

População de bactérias e fungos no solo contaminado com cobre nas Minas do Camaquã, RS, Brasil

Lílian Castilho dos Santos¹, Zaida Inês Antonioli²,
Lineu Trindade Leal³, Manoeli Lupatini³

¹*Bióloga, Mestre em Ciência do Solo da Universidade Federal de Santa Maria
e-mail: lilianbio@terra.com.br*

²*Professor Adjunto da Universidade Federal de Santa Maria
e-mail: zaida@ccr.ufsm.br*

³*Graduando do Curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria*

Resumo

Os microrganismos são sensíveis à presença de determinadas concentrações de cobre no solo, sendo por isso, também, considerados indicadores de qualidade ambiental. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do cobre sobre a população de fungos e bactérias do solo e identificar os gêneros de fungos encontrados em área com contaminação de cobre nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, Brasil. As amostras de solo foram coletadas em área de rejeito, margem, cultivo de eucalipto, pinus com 2 anos e com 10 anos de cultivo. A contagem da população de fungos e bactérias do solo foi realizada pelo método da diluição do solo em solução salina e inoculação em meio de cultura. As maiores médias para a população de bactérias totais foram encontradas nas áreas de margem e de cultivo com eucalipto. Para a população de fungos do solo a maior ocorrência foi em área de margem. A quantidade de 203 mg dm⁻³ de cobre reduz a população de bactérias e fungos do solo.

Palavras-chave: metal pesado, microrganismos, indicadores de qualidade ambiental

Summary

The microorganisms are sensitive to the presence of copper in high concentration in the environment, being considered indicators of soil pollution. The aim of this study was to evaluate the effects of copper in the

soil bacteria and fungi population in the contaminated copper soil, in Camaquã Minas, Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. The soil samples were collected in reject, adjacent, eucalyptus cultivation, pinus with two and ten years old area. The counting of bacteria and fungi soil population was carried out in culture medium. The highest average for the total bacteria population was found in the adjacent and eucalyptus cultivation area. The soil fungi population was in the adjacent area. The copper concentration of 203 mg dm⁻³ inhibits the bacteria and the fungi soil population.

Key words: heavy metal, microorganisms indicators of environmental quality

Introdução

As Minas de Camaquã estão localizadas no município de Caçapava do Sul, na Região Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Esta área foi considerada a principal jazida de cobre do sul do Brasil, tendo sido explorada até a década de 1980. Neste local houve intensa exploração de minérios constituídos por sulfetos de cobre (calcopirita, bornita e calcosina) associados à pirita (Teixeira & Gonzalez, 1988). Atualmente, o local apresenta certa quantidade de rejeito, prejudicando o crescimento de plantas no local.

A contaminação do solo por metais devido às atividades exercidas pelo homem, como a mineração, é um problema ambiental que merece atenção, sendo seus efeitos pouco conhecidos nas condições brasileiras (Dias Junior *et al.*, 1998). Metais pesados como cobre podem em elevadas concentrações exercer efeitos deletérios em diversas formas de vida, causando poluição dos ecossistemas (Leyval *et al.*, 1997; Siqueira *et al.*, 1999). O cobre, assim como os demais metais pesados, não é biodegradável e apresenta uma dinâmica no solo bastante complexa, alterada diretamente por fatores do meio, principalmente pela quantidade de matéria orgânica, pH e CTC (Sodré & Lenzi, 2001).

Os microrganismos são sensíveis às alterações que ocorrem no ambiente (Siqueira *et al.*, 1994). Vários parâmetros microbiológicos têm sido usados como indicadores de alterações no solo, mas nenhum é adequado a todas as situações, devido à natureza dinâmica e complexa dos ecossistemas (Dick, 1992). A biomassa microbiana é responsável pela quase totalidade da atividade biológica no solo, catalisando as transformações bioquímicas, representando fonte e dreno de carbono e troca de nutrientes entre a atmosfera e o ecossistema solo-planta (Moreira & Siqueira, 2002). Mudanças significativas na quantidade de biomassa podem ser detectadas muito antes que alterações na matéria orgânica total possam ser percebidas

por métodos laboratoriais, possibilitando a adoção de medidas de correção antes que a perda da qualidade do solo seja mais severa. O monitoramento das alterações nos níveis de biomassa microbiana do solo é uma medida adequada para determinar se um conjunto de práticas é sustentável (Tótola & Chaer, 2002).

Assim, o estudo da população de fungos e bactérias do solo pode auxiliar no monitoramento da qualidade ambiental do solo, visando à recuperação de áreas contaminadas por cobre. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do cobre sobre a população de bactérias e fungos do solo, e identificar os gêneros de fungos encontrados nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS.

Material e métodos

O trabalho foi realizado em amostras de solo coletadas em área de mineração de cobre nas Minas de Camaquã localizadas no município de Caçapava do Sul, RS, Brasil. As amostras de solo foram coletadas em junho de 2006, na profundidade de 0-20 cm, em cinco locais denominados de: rejeito, margem, eucalipto, pinus 2 e pinus 10. Os diferentes locais amostrados foram selecionados conforme sua localização na área e cobertura vegetal apresentando as seguintes características: Rejeito, localizado entre a área de margem e de pinus com 2 anos de cultivo, sem a presença de vegetação e com depósito do rejeito extraído das minas; Margem, local situado entre as áreas de rejeito e área de cultivo de eucalipto, com 30 a 50 m de largura composta por vegetação rasteira e esparsa; Eucalipto, localizado entre a área de margem e pinus com 10 anos apresentando vegetação rasteira, arbustiva e bosque de eucalipto; Pinus 2 (com 2 anos de cultivo) localizado atrás da área de rejeito, exclusivamente cultivado com bosque de *Pinus*; Pinus 10 (com mais de 10 anos de cultivo), localizado após a área cultivada com eucalipto, somente com o cultivo de *Pinus*.

Em cada local coletaram-se cinco amostras compostas, consideradas repetições, formadas por três subamostras, perfazendo um total de 25 amostras. Depois de coletadas as amostras foram embaladas em sacos plásticos devidamente etiquetados e transportadas em caixa de isopor com gelo até o Laboratório de Microbiologia do Solo e do Ambiente Marcos Rubens Fries, do Departamento de Solos, UFSM. As amostras de solo ficaram armazenadas em refrigerador a - 18°C, por 48 horas, até o momento da determinação da população microbiana do solo. Os materiais de solo foram analisados quanto à fertilidade no Laboratório Central de Análises de Solo da Universidade Federal de Santa Maria (Tabela 1).

Tabela 1. Características químicas e físicas do solo de área de rejeito, margem, eucalipto, pinus 2 e pinus 10. Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006, (Média de cinco repetições).

Local	pH	P	K	Ca	Mg	CTC _e *	MO	Argila	Cu**
	H ₂ O	...mgdm ⁻³cmolc dm ⁻³gkg ⁻¹	mgdm ⁻³				
Rejeito	3,4	76	43	2,4	0,2	2,7	40	220	203
Margem	6,5	40	93	5,8	1,9	8,0	170	230	92
Eucalipto	4,8	25	82	3,7	1,2	7,0	300	430	94
Pinus 2	7,2	61	120	3,4	1,1	4,8	40	600	199
Pinus 10	4,7	3,7	48	2,9	0,8	5,5	180	600	6

*Capacidade de troca de cátions efetiva

** Determinado pelo método de Tedesco (1995)

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias e fungos foi realizada pelo método da inoculação de suspensões diluídas de solo em meio de cultura. Para tanto, preparou-se uma diluição decimal em série partindo-se de 10 g de solo colocado em frascos de erlenmeyer com 90 mL de água destilada e esterilizada. De cada diluição, foi retirado uma alíquota de 1 mL por placa de petri, sobre o qual verteu-se o meio. Para cada diluição foram feitas três repetições por placa. As placas foram envolvidas em papel filme e incubadas em estufa à 25°C no escuro. A contagem das UFC de bactérias e fungos foi realizada aos 8 dias após a incubação em estufa.

Para a determinação da população de bactérias do solo utilizou-se o meio Ágar-PG (Moreira & Siqueira, 2002) com a seguinte composição (g.L⁻¹ de água): glicose 0,1; peptona 1,0; K₂HPO₄ 0,1; FeSO₄.7H₂O 0,02; agar 15; Pentacloronitrobenzeno (PCNB), 2,4. O pH foi ajustado a 7,0 antes do meio ser autoclavado. Para avaliação da população de fungos utilizou-se o meio Martin's-Bengala Agar (Martin, 1950) com os seguintes nutrientes (g.L⁻¹ de água): glicose 10,0; peptona 5,0; KH₂PO₄ 1,0; ágar 15,0 e 3,3 mL de rosa bengala Os meios de cultura usados foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

Após o período de incubação os fungos foram identificados em nível de gênero, através de microscópio estereoscópico e ótico, com base na chave de identificação Barnett e Hunter (1999).

Os resultados obtidos sobre os grupos de bactérias e fungos do solo foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos

foram comparadas entre si pelo Teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003). Para a análise estatística, os dados foram transformados para raiz quadrada de $y+0,5$.

Resultados e discussão

As áreas de rejeito e Pinus 2 apresentaram as concentrações mais altas de cobre quando comparados com os outros locais de coleta de solo (Tabela 1). O número reduzido de bactérias na área de rejeito e pinus 2 anos (Tabela 2) era esperado em função do grau de degradação do local, mostrado pelos baixos valores de pH, de matéria orgânica ou elevada concentração de cobre e por conseqüência ausência de vegetação rasteira. Neste caso, pode-se ter o efeito direto do Cu que reduz a população de bactérias do solo pela sua toxicidade e/ou o efeito indireto, onde o Cu inibe o crescimento da vegetação, que por conseqüência influencia negativamente na população de bactérias do solo. Como exemplo, a aveia e mesmo outras espécies nativas têm apresentado crescimento fraco, clorose e morte de plantas em áreas com alta concentração de cobre (Santos et al., 2004). Apesar de maior, a população de bactérias da área pinus com mais de 10 anos, esta não diferiu estatisticamente da área com Pinus 2 anos e rejeito (Tabela 2).

O fato das bactérias se apresentarem em um número menor na área de Pinus com 2 anos de cultivo e rejeito poderia ser explicado pelos baixos teores de matéria orgânica (Tabela 1), levando assim a menor complexação do cobre. Além disto, a população de bactérias é influenciada pela presença da cobertura vegetal através da produção de exsudatos radiculares. Na área de Pinus com 2 anos de plantio, não havia nenhuma espécie como vegetação de cobertura do solo (dados não apresentados). Assim, a produção de exsudatos de raízes era pequena. Este resultado está de acordo com Catelan & Vidor (1990) que estudando os efeitos dos fatores ambientais sobre a biomassa, população e atividade microbiana no solo em diferentes sistemas de culturas, concluíram que o desenvolvimento dos microrganismos foi influenciado pela variação dos fatores climáticos como umidade e temperatura, que influenciam diretamente sobre a cobertura vegetal.

Embora a área de rejeito e Pinus 2 tenham apresentado elevados teores de cobre, os microrganismos se estabeleceram no local. Sabe-se que os microrganismos são influenciados de modo diferenciado pela presença de metais pesados no solo. Este comportamento depende do metal, da sua concentração no solo e dos microrganismos envolvidos no processo. Os fungos filamentosos, as leveduras, as bactérias e as algas são capazes de tolerar altas concentrações de metais pesados no ambiente, conforme de-

monstram os trabalhos Rosa (2001) e Guelfi (2001). A exposição dos microrganismos aos metais leva ao desenvolvimento da tolerância pela comunidade microbiana do solo (Ellis, 2003).

As áreas de margem e cultivo de eucalipto apresentaram as maiores contagens de bactérias, sem, no entanto, mostrar diferenças significativas entre elas quanto ao número de bactérias (Tabela 2). Estas áreas apresentavam uma boa cobertura vegetal, com uma razoável camada de restos vegetais em decomposição, o que representa importante fonte de carbono e energia para os microrganismos do solo.

A cobertura vegetal exerce forte influencia sobre o número de microrganismos do solo (Silva Filho & Vidor, 1984). Quando o solo é protegido por vegetação, aumenta a disponibilidade de nutrientes orgânicos, diminuindo os efeitos de variação de temperatura e umidade, tornando o ambiente propício para o desenvolvimento. O crescimento da vegetação promove a liberação de exsudatos das raízes alterando a disponibilidade dos metais para os microrganismos (Zilli, 2003).

Tabela 2. População de bactérias e fungos do solo (UFC g⁻¹ de solo seco) encontradas nas áreas de rejeito, margem, eucalipto, pinus 2 e pinus10 nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006.

Local	Bactérias	Fungos
Rejeito	190 b*	150 c
Margem	420 a	370 a
Eucalipto	510 a	250 b
Pinus com 2 anos	160 b	300 b
Pinus com 10 anos	250 b	100 c
CV%	27	40

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

A maior população de fungos foi observada na área de margem (Tabela 2), seguida das áreas de cultivo de eucalipto e pinus 2 anos, que não apresentaram diferenças significativas entre elas. Geralmente os solos com pH mais próximos da neutralidade e com maior quantidade de matéria orgânica reduzem os efeitos tóxicos dos metais pesados, tornando-os menos disponíveis para os microrganismos (Banu *et al.*, 2006). O Zn, Co e Ni

presentes na solução do solo podem não estar biodisponíveis, mas na forma de quelatos com moléculas orgânicas em formas químicas não disponíveis (Sanders *et al.*, 1986). A área de margem caracteriza-se pela presença de gramíneas cobrindo o solo e estas por terem um sistema radicular denso exercem maior efeito rizosférico, propiciando o desenvolvimento de fungos no solo. Resultados semelhantes foram encontrados por Nuernberg *et al.* (1984), onde a cobertura vegetal alterou o número de fungos de UFC do solo.

As áreas de rejeito e de Pinus com mais de 10 anos de cultivo apresentaram as menores médias na contagem da população de fungos quando comparadas com as outras áreas de coleta (Tabela 2). Os resultados podem ser explicados pelos elevados teores de cobre no solo, baixos valores de pH, matéria orgânica e pouca vegetação de cobertura. Trabalhos com crescimento micelial de alguns fungos fitopatogênicos mostraram que houve drástica redução da população total de fungos com adição de cobre (Bettiol & Trach, 2001). Assim, as quantidades de cobre disponíveis na solução do solo possivelmente atuam no desenvolvimento da população de fungos. Nestas áreas, a população de fungos pode ter sido alterada pela ação oligodinâmica do cobre. Essa ação pode acontecer quando substâncias atuam em função das condições que o organismo vivo se encontra, podendo inibir, estimular ou mesmo destruir os indivíduos (Borzani, 2000). A ação oligodinâmica do cobre é conhecida em fungos filamentosos *Aspergillus* e *Penicillium* com ocorrência nas áreas em estudo (Tabela 3).

Tabela 3. Gêneros de fungos do solo encontrados nas diferentes áreas de rejeito, margem, eucalipto, pinus 2 e pinus 10 nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS, 2006.

Área	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Penicillium</i>	Gêneros não identificados
Rejeito	x		x	x	
Margem	x	x	x	x	x
Eucalipto	x	x	x	x	x
Pinus (2anos)		x		x	
Pinus (10 anos)	x	x		x	x

Os fungos isolados da área de margem pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Penicillium*, além de alguns não iden-

tificados (Tabela 3). Neste trabalho, o gênero *Penicillium* sp. exibiu tolerância à presença do cobre do solo. Resultados semelhantes foram encontrados por Bãath (1989) que encontrou fungos do gênero *Penicillium* como espécie abundante em solos com alto teor de cobre.

Há variações na tolerância aos metais por parte dos microrganismos. Trabalhos realizados por Williams *et al.* (1977) relatam a diminuição do número de fungos do gênero *Penicillium* sp. em solos contaminados por metais pesados, podendo em alguns casos ocorrer a ausência deste gênero quando há presença de grandes concentrações do cobre. Gêneros de *Fusarium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* também foram encontrados na área de margem. Estes fungos possivelmente apresentam adaptações fisiológicas e mudanças genéticas para tolerar a presença do cobre no solo (Gaad, 2000).

O gênero *Trichoderma* exibe baixa tolerância à adição de sulfetos de cobre no solo (Bettioli & Trach, 2001). Os resultados encontrados na área de cultivo de pinus com 2 anos de idade não mostram a presença de *Trichoderma*. Há variações entre os gêneros de fungos quanto à tolerância adaptativa em relação a quantidades elevadas de metais no solo, podendo levar os indivíduos à morte (Banu *et al.*, 2006).

A população de fungos e bactérias foi maior na área de margem e menor na área de rejeito, indicando que a concentração de cobre associada ao pH do solo, quantidade de matéria orgânica e presença de vegetação influenciaram quanti-qualitativamente na população de microrganismos solo da área das Minas do Camaquã.

Referências bibliográficas

BÄATH, E. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air e Soil Pollution*, Dordrecht, v. 47, p. 335-379, 1989.

BANU, N. A.; SINGH, B.; COPELAND, L. Influence of copper on soil microbial and biodiversity in some NSW soil. Faculty of Agriculture, Food and Natural Resources. University of Sydney. Australia. 2006.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th edition. Minesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BETTIOLI, W.; TRACH, R. *Efeito do biofertilizante sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos*. 2001. Disponível em: < <http://atlas.sct.embrapa.br/pab/pab.ns> >. Acesso em: 25 de agosto 2006.

BORZANI, W. *Ação oligodinâmica*. In: Escola de Engenharia. Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia. São Caetano do Sul. 2000. Disponível em: <http://www.hottopos.com/regeq11> >. Acesso: em 10 de maio de 2006.

CATELAN, A. J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 14, n. 1, p. 125-133, 1990.

DICK, R.P. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agricultural Ecosystems & Environmental*, Amsterdam, v. 40, p.25-36, 1992.

ELLIS, R. J. Cultivation dependant and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 69, n.6, p.3223-3230, 2003.

FERREIRA, D. F. Sistemas de análises estatísticas para dados balanceados. Lavras: UFLA/ DEX/ SISVAR, 2003, 145p.

GAAD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanism of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, n. 2, p.271-279, 2000.

GUELFÍ, A. Resposta das enzimas antioxidantes em linhagens do fungo *Aspergillus* sp. na presença do metal pesado cádmio. 2001. 76f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo, 2001.

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

LEYVAL, C.; TURNAU, K. & HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, v. 7, n. 1, p. 139-153, 1997.

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

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Editora UFLA, 2002. 623 p.

NUERNBERG, N. J.; VIDOR, C.; STAMMEL, J. S. Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade microbiana do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 8, 197-203. 1984.

ROSA, L.H. Capacitação do *Aspergillus niger* para remoção de Cd na

presença de íons complexantes. 2001. Disponível em: <http://www.ufsc.br/ccb> >. Acesso: em 30 de agosto de 2006.

SANDERS, J. R.; Mc GRATH, S. P.; ADAMS, T. M. Zinc, copper and nickel concentrations in ryegrass growth on sludge-contaminated soil different pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 37, p.961-968, 1986.

SANTOS, H.P.; MELO, G.W.B.; LUZ, N.B.; TOMASI, R.J. *Comportamento fisiológico de plantas de aveia (Avena strigosa) em solos com excesso de cobre*. Comunicado Técnico nº49, Bento Gonçalves, RS, 2004. 10p.

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

SIQUEIRA, J. O.; POUYU, E.; MOREIRA, F. M. S. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplante de mudas de árvores em solo com excesso de metais pesados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 23, p. 569-580, 1999.

SODRÉ, F. F.; LENZI, E. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, p.324-330, 2001.

TEDESCO, M. J. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, Departamento de Solo, 1995. 174p.

TEIXEIRA, G.; GONZALEZ, M. Minas de Camaquã, Município de Caçapava do Sul, RS. *Principais depósitos minerais do Brasil*, 1988. cap. 3, p. 33-44.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. *Tópicos em Ciência do Solo*, v. 2, p.195-276, 2002.

WILLIAMS, S. T.; NEILLY, T. Mc.; WELLINGTON, E. M. H. The decomposition of vegetation growing on metal mine waste. *Soil Biology and Biochemistry*. v. 9, p.271-275. 1977.

ZILLI, J. E. Diversidade microbiana como indicador da qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*. Brasília, v. 20, p.391-411. 2003.