-RJ expandiu suas atividades de exportação de minério e as áreas adjacentes ao porto, em função da aproximação da indústria Ingá, foram gradualmente contaminadas com metais pesados ao longo dos últimos 20 anos. Os efeitos são sentidos até hoje. No caso de Cuba, o município de San José de las Lajas conta com um polo industrial. Uma dessas indústrias, a de Cerâmica Branca, fundada na década de 1950, não possui sistemas eficientes para tratar os resíduos resultantes do seu sistema produtivo. Estes têm se acumulado num ecossistema ao longo de meio século, afetando o entorno e à população circundante.

Todos os programas de remediação *in situ* seguem uma estratégia de contenção do contaminante ou de redução do contaminante (“limpeza”). Estratégias de descontaminação baseadas em plantas (fitorremediação) estão entre as técnicas mais recentes utilizadas para a redução de contaminantes *in situ*, por serem eficientes e de baixo custo.

Cada vez mais vem aumentando a procura por ferramentas que possam ser usadas no monitoramento do uso dessas plantas fitorremediadoras. Uma dessas ferramentas visa a monitorar a estrutura da microbiota e fauna do solo. Assim sendo, o estudo dos FMAs vem contribuir no desenvolvimento de mecanismos em busca de soluções que possam minimizar os impactos decorrentes da disposição deste resíduo e, ao mesmo tempo, procura reduzir os custos envolvidos nessa atividade.

Isso pode ser sustentado devido a resultados de pesquisas, os quais indicam que a presença dos FMAs em ambientes contaminados por metais pode levar à atenuação dos sintomas de toxicidade ou mesmo reduzir sua absorção excessiva pelas plantas. Desta forma, os fungos micorrízicos podem auxiliar no estabelecimento de plantas num ambiente desfavorável, abrindo as perspectivas de seu emprego na recuperação de áreas degradadas e contaminadas por metais em programas de fitorremediação ou fitoestabilização.

A grande motivação para realizar esse trabalho consistiu na necessidade de recuperar a área contaminada, estudada pelo despejo dos resíduos da Empresa de Cerâmica Branca, correspondente ao município de San José de las Lajas, província Mayabeque, em Cuba. A falta de informação e de trabalhos de pesquisa deste tipo em todo o país, onde as pesquisas com técnicas de biorremediação são voltadas para a recuperação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos, principalmente petróleo, evidenciou a necessidade de estudar os solos, sua composição mineralógica e sua microbiota e fauna.

A própria empresa envolvida no problema ambiental aproximou-se da Universidade Agrária de la Habana (UNAH) e esta também se interessou em dar solução ao problema ambiental. Os primeiros estudos começaram em 2005, com a formação de trabalhos comunitários e a identificação do que poderia ser feito no local e com a população afetada. Posteriormente, foi criado o grupo multidisciplinar de pesquisas Fitoplant, pertencente à Faculdade de Agronomia da UNAH. Os trabalhos conseguintes, em 2008, fizeram com que o projeto de estudo para a recuperação deste ambiente e/ou ecossistema adquirisse um caráter multidisciplinar. Com a incorporação dos projetos CAPES/MES e a parceria do Departamento de Solos, do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), o caminho escolhido foi o da identificação das potencialidades biológicas na área,

para poder estabelecer estratégias de recuperação onde futuramente sejam utilizadas as técnicas de fitorremediação e biorremediação.

Assim sendo, expõe-se a seguinte hipótese: em ambientes contaminados por metais pesados encontram-se plantas e microorganismos rizosféricos adaptados a tais condições, dentro das quais há gramíneas em associação com fungos micorrízicos e bactérias diazotróficas. Estes podem ser potencialmente utilizados no estabelecimento de técnicas de recuperação desses solos (Biorremediação).

Para a abordagem desta hipótese, foram traçados os seguintes objetivos: caracterização química do solo, teores pseudototais e biodisponíveis medidos através da especiação dos metais; levantamento das espécies vegetais; determinação dos teores acumulados nas plantas; identificação da ocorrência de fungos micorrízicos; caracterização da diversidade morfológica de FMAs; isolamento das bactérias Diazotróficas tolerantes aos metais pesados e caracterização do impacto antropogênico na comunidade microbiana através de biondicadores de qualidade de solos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Ao longo das últimas décadas, as atividades industriais aumentaram o nível de poluição na biosfera, incluindo os diferentes solos, com um impacto negativo sobre o meio ambiente. Entre estes poluentes, os metais pesados são considerados as causas mais importantes de contaminação do solo.

O efeito da contaminação por metais pesados é refletido no ciclo dos nutrientes, o que pode ser determinado através da estimativa do nível de biomassa microbiana, de emissão de CO₂, a atividade enzimática e a decomposição da matéria orgânica. A resposta das plantas à contaminação por metais pesados varia de acordo com o nível de contaminação, o tipo de solo, assim como também com a diversidade de microrganismos e plantas que influenciam os processos do solo (Gattai, et al., 2011)

Entre os microrganismos comuns a muitos tipos de solos, encontram-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e as bactérias fixadoras de nitrogênio que podem aumentar a taxa de sobrevivência de certas plantas, ajudando-as na extração de diversos nutrientes e água, ao mesmo tempo, promovendo a manutenção de raízes saudáveis, no caso dos FMAs. Também podem potencialmente contribuir para a recuperação de solos contaminados por metais pesados, a partir de ambientes poluídos.

2.1. Fungos Micorrízicos Arbusculares

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) forma uma relação mutualística com mais de 80% das plantas terrestres, desde as briófitas até as traqueófitas (Smith & Read, 2008). Essa relação é muito provável que tenha acontecido aproximadamente há 460 milhões de anos e pode ter tido um papel importante no estabelecimento das plantas na terra (Redecker et al., 2000; INVAM, 2012). FMAs produzem abundantes estruturas fúngicas ramificadas, arbúsculos e vesículas dentro das células corticais da raiz nas plantas hospedeiras, com as que elas trocam substâncias inorgânicas, especialmente fósforo e compostos de carbono (Smith & Read, 2008).

O FMA é um dos organismos mais abundante na rizosfera e podem ser encontrado formando simbiose com mais de 200 mil espécies de plantas. Mesmo com a ampla relação com as plantas, FMAs tem sido reportado com uma baixa diversidade de espécies, sendo descritas aproximadamente 240 espécies dentro de um filo, o Glomeromycota (Schubler e Walker, 2010; Krüger et al., 2012). Entretanto, estudos moleculares indicam que a diversidade de fungos pode ser muito maior (Fitter, 2005).

Várias formas de simbiose são reconhecidas, incluindo associação micorrízica arbuscular, ecto-, ericoide, arbutoide orquidoide (Smith & Read, 2008). A capacidade de formar micorriza arbuscular (MA) é restrita a fungos pertencentes a cinco famílias (Gigasporaceae, Glomeraceae, Acaulosporaceae, Paraglomaceae e Archaeosporaceae) da ordem Glomerales do filo Glomeromycota (Stürmer & Siqueira, 2006), (*Acaullospora*, *Archaeospora*, *Entrophospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Paraglomus* e *Scutellospora*) (INVAM, 2012). Plantas em simbiose micorrízica sofrem alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares relacionadas com o seu sistema de defesa para que a simbiose seja estabelecida (Garcia-Garrido e Ocampo, 2002). Essas respostas, entretanto, são limitadas, transientes e restritas a células específicas, porém as reações nas plantas têm semelhanças, do ponto de vista fisiológico, com as reações que se observam durante a infecção por patógenos (Lambais et al., 2003).

Muitos FMAs tem sucesso na colonização das plantas alvos, o que indica a falta de especificidade do hospedeiro (Smith & Read, 2008), por tal motivo assumiu-se o critério que os FMAs poderiam ser funcionalmente desnecessários (Allen et al., 1995), sendo ignorados

durante muito tempo os papéis dos FMAs nos ecossistemas, embora tenha sido relatados suas funções no processo de absorção do fósforo (Munkvold et al., 2004, Burleigh et al., 2002; Smith et al., 2004) e se conheça que diferenças na composição da comunidade de FMAs podem ter nas plantas efeitos diferentes, influenciando até na diversidade destas e na variabilidade de um ecossistema determinado, devido ao papel funcional que pode ter o efeito da simbiose sobre as plantas. Por tal motivo, os estudos mais recentes sobre FMAs tem se concentrado nas funções relacionadas à genética da espécie e seu papel no funcionamento dos ecossistemas naturais

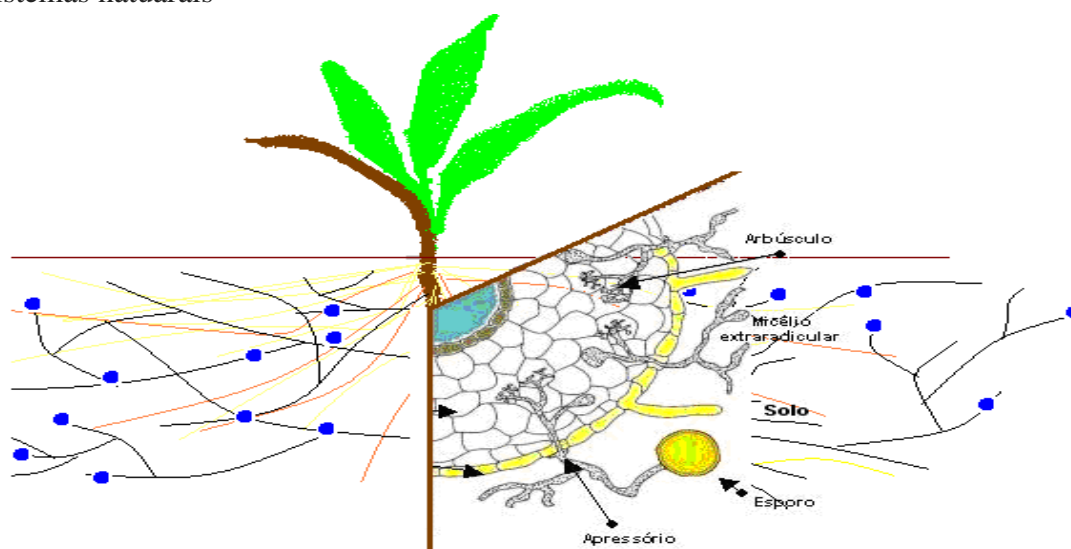


Figura 1. Características dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), visão através de um corte transversal da raiz mostrando partes dos fungos, como formação do arbúsculo, apressório, vesícula.

Esta simbiose fungo-planta é encontrada em ecossistemas de todo o mundo e envolve a translocação de carbono da planta para o fungo e promove a captação e o transporte de nutrientes do solo, principalmente de fósforo, na planta, através do fungo (Abbot e Robson, 1984; Newman e Reddel, 1987; Berbara et al., 2005). Além disso, ela também está associada a uma série de benefícios adicionais, incluindo a aquisição de outros nutrientes minerais, como o nitrogênio, zinco e a proteção a uma variedade de tensões, como infecções patogênicas. A maioria das plantas é capaz de formar associações com uma ampla variedade de fungos, entretanto, é evidente que existem diferenças a nível funcional. A razão pelo qual algumas plantas não formam micorrizas não é totalmente conhecida, mas pode estar relacionada à presença de compostos com atividade antifúngica em tecido cortical da raiz (Berbara et al., 2006).

A maioria das pesquisas de fungos micorrízicos tem foco na resposta individual de plantas hospedeiras, e não na população de plantas ou a nível comunitário. No entanto, um trabalho recente indicou que a simbiose micorrízica pode influenciar a concorrência com plantas daninhas, as respostas demográficas, estrutura da comunidade, e a dinâmica sucessional de algumas comunidades de plantas (Allen, 1991; Read, 1991; Goldberg e Barton, 1992; Hartnett et al., 1994).

Segundo Cavalcante et al. (2001), a contribuição dos FMA é otimizada em condições de cultivo sujeitas à deficiência hídrica atribuindo-se o papel preponderante da relação fungo-planta para manutenção do crescimento vegetal sob estresse hídrico.

A simbiose pode melhorar a resistência de plantas à seca, salinidade e outros estresses ambientais. Esses fungos do solo podem alterar o comportamento dos estômatos de seus hospedeiros (Augé et al., 1986).

O estresse hídrico é um dos principais entraves agrícolas nos trópicos semi-áridos. A seca inibe a fotossíntese e perturba o delicado mecanismo de controle de oxigênio em nódulos. Este último é essencial para a fixação de nitrogênio ativo (Goicoechea et al., 1995). FMAs podem proteger as plantas do hospedeiro contra os efeitos prejudiciais causados pelo estresse hídrico (Ruiz-Lozano et al., 1999; Sanchez-Diaz e Honrubia, 1994).

Mecanismos têm sido propostos para explicar a proteção da simbiose micorrízica, como alterações nos hormônios de plantas (Allen et al., 1982; Barea e Azcón-Aguilar, 1982; Danneberg et al., 1992; Goicoechea et al., 1995), aumento de trocas gasosas e da taxa fotossintética (Ruiz-Lozano et al., 1996), a absorção de água direto das hifas do solo e da transferência para a planta hospedeira (Hardie, 1985; Faber et al., 1991; Ruiz-Lozano e Azcón, 1996), o reforço das enzimas envolvidas na defesa anti-oxidante (Ruiz-Lozano et al., 1996), a assimilação de nitrato (Ruiz-Lozano e Azcón, 1996), a absorção de água melhorada através de condutividade hidráulica e o aumento da condutância foliar (Koide, 1985; Dell Amico et al., 2002), adaptação, osmótica (Augé et al., 2004) e as alterações na elasticidade da parede celular (Augé et al., 1987; Sanchez-Diaz e Honrubia, 1994).

Em diferentes níveis de zinco, a colonização micorrízica aumenta a absorção de zinco e acúmulo nas raízes. Isso pode ajudar a explicar a redução da toxicidade do zinco em altas concentrações (Chen et al., 2003).

Micorrizas podem aumentar a capacidade da planta de conseguir água em situações de estresse associadas à deficiência de nutrientes e secas (Schreiner et al., 1997).

O desenvolvimento de tolerância ao estresse devido a associações de plantas com FMA pode ser uma estratégia promissora para a fitorremediação e medidas de melhoria do solo.

2.1.1. Resposta das gramíneas à micorrização

É amplamente aceito que as plantas com sistema radicular altamente ramificado (Gramineae) são menos dependentes dos fungos (Smith et al., 2003; Carneiro et al., 2007; Costa et al., 2007; Souza et al., 2011) para o crescimento normal do que aqueles com raízes mais grossas (por exemplo, mandioca, cebola). As ramificações nas raízes determinam dependência de plantas sobre a simbiose.

As gramíneas geralmente apresentam elevada diversidade, facilidade de semeadura, rápido crescimento e estabelecimento, garantem a cobertura e proteção do solo e, por isso, destacam-se como potenciais para revegetação de áreas contaminadas por metais pesados. Além disto, as gramíneas associam-se a fungos micorrízicos arbusculares (FMA) que exercem grande influência sobre estas plantas, constituindo-se em importantes componentes bióticos do ecossistema (Smith & Read, 2008). Esta associação amplia o potencial de absorção pelo sistema radicular, facilitando a absorção de íons e de água do solo, o que pode aumentar a capacidade extratora das plantas (Klauber-Filho et al., 2005) e a ação filtrante e purificadora do solo (Safir et al., 1990). Plantas com fungos micorrízicos produzem maior quantidade de massa vegetal e absorvem e acumulam mais metais que plantas sem esses fungos (Chen et al., 2003).

Carneiro et al. (2001) mostraram que a semeadura conjunta de gramíneas e crucíferas, em solo contaminado e infestado com propágulos de FMA, aumentou a extração de metais biodisponíveis e facilitou o estabelecimento posterior da gramínea.

O arroz (*Oryza sativa*) é uma gramínea que é convencionalmente cultivado sob condições de inundação para a maioria do seu ciclo de crescimento (Kamoshita et al., 2008).

No entanto, cerca de metade da área de arroz no mundo não têm água suficiente para manter as melhores condições de crescimento e a produtividade é reduzida pela seca (Bernier et al., 2008; Ruiz Sanchez et al., 2012). Uma forma de aumentar a produção de arroz, a fim de atender a demanda, é melhorar a sua tolerância à seca por meio da simbiose de fungos micorrízicos arbusculares (Vallino et al., 2009). A simbiose reforça a eficiência fotossintética de plantas sob estresse em mais de 40%, induz o acúmulo de moléculas antioxidantes, a glutathione reduz o acúmulo de peróxido de hidrogênio e o dano oxidativo a lipídios nessas plantas (Ruiz-Lozano et al., 2008). Assim, estes efeitos combinados melhoraram o desempenho das plantas após um período de estresse hídrico (Porcel et al., 2004).

Como resultado desta simbiose com fungos micorrízicos arbusculares há a proteção das plantas hospedeiras contra os efeitos prejudiciais de déficit hídrico (Ruiz-Lozano, 2003; Ruiz-Lozano et al., 2008). Estudos realizados até agora têm sugerido vários mecanismos pelos quais esta associação pode aliviar o estresse hídrico em plantas hospedeiras. As mais importantes incluem: a captação direta e transferência de água através das hifas do fungo com a planta hospedeira (Hardie, 1985; Ruiz-Lozano e Azcón, 1996), mudanças nas propriedades de retenção de água do solo (Augé, 2001), melhor ajuste osmótico em plantas com esta associação com fungos (Augé et al., 1992; Kubikova et al., 2001; Ruiz-Lozano et al., 1995) e proteção contra o dano oxidativo gerado pela seca (Porcel e Ruiz-Lozano, 2004; Porcel et al., 2003; Ruiz-Lozano et al., 2001).

Em *Brachiaria decumbens*, a redução nos teores de metais na parte aérea causada pela micorriza, ameniza a toxidez dos metais, o que favorece o crescimento e, como consequência, a maior extração de metais do solo. Uma maior taxa de colonização radicular de fungos pode contribuir para o desenvolvimento da planta (Smith & Read, 2008).

2.1.2. Associação da *Brachiaria decumbens* com fungos micorrízicos arbusculares

Brachiaria decumbens, conhecida como capim-brachiaria ou braquiárinha é uma planta da família Poaceae. Consiste em uma planta perene, nativa da África, a qual foi introduzida no Brasil como forrageira e transformou-se em uma espécie invasora de diversos ecossistemas brasileiros, como o cerrado (Zupo, et al., 2010). Como invasora, ela impede o desenvolvimento das gramíneas (Alelopatia) nativas e sufoca o desenvolvimento dos campos nativos (Fagioli et al., 2000).

Carneiro et al. (1995), avaliando os efeitos de *Brachiaria decumbens* na revegetação de solos degradados, observaram, além da proteção física do solo, aumento da biomassa de raízes, enriquecimento do solo em carbono e aumento de 400% na densidade de esporos no solo, quando inoculada com *G. etunicatum*, confirmando ser esta espécie de gramínea boa multiplicadora desses fungos.

Cuenca et al. (1998), em solos degradados da Venezuela, através do excesso de Bauxita pela mineração, também verificaram que a revegetação com braquiária proporcionou aumento da densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares, de 18 a 471 vezes, com relação a solos degradados, não revegetados.

A contribuição dos fungos micorrízicos arbusculares para o acúmulo de metais pesados na *Brachiaria decumbens* é maior para o Cu, cuja retenção nas raízes é favorecida pela micorriza. Segundo Nogueira et al. (2004) menores teores de Mn em grãos de soja com inoculação de FMA, correspondem a maiores quantidades acumuladas nas plantas deste metal nas. Resultados semelhantes foram relatados sobre diversas gramíneas, em solo contaminado por metais pesados (Klauber-Filho et al., 2005).

De acordo com a pesquisa realizada por Carneiro et al. (2001) sobre o estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares, a semeadura conjunta de gramíneas, entre elas a *Brachiaria*

decumbens, e mostarda e a inoculação de FMAs favorece o estabelecimento das plantas em misturas de solo contaminado com metais pesados; são, portanto, práticas promissoras para o estabelecimento de plantas em áreas degradadas pelo excesso de metais pesados.

2.1.3. Micorrizas arbusculares e metais pesados

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) estão presentes na maioria dos ecossistemas, inclusive naqueles submetidos a alterações antrópicas. Em áreas severamente degradadas, mesmo sofrendo os efeitos de tais condições, são comumente encontrados (Miller, 1979; Melloni et al., 2003; Klausberg-Filho et al, 2005; Lins et al., 2006).

Têm ocorrência abundante em solos contaminados por metais pesados (Gaur & Adholeya, 2004; Silva et al., 2005; Stürmer e Siqueira, 2006) indicando que algumas espécies desses fungos evoluíram condicionalmente para tolerar a presença de metais (MP-Tolerância), e este fator, pode desempenhar um papel fundamental na fitorremediação do sítio contaminado (Miransari, 2011).

Os FMAs podem desempenhar um papel crucial na proteção das raízes de plantas que normalmente se desenvolvem em solos contaminados por metais pesados (GALI et al., 1994). A eficiência de proteção, no entanto, difere entre diferentes isolados de fungos micorrízicos e os diferentes metais pesados (KHAN et al., 2000). Na Tabela 1, encontra-se uma resposta de um determinado fungo micorrízico relacionado aos metais pesados. Em alguns casos, eles estudaram esses mecanismos, que são abordados no presente trabalho.

Tabela 1. Alguns autores estudaram a influência de certo metal aos FMs.

Micronutrientes e metais pesados	Autores
Ni	JAMAL et al., 2002; TURNEAU et al., 2003
Zn	PAWLOWSKA e CHARVART, 2004; JAMAL et al., 2002; WEISSENHORN et al., 1995; KOTHARI et al., 1991; TURNEAU, 1998
Cu	GONZALEZ-CHAVEZ et al., 2002; WEISSENHORN et al., 1995
Pb	PAWLOWSKA e CHARVART, 2004; WEISSENHORN et al., 1995
Mg	WEISSENHORN et al., 1995
As	TURNEAU et al., 2001
U	RUFYIKIRI et al., 2003
Al	RUFYIKIRI et al., 2000
Cd	PAWLOWSKA e CHARVART, 2004

O trabalho de Klausberg-Filho et al., (2005) aborda que o ciclo biológico dos fungos é complexo e é influenciado pelos metais pesados em suas múltiplas fases, afetando as suas relações funcionais e ecológicas. Os autores citam que esses efeitos são percebidos na germinação dos propágulos, estabelecimento da simbiose, colonização radicular, esporulação e no crescimento micelial de cada gênero e espécie dos FMAs. Os mais comumente são o atraso, inibição ou redução da germinação e colonização radicular. Para melhor compreensão foram representados na Tabela 2.

Tabela 2. Principais efeitos dos metais pesados sobre as diferentes fases do ciclo de vida dos FMAs que podem influenciar os processos de formação e efeitos da micorriza (Klausberg-Filho et al., 2005).

Fase do Ciclo	Resposta Avaliada	Mecanismo/Comentário Principal
Germinação de esporos	Tempo requerido para manutenção, quebra de dormência e taxa de velocidade de germinação	Efeito fungistático (reversível) dependendo do metal e da biodisponibilidade no meio. Diversidade quanto tolerância. Germinação reduzida ou retardada pelo excesso de metais
	Cumprimento e distribuição das hifas dos esporos, hifas do solo e pedaços de raízes colonizadas	Inibição parcial ou total do crescimento da hifa germinativa. Efeito variável para cada espécie/isolado fúngico
Colonização radicular	Desenvolvimento e crescimento das hifas e características de ocupação das raízes	Redução em altas concentrações de metais no solo. Grau de inibição dependente da biodisponibilidade e do tipo de metal
Crescimento das hifas no solo	Cumprimento e distribuição das hifas no solo (extra-radicular)	Inibição muito diferenciada e variável em função do fungo Efeito relacionado ao grau de colonização
Formação de propágulos	Numero e velocidade de produção de propágulos	Apresenta plasticidade quanto à capacidade de esporular na presença de quantidades excessivas de metais. Efeitos de colonização

Diversos estudos têm demonstrado que ecótipos de fungos micorrízicos procedentes de locais contaminados com metais pesados parecem apresentar mais tolerância a estes metais do que as estirpes de solos não contaminados (Galli et al., 1994; Hetrick et al., 1994; Leyval et al., 1995, Solís-Domínguez et al., 2011, Carrasco et al., 2011). No entanto, em relação aos FMAs os mecanismos de tolerância (MP-tolerância) são divergentes. Alguns autores indicam que sob o efeito de micorrizas, plantas em solos contaminados são capazes de acumular mais metais nos tecidos, tolerando-os até níveis que sejam tóxicos para estas (Weissenhorn e Leyval et al., 1997; Punamiya et al., 2010). Enquanto outros pesquisadores acharam valores reduzidos de metais nos tecidos vegetais de plantas micorrizadas (Heggo et al., 1990; Díaz et al., 1996). Na literatura especializada, são achadas publicações em ambos os grupos. O que mostra a diversidade de respostas e papéis dos FMAs, evidenciando a necessidade de estudos sobre os mecanismos de tolerância envolvidos.

Alguns aspectos aqui considerados conferem aos FMAs grandes vantagens para serem usados junto com plantas em processos de recuperação de áreas contaminadas com metais pesados. Particularmente quando se quer que plantas hiperacumuladoras de metais pesados sejam mais eficientes extraíndo tais elementos do solo. Estirpes de FMAs estimulam a fitoextração, podendo ser aplicada a fitorremediação para recuperar estes ambientes contaminados. Enquanto outros estão mais interessados em estabilizar os metais (fitoestabilização) no solo (Khan et al., 2000; Göhre e Paszkowski, 2006).

2.1.4. Principais benefícios dos FMAs e seu uso na fitorremediação

Díaz et al., (1996) estudaram a influência da absorção de Zn e Pb por *Lygeum spartum* e *Anthyllis cystosides*, plantas inoculadas com *Glomus mosseae* e *G. macrocarpum*, em solos diferentes níveis de metais pesados. Eles mostraram que em baixos níveis, as plantas tiveram igual ou superior concentrações de Pb do que as testemunhas que não estavam micorrizadas; nas doses elevadas, as concentrações de metais das plantas micorrizadas com *G. mosseae* foram inferiores às encontradas nos controles correspondentes, enquanto que as plantas inoculadas com *G. macrocarpum* apresentaram níveis semelhantes ou até superiores aos dos controles.

Galli et al (1998) relataram um aumento de Cisteína em raízes micorrizadas de milho cultivado em areia de quartzo sob adição de Cu. Como não houve diferenças na absorção do metal entre as plantas micorrizadas e as não micorrizadas, este resultado não suporta a idéia de que FMAs protegem ao milho de toxicidade pelo Cu. Mas, como qualquer simbiote, eles produzem substâncias estimuladoras, favorecendo a nutrição mineral, o crescimento e a biomassa, aspectos que podem tornar interessante uma estratégia viável ao uso da fitorremediação para a recuperação de solos contaminados.

Numa área cultivada com milho, afetada por Zn, foi reportado o efeito negativo do metal sobre uma população indígena de rizóbios, e nenhum efeito adverso nos esporos de FM (Weissenhorn e Leyval, 1992). Para poder chegar a análises concretas é preciso considerar vários fatores do solo, tais como: teores de argila, mobilidade dos metais pesados, espécies de plantas, microbiota do solo, biota em geral. É importante monitorar a quantidade de metal absorvido pelas plantas e sua relação com seus simbiontes e os efeitos fitotóxicos (Khan et al., 2000).

Estudos de localização de elementos foram realizados em plantas de milho micorrizadas e cultivadas em dois tipos de solos, sob estresse de varios metais pesados. Após usarem três métodos diferentes de micro tomografias fluorescentes (*microbeam analyse*, Kaldorf et al., 1999) acharam que: o milho quando cultivado em simbioses com o isolado que eles chamaram de Br1 apresentava mais elementos essenciais como K, P e Mg e menos metais pesados, quando comparado com milho que tinha raízes não micorrizadas. Os metais pesados tinham sido depositados nas células parenquimáticas internas da raiz assim como nas estruturas intracelulares dos fungos (hifas intraradiculares, arbúsculos e vesículas). Mas as técnicas empregadas não permitiram diferenciar se os elementos observados nas células parenquimáticas tinham sido depositados nas células vegetais, no fungo ou em ambas as células (Kaldorf et al., 1999).

Segundo (Tournau, 1998; Weiersbye et al., 1999; Pagano et al., 2010) vesículas poderiam servir como compartimentos de armazenagem de metais pesados. Entretanto, resultados recentes obtidos a partir de técnicas de Expectrometria dispersiva de raios-x (EDXA) mostraram que Zn, Cu e Cd tinham sido acumulados nas paredes celulares e em grânulos electrodensos, sendo que estas estruturas encontram-se normalmente livre destes metais (González-Guerrero et al., 2008, Cornejo et al., 2013).

Foram achados teores consideráveis de metais pesados contidos na glomalina (glicoproteína produzida pelos FMAs) em forma de quelato, os autores defendem a idéia de que os FMAs poderiam ser capazes de filtrar esses elementos tóxicos e mantê-los longe das plantas (González-Chávez et al., 2004; Chern et al., 2007; Vodnik, 2008).

Gaur e Adoleya (2004) apresentaram uma relação das principais espécies de FMAs estudadas relacionando-as com metais pesados e plantas hospedeiras. De acordo com cada pesquisa, foi identificado que na presença de um metal havia preferencia para uma espécie de FMAs, independentemente da pesquisa ou planta, Tabela 3.

Tabela 3. Relação de FMA e interação com metais pesados e plantas hospedeiras.

Metais pesados	FMA's	Plantas	Autores
Cd	<i>Glomus etunicatum</i> , <i>G. intraradices</i> <i>G. macrocarpum</i>	<i>Canavalia ensiformis</i>	ANDRADE et al. 2005
As	<i>Glomus mosseae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	LIU et al., 2005
As	<i>Glomus mosseae</i>	<i>P. vittata</i>	LEUNG et al. 2006
Cd, Cu, Zn	<i>Glomus intraradices</i>	<i>Medicago truncatula</i>	HILDENBRANDT et al. 2006
Cd	<i>G. intraradices</i>	<i>Nicotiana tabacum L.</i>	JANOUSKOVÁ et al. 2005
Cu	<i>Acaulospora mellea</i>	<i>Zea mays</i>	WANG et al. 2007
As	<i>Glomus mosseae</i>	<i>P. vittatae Cynodon dactylon</i>	LEUNG et al. 2010
Cd	<i>Glomus irregulare</i>	<i>Medicago truncatula</i>	ALLOUI et al. 2011

Como bem mostra a tabela 3, tem sido isolados esporos de FMAs associados a plantas que se desenvolvem em ambientes contaminados, principalmente dos gêneros *Glomus* e *Gigaspora*. Por exemplo: *Glomus mosseae* e *Glomus fasciculatum* já foram isolados em áreas contaminadas com metais pesados, e quase na totalidade dos esporos pertencem a essas duas espécies no momento da extração e a contagem (Pawlowska et al., 1996).

De acordo com Klauberg Filho et al. (2002) os metais pesados podem exercer um efeito seletivo sobre os FMAs. Dependendo dos teores de cada metal. O que também pode ser observado na tabela 3, onde algumas espécies são mais frequentes e podem ocorrer em vários ambientes.

Os FMAs têm papel fundamental na proteção das raízes das plantas que se desenvolvem em ambientes contaminados com metais pesados. A eficiência desta proteção está condicionada aos tipos de metais e as estirpes de isolados (Galli et al., 1994).

Hifas extra-radiciais podem transportar Cd do solo para plantas de trevo, mas a transferência do fungo para a planta é restringida pela imobilização. Não sendo reportada restrição alguma entre o crescimento das hifas e os níveis extraíveis de Cd no solo (Khan et al., 2000).

Outros estudos de localização de metais dentro de micélios fungicos e raízes micorrizadas de *Euphorbia cyparissias*, cultivada em solos contaminados com Zn, acharam elevados teores de Zn na forma de cristalóides depositados dentro dos micélios fúngicos e células corticais das raízes micorrizadas. Vários autores tem encontrado estirpes de fungos micorrizícos procedentes de zonas contaminadas que mostram certa tolerância aos metais pesados (Leyval et al., 1995), tendo desenvolvido resistência em relação às mesmas espécies isoladas em solos sem contaminação. A colonização micorrizica aumenta a absorção de zinco e a acumulação do metal nas raízes. Isso pode ajudar a explicar a redução da toxicidade do zinco em altas concentrações (Chen et al., 2003).

Apenas algumas plantas (metallophytas) conseguem se desenvolver nas condições adversas de solos com elevados teores de metais pesados. Algumas espécies são reportadas na Europa Central, exemplos típicos são: *Minuartia verna*, *Armeria marítima* ssp. *halleri*, *Cardaminopsis* (*Arabidopsis*) *halleri*, *Thlaspi calaminare*, sendo reclassificada como *Viola*

ssp. lutea. calaminaria ou *V.lutea ssp. Westfalica* (Hildebrandt et al., 2006). Estas plantas têm desenvolvido diversas adaptações fisiológicas que lhes permitem competir com êxito os efeitos estressantes do meio rico em metais pesados.

A relação de plantas acumuladoras ou tolerantes com os FMAs poderia lhes permitir uma proteção adicional, possibilitando uma redução na absorção dos metais, pela contribuição das raízes micorrizadas, e talvez, isto seria o mecanismo que usam essas plantas (metalrophytas) para ter maior sucesso nas áreas contaminadas (Weissenhorn et al., 1995; Leyval et al., 1997; Kaldorf et al., 1999; Ouziad et al., 2005). Por exemplo, ambas as espécies de violetas são intensamente colonizadas por FMAs (Hildebrandt et al., 1999). Já foram coletadas folhas de *Viola ssp. lutea calaminaria*, em sítios contaminados sendo que os níveis de metais contidos nessas folhas são extremadamente baixos, ao ponto de serem comparados com plantas não-metallophytes (Hildebrandt et al., 2007). Esse efeito observado não pode ser coincidência desde que há um incremento da micorrização nas raízes com o incremento dos teores de metais pesados no solo (Audet e Charest, 2006).

Mesmo assim, a diversidade de FMAs em solos contaminados é bem menor que em locais não contaminados (Pawłowska et al., 1996; Regvar et al., 2006). Em ambientes degradados é comum ocorrer redução da diversidade de FMAs no solo. Modificações na composição quantitativa e qualitativa da comunidade fúngica, o que poderia explicar o porquê de poucas espécies de FMAs e o baixo número de esporos encontrados na rizosfera de plantas (metalófitas) acumuladoras ou tolerantes (Ouziad, 1999; Tonin et al., 2001). No entanto, um número baixo de esporos de FMAs não reflete necessariamente, um desenvolvimento limitado das espécies de FM (Regvar et al., 2006) e sim de seleção daquelas mais tolerantes (Gadd, 1993).

Segundo o trabalho de Hildebrandt et al. (2007), em um estudo para avaliação de tolerância (FMA-planta-metais pesados), o isolamento mais promissor indicou *Glomus intraradices* (estirpes: Br1 e Sy167). Br1 resultou uma espécie indígena de solos contaminados e a de maior eficácia, constatando a importância das linhagens indígenas para esses fins, já que são mais adaptados aos metais pesados (Hildebrandt et al., 1999; Kaldorf et al., 1999). Mas, nem sempre as espécies mais adaptadas a certas condições são as mais eficientes em seu mutualismo com as plantas, o que também pode acontecer nas respostas de tolerância a metais pesados. Em estudos com cafeeiro Saggin Junior e Siqueira (1995) verificaram que isolados eficientes apresentavam baixa densidade relativa de esporos nas populações indígenas de FMAs no ecossistema estudado, afirmando que “a natureza seleciona para sobrevivência e não para eficiência”. Portanto, além dos efeitos dos metais sobre as estirpes de fungos, muitos outros efeitos devem ser considerados, como o efeito dos metais sobre as plantas que se desenvolvem em ambientes contaminados, e sobre a microbiota e sua atividade (Mench et al., 1994; Weissenhorn e Leyval, 1995; Zarei et al., 2010), além da eficiência da combinação fungo-planta.

A colonização e densidade de esporos em solos contaminados já foi amplamente abordada por diversos autores, revisto em Klauber-Filho et al. (2005). Os números podem variar de acordo com a época do ano, variações no solo, conteúdo de matéria orgânica, CTC, pH, Ca trocável, assim como a interação dos efeitos da variabilidade dos metais pesados no solo. Esses efeitos podem falsear algumas interpretações, dificultando as análises adequadas. Em estudos de menos de uma década Rivera-Becerril et al (2005) demonstraram em culturas de ervilhas o efeito tampão da colonização micorrízica frente ao estresse provocado por Cd.

Em Breinigerberg, Alemanha, um estudo de caso feito por Hildebrandt et al., (2007) constataram que *Medicago truncatula* consegue se desenvolver num solo contaminado com metais pesados quando micorrizado com *G. intraradices*. No entanto, a proteção da micorriza contra a toxicidade dos metais pesados pode variar dependendo do grau de comprimento das hifas, do tipo de metal e da concentração no solo, além das espécies de FMAs, assim como

das condições de crescimento das plantas (Weissenhorn et al., 1995; Leyval et al., 1997; Hildebrandt et al., 1999; Turnau e Mesjasz-Przybylowicz, 2003). Segundo Kaldorf et al (1999) o mecanismo tampão-FM-estresse tem sido atribuído, em alguns casos, à imobilização seletiva de metais pesados nos tecidos de raízes que contêm estruturas fúngicas, ou a uma elevada capacidade para absorber os metais nos micélios extraradicaís (Joner et al., 2000) Além disto, a colonização de FMAs nas raízes tem um impacto significativo na expressão de genes de diversas plantas que tem codificado proteínas envolvidas na tolerância a metais pesados, processos de desintoxicação (Rivera-Becerril et al., 2005).

2.2. Metais Pesados

2.2.1. Conceito de metais pesados

A expressão “metais pesados”, mesmo sendo comumente usada, não é muito bem definida, podendo-se utilizar como sinônimos, “metais traço”, “elementos traço”, “micronutrientes”, “microelementos”, entre outros. Designam-se metais pesados o grupo de elementos que ocorrem em sistemas naturais em pequenas concentrações e apresentam densidade igual ou acima de 5g/cm³ (Adriano, 1986; Egreja Filho, 1993). As fontes mais comuns de metais pesados no ambiente são fertilizantes, pesticidas, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, mineração, fundição, refinamento e incineração de resíduos urbanos e industriais. Cerca de 95% de Hg; 90% de Cd; 33% de Pb e 27% de Zn são perdidos na forma de gases e particulados quando queimados (Egreja Filho, 1993).

2.2.2. Metais e bactérias

Devido à sua grande versatilidade no que diz respeito aos processos metabólicos, as bactérias sobrevivem às condições químicas e físicas extremas, permitindo-se a existência nos mais variados meios. Entre os processos metabólicos supracitados, estão incluídos respiração aeróbia e anaeróbia, nitrificação e desnitrificação, oxidação do metano, oxidação e redução do S, Fe e Mn, entre outros (Warren e Haak, 2001).

Por serem capazes de utilizar outros elétrons que não do O₂ para a respiração, influenciam o comportamento de elementos químicos, por exemplo, assim como moléculas orgânicas e vários metais. Desta forma, podem ser consideradas como agentes primários das mudanças geoquímicas devido ao seu alto potencial metabólico, altas razões de crescimento e grande capacidade de adaptação que lhe confere uma larga e abundante distribuição (Warren e Haak, 2001).

No caso dos metais, influenciam ativamente na partição dos mesmos entre as fases sólidas ou dissolvidas através do controle da formação ou dissolução de minerais, assim como pela sua habilidade de modificar condições químicas ambientais (Nealson e Stahl, 1997). Para tal, utilizam de suas enzimas extracelulares, as esterases, modificando assim as fontes de nutrientes. As exoenzimas desempenham, assim, um papel fundamental na sobrevivência em ambientes que ofereçam condições peculiares (Warren, 2005).

2.2.3. Especificações dos metais pesados

Ao longo dos estudos dos efeitos sobre poluição por metais percebeu-se a importância da identificação das formas químicas dos metais nos sedimentos, com o intuito de se determinar seu comportamento no ambiente e os processos de remobilização. Metais pesados descarregados ao meio ambiente como sais inorgânicos metálicos, por exemplo, tais como

nitratos, sulfatos ou cloretos são mais biodisponíveis que metais introduzidos como descartes de esgotos lamosos (Hooda e Alloway, 1993b, Anjum et al., 2012).

Os processos que regem a compartimentalização dos metais nos solos se traduzem em reações de adsorção-dessorção e precipitação-dissolução, o que afeta diretamente às reações de distribuição de metais entre a fase sólida e aquosa, a complexação e redox, afetando a reatividade do próprio metal (Alleoni et al., 2005). Estas reações são controladas por factores ambientais tais como o pH e também pela capacidade de troca catiônica (CTC), o potencial redox, as espécies químicas dos elementos (Adriano, 1986; Alloway, 1995; Sposito, 1989, Warren e Haack, 2001).

Além dos hidróxidos de Fe e Mn, uma variedade de sólidos também possui grande importância geoquímica no transporte e captura de metais. Em particular, sólidos orgânicos como matéria orgânica natural ou componente da matéria orgânica, como ácidos húmicos e fúlvicos se mostraram aprisionadores efetivos de elementos traços, e por isso são componentes fundamentais a serem considerados em qualquer modelo global de comportamento dos metais pesados (Warren e Haack, 2001). A relativa importância do conteúdo orgânico ou inorgânico na retenção de metais potencialmente tóxicos é uma área de intensa pesquisa (Li et al., 2001).

O pH é um fator de grande importância no comportamento dos metais no solo devido a que afeta a carga superficial da fração argila, a matéria orgânica e os óxidos de Fe e Al. Também pode influir na complexação dos metais com a matéria orgânica, na dispersão dos coloides e nas reações redox. Um aumento do pH conduz a um aumento da adsorção e retenção de cátions com um máximo à volta da neutralidade (Evans et al., 1995). No caso de Cd, a solubilidade aumentada com a diminuição do pH a partir de pH 6,5. Entre tanto, Pb e Hg aumenta a partir de valores de pH 4, enquanto que outros elementos, tais como As, Cr, Ni e Cu a solubilidade aumenta com valores de pH entre esses extremos (Anjum et al., 2012).

A CTC dos solos é amplamente dependente das superfícies de adsorção, determinadas pela quantidade e tipo de argila, matéria orgânica e os óxidos de Fe, Al e Mn. Quase sempre, quanto maior é o teor de argila, maior é a CTC e por tanto, maior o teor de metais que pode ser retidos sem perigo potencial, devido a que se limita a mobilidade e solubilidade dos metais trocados. As argilas de tipo 2:1 (montmorilonita e vermiculita) também têm maiores teores de CTC quando comparadas com as argilas de tipo 1:1 (caulinita), segundo (Evans, 1989).

A capacidade de adsorção dos óxidos de Fe, Al e Mn podem também desempenhar um papel importante no controle da imobilização de metais em solos e sedimentos (Gadde e Laitinen, 1974). Além disso, alguns metais pesados, como Co, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn apresentam afinidades muito elevadas com a matéria orgânica, formando complexos solúveis e insolúveis. O material orgânico tem tanto a propriedade de troca de cátions como a capacidade de complexação. Os processos de complexação ocorrem como uma reação de troca com as moléculas de água coordenadas que são trocadas por alguns ligandos, os quais podem ser descritos pelo princípio de ácidos fortes e fracos, e bases de Lewis (Stumm e Morgan, 1981). De acordo com o princípio de Lewis, bases fortes tem afinidade em se complexar com ácidos mais fortes, enquanto as bases fracas preferem formar complexos com ácidos fracos sob condições comparáveis de ácido base (Essington, 2004). Sendo que essas uniões são muito mais fortes devido a que os iões penetram na estrutura cristalina e são ligadas por enlaces covalentes através de átomos de O ou grupos OH.

O teor de umidade do solo é outro fator importante que rege a especiação dos metais e sua mobilidade através de reações de oxidação-redução. Condições redutoras, podem formar sulfetos de metal, que são bastante insolúveis, a mobilidade e biodisponibilidade são significativamente mais baixos do que os esperados sob condições oxidantes. Uma solução extraída de um solo tratado com lodo indica, por exemplo, a diminuição da solubilidade de Cd, Cu e Zn e o aumento da solubilidade de Mn e Fe sob condições redutoras (Bingham et

al., 1976; Kiekens et al., 1984; Chaudri et al., 2001). Entre tanto, a natureza química das superfícies minerais é o factor mais significativo que contribui para a retenção/mobilidade dos contaminantes, e estas propriedades são, em geral consideradas invariáveis durante o tempo de exposição e reacção do contaminante. Outros estudos, no entanto, demonstraram que a superfície química mineral é modificada amplamente por câmbios produzidos no estado de oxidação do Fe na estrutura cristalina mineral, pressupondo um grande impacto sobre o ambiente químico. A atividade redox da superfície mineral pode afetar o estado de oxidação e por tanto, à especiação e o comportamento químico dos ions metálicos da fase aquosa sensíveis às reacções redox. As variações na oxidação-redução devem desempenhar sobre os compostos absorventes sensíveis às reacções redox mudanças químicas "*in situ*" durante curtos períodos de tempo que produzem diferenças vitais na especiação e reatividade de todos os componentes no sistema solo-água (Adriano, 2001).

Algumas propriedades físico-químicas dos próprios metais, tais como a eletronegatividade, o potencial iônico, raio e diâmetro do íon hidratado em solução aquoso, também têm influência sobre o comportamento biogeoquímico dos metais. A electronegatividade afecta a ordem em que os metais pesados são adsorvidos pelos constituintes do solo, de modo que metais mais electronegativos tendem a formar fortes ligações covalentes com os átomos de oxigênio na superfície. Para alguns metais bivalentes as preferências de ligação se apresentam: Cu > Ni > Co > Pb > Cd > Zn > Mg > Sr (Adriano, 2001). No entanto, a força de ligação é também influenciada pelo potencial iónico (razão de carga /raio), gerando um padrão diferente: Ni > Mg > Cu > Co > Zn > Cd > Sr > Pb (Adriano, 2001). Os metais traços trivalentes Fe⁺³ e Cr⁺³ podem ser preferencialmente adsorvidos na presença dos metais divalentes mencionados. Desta forma, também os óxidos de manganês mostram uma forte preferência particularmente forte pela adsorção de Cu, Ni, Co e Pb, entre tanto, óxidos de Fe e Al absorvem preferivelmente Pb e Cu (McBride, 1994; McBride et al., 2000).

A biodisponibilidade de um elemento refere-se a formas biologicamente disponíveis que podem chegar a serem absorvidas por um organismo e integradas no seu metabolismo (Campbell, 1995), e dependerá principalmente das formas ou especiação em que os metais se encontrarem no solo e da capacidade de absorção do organismo. Este fenómeno e a toxicidade de muitos metais mostram uma forte dependência da especiação e são muitas vezes correlacionadas com a actividade do íon metálico livre (McBride et al., 2000).

Ao longo dos últimos 25 anos foram desenvolvidos uma variedade de métodos de extracção, e alguns deles têm sido amplamente utilizados pelos diferentes grupos de pesquisas; dentre dos quais se encontram os métodos de extracção simples, comumente usados para análises de ecotoxicidade e estudos da mobilidade dos metais no solo, determinando nestes casos a fracção biodisponível de metal. Além disso, tem sido usada uma variedade de extractores de soluções mais fortes de sais neutros ácidos tamponados ou sem buffers, ou agentes complexante de metais (Pickering, 1986; Lebourg et al., 1996), tais como EDTA, DTPA, ou a mistura de acetato amónio/EDTA, que tem sido amplamente utilizados.

Para estudos de especiação química, geralmente são feitos procedimentos de extracção, simples ou sequencial. No procedimento de extração sequencial vários extractores químicos são aplicados sequencialmente para a mesma amostra de cada fase, onde em cada fase há condições mais drásticas de extracção em relação ao anterior. No entanto, a grande variedade de procedimentos utilizados, faz com que os resultados obtidos em diferentes estudos sejam difíceis de comparar quanto às condições de variáveis operacionais com cada método (Filgueiras et al., 2004). Por tal motivo, a Comunidade Europeia através do Gabinete Comunitário de Referência (Método de extração sequencial-BCR), que desde 2002 é chamado de medição Standard and Testing Program (SM & TP), iniciou um programa para harmonizar a metodologia utilizada na extração sequencial para determinar metais pesados em solos e

sedimentos. Este procedimento (que ainda é conhecido como método BCR) tem sido aplicado com sucesso a uma grande variedade de matrizes sólidas, incluindo resíduo (Rauret et al., 2000; Filgueiras et al., 2004; Varejão et al., 2009).

Segundo o método BCR sem modificações, as frações consideradas são:

- Fração trocável: Metais em solução, em conjunto com carbonatos e intercambiáveis. E intercambiáveis em metais solúveis em ácido são extraídos, incluindo os metais adsorvidos. Estes metais são libertados através de uma permuta iônica por um agente de extração como o ácido acético.
- Fração redutível: Metais ligados a ferro e manganês. Oxihidróxidos de metais ligados a óxidos de ferro e manganês, instáveis são liberados em condições redutoras.
- Fração oxidável. Registrado para sulfetos metálicos e matéria orgânica. Degradação da matéria orgânica sob condições oxidantes, liberando sulfetos metálicos solúveis ou ligados a ele.
- Fração residual. Metais ligados aos minerais primários, tais como silicatos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Á área de estudo encontra-se situada em frente à Indústria de Cerâmica Branca “Adalberto Vidal” no município San José de Las Lajas (22°58'29.81" N, 82°09'57.65" O), Província Mayabeque. Foi definida pelo Centro de Desenvolvimento Agrário e Rural - CEDAR (2004) como um dos focos contaminantes do município.

Este município ocupa 10,4 % da área total da província, sendo o segundo maior em tamanho, onde 76% correspondem ao fundo agrícola, sendo 54% cultivado e 22% não cultivado. Possui várias indústrias que constituem no plano econômico, importantes fontes de emprego. No entanto, estas também são fontes de contaminação relacionadas com as atividades que realizam, as quais representam um perigo para a segurança alimentar da região (CEDAR, 2004). Foram identificadas na área um total de 32 espécies agrupadas em 22 famílias que se desenvolvem sem mostrar sintomas de toxicidade (Quevedo, 2006).



Figura 2. Mapa do município de San José de Las Lajas, com os focos de contaminação segundo o CEDAR (2004). Seguido de área de trabalho frente à indústria de Cerâmica Branca, pode-se observar o despejo do esgoto da indústria espalhado em uma área agrícola perto de um assentamento rural.

O substrato estudado se encontra situado sobre um solo do agrupamento *Ferrasols*, (WRB, 2007) segundo classificação de solos de Cuba Ferralítico Amarillento lixiviado (Hernández et al., 2004). O mesmo se situa numa posição intermédia no meso-relevo, tendo a influência aluvial de outro agrupamento de solos, conhecido como Pardo Sialíticos os quais ocupam posições mais altas. Essa influência é significativa durante eventos ciclónicos devido aos volumes das águas que arrastam uma grande quantidade de coloides e sais solúveis (Martín, 2001; Guzmán, 2006) o qual pode justificar os níveis elevados de carbonatos presentes no substrato (Guzmán et al., 2008).

As condições de contaminação por metais pesados estão relacionadas à Empresa de Cerâmica Branca “Adalberto Vidal”, que como parte do processo de produção gera resíduos líquidos e sólidos despejados na área de estudo. Os resíduos aportam ao solo elevadas concentrações de silicatos, cálcio, magnésio, níquel, cobalto, zinco e Chumbo, entre outros

elementos (Guzmán, 2006). O solo atua como um elemento filtrante, assim como as águas do lençol freático, produzem movimentos dos metais pesados a nível superficial e no intrassolo. Na mesma área se desenvolvem processos cárscicos devido à aproximação da rocha Martín (2002).

3.1. Descrição do Solo Contaminado

Horizonte AP: Possui uma profundidade de 0-20 cm. A cor quando seco é 5YR 4/6 sendo vermelho amarelado

Horizonte A: Possui uma profundidade de 20-60 cm e a cor quando seco é 2.5YR 3/6 vermelho escuro. Apresenta textura argilosa, estrutura granular e são observadas raízes. A sua reação H^+ é negativa e se observam plintitas de manganês

Horizonte B₁: Possui uma profundidade de 60-95 cm. Cor quando seco é 2.5 YR 4/6 vermelho. Textura argilosa, com uma estrutura granular fina, se observam ainda algumas raizinhas, reação H^+ é negativa e não se observam plintitas.

Horizonte B₂: 95 cm a + apresenta um material argiloso de cor vermelho.

Topografia: relevo ondulado.

Drenagem interna: regular.

Fertilidade: média.

Productividade: média, limitada pela drenagem interna no período chuvoso.

Fator de formação predominante: o clima.

Processo de formação: Ferralitização cálcica.

Fatores limitantes: São solos extremadamente secos no período pouco chuvoso pelo que precisam ser irrigados.

Clasificación Genética

Agrupamento: Ferralítico. (Ferrasols segundo WRB, 2007)

Tipo: Amarelhento

Sub-tipo: Lixiviado.

Gênero: Éutrico.

Espécie: Profundo.

Variedade: Argiloso

3.2. Amostragem do Solo

A amostragem do solo foi feita em forma de grade, coletando um total de 20 pontos em triplicata, em duas profundidades (0-20) e (20-40), de acordo com a Norma Mexicana NMX-132-SCFI-2006 (SCFI 2006) e metodologia de Valdés et al. (2006). Cada ponto foi georeferenciado com ajuda de um GPS manual (Garmin Etrex 12555489). Com os dados coletados, foi construída uma planilha em excel e a cada ponto lhe foi atribuído uma localização geográfica de acordo ao sistema GIS. Usando os módulos do sistema Spatial Analyst do ArcGis (9.2 ESRI) os dados de localização foram convertidos em UTM. Através dos interpoladores do inverso da distância ao quadrado (IQW) foram gerados mapas de distribuição geoespacial dos teores pseudototais dos metais pesados determinados

Grid Datum	UTM WGS 84								
Header	Name	Description	Type	Position	Altitude				
waypoint		01	User	waypoint	17 Q 380213	2541221			
waypoint		02	User	waypoint	17 Q 380221	2541206			
waypoint		03	User	waypoint	17 Q 380208	2541210			
waypoint		04	User	waypoint	17 Q 380243	2541199			
waypoint		05	User	waypoint	17 Q 380226	2541230			
waypoint		06	User	waypoint	17 Q 380227	2541240			
waypoint		07	User	waypoint	17 Q 380242	2541242			
waypoint		08	User	waypoint	17 Q 380253	2541232			
waypoint		09	User	waypoint	17 Q 380263	2541221			
waypoint		10	User	waypoint	17 Q 380268	2541211			
waypoint		11	User	waypoint	17 Q 380280	2541219			
waypoint		12	User	waypoint	17 Q 380273	2541231			
waypoint		13	User	waypoint	17 Q 380269	2541242			
waypoint		14	User	waypoint	17 Q 380276	2541262			
waypoint		15	User	waypoint	17 Q 380281	2541252			
waypoint		16	User	waypoint	17 Q 380288	2541245			
waypoint		17	User	waypoint	17 Q 380291	2541232			
waypoint		18	User	waypoint	17 Q 380305	2541253			
waypoint		19	User	waypoint	17 Q 380286	2541257			
waypoint		20	User	waypoint	17 Q 380285	2541266			

Figura 3. Matriz de dados usada para a interpolação dos 20 pontos que permitiu a geração dos mapas de distribuição espacial dos elementos traços.

Para determinar relações de influência entre os metais pesados foi realizada uma análise de correlação e de componentes principais (ACP), inteiramente causalizado e foi usado o teste de Tukey com 5% de probabilidade. Foi usado o programa estatístico Statgraphic Centurion XVI versão 16.1.18 (64 bits) – Edição Profissional.

3.3. Análises Laboratoriais

Após coleta, as amostras foram secas ao ar, destorroadas, homogeneizadas e passadas através de uma peneira de 2 mm de malha nylon para realização da caracterização do substrato. Para determinação das concentrações pseudototais de Pb, Zn, Co, Cu e Ni as amostras foram trituradas em almofariz de ágata e novamente peneiradas, utilizando uma peneira de malha de nylon, com abertura de 210 µm, e realizada à extração com água régia (ISO 11466, 1995). Os extratos obtidos foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica em aparelho VARIAN-AA600.

A caracterização química e física foi determinada pela metodologia descrita no manual de métodos de análise de solo EMBRAPA (1997).

- Carbono Orgânico (Corg.): obtido pela oxidação da matéria orgânica do solo via úmida com solução de dicromato de potássio em meio sulfúrico, empregando-se como fonte de energia o calor desprendido de ácido sulfúrico com aquecimento. O excesso de dicromato após a oxidação é titulado com sulfato ferroso amoniacal.
- Cátions trocáveis (Ca, Mg e Al): extração dos elementos trocáveis com solução de KCl mol L⁻¹, e os cátions trocáveis (Na, K) extração com HCl 0,05mol L⁻¹, e determinação de seus teores no extrato.
- CTC efetiva (CTCE): obtida através do somatório dos cátions trocáveis (Ca⁺² + Mg⁺² + Al⁺³ + Na⁺, K⁺).
- pH em H₂O: relação solo: líquido 1:2,5, valores obtidos pela medida da variação do potencial em eletrodo combinado com a variação da atividade hidrogeniônica da solução.

Tabela 4. Características químicas do solo contaminado.

Prof.	pH água	pH KCl	Na	Ca	Mg	K	S	T	V	m	n	Corg	M.O
(cm)	1:2,5		-----cmolc / dm ³ -----						-----%-----			%	%
0-20	7,3	6,4	0,14	29	6,5	0,090	35,730	35,730	100	0	0,392	1,78	3,07

3.3.1. Extração sequencial dos metais pesados

A extração sequencial foi feita pelo método do Community Bureau of Reference – BCR segundo Ure et al. (1993) e modificado segundo o manual de laboratório. de química e poluição, Ciências do Solo-UFRRJ. O mesmo conta de seis frações que as quais descrevem a especiação dos metais pesados no solo.

Tabela 5. Procedimento da extração sequencial usada para o fracionamento dos metais no solo.

Frações	Reagentes	Reação-Fração do solo	Processamento das amostras
F1	Água destilada	Solúvel	Sem agitação, *centrifugação 5min/3000 rpm
F2	MgCl ₂ 1M	Trocável	Agitação 2hrs *15min/3000 rpm
F3	C ₂ H ₄ O ₂ 11M	Ácido trocável	Agitação 16-20 hrs e *15min/3000 rpm
F4	NH ₂ OH 1M	Óxidos de Fe e Mn	Agitação 20hrs e *15min/3000 rpm
F5a	H ₂ O ₂	Matéria Orgânica	(Banho Maria) 1:30 hr/min
F5b	NH ₂ OH 1M		posteriormente F5b
F6	Fração residual = biodisponível (F1+F2+F3)-pseudototal		

Após a obtenção dos extratos, as amostras foram homogeneizadas com 50 ml a pH 7 e reservadas para leitura. Os extratos obtidos foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica em aparelho VARIAN-AA600.

3.3.2. Análises químicas e microbiológicas dos efluentes líquidos

A área possui um canal coletor de despejo do residual líquido (CDL) que sai da fábrica levando todos os residuais até uma caixa de contenção de despejo sólido (CDS). Quando esta caixa enche operários ao invés de coletarem os resíduos sólidos, estes são depositados no ecossistema. Ao mesmo tempo, a construção da fábrica é da década dos 50 e hoje a produção é bem maior que a capacidade de retenção para a qual foi construída e portanto, a caixa de contenção é pouco eficiente (Quevedo, 2006).

Amostragem: De cada parte foram feitas cinco amostras. No canal (CDL) foram tomadas cinco amostras líquidas; e na caixa de contenção (CDS) foram amostrados os extremos e o centro, igualmente, cinco amostras da água e cinco compostas do sólido retido. Posteriormente foram trasladadas para a faculdade de agronomia da Universidad Agraria de la Habana (UNAH) e procesadas. Os resíduos sólidos foram secos ao ar e logo foram processados conjuntamente com o solo para a determinação dos teores de elementos-tracos. As amostras líquidas foram filtradas e posteriormente determinaram-se os teores de metais pesados presentes no efluente líquido, mediante espectrofotometria de absorção atômica em aparelho VARIAN-AA600.

Também foram feitas as contagens de aeróbios totais, coliformes totais, das bacterias *Escherichia coli* e *Pseudomas aeruginosa*, nas amostras procedentes do despejo líquido

(CDL) e procedente da caixa de contenção (CDS) de acordo com a norma cubana (2004). Assim como a descrição morfológica de cada colônia dos microorganismos aeróbios, segundo o manual de análises microbiológicas, Novo (2007) e Atlas e Bartha (2007).

3.4. Levantamento de Espécies Vegetais

O levantamento das espécies vegetais foi feito usando o método do quadrado (Labrada et al., 1979; Mostacedo e Fredericksen, 2000) paralelo ao geo-referenciamento dos pontos de amostragem e coleta de solo. A cada amostra coletada lhe foi avaliado um valor de cobertura (1-100%) contando a quantidade de espécies dentro do m^2 . A porcentagem de cobertura foi usada para avaliar a espécie de maior influência na área.

As espécies coletadas foram identificadas no laboratório de botânica (UNAH-Cuba) onde existe um herbário coleção.

Os resultados foram analisados estatisticamente através do XLSTAT. Pro 7.5. Foi realizada uma análise de correlação de Person entre o número de espécies por m^2 e o conteúdo pseudotal dos metais pesados.

3.5. Microcosmos

Estudo da tolerância de *Brachiaria decumbens* em um solo contaminado com elevados teóres de Pb, Zn e Co, no sistema de microcosmos. Foram usadas amostras de solo de Cuba procedentes dos mesmos pontos onde foram feitas as análises químicas, com variações nos teores de cada metal. Usou-se um volume de solo de 30 cm^3 , que foi depositado em copos plásticos descartáveis (30 ml), por sua vez, colocados dentro de recipientes de vidro de 100 ml, de modo que pudessem ser irrigados de maneira isolada. Segundo a Figura 6. Cada amostra foi trabalhada em triplicatas sendo 9 o número de amostras de solo de Cuba, e uma testemunha (areia estéril com solução nutritiva), de acordo com o delimitamento experimental casualizado bicatorial 10×3 . Sendo um total de 30 amostras.

Em cada vaso, foram depositadas 10 sementes de *B. decumbens*, previamente esterilizadas e escarificadas: para isto, foram imersas em ácido sulfúrico concentrado comercial durante 13 minutos. Posteriormente foram lavadas em água destilada para eliminar todo o ácido e em seguida, mantidas por 60 minutos em recipientes contendo 200 ml de água destilada; finalmente, foram colocadas para secar na sombra.

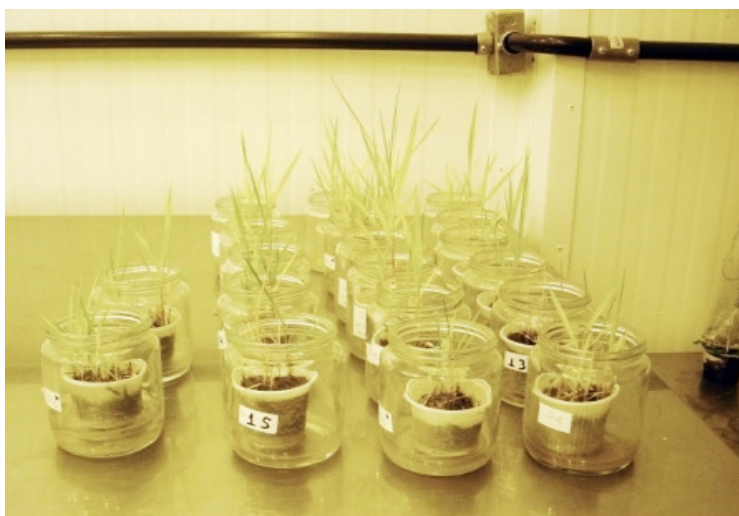


Figura 4. Microcosmos com *Brachiaria decumbens* e solo contaminado com metais pesados.

Os vasos com as sementes foram colocados no fitotron com luz e umidade controlada, sendo a frequência de 16 horas/luz 8 de escuridão. Após 7 dias da germinação, foram deixadas crescer só 5 plântulas por vaso por um período de 60 dias até serem efetuados os cortes de todas as folhas. As folhas coletadas foram pesadas e foi determinado o conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofilas A e B) pelo método de (Arnon, 1949; Baskaram et al. 2009). Após a extração o material vegetal foi secado em estufa, pesado novamente e reservado para análises de metais pesados.

A solução de acetona (80%) + pigmentos foi deixada secar ao ar. O extrato resultante foi redissolvido com uma solução de ácido clorídrico na proporção de 1% e foi medido o teor de (Pb, Co, Zn, Mg) contidos na solução de clorofila; possível relação de absorção no complexo de pigmentos.

3.5.1. Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos

A massa de 500 mg de folhas frescas foi macerada e homogeneizada em 10ml de acetona 80% por 48 horas, sendo o sobrenadante misturado e centrifugado 15 minutos a 800 rpm. O sobrenadante foi separado e reservado para medição de absorbâncias.

Foram medidas absorbâncias (645 nm, 663 e 480 nm) correspondentes aos conteúdos fotossintéticos, clorofila a e b, usando um espectrofotômetro UV visível U-2900. O resultado foi calculado usando como base para o cálculo as seguintes equações:

Clorofila a (massa fresca mg g^{-1}) = $(0,0127)(\text{Abs}663) - (0,00269)(\text{Abs}645)$;

Clorofila b (massa fresca mg g^{-1}) = $(0,229)(\text{Abs}645) - (0,00488)(\text{Abs}663)$;

Clorofilas Totais (massa fresca mg g^{-1}) = $(0,0202)(\text{Abs}645) + (0,00802)(\text{Abs}663)$.

3.5.2 Isolamento de bactérias diazotróficas e atividade da nitrogenase

O procedimento para o isolamento das bactérias foi o seguinte: Em vasos com 30 ml de solo, reservaram-se nove dos 20 pontos amostrados do ecossistema contaminado, foram cultivadas mudas de *Brachiaria decumbens* como isca. Após 30 dias, foram selecionados ao acaso 3 amostras com as suas repetições que tivessem diferenças nos teores de Pb, Zn e Co, para proceder ao isolamento das bactérias a partir de tecidos vegetais (raízes e folhas).

Foram trituradas amostras de 10 g de tecido vegetal (raízes e folhas) em solução de sacarose a 5%, e maceradas, e submetidas a diluições sucessivas em solução de sacarose a 5%, em concentrações de 10^{-2} a 10^{-6} e calculado o NMP. Destas diluições, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para frascos de 10 mL com 5 mL dos seguintes meios semi-sólidos e isentos de N: LGI-P (Cavalcante e Döbereiner, 1988), NFb-malato (Döbereiner, 1980) e os sais do NFb, tendo glicose, amido ou a mistura 3 g de glicose + 1 g de oxalato + 1 g de citrato por litro (JNFb) como fonte de carbono, em três repetições. Os frascos são incubados por cinco dias, a 28 °C, no escuro, avaliando-se, então, as características de crescimento (formação de película ou bolhas de gases) Conforme o descrito por (Baldani et al., 1999).

A atividade da enzima nitrogenase foi avaliada através da atividade de redução de acetileno (ARA). Foram inoculados 50 µl de cultura (com densidade ótica ajustada para 0,5) em frascos com volume de 10 mL contendo 5 mL de meio de cultivo (JNFb para *Herbaspirillum*; NFb para *Azospirillum*) incubados a 30°C. As análises foram realizadas 48 e 72h após a inoculação. Os frascos foram vedados com uma rolha de borracha perfurável e 1mL de acetileno foi introduzido com o auxílio de uma seringa e incubados por 1h a 30°C.

Posteriormente, 0,5 mL da atmosfera foram retirados e injetados em cromatógrafo gasoso para determinar a concentração de etileno na amostra. Foram utilizadas três repetições de cada estirpe, além de meio de cultura estéril como controle (Lowry et al., 1951;

Guedes et al., 2007). Foram utilizadas três repetições para cada estirpe bacteriana além de um meio de cultura estéril como controle.

Utilizou-se a tabela de McCrady (Döbereiner et al., 1995) para determinar, pelo método estatístico o NMP de bactérias diazotróficas por grama de amostra, seguindo-se a transformação dos dados para log (NMP+1) e a análise de variância com comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.5.2. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares

O isolamento dos Fungos Micorrízicos Arbusculares foi feito seguindo o protocolo da Embrapa Agrobiologia – Lab. Micorrizas e modificado de Gledermann e Nicolson (1963). Após a extração dos esporos, foi feita a contagem em uma placa com anéis concêntricos (5 mm entre cada) e com auxílio de um estereoscópio (40x). Os esporos foram separados pela cor, tamanho, forma e divididos em dois grupos que foram transferidos para lâminas e fixados com álcool polivinil em lactoglicerol (PVLG) de um lado, e outro grupo fixados com álcool polivinil em lactoglicerol (PVLG) + reagente de Melzer. Posteriormente foram cobertos cada grupo com lamínula. O grupo de esporos fixados com PVLG+Melzer e quebrados cuidadosamente, fazendo pressão sobre a lamínula com um auxílio de um cotonete de algodão para promover a exposição das paredes e estruturas internas (Furrazola et al., 2011). Mediante um microscópio Karl Zeiss e câmera acoplada AxioVision (v. 3.1 software at 1300 × 1030 dpi) foram feitas fotografias de cada tipo de esporo identificado que foram usadas como auxílio na classificação e identificação de gêneros e espécies.

3.5.3. Identificação de espécies

As espécies foram identificadas a partir da coleção criada em lâminas e mediante o auxílio das fotografias. Foi usado o sistema de classificação de análise morfológica clássica, o auxílio dos especialistas do Instituto de Ecología y Sistemática-La Habana, Cuba e os critérios de classificação taxonômica, segundo Oehl et al. (2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises do Solo

4.1.1. Distribuição espacial de metais pesados

A Figura 5 mostra a distribuição espacial da concentração pseudototal dos seguintes metais pesados: Pb>Zn>Co>Cu>Ni na área de despejo da Empresa de Cerâmica Branca Adalberto Vidal. Nela podem ser observadas as variações que definem áreas de maior e de menor concentração dos metais pesados, definidos por médias estatísticas em cada ponto. Sendo como se observa a cor verde para a média do menor valor e a cor vermelha para a média do maior valor. Se apresenta uma distribuição desigual dos teores de metais pesados na área estudada, com predominância de Pb>Zn>Co, sendo esses metais pesados os contaminantes mais concentrados na área estudada.

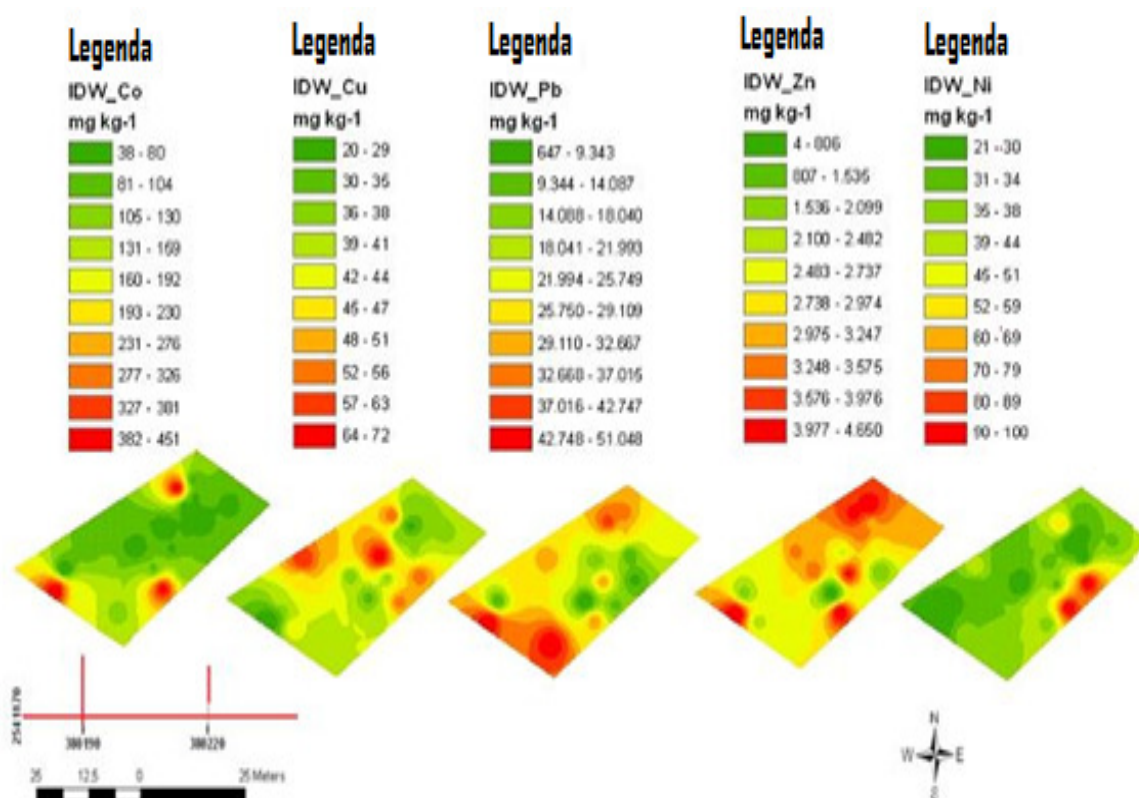


Figura 5. Mapa da distribuição espacial dos valores pseudototais dos metais pesados Co, Cu, Ni, Zn e Pb, na área de despejo da Cerâmica Branca.

A continuação mostram-se os pontos da amostragem interpolados ao mapa do Google (IQW, com ArcGIS e coordenadas UTM (Figura 6) e a distribuição espacial de Pb e os teores biodisponíveis nos pontos onde os valores pseudo totais foram máximos, (Figura 7). O Pb é o elemento-traço mais concentrado (51048 mgkg⁻¹ valor máximo) na área de estudo. A sua concentração se apresenta muito elevada em toda a área e máxima nos pontos mais próximos à fonte de contaminação. O que pode estar relacionado com a sua estrutura química, sendo pouco móvel e por isso é mais acumulado nas áreas mais próximas à fonte de contaminação.

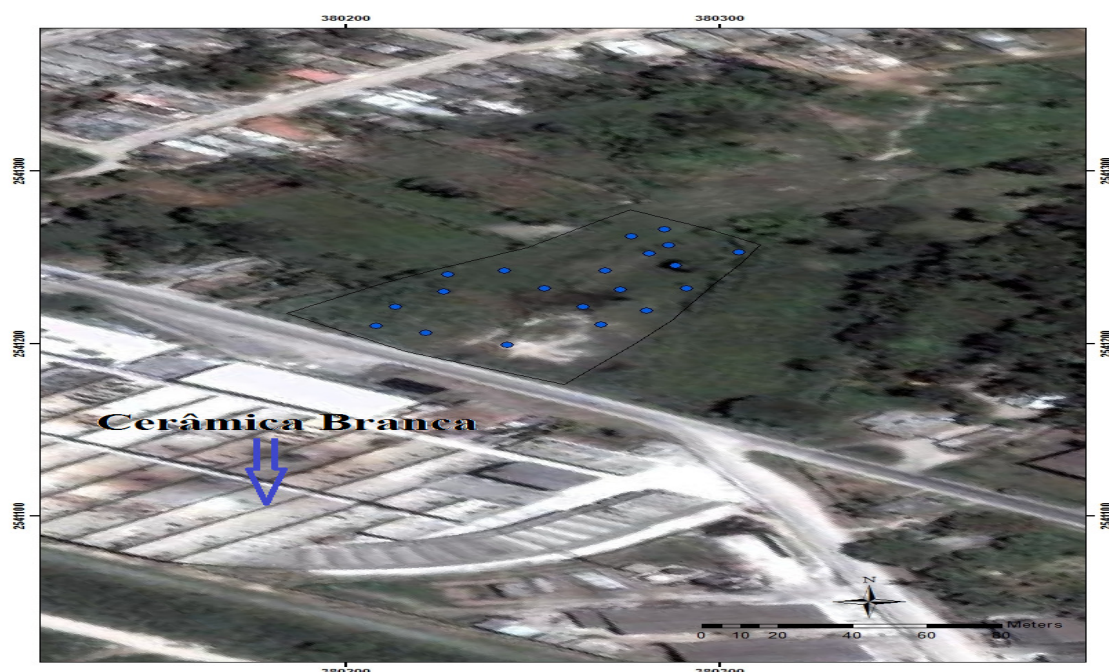


Figura 6. Área de despejo, Empresa Cerâmica Branca (posição indicada pela seta) Adalberto Vidal, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba; pontos de amostragem (pontos em azul no espaço traçado).

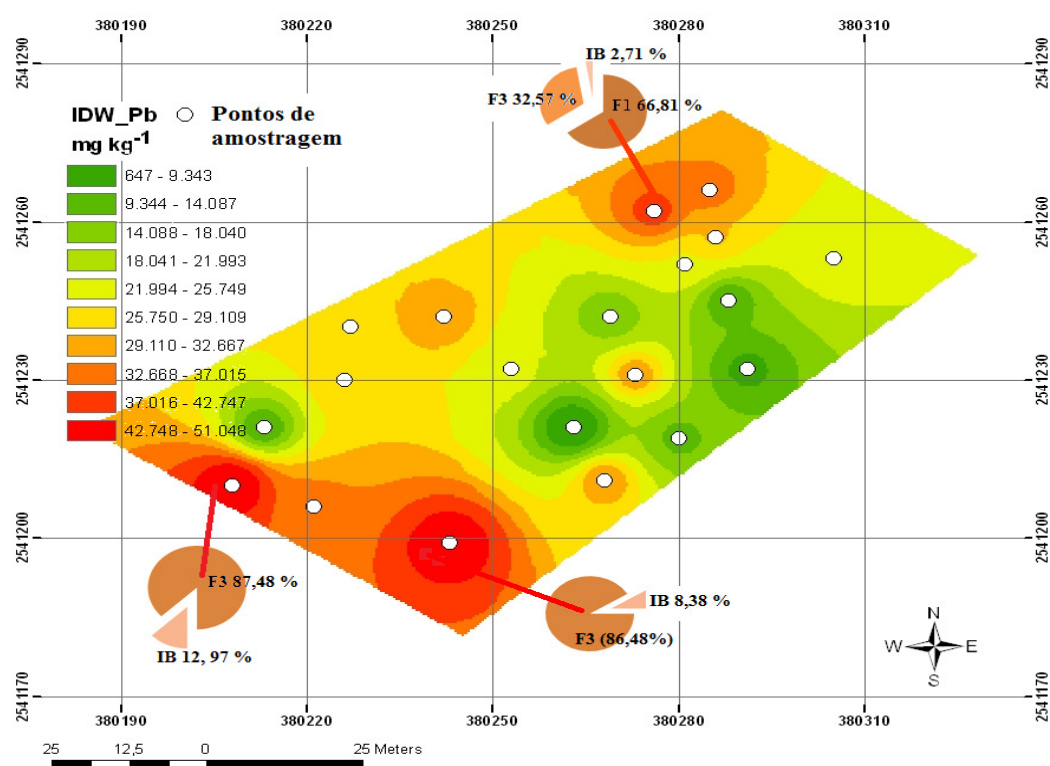


Figura 7. Distribuição espacial da concentração pseudototal do Pb; teores médios nos pontos amostrados. Conteúdo biodisponível; fração F3 da extração sequencial.

De acordo com valores orientadores do CONAMA (2009) valores mínimos estão acima dos valores de investigação para o cenário Agrícola e os maiores teores estão muito por

cima dos valores de Investigação para o cenário industrial. Como se trata de um ecossistema que está próximo de assentamento populacional, a área precisa ser recuperada, na maior brevidade possível.

A especiação de Pb pode ser observado na (Figura 8) em porcentagens de acordo com as frações. No mapa de distribuição espacial foram situadas porcentagens dos valores biodisponíveis correspondentes aos teores máximos pseudotais. Verificou-se que há presença de Pb em todas as frações analisadas da extração sequencial, por tanto, está presente no solo, solúvel (F1), ácido solúvel (F3), ligado aos óxidos de Fe e Mn (F4) e ligado à matéria orgânica (F5). Os menores teores foram determinados na fração trocável (F2) e os maiores entre a fração residual (F6) e os valores pseudototais (100%).

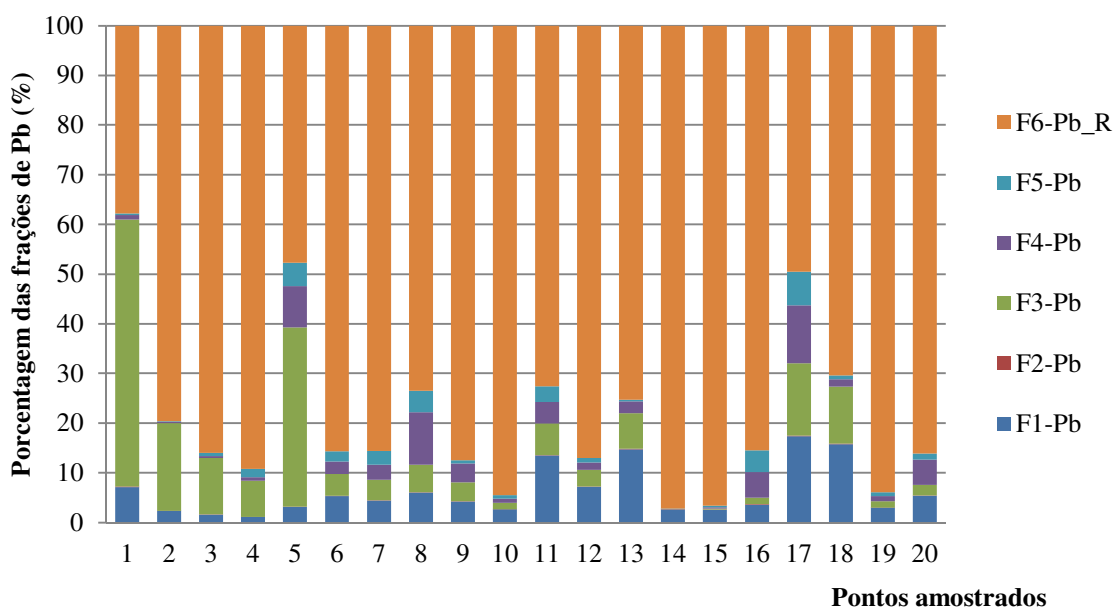


Figura 8. Especiação de Pb, porcentagens das frações (mgkg^{-1}), x (pontos de amostragem). F1 (solúvel em água), F2 (trocável), F3 (ácido solúvel), F4(ligado aos óxidos de fe e Mn), F5 (matéria orgânica), F6 (residual).

A fração residual (F6) representa entre 70-95% do dos teores pseudototais (100%), excepto em alguns pontos de amostragem onde o valor cai para 37-47%. Nesses pontos, há maior quantidade de Pb ácido solúvel (F3). No mapa de deistribuição pode ser observado que os teores biodisponíveis estão na fração F3 principalmente com valores que representam 66,81; 87,48; 86,48 % do total da somatória das frações (F1, F2, F3) e o índice biodisponibilidade foi de 32,7; 12,97; 8,38% respectivamente. A variações dos teores biodisponíveis pode estar obedecendo à influência dos valores de pH, devido a que este é maior que 8 nos pontos do terço superior do terreno, ou primeiros pontos e entre 7-7,8 nos pontos mais distantes ou terço inferior e essas mudanças podem mobilizar o elemento-traço de uma fração para outra. Também a fração F3 está relacionada com os carbonatos, por tanto uma parte de Pb pode estar sendo absorvida nos carbonatos o que pode ter contribuído com esses valores nesta fração. O que pode ter contribuído para o aumento da biodisponibilidade. Outro fator pode estar relacionado com a quantidade significtiva do elemento-traço no ecossistema e com a elevada CTC prsente.

Geralmente em análises de especiação de metais pesados a través dos métodos onde são usados diversos extratores, tem-se verificado que os elementos de maior mobilidade encontram-se, predominantemente, nas formas químicas solúvel, trocáveis e ligados a

carbonatos, enquanto os de baixa mobilidade aparecem ligados às frações óxidos de Fe, Mn, além das frações orgânica e residual (Amaral Sobrinho et al., 1994). Neste caso, similar ao que foi constatado pelos autores, a maior porcentagem de Pb encontra-se entre os teores pseudotais e a fração residual. Mas não foi só observado que outros valores estivessem só ligados com a matéria orgânica (F5) e ligado aos óxidos de Fe e Mn (F4). Pelo contrário, uma porcentagem significativa se encontra biodisponível. O que pode ser absorvido pelas plantas e gerar impactos negativos na microbiota do solo.

Nesta área Pb é um elemento de origem antrópica e de acordo com o seus teores de concentração é o elemento principal contaminante. Smith (2009) e Mahviet al. (2005) em estudos de metais pesados de solos próximos a áreas industriais observaram que a distância da fonte de contaminação tem um efeito redutor na concentração de Pb, sendo significativa essa diminuição a medida que as cotas se afastam da fonte contaminante. Segundo Alloway (1995) e Becerril (2002) Pb é um elemento de baixa mobilidade. Portanto, liberado no ambiente, concentra-se próximo da superfície e próximo às fontes de contaminação, tendo similar comportamento ao observado neste estudo.

O próximo elemento a ser analisado é que também se encontra em elevadas concentrações é o Zn (Figura 9) com o valor médio máximo de (4050 mg kg^{-1}). Similar ao observado para Pb, em todos os pontos de amostragem os teores são elevados.

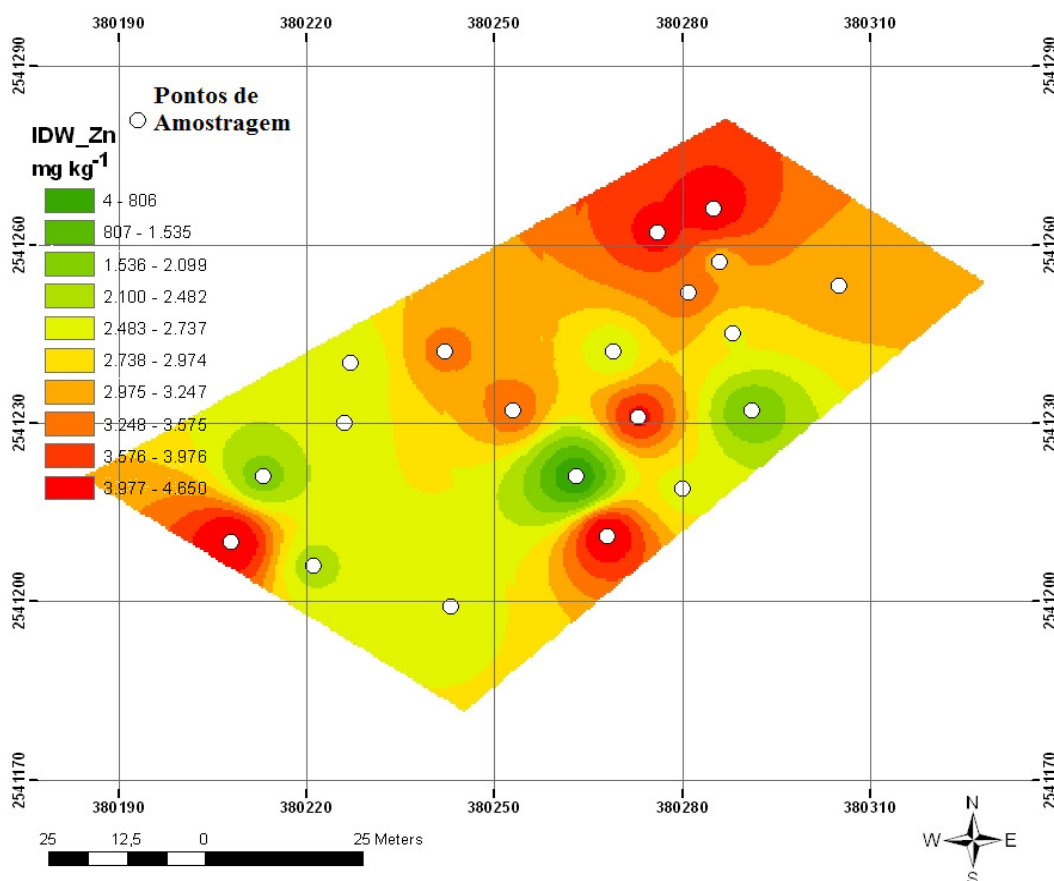


Figura 9. Distribuição espacial da concentração pseudototal do Zn, teores médios nos pontos amostrados. Área de despejo, Empresa Cerâmica Branca Adalberto Vidal, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Zn é um elemento-traço que tem maior mobilidade que Pb (Kabata Pendias e Pendias, 2001). Os mapas de distribuição espacial mostram tal fenômeno. Alguns fatores químicos e

físicos e biológicos também podem interferir na mobilidade deste. Apresenta sensibilidade aos efeitos de escoamento das águas superficiais, é retido pela matéria orgânica devido a sua afinidade para formar quelatos (Ross, 1995).

Através do mapa de distribuição espacial (Figura 9) é possível observar que na medida em que os pontos estão mais distantes da fonte de contaminação os teores de metais pesados são mais elevados. Sendo mais concentrados no terço médio inferior da área amostrada.

De acordo com os valores orientadores do CONAMA (2009) Zn também se encontra com teores muito superiores ao valor de intervenção para o cenário Agrícola e industrial (Tabela 6).

A especiação de Zn pode ser observada na Figura 10. Foi determinada a presença de Zn em todas as frações da extração sequencial. Os maiores valores encontram-se na fração residual e representam entre o 45-95% com relação aos teores pseudotais (100%)

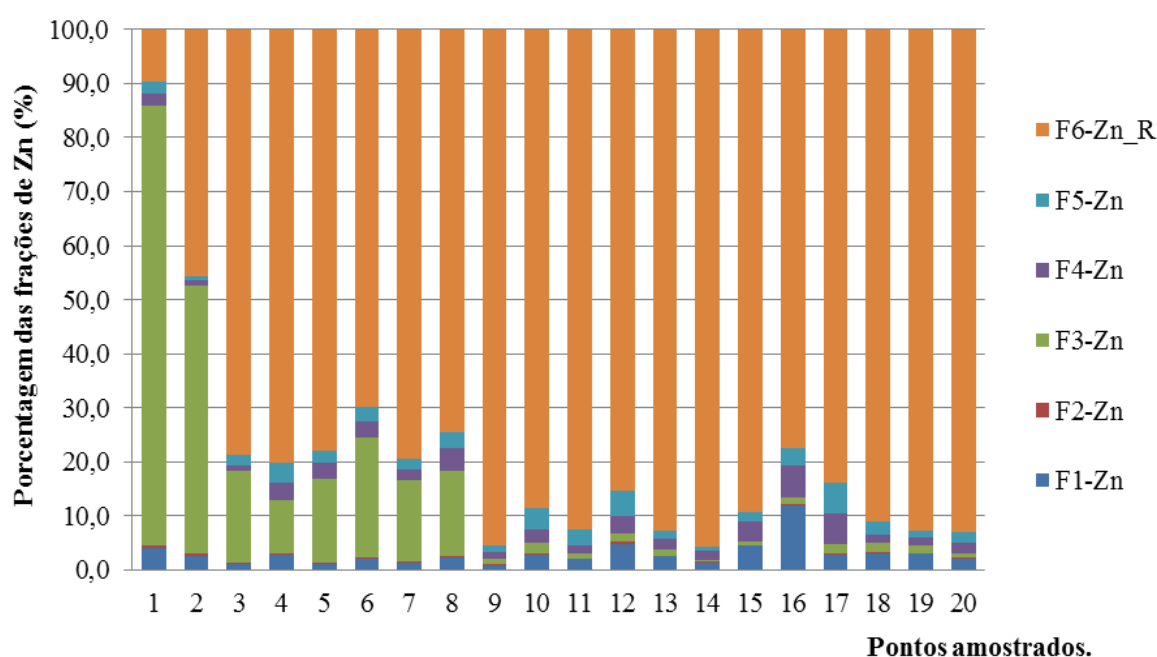


Figura 10. Especiação de Zn, porcentagem das frações (mgkg^{-1}) x (pontos de amostragem). F1 (solúvel em água), F2 (troçável), F3 (ácido solúvel), F4 (ligado aos óxidos de Fe e Mn), F5 (matéria orgânica), F6 (Residual).

Os maiores valores biodisponíveis resultaram na fração ácido solúvel (F3). Em geral observou-se que há uma diminuição dos teores biodisponíveis do ponto 1 para o ponto 8 (Figura 10) aumentando os teores na fração residual, o qual indica que a partir deste ponto a biodisponibilidade cai drasticamente.

O teor de Zn solúvel na fração (F3) apresentou comportamento contrário ao esperado, havendo diminuição deste com a diminuição do pH de 8 para 7. Resultados similares foram constatados por Nachtigall et al. (2008) que atribuíram esta diminuição à falta de especificidade do extrator para determinar teores nessa fração.

A maior proporção do Zn (média de 79,9%) esteve ligada à fração residual. Os resultados são milares aos obtidos por Iyengar et al. (1981) que trabalharam com 19 solos do Estado da Virgínia (EUA), observaram que, em média, 70% do Zn se encontravam na fração residual. Shuman (1985) observou que o Zn de solos do Estado da Geórgia (EUA) estava associado principalmente aos óxidos de Fe cristalinos e à fração residual. Silveira et al. (2006)

também constataram que a maior parte do Zn está relacionada às frações residual e ligada a óxidos de Fe.

Em relação aos teores de Zn da fração do Zn ligada aos óxidos representou, em média, 4%, a fração ligada à matéria orgânica totalizou menos que 2,5%, enquanto à soma das frações biodisponíveis (F1+F2+F3) foi de 15%, com uma maior contribuição da fração ácida solúvel (F3) que resultou de 12,5%, e solúvel em água (F1) 3,0 %.

De forma análoga, Zhang et al. (1998) obtiveram valores de Zn associados à fração óxidos entre 4,5 e 8,8% do Zn total. Por outro lado, Silveira et al. (2006) observaram que o Zn ligado à matéria orgânica e à fração trocável foi inferior a 1% do total em um Latossolo Vermelho, sendo similar ao observado neste estudo.

Selhantes resultados foram constatados por Sposito et al. (1982) que estudaram solos tratados com biossólidos, também encontraram valores entre 1,6 e 1,7% do Zn total associado à fração solúvel + trocável.

Os teores de Co também são apresentados em um mapa de distribuição espacial (Figura 11). Ao contrário de Pb e Zn, Co apresenta teores máximos de concentração nos três terços da área amostrada. De acordo com os valores orientadores do CONAMA (2009) os teores de Co, também se encontram acima dos valores de referências para o cenário agrícola e industrial.

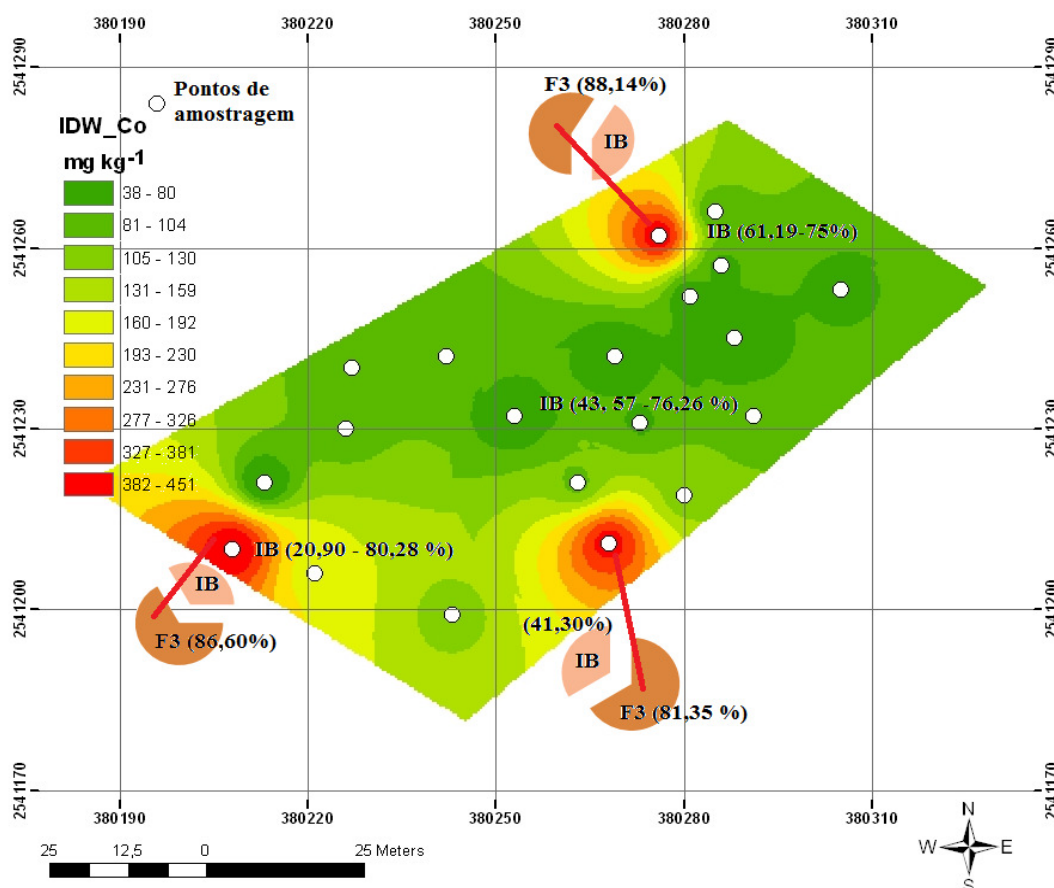


Figura 11. Distribuição espacial da concentração pseudototal do Co, teores médios nos pontos amostrados. Teores biodisponíveis e índice de biodisponibilidade (IB) nos pontos onde os teores pseudototais resultaram máximos. Área de despejo, Empresa Cerâmica Branca Adalberto Vidal, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Quanto a especiação (Figura 12) de Co, nos pontos onde os valores pseudototais resultaram máximos, no mapa de distribuição espacial foram situados os valores biodisponíveis relacionados com a fração ácido solúvel (F3), onde se obtiveram valores médios para os três pontos de 86,60; 81,35 e 88,14%.

Contrário a Pb e Zn, verificou-se que há teores biodisponíveis pertencientes à fração ácido solúvel em todo o ecossistema. Os teores biodisponíveis relacionado com a fração ácido solúvel variaram de 6,8-66,6% para uma média de 37,34%. Entre tanto, (média de 10%) do total encontra-se ligado à matéria orgânica (F5). Quanto aos teores da fração residual, foram determinados valores médios de 41,66%. Por tanto, os maiores teores de Co, encontram-se alternados entre a fração ácida solúvel (F3), que são biodisponíveis e os toeres da fração residual (F6), que não o são.

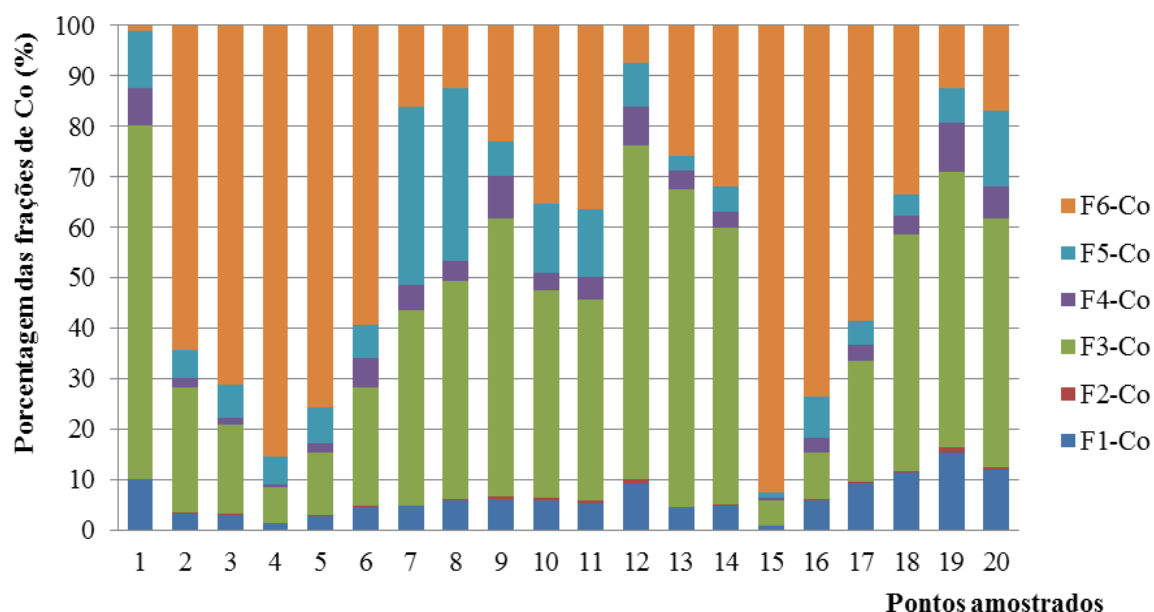


Figura 12. Especiação de Co, porcentagem das frações (mgkg^{-1}), x (pontos de amostragem). F1 (solúvel em água), F2 (trocável), F3(ácido solúvel), F4 (ligado aos óxidos de Fe e Mn), F5 (matéria orgânica), F6 (Residual).

Há uma grande variação da biodisponibilidade medida pelo índice de biodisponibilidade (IB) dos teores de Co no ecossistema, variando desde 8,38-80,28 % com uma média de 45,23%. Indicando biodisponibilidade elevada, no agroecossistema.

Isto pode estar acontecendo porque de acordo com Quevedo (2006) que caracterizou o processo produtivo da empresa de cerâmica branca, de San José-Mayabeque, a chegada de Co no ecossistema pode estar sendo em forma solúvel, dissolvido nas águas de despejo, provenientes da planta de produção No. 2 como resíduos dos pigmentos usados na confecção de pisos e azulejos.

No solo, Co é um microelemento e se apresenta geralmente em quantidades muito baixas, muitas vezes em deficiência. A sua origem quase sempre é litogênica e pode estar associado aos óxidos de Fe e Mn. Neste caso, os teores observados são consequência da atividade industrial. Os óxidos de cobalto são usados como pigmentos na indústria de cerâmicas e pinturas (Adriano, 2001).

Por sua vez, o Cu, com valores de 20-72 mgkg^{-1} , é um elemento-traço com valores dentro dos parâmetros dos valores orientadores do CONAMA (2009), entre tanto forma determinados alguns pontos onde os teores também superam os valores orientadores de

investigação do CONAMA (2009) para o cenário agrícola e Industrial. Em estudos de áreas próximas a indústrias de cerâmicas Peris (2006) também determinou presença de Cu, em valores similares aos observados neste trabalho.

Para o caso de Ni os teores médios pseudototais não se encontram acima dos valores orientadores do CONAMA (2009). Entre tanto é possível observar no mapa de distribuição espacial no terço médio há teores elevados e é onde se encontra mais concentrado.

Os grandes volumes de rejeitos carregados de metais representam um risco enorme para a região tendo em conta a proximidade com assentamentos urbanos e a atividade agrícola.

Resultados similares foram obtidos por Peris et al. (2008) em uma área com influência de rejeitos de uma fábrica de cerâmica na Espanha. A presença de Cu, Ni, Zn e Pb fortemente correlacionados em áreas contaminadas próximas de indústrias de cerâmicas também foi reportado por Iyaka e Kalulu (2012) na Nigéria, evidenciando a relação deste tipo de atividade industrial com esses metais pesados.

Devido ao fato de não existirem níveis orientadores para os solos de Cuba, diversos trabalhos encontram-se em andamento através de projetos de colaboração CAPES/MES, entre o Departamento de Solos UFRRJ, Brasil e o Departamento de Química da UNAH, Cuba, para o estabelecimento de valores de referência nacional a fim de verificar tais padrões. Como parte de estes trabalhos, estudos preliminares realizados em solos cubanos nas regiões de Artemisa e Mayabeque determinaram que os solos do tipo Ferralíticos – Ferrasols – (WRB, 2007) sobre calcário duro fragmentado possuem naturalmente teores pseudototais elevados de Ni e Cu (Amaral Sobrinho et al., 2011; Pérez et al., 2012). Valores similares para Ni e Cu foram determinados nesta pesquisa. Portanto, a matéria prima que usa a indústria cerâmica cubana poderia estar sendo obtida de alguma região onde ocorre a presença de solos do tipo Ferrasols (WRB, 2007) com elevados teores de metais pesados de forma natural.

Através da distribuição espacial dos metais pesados, é possível conhecer o ponto específico de contaminação, o qual poderia ajudar no momento de estabelecer medidas de contenção e aplicação de técnicas como a fitorremediação.

Apesar das vantagens do processo de extrações sequenciais em relação apenas à determinação dos teores totais de metais pesados no solo, podem ocorrer problemas de baixa seletividade dos extratores (Shan & Chen, 1993; Shiwatana et al., 2001), redistribuição dos metais durante os processos de extração (Tu et al., 1994; Rakasasaya et al., 1996) e dependência dos resultados das condições operacionais (Sahuquillo et al., 1999).

4.1.2. Análise de correlação e componentes principais dos metais pesados

A análise de componentes principais ACP mostra as relações entre os metais pesados. Existem dois agrupamentos principais (Figura 13). O agrupamento um, relaciona a Fe, Pb e Co, o agrupamento dois, relaciona a Cu, Zn, Ni e Mn. Esses agrupamentos podem ser explicados devido às afinidades existentes entre os metais pesados: Co-Fe (0,5149), por exemplo, pode ser explicado, devido a que Co é um elemento siderófilo, o que quer dizer que tem afinidade por Fe. Co e Pb, podem ter a mesma origem antrópica devido a atividade industrial (Peris et al. 2008) ou estão fortemente ligados as argilas, óxidos de Fe (Navas e Machín, 2002).

No segundo agrupamento, Ni-Mn (0,9085), uma relação muito forte, poderia estar indicando que Ni pode estar fortemente absorvido pelos óxidos de Mn. O mesmo compartimento pode ser observado na distribuição espacial, onde o Ni é mais concentrado no terço médio (Figura 7) onde por demais foram determinados os menores teores de Mn. A mesma relação pode existir entre Zn-Mn, Cu-Mn. Esses resultados são similares aos obtidos por Peris et al. (2008) os quais em um estudo de componentes principais (ACP) dos efeitos da

distância sobre os metais pesados na área estudada Peris et al. (2008) verificaram a existência de uma forte correlação entre Ni-Mn / Zn-Mn, o que pode estar relacionado com a capacidade destes elementos em formar complexos com os óxidos e hidróxidos de manganês.

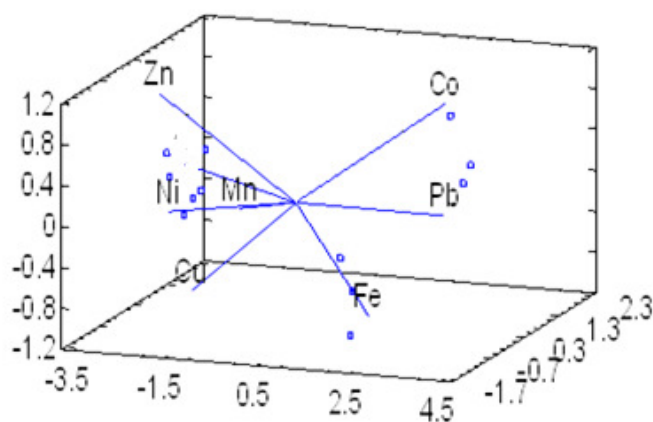


Figura 13. Análise de correlação de componentes principais ACP entre os teores pseudototais dos metais pesados.

A relação Cu-Zn foi descrita por Ma et al. (1997) sugerindo que a mesma acontecia devido a que ambos os apresentam raios iônicos similares. Neste caso, podendo estar absorvidos pelos óxidos de Mn.

Em solos com elevados teores de carbonatos como observado na área estudada (Marín et al., 2000) a relação entre Pb e Zn é de tipo Pb/Zn (Ross, 1995) fenômeno também observado na distribuição espacial dos elementos traços (Figura 6) Esses elementos possuem comportamentos de mobilidade opostos, como pode ser observado também na ACPs.

A presença de Pb, Zn e Co em solos próximos a indústrias de cerâmicas, foi observada por Peris (2006) na Região de L'Alcora, Castellón, Espanha com resultados similares observados neste estudo. O mesmo autor refere-se à atividade industrial como a principal provedora dos metais pesados nos solos dessa região, e associa ao uso de tintas e argilas básicas durante o processo de fabricação de azulejos e pisos com grandes volumes de resíduos carregados de metais pesados.

4.1.3. Análises dos efluentes que são despejados na área

Os efluentes líquidos analisados (CDL) e (CDS) apresentaram teores totais de Pb, Cu, Co e Ni acima dos parâmetros admissíveis da Norma Cubana (2004), o que representa um grande risco para a saúde (Tabela 6) constituindo-se num fator a ser levado em consideração em análises futuras no local, com o objetivo de calcular o volume despejado na área e poder estimar a carga contaminante no efluente líquido. Do mesmo modo, o conteúdo pseudototal dos metais pesados presente no sedimento (CDS) resultou em valores elevados seguindo a ordem de concentração $Pb > Zn > Co > Cu > Ni$.

Quando comparados com os valores orientadores do CONAMA (2009), os teores de Ni se apresentaram muito baixos e os de Pb (8600 mg.kg^{-1}) foram os mais elevados, que, juntamente com Co (651 mg.kg^{-1}) superaram todos os valores de referências de qualidade (VRQ), sendo maiores que o valor de referência industrial (VI: $900, 90 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente). Zinco (910 mg.kg^{-1}) e Cu (200 mg.kg^{-1}) apresentaram teores superiores ao V. P (300 e 60 mg.kg^{-1} respectivamente). No caso do Zn, muito próximo do V. I. para áreas agrícolas (1000 mg.kg^{-1}). Já Cu tem um valor similar (200 mg.kg^{-1}) ao V.I. Tal critério pode

ser usado como parâmetro de comparação, dado ao fato de que a fábrica encontra-se em atividade e que, em algum momento, esses níveis poderiam se incrementar.

Tabela 6. Teores totais e parâmetros de qualidade no despejo líquido e teores pseudototais no despejo sólido do canal e do substrato contaminado da área em estudo. (mg.kg⁻¹ solo seco).

	CDL (Total)	CDS (Água)	Valores Admissíveis (mgL-1)	CDs (Sedimento)	SC (0-20 cm)		Valores Referência de Qualidade*		
Pb	0,22	0,234	0,05* ¹	8600	Max	Min	P	A	I
					49683,33	7033,33	72	180	900
Cu	0,07	0,191	1,0* ¹	200	72,33	19,97	60	200	600
Zn	0,32	0,253	5,0* ¹	910	4650,00	1566,67	300	1000	2000
Co	0,15	,08	0,05* ¹	651	450,67	37,67	25	35	90
Ni	0,12	0,04	0,02* ¹	6.0	100,33	21,67	30	70	130

¹cmol kg⁻¹ VI Valor de intervenção para áreas de contaminação industrial, o maior valor tendo em conta o tipo de contaminação e os teores analisados. *¹ Valores de referencia CONAMA (2009) P: prevenção; A: agrícola; I: industrial.

A área de estudo está assentada sobre um solo originado a partir de calcário (rochas carbonáticas) existindo uma forte atividade de processos carsticos (Hardt, 2004) que dá origem a profundas rachaduras e/ou depressões circulares no solo conhecidas por “ponor ou dolinas”. Nestas depressões descritas perdem-se elevados volumes de solo na região (Febles et al., 2011).

No caso dos efluentes líquidos analisados (CDL) e (CDS), estes apresentaram teores totais solúveis de Pb, Cu, Co e Ni acima dos parâmetros admissíveis segundo as normas cubanas (2004).

Um estudo sobre o processo de produção da indústria cerâmica foi conduzido por Quevedo (2006). No mesmo, foi comprovado que as matérias primas que tem origens pedogenéticas podem estar vindo de áreas onde os teores naturais desses metais pesados são mais elevados. No processo produtivo, grandes volumes de argilas são transformados em lodos que canalizadas atravessam um sistema de esgoto até armadilhas encarregadas de reter todo o material sólido, sendo que a cada certo tempo, as mesmas são limpas e o material é despejado no ecossistema que está sendo analisado. Junto com este fator, o sistema de armadilhas é muito ineficiente e por tanto, grande parte dos resíduos avançam sem ser contidos.

A área possui leve inclinação de acordo com a topografia do local, associado ao carste existente devido as características próprias da região (Febles et al., 2011), o relevo, favorece o escoamento superficial destas águas carregadas de coloides, minerais argilosos, e metais pesados a serem depositados ao longo da topo sequencia. O que pode ser observado na Figura 14 que mostra os processo de escoamentos das águas da região, de formas superficiais e subsuperficiais, no processo natural está envolvido o transporte destes resíduos, que se acumulam contaminando os solos, com grande perigo de contaminação das águas.

É importante citar, que o ecossistema analisado faz parte de uma bacia dominada por processos carsticos muito grandes como aparece na Figura 14. Na mesma região, são comuns depressões do relevo de forma circular e grandes rachaduras, por onde as águas são incorporadas ao lençol freático, por onde também, se perdem cada ano elevados volumes de

solo (Febles, 2006). O que significa um grande perigo de contaminação desses aquíferos com metais pesados.

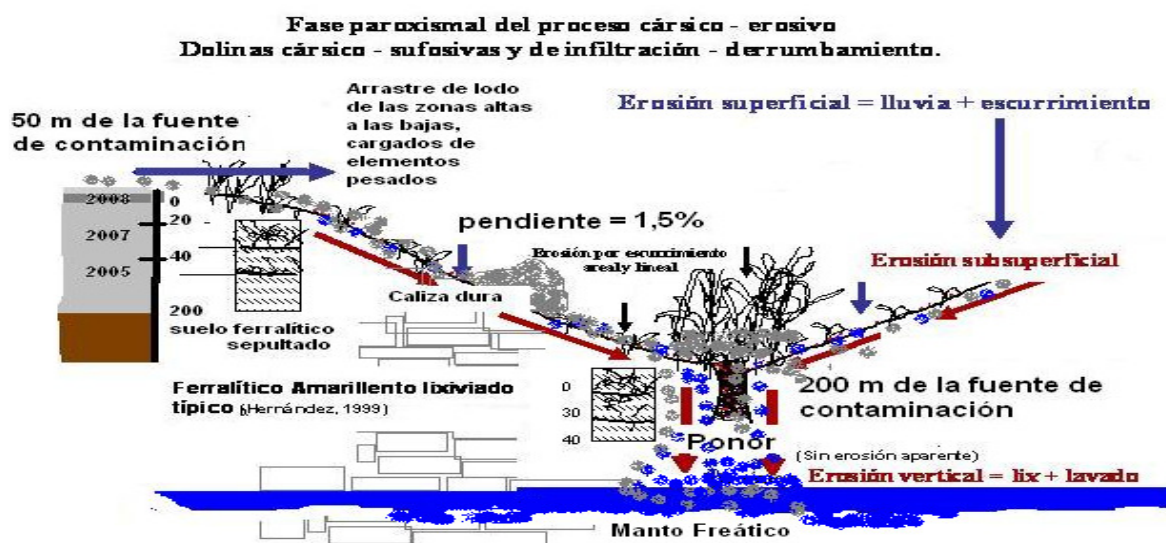


Figura 14. Processos de escoamento superficial e fenômenos cárnicos, na região onde se encontra situado o ecossistema estudado. Esquema de transporte dos resíduos que são despejados da empresa contaminadora, modificada de Febles (2006) com licença do autor.

Alguns trabalhos feitos na área pelo grupo FITOPLANT-UNAH, tem monitorado a deposição de resíduos (Guzmán, 2006, Quevedo, 2006) chegando a ser em alguns lugares de até 1 metro sobre o solo.

O grupo FITOPLANT vem fazendo desde vários workshops com moradores da região e trabalhadores da fábrica como uma forma de trabalho participativa (Fitoplant, 2005-2012). Nesses eventos tem sido possível conhecer informações como a data do local, o alcance dos resíduos em épocas de chuvas, algumas possíveis doenças em animais domésticos que costumavam pastar no local. Pessoas da fábrica que ficaram doentes. O que faz do trabalho participativo uma ferramenta importante que facilita a observação e a recopilación de informações. Permitindo maior visualização do alcance do problema.

Sobre o radio de expansão dos resíduos, que não tem sido tratado neste trabalho, mas é importante mencionar, devido aos mecanismos aqui tratados sobre as características pedogenéticas da região, pode se dizer que, esta área, encontra-se situada numa posição intermédia dentro do meso relevo. Solos Pardos Sialíticos, que ocupam uma posição mais elevada contribuem para o aporte de grandes quantidades de coloides, e sais solúveis (Martín, 2002). A posição no relevo do ecossistema facilita a dispersão e disseminação de parte desses contaminantes, em épocas ciclónicas o rádio de alcance de águas brancas pode ser de vários quilómetros, aspecto que deve ser abordado em próximos trabalhos.

As análises microbiológicas (Tabela 7) indicam valores de coliformes fecais superiores no que se refere às Normas cubanas (2004) de qualidade das águas com destino ao consumo e não ultrapassam os valores do CONAMA (2009) para águas de origem industrial que são despejadas em rios e lagos no Brasil. No entanto, como em Cuba não existem grandes rios, os mesmos valores representam uma ameaça para as condições cubanas. Ademais, a área de estudo encontra-se sobre um solo originado a partir de calcário – caliza dura (Febles, 2006) – existindo uma grande proximidade do lençol freático e abundantes áreas de evacuação das águas superficiais, o que representa um perigo potencial de contaminação das águas subterrâneas com os despejos da fábrica. A contagem de aeróbios totais encontrou-se em

valores normais, sendo descritas estirpes bacilares, cocos, cocobacilos, do tipo gram positivos e negativos, com aparências diversas, predominando colônias de margens lisas e irregulares, convexas e planas, de cores amarelas, verdes e rosas, com exceção da *Escherichia coli*, que apresentou colônias de cor vermelho brilhante na prova do Agar Endo (Mayea et al., 1998; Novo, 2007), indicativo de que as águas estão misturadas com esgoto urbano.

Tabela 7. Análises microbiológicas do efluente despejado no canal e na armadilha, assim como do solo contaminado próximo da zona de saída do efluente.

Análises Microbiológicas	CDL (Total)	CDS (Água)	CDS (Sedimento)	Valores Permissíveis
C. aeróbios (u.f.c/ml)	1,0x10 ⁴	1,3x10 ⁷		0.0
Coliformes totais (37°C) (N.M.P./100 ml)	39	50		<2,2* ¹ ≤300* ²
<i>Escherichia coli</i> (N.M.P./100 ml)	20	10		0
<i>Pseudomonas</i> , spp	-	+		0

*¹ Valores para água potável NC (Norma Cubana, 2004), CDL (canal de despejo líquido), CDS (canal de despejo sólido) SC (substrato contaminado), *²CONAMA (2009)

Apesar de serem estudos preliminares, na área contaminada existem estirpes autóctones com mecanismos desenvolvidos para sobreviver em ambientes contaminados. Estudos realizados em lodos de esgotos não tratados no Rio Quibú da cidade de Havana reportaram resultados similares referentes ao número de populações gerais de microorganismos aeróbios descritos (Álvarez et al., 2007). Microorganismos autóctones isolados de ambientes contaminados apresentam motivo de interesse para estudos de estirpes capazes de serem usadas em técnicas de biorremediação e recuperação de solos.

A área com influência da empresa de cerâmica branca encontra-se contaminada principalmente com Pb, Zn e Co, sendo estes três metais relacionados à atividade industrial da área. Os residuais líquidos contêm teores de metais superiores aos permissíveis, assim como os sedimentos depositados na caixa de contenção, resultando na contaminação elevada do solo na área estudada. Existem populações gerais de microorganismos aeróbios autóctones em valores normais que podem ser usadas para próximos estudos visando às técnicas de biorremediação. No entanto, os coliformes totais superam os valores segundo as normas cubanas (2004), o que representa um risco para as águas subterrâneas. Foram encontradas colônias de *Escherichia coli*, significando que os despejos industriais estão misturados com esgoto de origem urbana.

4.2. Impacto dos Metais Pesados na Microbiota do Solo

4.2.1. Bioindicadores de qualidade: Cmic, C-CO₂, qCO₂ e qMIC

Os resultados na Tabela 8 indicam que existem diferenças estatisticamente significativas na biomassa microbiana (Cmic) em relação aos terços amostrados na área de estudo, na sequência TS<TM<TI, sendo maiores no TI. Igualmente a respiração microbiana (C-CO₂) resultou maior no TI e não houve diferenças significativas para os valores de respiração nos outros dois terços, o que pode estar relacionado com o aporte de carbono orgânico total (Corg), cujos valores encontrados seguiram a mesma distribuição que a respiração.

Com relação ao quociente metabólico (qCO_2) foram observadas diferenças entre os valores, na sequência TS>TM>TI, indicando que há uma redução gradual e significativa do quociente metabólico no sentido da declividade de amostragem, sendo o TI o que apresentou o valor mais baixo de $0,68 \cdot 10^{-3} \mu g CO_2$ solo seco h^{-1} . Os valores de carbono orgânico total (Corg. %) e pH no TI foram os mais próximos ao solo testemunha, onde a média de carbono orgânico foi de (3,07%) e de pH em torno de 7,3.

Tabela 8. Indicadores biológicos do solo.

Área	Cmic	CO ₂ -C	qCO ₂	Corg	pH	qMIC
TS	136,47±17,77 c	0,14 ± 0,11b	1,02±0,09a	1,86 ± 0,63b	8,08±0,3a	0,78 n.s
TM	162,94±25,99b	0,13 ± 0,15b	0,80±0,06b	1,96 ± 0,16b	7,8±0,07b	0,83 n.s
TI	249,20±20,94 a	0,17 ± 0, 07a	0,68±0,04c	2,88 ± 0,26a	7,69±0,12b	0,86 n.s
E.P	7,93	0,003	0,023	0,09	0,04	-
C. V (%) P < 0,05	29,09 0,000	14,04 0,0000	18,97 0,0000	27,35 0,0000	3,17 0,0000	-
Diferenças	TS<TM<TI	TS=TM<TI	TS>TM>TI	TS=TM<TI	TS>TM=TI	-
S. T	275-335	-	-	3,07	7,3	1,6

Análises de variância pelo teste de diferenças honestamente significativas (HSD) de Tukey: n.s-medias não diferem significativamente, letras a,b,c em colunas, medias com diferencias estadísticas significativa com um nível de confiança de 95%. Teste da Variância mediante prova de Bartlett. S. T; Solo não contaminado usado como Testemunha, n.s: Não significativo. Cmic ($\mu g \cdot g^{-1}$); C-CO₂ ($\mu g CO_2 g^{-1}$ solo seco h^{-1}); qCO₂ (CO₂-C/Cmic: $10^{-3} \mu g CO_2 g$ solo seco h^{-1}); Corg(%); pH (H₂O).qMIC (Cmic:Corg).

O quociente microbiano (qMIC) ou relação entre Cmic:Corg, que representa a contribuição do carbono orgânico na biomassa microbiana, não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os terços, resultando nos três terços amostrados, em um valor mais baixo que a média do valor obtido para o solo testemunha.

Em todos os terços, como foi citado, os valores de biomassa microbiana estão abaixo do valor obtido no solo testemunha ($335 \mu g g^{-1}$) e de outros valores ($275-449 \mu g g^{-1}$) reportados para os solos da mesma região (Gómez et al., 2012). Por outro lado, o carbono da biomassa microbiana geralmente está compreendido no intervalo de 1 a 5% (Anderson e Domch, 2010) do carbono orgânico total. Valores menores a estes intervalos indicam perdas de carbono do sistema, como foi observado neste trabalho onde a biomassa microbiana apresentou valores menores a 1%, diferente do obtido no solo testemunha com valores médios de 1,6%. Segundo esses autores uma relação Cmic: Corg menor a 1% indica uma alteração anormal do retorno da matéria orgânica ou “turnover” no solo.

A redução da Cmic (%) e o aumento de qCO₂ com relação ao solo testemunha pode ser descrita através de uma curva exponencial (Figura 15). Onde aumento de qCO₂ como observado no gradiente desde o TI até o TS, indica que há um estresse na comunidade microbiana do solo onde qualquer perturbação no ecossistema representa uma mudança de energia de crescimento para manutenção (Anderson e Domsh, 2010), resultando em qCO₂ elevados e redução na biomassa microbiana, como observado no TS.

Em solos contaminados com metais pesados, a contaminação pode levar a uma redução da biomassa microbiana. Similar ao observado neste experimento e descrito na Figura 15, o que tem a ver com o decréscimo no número de populações específicas de microrganismos ou então com substituição na estrutura da microbiota (Barros et al. 2010).

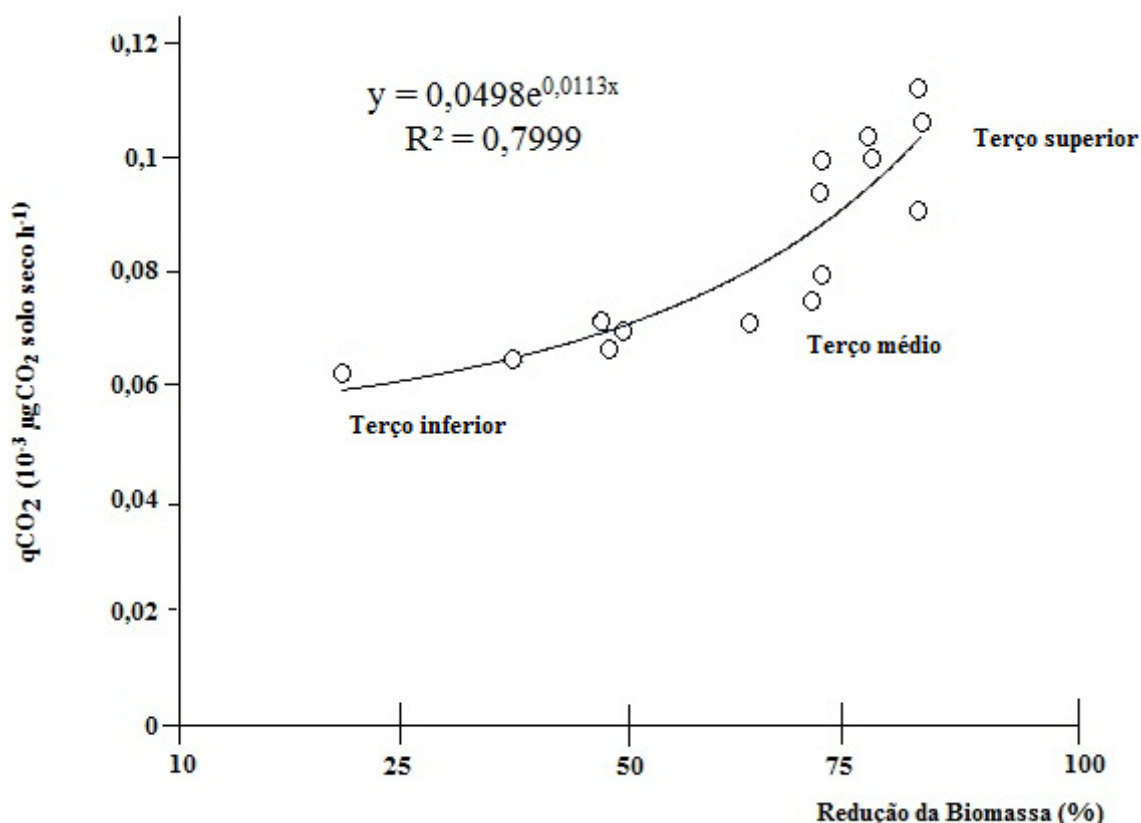


Figura 15. Relação entre o incremento de qCO_2 e a biomassa microbiana. Descrito através de uma curva exponencial com a função $y=0,0498e^{0,0113x}$, onde debaixo da curva são indicados os três terços que está dividida área de amostragem (Terço inferior, médio e superior). Observe-se como há uma redução da biomassa microbiana em relação ao aumento do qCO_2 (%).

Segundo Andersom e Domsch (2010) a síntese de biomassa microbiana é menos eficiente devido à incapacidade de síntese de biomassa sob estresse por metais pesados, o que implica em uma redução da biomassa microbiana em solos contaminados. Nesta pesquisa, a redução da biomassa microbiana no ecossistema quando comparado com o solo testemunha esteve acompanhada de um incremento do qCO_2 do TI para o TS.

No TI, onde os valores pseudototais e biodisponíveis de Pb comparativamente aos valores dos outros terços foram inferiores (Tabela 7), foi observado o maior valor de biomassa microbiana ($249,20 \mu g g^{-1}$) e o menor valor do qCO_2 ($0,68 \cdot 10^{-3} \mu g CO_2 \text{ solo seco } h^{-1}$, Figura 15).

Esta relação pode ser explicada dado que em solos sob estados de equilíbrio a biomassa é tanto mais eficiente quanto menos carbono é perdido em forma de CO_2 , resultando em quocientes metabólicos (qCO_2) baixos (Gama-Rodrigues et al., 2008). Portanto, o terço inferior ao apresentar o mais baixo quociente metabólico estaria sofrendo menor influência dos metais pesados entre os três terços da área estudada (Tabela 8), o que pode estar relacionado com a distribuição desses elementos no solo.

Nesta área o Pb é mais acumulado no TS por se encontrar mais próximo da fonte de contaminação (Figura 6) e ao se afastar da fonte contaminante os teores diminuem devido à baixa mobilidade deste metal (Alloway, 1995; Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Também no TI o pH apresenta valores próximos aos do solo testemunha, não contaminado (ST), pelo que os microrganismos estariam em melhores condições para se desenvolver. Entretanto, o TS e

TM estão sob os maiores efeitos da contaminação, e isto pode ser observado nos baixos índices de (C-CO₂, qCO₂, C_{mic} e qMIC, Tabela 8).

Os maiores níveis de Ni foram observados no TM com uma variação dos teores biodisponíveis de até 28,9%, mas não foram observados resultados isolados significativos que apontem uma influência deste metal nos indicadores neste terço. A variação do teor biodisponível de Cu com relação ao pseudototal foi de até 62%, o que significa dizer que uma quantidade significativa deste metal poderia estar disponível em toda a área (Figura 6), afetando também os processos metabólicos da microbiota do solo. Resultados similares foram obtidos na influência do pH e de elevados teores de Cu/Zn na redução da biomassa microbiana foi obtido por Wang et al. (2007a) na análise dos efeitos dos metais pesados em um gradiente. Os autores comprovaram que os metais afetavam processos metabólicos na comunidade microbiana pela ação combinada dos metais e que a variação do pH (7,64-8,27) não resultou significativa.

As análises de respiração de solos (C-CO₂) e de quocientes (qCO₂) são de grande ajuda em trabalhos sobre impacto de metais pesados em solos contaminados porque uma característica principal dos metais é afetar os processos de respiração dos solos e as comunidades microbianas (Moscatelli et al., 2007), o que foi possível verificar neste trabalho, usando os mesmos bioindicadores.

Vários trabalhos avaliam os efeitos dos metais pesados sobre as comunidades microbianas através de parâmetros como C_{mic}, C-CO₂, e qCO₂ e nem sempre é possível estabelecer uma relação lógica existindo alguns estudos que são contraditórios. Alguns resultados reportam incrementos da biomassa microbiana em solos onde tem sido adicionados biossólidos com elevados teores de metais pesados (Kao et al., 2006), uma vez que passado um tempo as condições no solo podem se estabilizar, não sendo possível medir mudanças através desses parâmetros entre solos contaminados e não contaminados. Entretanto, as diferenças encontradas entre a biomassa microbiana no solo contaminado e não contaminado neste experimento são bons indicadores dos efeitos tóxicos dos metais pesados aqui analisados sobre a comunidade microbiana no ecossistema estudado.

O efeito dos metais pesados na microbiota do solo contaminado também pode ser avaliado através do quociente microbiano (qMIC). Ainda que não existam diferenças significativas entre os valores dos terços amostrados, a análise deste quociente resulta de grande importância, muito em decorrência do fato de que o (qMIC) é um indicador da proporção da disponibilidade de carbono para o crescimento microbiano. À medida que aumenta o valor desta relação, maior será a eficiência dos microrganismos no uso do carbono, o que representa uma elevada acumulação de biomassa por unidade de substrato consumido (Anderson e Domsh, 2010).

As perdas de Corg neste trabalho poderiam ser uma consequência das condições de estresse dominantes no ecossistema contaminado com metais pesados. Um quociente microbiano qMIC ou a relação C_{mic}:Corg similares, como constatado neste experimento, pode ser um indicativo da diminuição do carbono associado à biomassa microbiana. Segundo Yang et al. (2005) a contaminação por metais pesados pode diminuir a relação do carbono da biomassa microbiana com a matéria orgânica do solo, e a relação C_{mic} / C-orgânico tem sido um indicador proposto por vários autores como uma ferramenta útil para medir o impacto da contaminação por metais nos solos.

4.3. Vegetação Ruderal

As espécies de maior relevância identificadas nos pontos de amostragens são apresentadas na Tabela 9. Por diversos fatores, dentre dos que se encontra a intervenção antrópica, a ocorrência destas espécies é variável. Mudando também de forma estacionária.

Podendo achar uma ou outra a cada certo tempo. Isso pode obedecer a ocorrência que se estabelece nas espécies entre o período seco e chuvoso, ou a fatores externos como a queima da área e a remoção da terra por maquinaria pesada (Guzmán, 2006).

Tabela 9. Classificação de espécies ruderais identificadas nos pontos geo-referenciados.

Famílias	Nome Científico	Classificação
Poaceae	<i>Cynodon nlemfluensis</i> Lin. Vender	Perene
	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers	Perene
	<i>Panicum máximum</i> Jacq	Perene
Cyperaceae	<i>Cyperus gigantus</i> L.	Anual ou Perene
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	Anual
Fabaceae	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd	Perene
Convolvulaceae	<i>Ipomoea triloba</i> L.	Anual

O que está relacionado com o observado durante a amostragem, pela presença de forte odor de queimado e restos vegetais, indicativos de queimadas. Nesse sentido, foram identificadas espécies ressurgentes após a queima, cuja adaptação aos níveis de contaminação – seja como sementes, rizomas, bulbilos ou estolões – possuem mecanismos para se perpetuar no lugar, apesar dos níveis de contaminação existentes. Além disso, como dato interessante para o estudo, em vários trabalhos de monografia e mestrado, realizados pelos integrantes do grupo FITOPLANT, desde 2005 quando começaram os primeiros trabalhos investigativos, foram determinadas, coletadas e identificadas espécies que se desenvolvem nesta área (Quevedo, 2006; Sánchez 2008) e em todos os trabalhos foram identificadas pelo menos uma espécie de cada família, das que são apresentadas neste estudo.

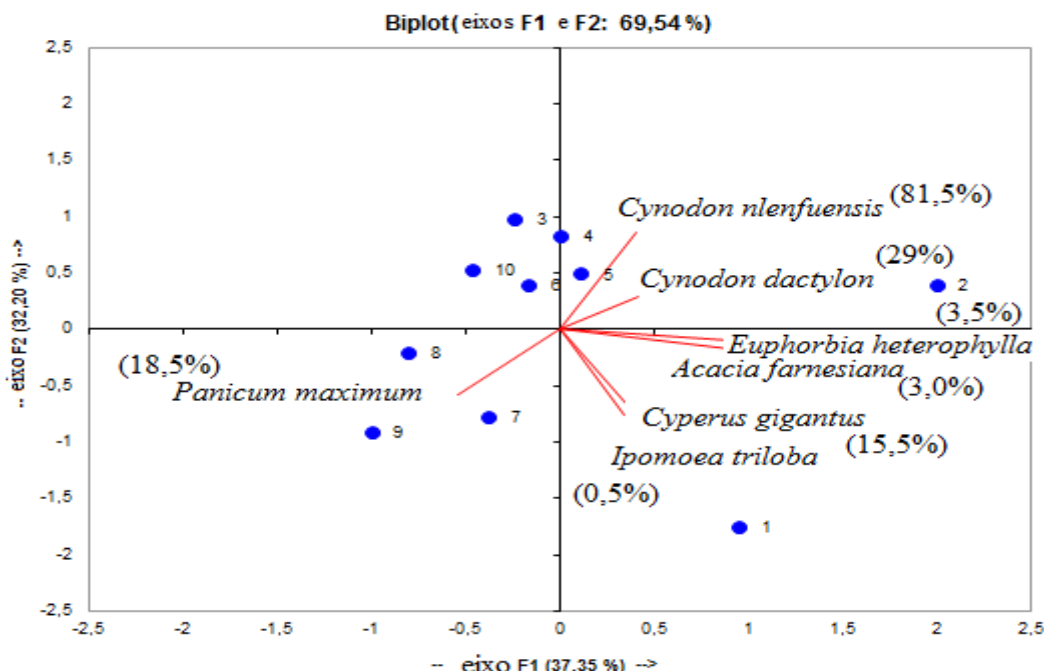


Figura 16. Distribuição percentual de cada espécie por m² dentro da área estudada.

Na análise de ACP, ambos os eixos, explicam 69,54 % da variação das espécies na área. Igualmente pode-se observar que as espécies mais abundantes, de acordo com a porcentagem de distribuição por m² é a seguinte: *Cynodon nlemfluensis* (81,5%) > *Cynodon dactylon* (29%) > *Panicum máximum* (18,5%). Estas são as espécies mais abundantes na área,

mesmo após ocorrência de práticas como a queima ou remoção do substrato. Esta condição pode ser resultado de mecanismos adaptativos que permitem que as gramíneas se adaptem às condições estressantes, tais como a colonização de terrenos pouco férteis e a tolerância, neste caso específico, de elevados teores de metais pesados presente na área.

Tabela 10. Teores totais de Pb, Co e Zn (mgKg^{-1} de massa seca) presentes nas partes aéreas e radical nas espécies predominantes na área contaminada.

Espécie	Parte	Pb	Co	Zn
<i>Cyperus giganteus</i> L.	Folhas + Caule	69,07 + 0,9	4,41 + 0,51	290,50 + 4,77
	Raiz	72,21 + 0,93	1,20 + 0,04	620,67 + 1,61
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	Folhas + Caule	312,47 ± 17,62	5,21 + 0,04	1281,50 + 3,12
	Raiz	235,25 + 1,18	2,11 + 0,01	416 + 13,44
PA/Raíz <i>Cyperus</i>		0,96	3,76	0,47
PA/Raíz <i>Cynodon</i>		1,33	2,46	3,08

Através do conteúdo total de metais pesados nas partes aéreas e raízes de *Cynodon nlemfuensis* e *Cyperus giganteus* verificou-se que existem níveis consideráveis de Pb, Zn, Co nas folhas e raízes em ambas as espécies (Tabela 9). *C. giganteus* resultou ser boa fitoestabilizadora de Pb e Zn, devido a que os maiores teores se encontram em suas raízes tendo um índice de traslocação de 0,96 para Pb e 0,47 para Zn. Com relação a Co os valores não são muito elevados, mas a tendência da planta é a acumular mais esse metal nas folhas. Este comportamento poderia ser um bom indicador para fitoextração e precisa ser verificado com maior detalhamento.

A espécie *C. nlemfuensis* é mais abundante na área contaminada e para os três metais pesados, a tendência é a traslocar os metais para a parte foliar. Foram obtidos valores de Pb (médios 313 mg.kg^{-1}) e (1281 mg.kg^{-1}) de Zn na parte aérea com um índice de traslocação de 1,3 e 3,8 respectivamente.

Sendo assim, poder-se-ia pensar em um mecanismo adaptativo que permite à planta tolerar certos níveis de metais pesados (Lasat, 2000), acumulados, os quais, caso contrário, poderiam causar toxicidade. Segundo Pérez et al. (2002), numerosas gramíneas mostram especial sensibilidade à deficiência de Zn, com o que se estaria estabelecendo certa relação de dependência com este elemento, de modo que este fator poderia estar associado aos mecanismos de acumulação e tolerância. O mesmo autor sugere que, quando a concentração de metais pesados em tecidos vegetais é capaz de superar os 400 mg.kg^{-1} de metais, o valor é considerado excessivo e tóxico para as plantas. No entanto, Morejón (2008) encontrou valores superiores de metais pesados aos reportados por Pérez et al. (2002), em partes aéreas e raízes das plantas analisadas, sem apresentar sintomas de toxicidade e uma aparência normal.

Esses estudos indicam a importância de utilizar essas gramíneas em estudos posteriores com o uso de armadilhas, sendo associadas a diversas espécies de FMAs, isoladas do mesmo ambiente contaminado. O objetivo, portanto, é o de estudar mecanismos adaptativos que vinculem as plantas e as FMAs nesses ambientes para serem usadas numa estratégia de recuperação do solo, visando o uso da biorremediação.

Em áreas de pastagem, as espécies do gênero *Cynodon* são de grande importância na pecuária cubana tanto por seu valor nutritivo como por sua excelente palatabilidade e adaptação a diferentes tipos de solos, assim como por ter uma alta resistência ao pastejo (Peña, 2008). Por outro lado, sua alta resistência na área contaminada e seu caráter acumulador de metais representam risco para animais que venham a se alimentar deste pasto, tendo já sido reportada na área de forma regular a presença de bovinos, caprinos e equinos.

Situação que representa um grave perigo uma vez que a parte aérea desta planta é utilizada para o consumo animal, provocando a introdução de contaminantes na cadeia trófica.

Segundo Berazaín (1999), esta capacidade de acumular elementos pesados pelas plantas, ao que parece, está ligada a certo nível taxonômico como o intra-específico, onde uma espécie ou suas sub-variedades, que se desenvolvem sobre um substrato com uma elevada concentração de elementos pesados irão se comportar de forma similar. É dizer, portanto, que todos estes níveis intra-específicos reagem por igual: numa mesma família, as plantas ou são acumuladoras ou não. E para este caso de estudo *C. nlemfuensis* e *Cyperus gigantus* corroboram seu comportamento com tendência à acumulação (Sánchez, 2008).

Este grupo de espécies encontradas coincide com a vegetação característica que se desenvolve sobre rocha serpentinita, especificamente as famílias Convolvulaceae, Euphorbaiceae, Fabaceae, Mimosaceae que, segundo Lazcano et al. (1999), formam parte da recuperação natural da flora de áreas de serpentinas, onde um dos fatores limitantes destes solos é o alto conteúdo de metais pesados e seus efeitos tóxicos. Assim, as espécies que crescem nessas áreas têm como características comuns a possibilidade de tolerar as condições ecológicas imperantes.

4.3.1. Análise de correlação entre as espécies vegetais e os metais pesados

Na Figura 17 observam-se os dados da matriz de correlação entre a vegetação ruderal e os metais associados nos pontos de amostragens. Neste desenho, são apresentadas as relações entre as espécies vegetais, as espécies e os metais e entre os metais. Para um nível ($\alpha=0,050$), as relações entre *C. nlemfuensis* e Pb resultaram significativas para um valor de 0,78%. A mesma espécie ocupa 85,5% na área amostrada (Figura 17).

	C. dactylon	C. nlemfuensis	P. maximum	C. gigantus	E. heterophylla	A. farnesiana	I. triloba	Cu	Ni	Co	Zn	Media	D. típica
C. dactylon												29,0	24,8
C. nlemfuensis	0,2125											81,5	71,5
P. maximum	-0,2785	-0,7562										18,5	27,8
C. gigantus	0,1164	-0,5191	0,1287									15,5	14,9
E. heterophylla	0,2608	0,2971	-0,2825	0,2723								3,5	6,3
A. farnesiana	0,2710	0,2196	-0,2279	0,3509	0,9723							3,0	6,4
I. triloba	-0,2556	-0,3567	-0,0420	0,5478	0,3415	0,3644						0,5	1,5
Cu	0,4154	-0,1596	-0,2220	0,3641	0,0378	0,0501	-0,0390					40,4	10,6
Ni	-0,0378	0,2055	-0,1106	0,0557	0,1038	0,0453	-0,3426	0,5246				32,7	6,3
Co	-0,3918	0,5994	-0,3983	-0,5297	-0,1292	-0,1029	-0,2803	-0,5340	-0,0971			160,9	140,2
Zn	-0,1142	0,3679	-0,3901	-0,5191	-0,3342	-0,3082	-0,3184	-0,3007	-0,4490	0,7452		2901,7	1083,5
Pb	0,1671	0,7861	-0,6751	-0,5254	0,0064	-0,1037	-0,4470	-0,1465	-0,0532	0,5402	0,6759	29156,7	14559,9

valores signivativas em escuro (fora diagonal), umbral alfa 0,050 (prova bilateral)

Figura 17. Matriz de correlação da análise de componentes principais entre a vegetação ruderal avaliada e a concentração de metais pesados associada em cada ponto de amostragem.

A correlação significativa encontrada entre os metais Pb, Co e Zn pode estar relacionada com uma origem antrópica, devido a presença de uma empresa de Cerâmica Branca e à relação existente com a área de amostragem e os despejos dessa mesma empresa. Esses teores (Figura 7) representam um grave perigo para o ecossistema analisado. Segundo ROSS (1995) são afetados os procesos de mineração e a microbiota do solo, pelo que toda

planta e micro ou macro-organismos encontrados na área, podem estar submetidos a uma situação de estresse e a sua permanência pressupõe certa tolerância a esses níveis de concentração dos metais (VAN HOEWYK et al. 2005). Como observado e discutido no subcapítulo (4.2.1).

Outros trabalhos feitos em áreas contaminadas com metais pesados, sob influência de empresas de cerâmicas referente ao uso de pigmentos, relatam a presença dos metais Pb, Co, Zn como parte dos óxidos que são usados no processo produtivo (Navas e Machín 2002; Peris, 2006).

4.4. Microcosmos

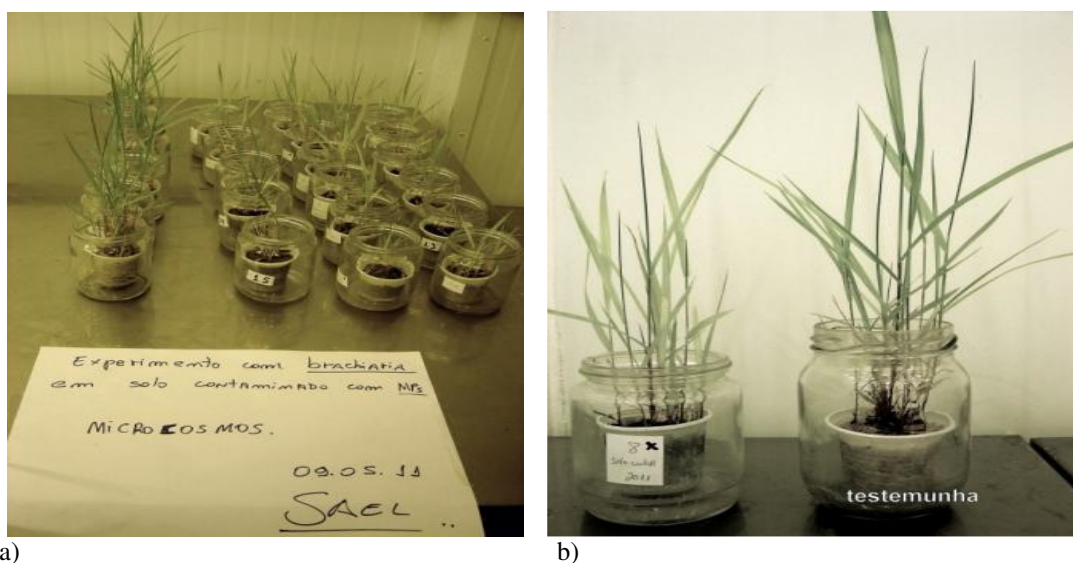


Figura 18. a) Microcosmos com *Brachiaria decumbens* e solo contaminado; a fileira da esquerda são as testemunhas e as tres fileiras da direita os diferentes pontos de coleta de solo onde a variação dos metais (Pb, Zn, Co) é diferente. b) Figura 18b, mostra bem detalhado o desenvolvimento da planta com solo contaminado e a testemunha em areia aos 60 dias.

4.4.1. Pigmentos fotossintéticos

O conteúdo de clorofila (a) e (b) da *Brachiaria decumbens* cultivada em microcosmos, quando comparado com a testemunha teve uma redução considerável (Figura 19).

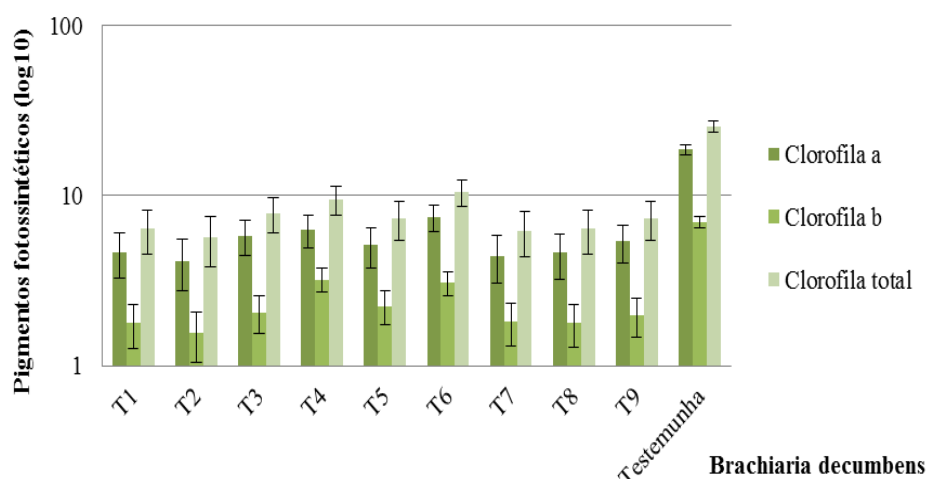


Figura 19. Concentração de pigmentos fotossintéticos ($\log_{10}$ dos valores mg g^{-1}) na *Brachiaria decumbens*. T1-T9 Brachiarias no microcosmos com solo contaminado.

Os metais pesados podem inibir certos processos metabólicos (Manoj e Prasanna, 2004), como a produção de pigmentos. Em todos os casos quando comparado com a testemunha, o conteúdo de pigmentos foi afetado.

Resultados similares de redução do conteúdo de clorofilas foram citados por Santos et al. (2011) quando plântulas de *B. decumbens* Stapf, foram submetidas a contaminação com Cd e Zn.

O decréscimo do conteúdo de clorofila tem sido observado em várias espécies de plantas devido à contaminação com metais pesados (Oncel et al., 2000; Mobin e Khan, 2007) especialmente Zn que, frequentemente, inibe processos metabólicos através da inibição da ação de enzimas.

O decréscimo no conteúdo de clorofila associado com o estresse de metais pesados pode ser resultado da inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese de clorofila (Stobart et al., 1985; Chettri, et al., 1998; Shakya et al., 2008.).

Na solução de clorofila foram obtidos teores de Pb, Zn, Co, Cu (Figura 20); resultado que reforça a teoria sobre a intervenção dos metais nos processos de biossínteses.

Observe-se que em todos os tratamentos (1-9) há presença de Pb, o metal pesado mais concentrado no solo analisado. No tratamento 10 que é a testemunha, onde as plantas encontravam-se expostas a uma solução nutritiva de Hoagland, Pb não foi detectado. Outros elementos (Zn, Co, Cu) são micronutrientes e estão presente na solução nutritiva.

De modo geral, todos os metais foram adsorvidos seguindo o mesmo comportamento da sua especiação, discutido no subcapítulo (3.2.1) de acordo com a biodisponibilidade de cada metal em cada uma das amostras que conformam os tratamentos (1-9) onde foram detectados teores variáveis, com exceção de Co.

Em presença de elementos-traço, pode existir substituição do Mg^{2+} por metais bivalentes (Cu, Zn) pela formação de quelatos. Também a planta pode acumular, Pb quando disponível como observado na Figura 20. Em todos os tratamentos, com exceção da testemunha, houve uma diminuição do conteúdo de Mg o que deve ter sido influenciado pela presença de Pb, Zn e Cu. Isto significa que houve efeito fitotóxico dos metais absorvidos provocando danos nos conteúdos fotossintéticos.

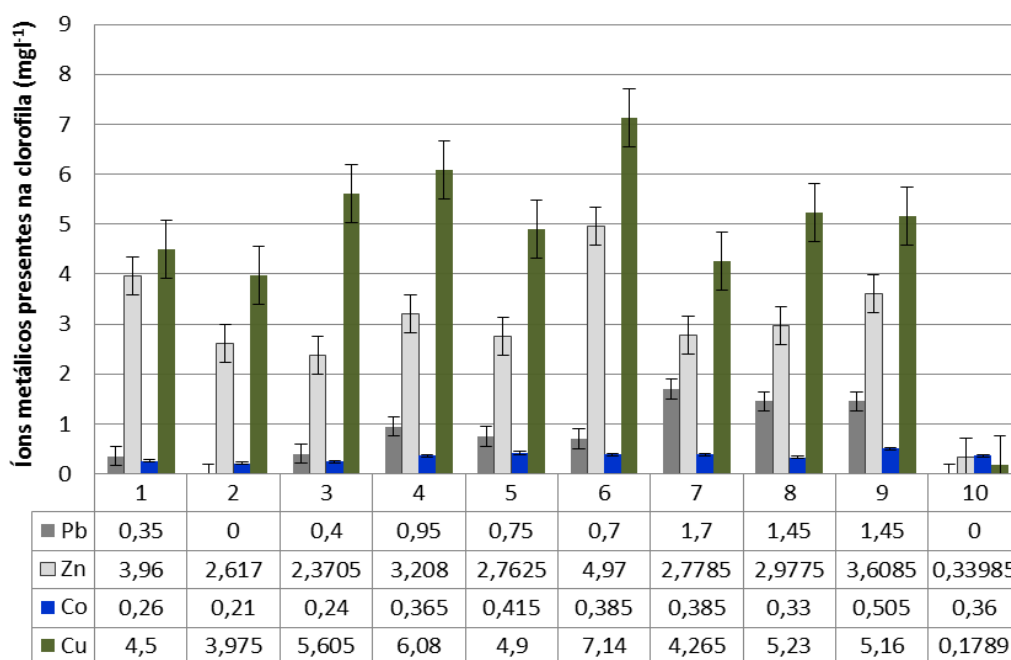


Figura 20. Teores de metais determinados na solução de extração dos pigmentos fotossintéticos.

Num estudo de líquenes do género *Cladonia* que se desenvolviam em áreas de mineração onde Cu, Zn e Pb estavam presentes, foi colocada a hipótese que Cu tinha sido responsável pela redução do conteúdo de clorofila destes organismos, pela ação tóxica individual ou o seu efeito combinado, de acordo com os teores achados destes metais nos talos das espécies de líquenes estudadas. Foi determinado que, provavelmente cátions de metais estariam ionicamente ligados dentro da parede celular na forma permutável com afinidades de ligação $Pb > Cu > Zn$. Sendo Cu apenas que é captado pelas células fotossintéticas podendo interferir na biossíntese de clorofila ou desencadear processos de peroxidação de lipídios de membrana (Chettri et al., 1998; Markert e Friese, 2000; Sharma e Dubey, 2005), o que pode ter acontecido com a *B. decumbens* expostas aos efeitos dos metais no microcosmos.

A redução dos teores dos pigmentos fotossintéticos pela toxicidade de metais pesados como Cd, Cu e Pb foi reportada por Burynski et al. (2004), e em arroz foi observada por He et al. (2006), descrevendo que há sensibilidade diferente entre as clorofilas (a) e (b) em dependência do tipo de metal.

4.4.2. Bactérias diazotróficas

O crescimento das plantas nas porções de solos reduzidas em microcosmos garantiu o isolamento de estirpes bacterianas provenientes do solo contaminado após 30 dias de cultivo, como se mostra na Tabela 12.

O número de bactérias desenvolvidas mesmo que estatisticamente não for significativo, foi maior nas raízes nos meios LGI e JNFb, R2 ($9,5 \times 10^4$ NMP/mL), nos três casos. Os resultados se encontram entre os padrões de crescimento para bactérias diazotróficas onde têm sido detectadas na rizosfera de plantas, em densidades de até 10^7 /g, sendo esta densidade maior que nas folhas (Baldani et al., 1986; Reis et al., 2006). Como observado em esses resultados.

Tabela 12. Densidade de isolados bacterianos obtidos em meios seletivos para bactérias diazotróficas pelo NMP/mL, a partir do microcosmos.

	LGI	JNFb	NFb
Raíz			
R1	6,5x10 ⁴	4,5x10 ⁴ a	3,0x10 ⁴
R2	9,5x10 ³	9,5x10 ⁴ a	4,0x10 ⁴
R3	6,4 x10 ⁴	9,5x10 ⁴ b	4,2x10 ⁴
Folha			
F1	4,2x10 ³	3,2 x10 ³	3,2 x10 ³
F2	7,5 x10 ³	5,3 x10 ³	5,3 x10 ³
F3	6,5 x10 ³	8,7 x10 ³	4,2 x10 ³

Meio LGI, seletivo para *Azospirillum amazonense*, NFb seletivo para *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense*, JNFb seletivo para *Herbaspirillum sp.* Análise pelo teste de Tukey 95 % de confiança, p<0,05 valores não significativos. R1(maior teor de Pb), R2(maior teor de Zn) e R3 (maior teor de Co) no solo contaminado.

Do mesmo modo, bactérias diazotróficas têm sido detectadas em rizosferas de plantas em densidades de até 10⁷/g (Magalhães et al., 1979; Moreira et al., 2010). Modificações significativas nas propriedades físico químicas do solo causadas pelos diversos usos seja por adição ou remoção de elementos e/ou práticas de cultivo poderão causar alterações na comunidade microbiana (Moreira e Siqueira, 2006). Como observado nesses resultados. Do mesmo modo como foi discutido com os indicadores microbianos (Tabela 8, Fig 15), as bactérias de fato podem estar sob a influência dos efeitos tóxicos dos metais pesados. Pode ser que, os valores de densidade encontrados nas raízes R1, R2 e R3, se deva a que muitas vezes situações de estresse contribuem para aumentar a densidade dos microrganismos. Tem sido observado que algumas modificações significativas nas propriedades físico químicas do solo causadas pelos diversos usos seja por adição ou remoção de elementos e/ou práticas de cultivo, podem causar alterações na comunidade microbiana (Moreira e Siqueira, 2006), onde as bactérias provenientes de ambientes estressantes como o solo contaminado, experimentam taxas de crescimento acelerado. O que foi observado neste experimento.

Resultados similares com este trabalho foi obtido por Prado Junior (2012) num estudo de isolamentos de bactérias a partir de plantios de cana-de-açúcar sob um solo contaminado com metais pesados. O trabalho dele cita que outros autores obtiveram m densidades menores ao isolarem bactérias diazotróficas a partir de raízes e folhas de plantas procedentes também de sítios contaminados por metais pesados.

No processo de isolamento também foi possível observar as mudanças de coloração dos meios (verde para azul), (amarelo para verde) indicando que houve interação das bactérias com os meios seletivos (LGI, JNFb, NFb) e variações no pH que provocaram a mudança da cor do indicador.

Espécies de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de espécies de importância agrícola como as gramíneas (Magalhães e Döbereiner, 1984; Döbereiner, 1992; Baldani et al., 1997; Fernandes et al., 2001).

Resultados similares aos de este trabalho, sobre o isolamento de bactérias diazotróficas a partir de solos contaminados tem sido descritos também por Moreira et al., (2008). Em solos tratados com resíduos siderúrgicos e biossólido industrial (Melloni et al., 2000) e em áreas sob reabilitação de bauxita (Melloni et al., 2004; Nóbrega et al. 2004).

Segundo Baldani e Baladani (2005) nos meios seletivos para diazotróficos, não só crescem as baterias para os quais foi desenvolvido, outras bactérias podem crescer também. Por tal motivo são necessários outros testes até a seleção final de cada estirpe fixadora.

4.4.3. Atividade da nitrogenase por médio da redução do acetileno

Os resultados obtidos no teste de redução do acetileno (ARA), são apresentados na Figura 21, foram avaliados conjuntamente com resultados padrões de ARA, indispensável para a caracterização das estirpes como fixadoras de nitrogênio, apresentados na mostra a densidade de bactérias (log NMP) que apresentaram conjuntamente um bom resultado de ARA, sendo possível avaliar a atividade da nitrogenase, e selecionadas como promissoras para o seu uso futuro em solos contaminados com metais pesados. Em total foram isoladas 66 colônias puras, das quais 52 -78,78% formaram películas características para diazotróficos.

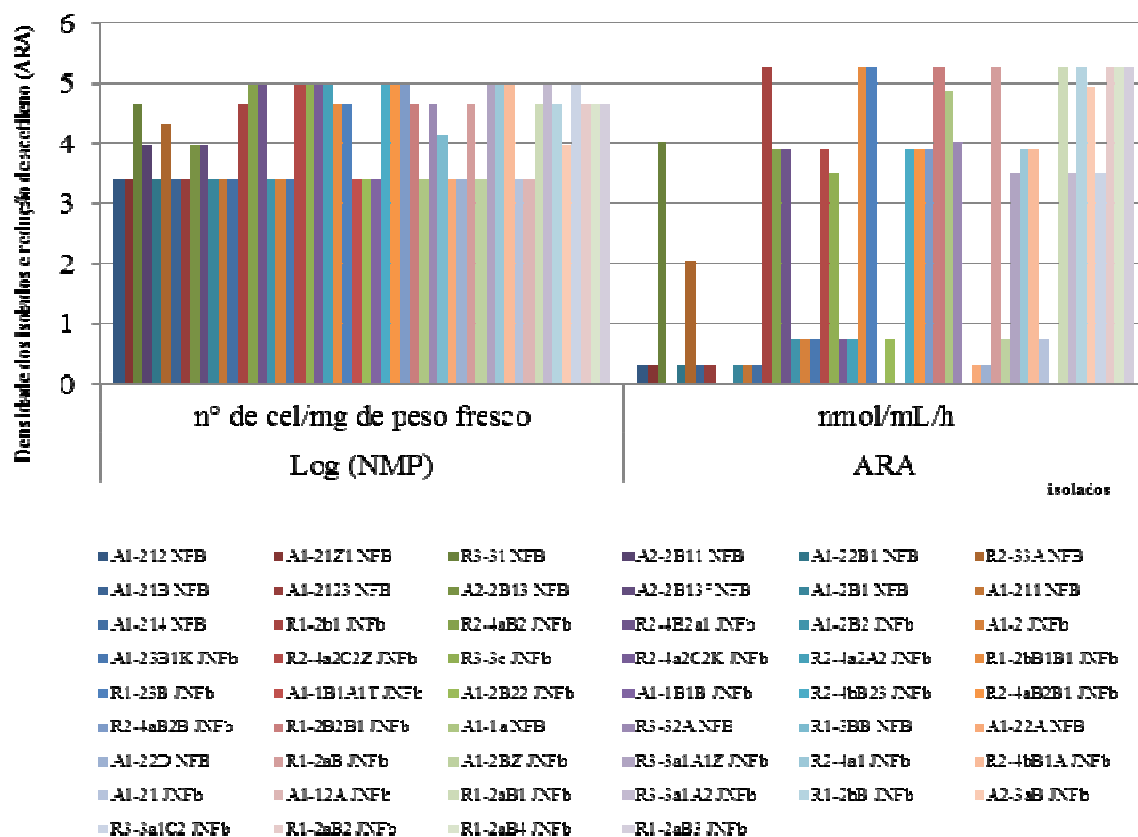


Figura 21. Densidade dos isolados obtidos nos meios JNFB e NFB, Log (NMP) e medição da redução de acetileno (ARA).

Foram selecionadas 25 estirpes como promissoras para estudos em campo por apresentarem os maiores resultados de ARA, totalizando o 37,87% da quantidade inicial dos isolados. As bactérias que cresceram em meio NFB consideradas promissoras foram as denominadas 3, 6, 32 e 33, que apresentaram os respectivos resultados de ARA: 4,019; 2,035; 4,882 e 4,019 nmol/mL/h., como se mostra na Figura 21. Tiveram respectivamente a densidade de colônias, segundo o número mais provável: 4,653; 4,301; 3,397 e 4,653 (nº de cel/mg de peso fresco).

Esses resultados não são tão significativos no sentido da quantidade de acetileno reduzido quando comparado com similares resultados obtidos por Sabino, et al. (2012) mas é de destacar que esses isolados são originários de um solo muito contaminado com metais pesados o que pode interferir no seu metabolismo. Outro fator que pode afetar os valores de redução do acetileno, está nos dias de crescimento que experimenta cada colônia antes de serem analisados, tais diferenças foram reportados por Rodrigues et al. (2006).

Como resultado de grande importância, se obtém estirpes puras, ao parecer fixadoras de nitrogênio e isoladas de um ambiente altamente contaminado.

4.5. Fungos Micorrízicos Arbusculares

Na Tabela 13, mostra-se a ocorrência de FMAs procedentes do solo contaminado nos três terços e do ecossistema não perturbado. Foram identificadas um total de 13 espécies, procedentes de 6 famílias.

Tabela 13. Abundancia de espécies de fungos micorrízcos arbusculares (FMAs) identificadas no ecossistema contaminado comparadas com um ecossistema não perturbado.

Espécie/parcela	Ecossistema não perturbado	Terço inferior	Terço Médio	Terço superior
<i>Acaulospora morrowiae</i> cf.	47	0	0	0
<i>Acaulospora</i> sp 02	40	0	0	0
<i>Diversispora spurca</i>	335	20	160	20
<i>Gigaspora margarita</i>	10	0	0	0
<i>Glomus albidum</i>	0	38	0	0
<i>Glomus halonatum</i>	20	0	3	0
<i>Glomus intrradices</i> cf.	100	27	85	90
<i>Glomus</i> sp 01	468	0	20	0
<i>Glomus microcarpum</i> cf.	1586	0	0	0
<i>Glomus</i> sp 03	147	225	715	0
<i>Glomus</i> sp 04 aggregatum-like	27	0	0	0
<i>Glomus</i> sp 05	7	0	0	0
<i>Glomus</i> sp 06	7	0	0	0
<i>Glomus</i> sp 07	7	0	0	0
<i>Glomus geosporum</i> cf.	7	0	0	0
<i>Glomus</i> sp 09	27	0	0	0
<i>Glomus</i> sp 10	20	0	0	0
<i>Glomus</i> sp 11	0	3	0	0
<i>Glomus</i> sp 12	0	7	23	220
<i>Kuklosporakentinensis</i>	20	0	3	0
<i>Ornamentado</i> 01	7	0	0	0
<i>Pacisporasp</i> 01	0	3	0	7
<i>Pacisporasp</i> 02	0	0	7	0
<i>Pacispora</i> cf. <i>Ornamentada</i> sp 03	7	0	0	0
<i>Paraglomus oculum</i>	213	1338	2335	2457
<i>Glomus sinuosum</i>	4	37	13	43
<i>Fuscutata savannicola</i>	10	0	0	0
<i>Xerofiticasp</i> 01 (gen. novo)	2	0	0	0
Densidade de esporas (100g)	3118	1698	3364	2837
Nº de Espécies	23	9	10	6

De acordo com o resultado na Tabela 13, as espécies mais abundantes foram, em ordem de abundância, *Paraglomus oculum*>*Glomus* SP>*Glomus* sp3>*Glomus*

intrarradices>*Diversispora spurca*. Observe-se que as mesmas espécies ocorrem em maior abundância que no ecossistema natural.

Algumas das espécies identificadas na Figura 22, a seguir.

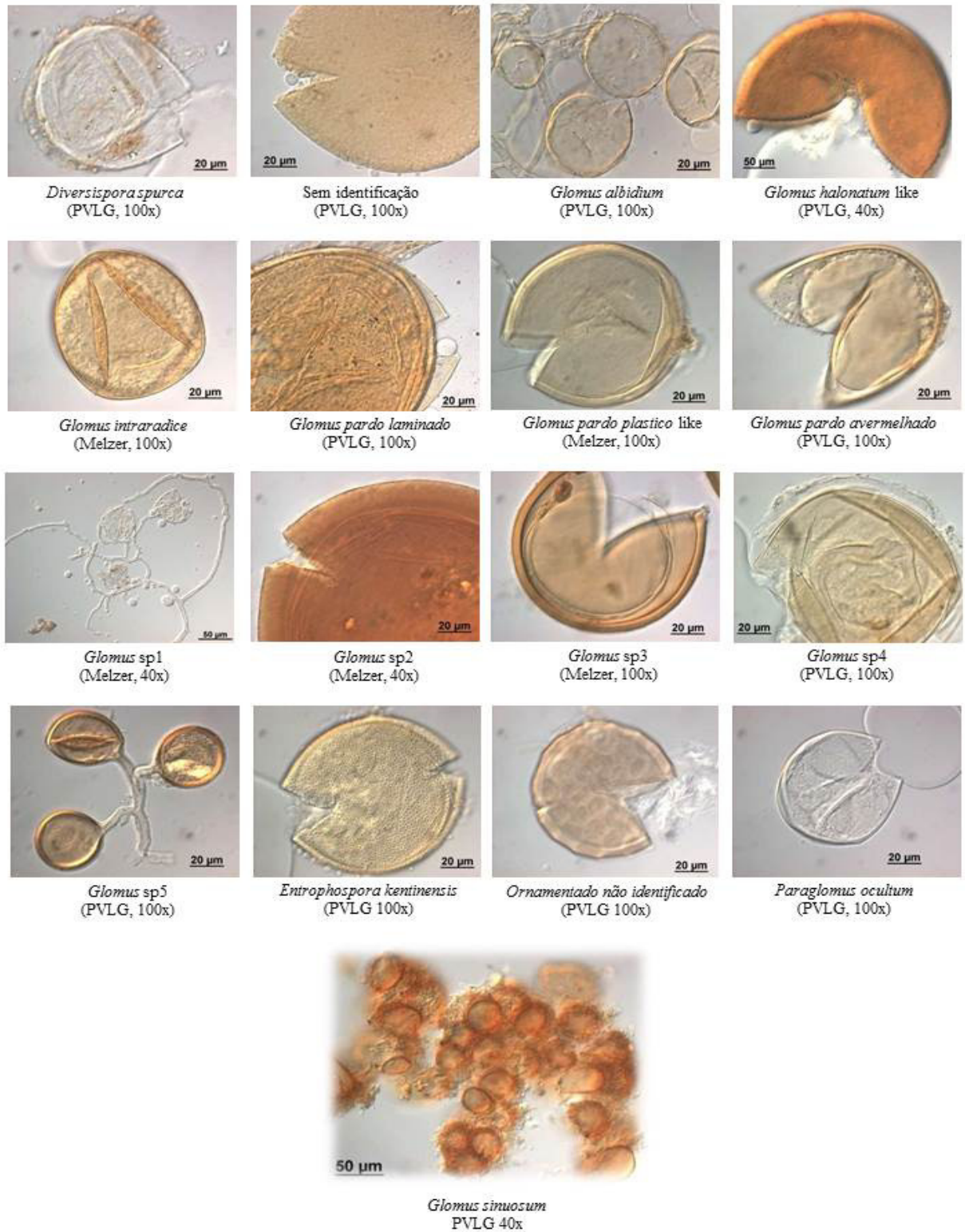


Figura 22. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificados no ecossistema contaminado.

Similares resultados foram observados por Del Val et al. (1999) ao estudar a ocorrência de populações de FMAs em solos contaminados com metais pesados.

Como constatado nos resultados (Figura 22), os FMAs tem ocorrência abundante em solos contaminados por metais pesados (Gaur e Adholeya, 2004; Silva et al., 2005; Stürmer e Siqueira, 2006) indicando que algumas espécies desses fungos evoluíram condicionalmente para tolerar a presença de metais (MP-Tolerância), e este fator, pode desempenhar um papel fundamental na fitorremediação do sítio contaminado (Del Val et al., 1999; Miransari, 2011).

Nesta área que é um ecossistema sob efeitos de resíduos industriais, poderam ser observadas algumas espécies de FMAs que são predominantes em número de esporos como é *Sclerocystis sinuosa*, que está presente em todas as amostras analisadas. Similar ao que acontece com *Paraglomus occultum*, que é a espécie mais abundante, por tanto, a espécie que ao parecer é a mais tolerante na área. A presença destes fungos, nativos, na área amostrada, pelo fato de se encontrar contaminada com elevados teores de Pb, Zn, e Co, evidencia a existência de mecanismos adaptativos a tais condições (Del Val et al., 1999). Em estudos realizados por Malcová et al. (2003) numa área contaminada com elevados teores de Mn com espécies do gênero *Glomus* e isolados de uma área contaminada, os resultados indicaram que o isolado proveniente da área contaminada e mantido num substrato contaminado, resistiu as diferentes doses usadas na pesquisa. Observando-se nas espécies pouco tolerantes ao Mn, que o índice de colonização diminuía até um 90%.

Outros estudos similares a este, com isolados provenientes de áreas contaminadas com Zn e Cu, demonstraram que esses simbiontes apresentavam certa especialização para acumular Cu e Zn e biodisponibilizá-lo para a planta (Miransari, 2011).

Outros estudos têm demonstrado que ecótipos de fungos micorrízicos procedentes de locais contaminados com metais pesados apresentam mais tolerância a esses metais do que as estirpes de solos não contaminados (Galli et al., 1994; Hetrick et al., 1994; Leyval et al., 1995; Solís-Domínguez et al., 2011; Carrasco et al., 2011). No entanto, a relação dos FMAs com os mecanismos de tolerância (metais pesados-tolerância) são divergentes. Alguns autores indicam que sob o efeito de micorrizas, plantas em solos contaminados são capazes de acumular mais metais nos tecidos, tolerando-o até em níveis que resultam tóxicos para elas (Weissenhorn e Leyval, 1995; Punamiya et al., 2010). Entretanto, outros pesquisadores acharam valores reduzidos de metais nos tecidos vegetais de plantas micorrizadas (Heggo et al., 1990; Díaz et al., 1996). Na literatura especializada, são achadas publicações em ambos os sentidos. O que mostra a diversidade de respostas e roles dos FMAs, evidenciando a necessidade de outros estudos sobre os mecanismos de tolerância envolvidos.

Segundo trabalho de Hildenbrandt et al. (2007), em um estudo para avaliação de tolerância (FMA-planta-metais pesados), o isolamento mais promissor foi o *Glomus intraradices*, sendo as estirpes: Br1 e Sy167. Br1 uma espécie indígena de solos contaminados e a de maior eficácia, constatando a importância das linhagens indígenas para esses fins, já que são mais adaptados aos metais pesados (Hildebrandt et al., 1999; Kaldorf et al., 1999).

5. CONCLUSÕES

O ecossistema se encontra contaminado com teores que superam os valores até 5 vezes superior aos maiores valores de referências do CONAMA (2009). Sendo Pb, Zn e Co os elementos traços que estão mais concentrados.

Os mapas de distribuição geoespacial dos metais pesados permitem compreender a distribuição de cada metal pesado no solo, evidenciando que existem zonas de maior acumulação e outras de maior dispersão.

A partir do estudo da contaminação na comunidade microbiana, mediante a análise dos bioindicadores, foi determinado que os contaminantes exercem um impacto negativo na comunidade microbiana, havendo perdas do carbono orgânico no solo

O impacto da contaminação estimado através de bioindicadores de qualidade do solo precisa ser mais estudado devido aos resultados alcançados que mostraram os efeitos dos metais pesados sobre a comunidade microbiana

As espécies de maior abundância na área continuam sendo *Cynodon nlemfuensis* e *Cyperus gigantus*, que são capazes de acumular elevados teores de metais pesados.

Mediante o crescimento de *Brachiaria decumbens* num sistema de microcosmo foi possível isolar 66 colônias puras, das quais 78,78% formaram películas características para diazotróficas e destas, 25 estirpes resultaram promissoras para outros estudos por apresentar os maiores resultados de ARA, totalizando 37,87% do total.

A diversidade de FMAs mais abundantes foram: *Paraglomus oculum*>*Glomus sp*>*Glomus sp3*>*Glomus intrarradices*>*Diversispora spurca*.

A existência de varios gêneros de FMAs e de bactérias dizotróficas que constituem um componente funcional importante dos sistemas solo-planta, é fundamental, para uma produtividade sustentável e são um recurso potencialmente a ser aprofundado em próximos estudos, podendo ser usados conjuntamente com as gramíneas em estratégias de recuperação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, L.K.; ROBSON, A.D. The effect of root density inoculum placement and infectivity of inoculum on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, v.97, p.285-299, 1984.

ADRIANO, D.C. **Trace Elements in Terrestrial Environments. Biogeochemistry, Bioavailability and Risk of Metals.** Second Edition. (Ed). Springer-Verlag, New York, 2001. p.2001-867.

ADRIANO, D.C. **Trace elements in the terrestrial environment.** (Ed). Springer-Verlag, New York, 1986. 533p.

ALLEN, E.B.; ALLEN, M.F.; HELM, D.J.; TRAPPE, J.M.; MOLINA, R.; RINCON, E. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. **Plant Soil**, v.170, p.47-62, 1995.

ALLEN, M.F. **The ecology of mycorrhizae.** (Ed). Cambridge University Press, Cambridge, 1991. 200p.

ALLEN, M.F.; MOORE, T.S.Jr. & CHRISTENSEN, M. Phytohormone changes in *Boteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of giberellin- like substances and abscisic acid in the host plant. **Canadian Journal of Botany**, v.60, p 468-471, 1982.

ALLEONI, L.R.F.; IGLESIAS, C.S.M.; MELLO, S.C.M.; CAMARGO, O.A.; CASAGRANDE, J.C.; LAVORENTI, N.A. Atributos do solo relacionados à adsorção de cádmio e cobre em solos tropicais. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v.27, n.04, p.729-737, 2005.

ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils.** Second edition. (Ed). The University of Reading, UK., 1995. 362p. 1995

ALOUI, A.; RECORBET, G.; ROBERT, F.; SCHOEFS, B.; BERTRAND, M.; HENRY, C. Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits shoot proteome changes that are modified during cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula*. **BMC Plant Biol.**, v.11, n.75, 2011.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; LÓPEZ, Y.P.; FEBLES, J.M.G.; MAGALHÃES, M.O.L.; GUEDES, J.N.; ZOFFOLI, H.J.O. Valores de metais pesados en suelos de la provincia de la Habana en condiciones naturales. In: Congreso Venezolano de Ciencias del Suelo, **Anais...** Venezuela, 2011.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; VELLOSO, A.C.X.; COSTA, L.M.; OLIVEIRA, C. Formas químicas de zinco e sua adsorção por plantas de milho cultivadas em solo tratado com resíduos siderúrgico. **Rev. Bras Ci. Solo**, Campinas, v.18, n.313- 320, 1994.

ANDERSON, T.H., DOMSCH, K.H. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. **Soil Biology & Biochemistry**, v.42, p.2039-2043, 2010.

ANDRADE, S.A.L.; JORGE, R.A.; SILVEIRA, A.P.D. Cadmium effect on the association of jack bean (*Canavalia eniformis*) and arbuscular mycorrhizal fungi. **Sci Agric.**, v.62, p.389-394, 2005.

ANJUM, N.A.; PEREIRA, M.E.; AHMAD, I.; DUARTE, A.C.; UMAR, S.; KHAN, N.A. Phytotechnologies: Remediation of Environmental Contaminants October 23, 2012 CRC Press/Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL (USA), 2012, 617p. DOI: 10.1201/b12954-1

ARNON, D. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, n.1, 1-15, 1949.

ATLAS, R.; BARTHA, R. **Ecología microbiana y Microbiología ambiental, Capítulo 9. Los microorganismos en su hábitat naturales**, Edición española, 2002, 370p.

AUDET P, CHAREST C. Effects of AM colonization on “wild tobacco” plants grown in zinc-contaminated soil. **Mycorrhiza**, v.16, p.277-283, 2006.

AUGÉ, R. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. **Canadian Journal of Soil Science**, v.84, p.373-381, 2004.

AUGÉ, R.M. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, v.11, n.3-42, 2001.

AUGÉ, R.M.; SCHECKEL, K.A.; WAMPLE, R.L. Greater leaf conductance of well-watered VA mycorrhizal rose plants is not related to phosphorus nutrition. **New Phytol.**, v.103, p.107-116, 1986.

AUGÉ, R.M.; STODOLA, A.J.; BROWN, M.S.; BETHLENFALVAY, G.J. Stomatal response of mycorrhizal cowpea and soybean to shortterm osmotic stress. **New Phytol.**, v.120, p.117-125, 1992.

AUGÉ, R.M.; SCHECKEL, K.A.; WAMPLE, R.L. Leaf water and carbohydrate status of VA mycorrhizal rose exposed to water deficit stress. **Plant Soil**, v.99, p.291-302, 1987.

AZEVEDO, M.L., FERRACCIÚ, L.R.; GUIMARAES, L.R. Biosolids and heavy metals in soils. **Sci. Agric.**, 60, 793-806. 2003.

BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D. Y DÖBEREINER, J.. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E. & CARVALHO, J.G. (Eds.) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, SBCS/UFLA/DCS, p 621-666, 1999.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 77, n.3, 2005.

BAREA, J.M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.810-813, 1982.

BARROS, Y.J.; MELO, KLAUS, V.F.; SAUTTER, D.; BUSCHLE, B.; OLIVEIRA E. B.; AZEVEDO, J.C.R.; SOUZA, L.C.P.; KUMMER, L. Indicadores de qualidade de solos de área de mineração e metalurgia de chumbo: II - Mesofauna e plantas. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v.34, n.4, p.1413-1426, 2010

BASKARAN, M., G. H. HONG, P. H. SANTSCHL. Radionuclide analysis of seawater. In: O. Wurl. (ed.) **Practical guidelines for the analysis of seawater**. CRC Press, 2009, p 259-304. Doi:10.1201/9781420073072.ch13.

BECERRIL, J. M.; BARRUTIA, O.; HERNÁNDEZ-ALLICA, O.; GARCÍA-PLAZAOLA, J.; HERNÁNDEZ, A.; GARBISU, C. **Fitorremediación y Biorremediación**: Nuevas tecnologías biológicas para la eliminación de los contaminantes del suelo. Ciencia y medio ambiente. II Jornadas Científicas. CCMA-CSIC, p145-152, 2002.

BERAZAÍN, R. Estudios de plantas acumuladoras e hiperacumuladoras de níquel en las serpentininas del Caribe. **Rev. Jardín Botánico Nacional**, v.20, p.17-30, 1999.

BERBARA, R.L.L.; SOUZA, F.A.; FONSECA, H.M.A.C. Fungos micorrízicos arbusculares: Muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.53-88.

BERNIER, J.; ATLIN, G. N.; SERRAJ, R.; KUMAR, A. Y SPANER, D. Breeding upland rice for drought resistance. **J. Sci. Food Agric.**, v.88, p.927-939, 2008.

BINGHAM, F.T.; MITCHELL, G.A.; PAGE, A.L. Cadmium availability rice in sludge amended soils under "flood" and "nonflood" culture. **Journal of Environ. Quality**, Madison, v.50, p.715-718, 1976.

BURLEIGH, S.H.; CAVAGNARO, T.; JAKOBSEN, I. Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. **J. Exp. Bot.**, v.53, p.1593-601, 2002.

BURZYŃSKI, M.; KŁOBUS, G. Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. **Photosynthetica**. v.42, n.2, p.505-510. 2004.

CAMPBELL, P. G. C. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In: TESSIER, D.; TURNER, R. (Eds.). **Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems**. A. Wiley, New York, 1995, p45-97

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J. O.; VALE, F.R.; CURI, N. Limitação nutricional e efeito do pré-cultivo do solo com *Brachiaria decumbens* e da inoculação com *Glomus etunicatum* no crescimento de mudas de espécies arbóreas em solo degradado. *Ciência e Prática*, Lavras, v.19, n.3, p.281-288, 1995.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solos com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, p.1443-1452, 2001.

CARNEIRO, R.F.V.; MARTINS, M.A.; FREITAS, M.S.M.; DETMANN, E.; VÁSQUEZ, H.M. Inoculação micorrízica arbuscular e doses de fósforo na produção do capim-andropogon, em substrato não estéril. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, Recife v.2, n.3, p.212-218, 2007.

CARRASCO, H.V; MORENO, P.J; ESPINOSA, H.V; ALMARAZ, J. S; QUINTERO, L.R; TORRES, M.A. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas*, v.1, n.4, p.567-577, 2011.

CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, V.F. Respostas fisiológicas em mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e submetidas a estresse hídrico. *Acta Botanica Brasilica*, v.15, n.3, p.379–390, 2001.

CAVALCANTE, V.A. & DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*, v.108, p.23-31, 1988.

CENTRO DE DESAROLLO AGRARIO Y RURAL (CEDAR) Boletín científico por un desarrollo local sostenible. San José de las Lajas, Mayabeque, 2004, 10p.

CHAUDRI, A.M., ALLAIN, C.M.G., BADAWAY, S.H., ADAMS, M.L., MCGRATH, S.P., CHAMBERS, B.1.. Cadmium content of wheat grain from a long-term field experiment with sewage sludge. *J. Environ. Qual.*, v.30, 1575-1580, 2001

CHEN, B.D.; LI, X.L.; TAO, H.Q.; CHRISTIE, P; WONG, M.H. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere*, v.50, p.839-845, 2003.

CHERN, E.C.; TSAI, D.W.; OGUNSEITAN, O.A. Deposition of glomalin related soil protein and sequestered toxic metals into watersheds. *Environ. Sci. Technol.*, v.41, n.10, p.3566-72, 2007.

CHETTRI, M.K., C.M. COOK, E. VARDAKA, T. SAWIDES AND T. LANARAS: The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens: *Cladonia convolute* and *Cladonia rangiformis*. *Environ. Exp. Bot.*, v.39, p.1-10, 1998.

CONSELHO NACIONAL DE MEDIO AMBIENTE - CONAMA. Critérios e valores orientadores de qualidade do solo. (No. 420/28/2009) Ministerio de Medio Ambiente. 2009, disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/index.cfm>. Acesso em: outubro de 2012.

CORNEJO, P.; PÉREZ-TIENDA, J.; MEIER, S.; VALDERAS, A.; BORIE, F.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscularmycorrhizal fungi in Cu-polluted environments, *Soil Biology & Biochemistry*, v.57, p.925-928, 2013.

COSTA, N.L.; MAGALHÃES, J.A.; PEREIRA, R.G.A.; TOWNSEND, C.R.; OLIVEIRA, J.R.C. Considerações sobre o manejo de pastagens na Amazônia Ocidental. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, Brasília, v.13, n.40, p.37-55, 2007.

CUENCA, G.; ANDRADE, Z.; ESCALANTE, G. Diversity of glomalen spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v.30, n.6, p.711-719, 1998.

DANNEBERG, G.; LATUS, C.; ZIMMER, W.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDERPOETSCH, H.J.; BOTHE, H. Influence of vesicular arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *J Plant Physiol.*, v.141, p.33-39, 1992.

DEL VAL, C.; BAREA, J.M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Populations in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.2, p.718-723, 1999.

DELL'AMICO, J.; TORRECILLAS, A.; RODRÍGUEZ, P.; MORTE, A.; SÁNCHEZ-BLANCO, M.J. Responses of tomato plants associated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* during drought and recovery. *Journal of Agricultural Science*, v.138, p.387-393, 2002

DIAZ, G.; AZCÓN-AGUILAR, C.; HONRUBIA, M. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cystisoides*. *Plant Soil*, v.180, p.241-249, 1996.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. *Ci. Cult.*, v.44, p.310-313, 1992.

DÖBEREINER, J. Speciation of dissolved copper and nickel in South San Francisco Bay: a multi method approach. *Analytica Chimica Acta*, v.284, p.547-571, 1980.

DÖBEREINER, J. V. L. D. BALDANI Y J. L. BALDANI. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas. MAARA-EMBRAPA-CNPAB. Brasilia, Brazil. 1995. 60p.

EGREJA FILHO, F.B.. Avaliação da ocorrência e distribuição dos elementos-traço na compostagem de lixo domiciliar urbano. Viçosa. 1993. 176p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa. 1993

EMBRAPA/CNPS. Manual de métodos de análise de solo. 2a edição, Rio de Janeiro, 1997. 212p.

ESSINGTON, M.E. Soil and water chemistry: an integrative approach. Boca Raton, CRC Press, 2004. 534p

EVANS, L.J. Chemistry of metal retention by soils. *Environmental Science & Thecnology* v.23, p.1046-1056, 1989.

EVANS, L.J.; SPIERS, G.A.; ZHAO, G.; Chemical aspects of heavy metal solubility with reference to sewage sludge amended soils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* v.59, p.291-302, 1995.

FABER, B.A.; ZASOSKI, R.J.; MUNNS, D.N.; SHACKEL, K. A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. *Canadian Journal of Botany*, v.69, p.87-94, 1991.

FAGIOLI, M.; RODRIGUES, T.D.J.; ALMEIDA, A.R.P.; ALVES, P.L.C.A. Efeito inibitório da *Brachiaria decumbens* STAPF. PRAIN. e *B. brizantha* (HOCHST ex A. RICH.) STAPF. cv. marandu sobre a germinação e vigor de sementes de guandu (*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.). *B. Ind. An.*, v.57, n.2, p.129-137, 2000.

FEBLES, J. M. Integración de Métodos para Evaluar la Erosión de los Suelos en las Regiones Cársticas de Cuba. 2006. 100f. Tese (Doctorado em Ciências), Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana, 2006.

FEBLES, J. M., VEGA, M. B, TOLÓN, A., LASTRA, X. Assessment of Soil Erosion in Karst Regions of Havana, Cuba. *Land Degradation and Development*, v.23, n.5, p.465-474, 2011.

FILGUEIRAS, A.V.; LAVILLA, I. & BENDICHO, C. Chemical sequential extraction form metal partitioning in environmental solid samples. *J. Environ. Monitoring*, v.4, p.823-857, 2004.

FITTER AH. Darkness visible: reflections on underground ecology. *J Ecol.*, v.93, p.231-243, 2005.

FURRAZOLA, E.; TORRES-ARIAS, Y.; FERRER, R.I.; HERRERA, R.A.; BERBARA. R.L.L.; GOTO, B.T. *Glomus crenatum* (Glomeromycetes), a new ornamented species from Cuba. *Mycotaxon*, v.116, p.143–149,2011. Doi: 10.5248/116.143.

GADD, G.M.. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, v.124, p.25-60, 1993.

GADDE, R.R.; LAITINEN, H.A. Studies of heavy metal adsorption by hydrous iron and manganese oxides. *Analytical Chemistry*, Washington, v.46, p.2022-6, 1974.

GALLI, U.; SCHUEPP, H.; BRUNOLD, C. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plantarum*, v.92, p.364-368, 1994.

GALLI, U.; SCHÜEPP, H.; BRUNOLD, C. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plantarum*, v.926, p.364–368, 1994.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; BARROS, N.F.; VIANA, A.P.; SANTOS, G.A. Alterações na biomassa e na atividade microbiana da serapilheira e do solo, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa por plantações de eucalipto, em diferentes sítios da região Sudeste do Brasil. *R. Bras. Ci. Solo*, v.32, p.1489-1499, 2008.

GARCIA-GARRIDO, J.M.; OCAMPO, J.A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exper. Bot.*, v.53, p.1377-1386, 2002.

GATTAI, G. S., PEREIRA, S. V., COSTA, C. M. C., LIMA, C. E. P., MAIA, L. C. Microbial activity, arbuscular mycorrhizal fungi and inoculation of woody plants in lead contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.42, n.3, p.859-867, 2011. doi:10.1590/S1517-83822011000300004

GAUR A., ADHOLEYA A. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Sci.*, v.86, p.528-534, 2004.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from the soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc.*, v.46, p.235-244, 1963

GÖHRE V., PASZKOWSKI U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, v.223, p.1115–1122, 2006.

GOICOECHEA, N.; DOLÉZAL, K.; ANTOLÍN, M. C; STRAND, M.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Influence of mycorrhizae and *Rhizobium* on cytokinin content in drought stressed alfalfa. *Journal of Experimental Botany*, v.46, p.1543-1549, 1995.

GOLDBERG, D.E., BARTON, A.M. Patterns and consequences of interspecific competition in natural communities: a review of field experiments with plants. *Am. Nat.*, v.139, p.771-801, 1992.

GÓMEZ, L.A.J.; MORALES, A.V.; DUEÑAS, G.V.; DANTIN, J.M.M.; CHÁVEZ, N.G.; TORRES, M.L. Contenido de Carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana em suelos de la Habana. *Agronomía Mesoamericana*, v.23, n.1, 179-187, 2012.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, C.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Poll.* 130, p.317-323, 2004.

GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; MELVILLE, L.H.; FERROL, N.; LOTT, J.N.A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; PETERSON, R.L. Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.54, p.103-110, 2008.

GUZMÁN, A.R. Impacto de los desechos de la Empresa Cerámica Blanca "Adalberto Vidal" sobre un agroecosistema del municipio San José de las Lajas. 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Agricultura Sustentável). Universidad Agraria de la Habana, La Habana, 2006.

GUZMÁN, M. A. R., SÁNCHEZ, E. S.; GARCÍA N. E. Degradación de un suelo por efecto de residuales de la Empresa Cerámica del municipio San José de las Lajas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, v.17, n.3, p.45-51, 2008.

HARDIE, K. The effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytologist*, v.101, p.677-684, 1985.

HARDT, R. Aspectos da morfologia cárstica da Serra do Calcário. 2004, 98f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2004.

HARTNETT, D. C., R. J. SAMANUS, L. E. FISCHER, AND B. A. D. HETRICK. Plant demographic responses to mycorrhizal symbiosis in tallgrass prairie. *Oecologia*, v.99, p.21–26, 1994.

HE, H.; ZHITING, X.; MINJING, L.; SHUANGLIAN, X.; SHENGLAN, L.; MBA, F.O. Effect of cadmium and herbicides on the growth, chlorophyll and soluble sugar content in rice seedlings. *Wuh. Univers. J. Nat. Sci.*, v.11, p.742-748, 2006.

HE, Z. L.; YANG, X. E.; STOFFELLA, P. J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v.19, n.2-3, p.125–140, 2005

HEGGO, A.; ANGLE, A.H., CHANEY, R.L. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biol. Biochem.*, v.22, p.865-869, 1990.

HERNÁNDEZ, A.; CABRERA, A.; ASCANIO, M.; MORALES, M.; RIVERO, L.; MARTÍN, N. J.; BAISRE, J.; FROMETA, E. Claves para la nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Problemas de actualidad en la clasificación de suelos. Énfasis en Cuba. Editorial Universidad Veracruzana, México, 2004. 140 p.

HETRICK, D.B.A., G. WILSON Y D.A. FIGGE. The Influence of mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation in heavy metal mine spoil. *Environ. Pollut.*, v.86, p.171-179, 1994.

HILDEBRANDT U, OUZIAD F, MARNER FJ, BOTHE H. The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.254, p.258-267, 2006.

HILDEBRANDT, U.; KALDORF, M., BOTHE, H. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Plant Physiol.*, v.154, p.709-717, 1999.

HILDEBRANDT, U; REGVAR, M; BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, v.68, n.1, 139-146, 2007.

HOODA, P.S., B.J. ALLOWAY. Effects of time and temperature on the bioavailability of Cd and Pb from sludge-amended soils. *J. Soil Sci.*, v.44, p.97–110, 1993.

INVAM - International culture collection of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. Disponível em: <<http://invam.caf.wvu.edu>>. Acesso em: 8 de fev. de 2012.

ISO 11466. INTERNATIONAL STANDARD: Soil quality–Extraction of trace elements soluble in aqua regia, 1995.

IYAKA, Y. A. AND KAKULU, S.E. Heavy Metal Concentrations in Top Agricultural Soils around Ceramic and Pharmaceutical Industrial Sites in Niger State, Nigeria. *R. J. of Environ. Earth Sci.*, v.4, n.2, p.171-176, 2012.

IYENGAR, S.S., D.C. MARTENS AND W.P. MILLER, Distribution and plant availability of soil zinc fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.45, p.735-739, 1981.

JAMAL, A.; AYUB, N.; USMAN, M. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soybean and lentil. *International Journal Phytoremediation*, v.4, n.3, p.205-221, 2002.

JANOUSKOVA, M.; PAVLIKOVA, D.; MACEK, T.; VOSATKÁ, M. Arbuscular mycorrhiza decreases cadmium phytoextraction by transgenic tobacco with inserted metallothionein. *Plant Soil*, v.272, p.29-40, 2005.

JONER, E.J.; BRIONES, R.; LEYVAL, C. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil*, v.226, p.227-234, 2000.

KABATA - PENDIAS, A., PENDIAS, H. Trace Elements in Soils and Plants. Third Edition. CRC Press, Boca Raton, USA, v.49, p.45-66, 2001. 365p

KALDORF, M.; KUHN, A.J.; SCHRODER, W.H.; HILDEBRANDT, U.; BOTHE, H. Selective Element Deposits in Maize Colonized by a Heavy Metal Tolerance Conferring Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Journal of Plant Physiology*, v.154, p.718-728, 1999. DOI: 10.1016/S0176-1617(99)80250-8.

KAMOSHITA, A.; BABU, R.C.; BOOPATHI, N.M.; FUKAI, S. Phenotypic and genotypic analysis of drought-resistance traits for development of rice cultivars adapted to rainfed environments. *Field Crops Res.*, vol.109, p.1-23, 2008.

KAO, P. H., HUANG, CH. CH., HSEU, Z. Y. Response of microbial activities to heavy metals in a neutral loamy soil treated with biosolid. *Chemosphere*, v.64, p.63-70, 2006.

KHAN A.G., KUEK C., CHAUDHRY T.M., KHOO C.S. Y HAYES W.J. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, v.41, p.197-207, 2000.

KIEKENS, L., COTTENIE, A., VAN LANDSCHOOT, G. Chemical activity and biological effect of sludge borne heavy metals and inorganic metal salts added to soils. *Plant Soil*, v.79, p.89-99, 1984.

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

KOTHARI, S.; MARSCHNER, H.; ROMHELD, V. Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in calcareous soil. *Plant and Soil*, v.131, p.177-185, 1991.

KRÜGER, M.; KRÜGER, C.; WALKER, C.; STOCKINGER, H.; SCHÜBLER, A. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol.*, v.193, n.4, p.970-84, 2012.

KUBICOVA, E.; MOORE, J.L.; OWNLEW, B.H.; MULLEN, M.D.; AUGÉ, R.M. Mycorrhizal impact on osmotic adjustment in *Ocimum basilicum* during a lethal drying episode. J. Plant Physiol, v.158, p.1227-1230, 2001.

LABRADA, R.F.; LA O, Y.; GESHTOVT, N Metodología sobre malas hierbas. Parte III. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. MINAG. La Habana, 1979, 10p

LAMBAIS, M.R.; RÍOS-RUIZ, W.F.; ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol., v.160, p.421-428, 2003.

LASAT, M. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. J. Hazard Subst Res., v.2, n.1-25, 2000.

LAZCANO, L.J. Recuperación natural de la flora serpentinícola en “lomas de Galindo”: una alternativa de conservación. Revista del Jardín Botánico Nacional, v.20, p31-39, 1999.

LEBOURG, A., STERCKEMAN, T., CIESIELSKI, H. AND PROIX, N. 1996. Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol. Agronomie, v.16, p.201-215, 1996.

LEUNG, H.M.; YE, Z.H.; WONG, M.H. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (As hyperaccumulator) in As-contaminated soils. Environ. Pollut., v.139, p.1–8, 2006.

LEYVAL, C.; SINGH, B.R.Y.; JANER, E.J. Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. Water. Air Soil. Pollut., v.83, p.203-216, 1995.

LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: Physiological, ecological and applied aspects. Mycorrhiza. v.7, p.139–153, 1997.

LI, X.D.; POON, C.S.; SUN, H.; LO, I.M.C.; KIRK, D.W. Heavy metal speciation and leaching behaviors in cement based solidified/stabilized waste materials, Journal of Hazardous Materials, v.82, n.20, p.215-230, 2001.

LIAO J.P., LIN X.G., CAO Z.H., SHI Y.Q., WONG M.H. Interactions between Arbuscular Mycorrhizae and Heavy Metals under Sand Culture Experiment. Chemosphere, v.50, p847–853, 2003.

LINS, C.E.L.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.M.T., SAMPAIO, E.V.S. B. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in a copper contaminated soil. Applied Soil Ecology, v.31, p.181-185, 2006.

LIU, S.L.; LOU, Y.M.; DING, K.Q.; LI, H.; WU, L.H.; XING, W.Q.; SONG, J.; CAO, Z.H. Enhanced phytoremediation of benzo[a] pyrene contaminated soil with arbuscular mycorrhizal fungi. Acta Pedol. Sinica., v.41, p.336-342, 2004.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A., FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., v.193, p.265-275, 1951.
- MA, L.Q., TAN, F., HARRIS, W.G. Concentrations and distributions of eleven metals in Florida soils. Journal Environmental Quality, v.26, p.769-775, 1997.
- MAGALHÃES, F.M.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. R. Microbiol., v.15, p.246-252, 1984.
- MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. Revista Brasileira de Biologia, v.39, p.587-596, 1979.
- MAHVI, A.H., NAGHIPOUR, D., VAEZI, F., NAZMARA, S. Teawaste as an adsorbent for heavy metal removal from industrial wastewaters, Am. J. Appl. Sci., v.2, p.372-375, 2005.
- MALCOVÁ R; RYDLOVÁ J; VOSÁTKA M. Metal-free cultivation of *Glomus* sp. BEG 140 isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. Mycorrhiza, v.13, p.151-157, 2003.
- MANOJ, K. J.; PRASANNA, M. Chlorophyll a Fluorescence as a Probe of Heavy Metal Ion Toxicity in Plants. Chlorophyll a Fluorescence. 19: 637-661. 2004
- MARÍN, A.; ALONSO-MARTIRENA, J.I.; ANDRADES, M.; PIZARRO, C. Contenido de metales pesados en suelos de viñedo de la D.O.Ca Rioja. Edafología, v.7, p.351-357, 2000.
- MARKERT, □.; FRIESE, K. 2000.Trace Metals in the Environment.Trace Elements .Their Distribution and Effects in the Environment. (Ed.). B. Markert and K. Friese, v.4, 2000. 582p. ISBN: 978-0-444-50532-3
- MARTÍN, N.J. La morfología del perfil. (Ed.) Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas. 11p. 2000.
- MARTÍN, N.J. Los coloides minerales del suelo. Partes I y II. Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, 2001. 22p.
- MAYEA, S.; M. CARONE; R. NOVO; I. BOADA; E. SILVEIRA; M. SORIA; Y. MORALES, Y.; VALIÑO, A. Microbiología Agropecuaria. Tomo II, Editorial Félix Varela, La Habana, Cuba, 1998. 288p.
- MCBRIDE, M.B. Environmental Chemistry of Soils. Oxford University.Press, New York. 1994, 406p.
- MCBRIDE, M.B., MARTINEZ, C.E., TOPP, E., EVANS, L.Trace metal solubility and speciation in a calcareous soil 18 years after no-till sludge application. Soil Sci., v.165, p.646-656, 2000.
- MELLONI, R.; ABRAHÃO, R.S.; MOREIRA, F.M.S.; NETO, A.E.F. Impacto de resíduo de siderurgia na microbiota do solo e no crescimento de eucalipto. Revista Árvore, v.24, p.309-315, 2000.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.28, p85-93, 2004.

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

MENCH, M.; MARTIN, E.; SOLTA, P. After effects of metlas derived from a highly metalpolluted sludge on maize (*Zea mays* L). *Water, Air and Soil Pollution, Dordrecht*, v.75, p.277-291, 1994.

MILLER R.M. Some occurrences of vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural and disturbed ecosystems of the Red Desert. *Can. J. Bot.*, v.57, p.619-623, 1979.

MIRANSARI, M. Interations between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.89, p.917-930, 2011.

MOBIN, M.; KHAN, N.A. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol.*, v.164, p.601–610, 2007.

MOBIN, M.; KHAN, N.A. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Plant Physiol.*, v.164, n.5, p.601-610, 2007.

MOREIRA, F.M.S., SILVA, K., NOBREGA, R.S. A., CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; LANGE, A., KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; NÓBREGA, R.S.A.; LIMA, A.S. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.80, p.749-761, 2008.
MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2da Edição (Ed.). UFLA, Lavras, Brasil. 2006. 729 p

MOSCATELLI, M. C., TIZIO, A. D., MARIANARI, S., GREGO, S. Microbial indicators related to soil carbon in Mediterranean land uses systems. *Soils and Tillage Research*, v.97, n.1, 51-59, 2007.

MOSTACEDO, B.; FREDERICKSEN, T.S. *Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal*. Proyecto de manejo florestal sostenible BOLFOR, (Ed.) El País. Santa Cruz, Bolivia, 2000, 82p.

MUNKVOLD L, KJØLLER R, VESTBERG M, ROSENDAHL S, JAKOBSEN I. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, v.164, p.357-64, 2004.

NACHTIGALL, G.R.; NOGUEIROL, R.C.; ALLEONI, L.R.F. Extração seqüencial de Mn e Zn em solos em função do pH e adição de cama-de-frango. *Rev. bras. eng. agríc. Ambiente.*, v.13, n.3, p 240-249, 2009.

NAVAS, A.; MACHÍN, J. Spatial distribution of heavy metals and arsenic in soils of Aragón (northeast Spain): controlling factors and environmental implications. *Applied Geochemistry*, v.17, p.961-973, 2002.

NEALSON, K.H.; STAHL, D.A. Microorganisms and biogeochemical cycles: What can we learn from layered microbial communities? In *Geomicrobiology: Interactions Between Microbes and Minerals*. (Ed.) J. F. Banfield and K. H. Nealson. Mineralogical Society of America. v.35, p5-34, 1997.

NEWMAN, E. I.; REDDELL, P. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytologist*, v.106, p.745–751, 1987.

NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, A.S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.28, p269-279, 2004.

NOGUEIRA, M.A.; MAGALHÃES, G.C.; CARDOSO, E.J.B.N. Manganese toxicity in mycorrhizal and phosphorus-fertilized soybean plants. *Journal of Plant Nutrition*, v.27, p.141-156, 2004.

NORMA CUBANA NC-ISO 3696. Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificaciones y método de ensayo. 2004. 12p

OEHL, F.; WIEMKEN, E.A.; SIEVERDING, F. *Glomus aureum*, a new sporocarpic arbuscular mycorrhizal fungal species from European grasslands. *Journal of Applied Botany*, v.77, p111-115, 2003.

ONCEL, I.; KELES, Y.; USTUN, A. S. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environ. Pollut.*, v.107, n.3, p.315-20, 2000.

ONCEL, I.; KELES, Y.; USTUN, A.S. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environmental Pollution*, v.107, p.315-320, 2000.

OUZIAD, F. Charakterisierung der arbuskulären Mykorrhiza Pilz-Flora an ausgewählten Standorten mit molekularbiologischen Methoden. (Ed.) Diplomarbeit. Universität zu Köln, Germany. 1999

OUZIAD, F.; HILDEBRANDT, U.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.*, v.162, p.634-649, 2005.

PAGANO MC, CABELLO MN, SCOTTI MR. Agroforestry in dry forest, Brazil: Mycorrhizal Fungi Potential. In: Kellymore LR (Ed.). Handbook on Agroforestry: Management Practices and Environmental Impact. Nova Science Publishers, New York, p367–388, 2010. ISBN 978-1-60876-359-7

PAWLOWSKA, T. E.; BLASZKOWSKI, J. The Mycorrhizal Status of Plants Colonizing a Calamine Spoil Mound in Southern Poland. *Mycorrhiza*, v.6, n.6, p.499-505, 1996.

PAWLOWSKA, T.E.; CHARVAT, I. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, p.6643-6649, 2004.

PÉREZ, E.D.; P. MARRERO; O. CRUZ; E. FERNÁNDEZ; L. PEÑA. La producción agropecuaria y el cálculo de las necesidades alimentarias en el municipio San José de las Lajas, XIV Forum Ciencia y Técnica, La Habana, Cuba. 2002

PÉREZ, Y.L., AMARAL SOBRINHO, N.M., BALBÍN, M.I.A., VALDÉS, R.C., MAGALHÃES, M.O.L. Contenido de elementos metálicos en suelos característicos del municipio San José de las Lajas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, v.21, n.1, 2012.

PERIS, M.; RECATALÁ, L.; MICÓ, C., SÁNCHEZ, R.; SÁNCHEZ, J. Increasing the knowledge of heavy metal contents and sources in agricultural soils of the European Mediterranean region. *Water Air Soil Pollution*, v.192, p.25-37, 2008.

PERIS, M.M. Estudio de metales en suelos bajo cultivos hortícolas de la provincia de Castellón. 2006, 327f. Tese (Doutorado). Universitat de Valencia. CIDE, 2006.

PICKERING, W.F. Metal ion speciation. Soils and sediments. Review. *Ore Geol.*, v.1, p.83-146, 1986.

PORCEL, R., BAREA, J.M.; RUIZ-LOZANO, J.M. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytol.*, v.157, p.135- 143, 2003.

PORCEL, R.; AZCÓN, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Evaluation of the role of genes encoding for D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. *Physiol Mol Plant Pathol.*, vol. 65, p. 211-221, 2004.

PORCEL, R.; RUIZ- LOZANO, J.M. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J. Exp. Bot.*, v.55, p.1743-1750, 2004.

PRADO JUNIOR, J.P.Q. Bactérias fixadoras de nitrogênio em cana-de-açúcar: crescimento em ambiente com altas concentrações de Cd, Cr, Ni e Pb "in situ" e "in vitro". 2012, 63f. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde-21092012-131247/>>. Acesso em: 02 de fev. 2013.

PUNAMIYA P., DATTA R., SARKAR D., BARBER S., PATEL M. Y DAS P. 2010. Symbiotic role of *Glomus mosseae* in lead phytoextraction using vetiver grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)]. J. Hazard. Mat., v.177, p.465-474, 2010.

QUEVEDO, N. Identificación de especies botánicas que se desarrollan en un agroecosistema contaminado con elementos metálicos y sus potencialidades en la fitorremediación. 2006, 80f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Agricultura Sustentável), La Habana. Universidad Agraria de la Habana, 2006.

RAKSASATAYA, M.; LANGDOM, A.G. & KIM, N.D. Assessment of the extent of Pb redistribution during sequential extraction by two different methods. Anal. Chim. Acta, v.332, p.1-14, 1996.

RAURET, G., LÓPEZ-SÁNCHEZ, J.F.; SAHUQUILLO, A.; BARAHONA, E.; LACHICA, M.; URE, A.M.; DAVISON, C.M.; GOMEZ, A.; LÜCK, D.; BACON, J.; YLI-HALLA, M.; MUNTAU, H.; QUEVAUVILLER, P.H. Application of a modified BCR sequential extraction (three-step) procedure for the determination of extractable trace metal contents in sewage sludge amended soil reference material (CRM 483), complemented by a three-year stability study of acetic acid and EDTA extractable metal content. J. Environ. Monit., v.2, p.228-233, 2000.

READ, D.J. Mycorrhizas in ecosystems. Experientia, v.47, p.376-391, 1991.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. Science, v.289, n.5483, p.1920-1921, 2000. DOI:10.1126/science.289.5486.1920

REGVAR, M.; VOGEL-MIKUS, K.; KUGONI, N.; TURK, B.; BATI, F. Vegetational and mycorrhizal successions at a metal polluted sitedindications for the direction of phytostabilisation?. Environmental Pollution, v.144, p.976-984, 2006.

REIS, V.M; BALDANI, V.L.D; BALDANI, J.I. Ecologia e Isolamento de bactérias diazotróficas. Cap.10, p.257-280. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap10ID-RgZGnAKxOz.pdf>>, acesso em: 13 de janeiro de 2013.

RIVERA-BECERRIL; F, VAN TUINEN, D; MARTIN-LAURENT, F. Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. MYCORRHIZA, v.16, n.1, p.51-60, 2005.

RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.41, n.2, p.275-284, 2006.

ROSS, S.M. Retention, transformation and mobility of toxic metals in soils. In: Toxic metals in soil-plant systems (Ed.) S.M. Ross, John Wiley & Sons, Chichester. 1995, p.63-152.

RUFYKIRI, G., THIRY, Y., DECLERCK, S., 2003. Contribution of hyphae and roots to uranium uptake and translocation by arbuscular mycorrhizal carrot roots under root-organ culture conditions. New Phytologist, v.158, n.2, p.391-399, 2003.

RUFYIKIRI, G.; DECLERCK, S.; DUFEY, J.E.; DELVAUX, B. Arbuscular mycorrhizal fungi might all eviate aluminium toxicity in banana plants. *New Phytologist*, v.148, n.2, p.343-352, 2000.

RUIZ SANCHEZ, M.; PÉREZ, R.P.; II LLANO, B.V.; HERNÁNDEZ, Y.M.; OLIVERO, N.C.; RUIZ-LOZANO, J.M. La simbiosis micorrizica arbuscular en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) sometidas a estrés hídrico: Parte I. Mejora la respuesta fisiológica. *cultrop*, La Habana, Cultivos Tropicales, v.33, n.4, p.47-52, 2012. ISSN 1819-4087.

RUIZ-LOZANO J.M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress: new perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, v.13, p.309-317, 2003.

RUIZ-LOZANO J.M.; AZCÓN, R. 1996. Mycorrhizal colonization and drought stress exposition as factors affecting nitrate reductase activity in lettuce plants. *Agric Ecosyst Environ.*, v.60, p.175-181.

RUIZ-LOZANO J.M.; AZCÓN, R.; PALMA, J.M. Superoxide dismutase activity in arbuscular micorrhyzal *Lactuca sativa* plants subjected to droughts stress. *New Phytologist*, v.134, p.327-333, 1996.

RUIZ-LOZANO J.M.; COLLADOS, C.; BAREA, J.M.; AZCÓN, R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. *New Phytol.*, v.151, p.493-502, 2001.

RUIZ-LOZANO, J. M.; PORCEL, R. & AROCA, R. Evaluation of the possible participation of drought-induced genes in the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit. In: Varma A, (Ed.). *Mycorrhiza: state of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*, 3 ed. Germany: Springer-Verlag, 2008. p.185-205.

RUIZ-LOZANO, J.M.; AZCÓN, R.; GÓMEZ, M. 1995. Effects of arbuscular mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.456-460, 1995.

RUIZ-LOZANO, J.M.; ROUSSEL, H.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Defense genes are differentially induced by a micorrhyzal fungus and *Rhizobium* sp. in wild-type and symbiosis-defective pea genotypes. *Molecular plant-Microbe Interactions*, v.12, p.976-984, 1999.

SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L.. Bactérias diazotróficas como promotoras do desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. *Enciclopédia Biosfera*, Goiânia, v.8, n15; p.2337, 2012.

SAFIR, G.R.; SIQUEIRA, J.O.; BURTON, T.M. Vesiculararbuscular mycorrhizae in a wastewater-irrigated old field ecosystem in Michigan. *Plant and Soil*, v.121, p.187-196, 1990.

SAGGIN JÚNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O. Avaliação da eficiência simbiótica de fungos endomicorrízicos para o cafeeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.19, n.2, p.221-228, 1995.

SAHUQUILLO, A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J.F.; RUBIO, R.; RAURET, G.; THOMAS, R. P.; DAVIDSON, C. M.; URE, A.. Use of certified reference material for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta*, v.382, p.317-327, 1999.

SÁNCHEZ, S. E. Especies vegetales y microorganismos rizosféricos tolerantes a metales pesados de un ecosistema contaminado. 2008, 78f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Agricultura Sustentável). Universidad Agraria de la Habana. San José de las Lajas, La Habana, 2008.

SANCHEZ-DÍAZ, M. & HONRUBIA, M. Water relations and alleviation of drought in mycorrhizal plants. In: Gianinazzi, S y H Shüepf (Ed.). *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*, Birkhäuser Verlag, Basel. 1994, p.167-178.

SANTOS, F.S.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; MAZUR, N.; GARBISU, C; BARRUTIA, O.; BECERRIL, J.M. Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição de pigmentos fotoprotetores em *Brachiaria decumbens* Stapf submetida à contaminação com Cd e Zn. *Quím. Nova*, São Paulo, v.34, n.1, p16-20, 2011.

SCFI-2006 Norma Mexicana NMX-132-SCFI-2006. Muestreo de Suelos para la Identificación y la Cuantificación de Metales y Metaloides y Manejo de la Muestra. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Diario oficial de la Federación, sept. 2006.

SCHREINER, R.P., MIHARA, K.L.; McDaniels, H.; BETHLENFALVAY, G.J. 1997. Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant Soil.*, v.188, p.199-209.

SCHÜBLER, A & WALKER, C. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Edinburgh and Kew: The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University; 2010, 58p. Disponível em: <http://www.amf-phylogeny.com>. > Acesso em: março de 2012.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res.*, v.105, p.1413-1421, 2001.

SHAKYA, K.; CHETTRI, M.K.; SAWIDIS, T. Impact of Heavy Metals (Copper, Zinc, and Lead) on the Chlorophyll Content of Some Mosses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v54, n.3, p.412-421, 2008.

SHAN, X.Q.; B. CHEN. Evaluation of sequential extraction for speciation of trace metals in model soil containing natural minerals and humic acid. *Anal. Chem.*, v.65, p.802-807, 1993.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, v.17, p.35-52, 2005.

SHIOWATANA, J.; TANTIDANAIB, N.; NOOKABKAEWB, S.; NACAPRICHA, D. A Novel Continuous Flow Sequential Extraction Procedure for Metal Speciation in Solids. *Journal of Environmental Quality*, v.30, p.1195-1205, 2001.

SHUMAN, L.M. Fractionation method for soil microelements. *Soil Sci.*, v.140, p.11-22, 1985.

SIEVERDING, E. Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management, Technical Cooperation Federal Republic of Germany, Eschborn. 1991.

SILVA, G.A.; TRUFEM, S.F.B.; SAGGIN JÚNIOR, O.; MAIA, L.C. Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. *Mycorrhiza*, v.15, p.46-53, 2005.

SILVEIRA, M.L.; ALLEONI, L.R.F.; O'CONNOR, G.A.; CHANG, A.C. Heavy metal sequential extraction methods a modification for tropical soils. *Chemosphere*, v.64, p.1929-1938, 2006.

SMITH, S. R. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environment international*, v.35, n.1, p.142-156, 2009.

SMITH, S.E. & READ, D. *Mycorrhizal symbiosis*. 3 (Ed.). San Diego: Academic Press; 2008, 787p. ISBN. 9780123705266 0123705266

SMITH, S.E.; SMITH, F.A.; JAKOBSEN, I. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth and total P uptake. *New Phytol.*, v.162, p.511-524, 2004.

SMITH, S.E.; SMITH, F.A.; JAKOBSEN, I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology*, Bethesda, v.133, n.1, p.16-20, 2003.

SOLIS-DOMINGUEZ, F.A.; VALENTIN-VARGAS, A.; CHOROVER, J.; MAIER, R.M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial community structure of mesquite grown in acidic lead/zinc mine tailings. *Sci. Total Environ.*, v.409, p.1009-1016, 2011.

SOUZA, F.A.; GOMES, E.A.; VASCONCELOS, M.J.V.; SOUSA, S.M. Micorrizas arbusculares: perspectivas para aumento da eficiência de aquisição de fósforo (P) em Poaceae-gramíneas. In: Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, n.134. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2011. 32p.

SPOSITO, G. *The Chemistry of Soils*. 2 (Ed.). Oxford University Press, N.Y. 2008, 330p.
STOBART, A.K.; GRIFFITH, W.T.; BUKHARI, I.A.; SHERWOOD, R.P. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* 63:293-298, 1985.

STUM, W. & MORGAN, J. *Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. Wiley-Interscience publication: John Wiley and Sons. New York. 1981, 799 p

STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazilian ecosystems. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. & BRUSSAARD, L., eds. *Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems*. Wallingford, CABI-Pub., 2006. p.206-236.

- TONIN, C.; VANDENKOORNHUYSE, P.; JONER, E.J.; STRACZEK, J.; LEYVAL, C. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza*, v.10, p.161-168, 2001.
- TU, Q.; SHAN, X. Q.; NI, Z.M. Evaluation of sequential extraction procedure for the amorphous iron and manganese oxide organics matter in soils. *Science of the total Environment*. v.351, n.2, p.159-165, 1994.
- TURNAU, K. Heavy metals content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes in Southern Poland. *Acta Soci. Bot. Poloniae*, v.67, p.105-113, 1998.
- TURNAU, K.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J. Arbuscular mycorrhiza of *Berkheya coddii* and other Ni-hyperaccumulating members of Asteraceae from ultramafic soils in South Africa. *Mycorrhiza*, v.13, p.185-190, 2003.
- TURNAU, K.; PRZYBYLOWICZ, W.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J. Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas as revealed by proton microscopy and PIXE. *J. Nuclear Instruments*, v.181, p.649-658, 2001.
- URE, A.; QUEVAUVILLER, P.H.; MUNTAU, H.; GRIEPINK, B. Speciation of heavy metals in soils and sediments, an account of improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the Communities. *Intern. J. Environ Anal. Chem.*, v.51, p.135-151, 1993.
- VALDÉS, R.; GUZMÁN, A.; SANCHEZ, S.; GARCIA, E.; GURIDI, F.; CALDERÍN, A. Biorremediación. Metodología para el diagnóstico evaluativo de un sitio agrícola contaminado por metales pesados. XV Congreso Científico INCA, 2006. ISBN: 959-7023-36-9.
- VALLINO, M.; GREPPI, D.; NOVERO, M.; BONFANTE, P.; LUPOTTO, E. Rice root colonization by mycorrhizal and endophytic fungi in aerobic soil. *Ann. Appl. Biol.*, vol. 154, p.195-204, 2009.
- VAN HOEWYK, D.; GARIFULLINA, G.F.; ACKLEY, A.R.; ABDEL-GHANYSE, S.E; MARCUS, M.A.; FAKRA, S. Overexpression of AtCpNifS enhances selenium tolerance and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*; v.139, p.1518-1528, 2005.
- VAREJAO, E.V.V.; BELLATO, C.R.; MELLO, J.W.V.; FONTES, M.P. F. Otimização das condições de pré-redução do As(V) em extratos do método BCR para quantificação de arsênio por HG-AAS. *Rev. Bras. Ciênc.* v.33, n.4, p.875-883, 2009.
- VODNIK, D; GRČMAN, H; MACEK, I; VAN ELTEREN, J.T.; KOVACEVIC, M. The contribution of glomalin related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Sci Total Environ.*, v.392, p.130-136, 2008.
- WANG, F.Y.; LIN, X.G.; RUI, Y. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia*, v.51, n.2, p.99-109, 2007.

WANG, Y-P., SHI, J-Y., LIN, Q., CHEN, X-C CHEN, Y-X. Heavy metal availability and impact on activity of soil microorganisms along a Cu/Zn contamination gradient. *Journal of Environmental Sciences*, v.19, p.848–853, 2007a

WARREN, L.A. Biofilms and metal geochemistry: the relevance of micro-organism-induced geochemical transformations. (Ed.) *Symposia-society for general microbiology*. Cambridge; Cambridge University Press; v65, 2005. 388p

WARREN, L.A., HAACK , E.A. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments, *Earth-Science Reviews*, v.54, n.4, p.261-320, 2001.

WEIERSBYE, I.M.; STRAKE, R.C.J.; PRZYBYLOWICZ, W.J. Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots of the grass, *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v.158, p.335-343, 1999.

WEISSENHORN, I. & LEYVAL, C. Root coloization of maize by a Cd-sensitive and a Cd tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. *Plant Soil*, v.175, p.233-238, 1995.

WEISSENHORN, I.; MENCH. M.; LEYVAL. C. Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhiza in a sewage-sludge-amended sandy soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v.27, n.3, p.287-296, 1995.

WRB. World Reference Base for soil resources (FAO/ISRIC/ISSS, Roma, 1998. 2 (Ed.). IUSS Working Group WRB. 2007. World Reference Base for Soil Resources 2006, first update: Disponível em: <<http://www.fao.org/nr/land/soils/soil/en/>>. Acesso em: 13 de jan. de 2012, 2007.

YANG, Y.; CHEN, Y. X.; TIAN, G. M. Microbial activity related to N cycling in the rhizosphere of maize stressed by heavy metals. *Journal of Environmental Sciences*, v.17, n.3, p.448-451, 2005.

ZAREI, M.; HEMPEL, S.; WUBET, T.; SCHÄFER, T.; SAVAGHEB, G. S.; SALEHI, G.J.; KHAYAM, M.N.; BUSCOT, F. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environmental Pollution*, v.158, n.8, p.2757-2765, 2010.

ZHANG, C.; WANG, L.; ZHANG, S. Y LI, X. Geochemistry of rare earth elements in the mainstream of the Yangtze River, China. *Applied Geochem.*, v.13, p.451-462, 1998.

ZUPO, T.M. Invasão, competição e uso de recursos por uma gramínea nativa e uma gramínea invasora do cerrado. 2010, 75f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências. Departamento Ecologia. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2010.