

O papel das ectomicorrizas na biorremediação dos metais pesados no solo

The role of ectomycorrhiza in heavy metals bioremediation in soil

Amanda A Bertolazi^{1,4,*}, Gabriela C Canton^{1,4}, Inga G Azevedo², Zilma MA Cruz⁴, Daniela NES Soares⁴, Juliana M Conceição⁴, Wolmen O Santos⁴ e Alessandro C Ramos^{3,4}

¹ Graduação em Ciências Biológicas; ² Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF ³ Professor Titular I; ⁴ Centro Universitário Vila Velha - UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES. CEP 29101-770.

* Autor para correspondência: amanda.nany@gmail.com

Resumo Teores elevados de zinco, cádmio e cobre são responsáveis pela degradação de áreas e dificuldade de revegetação, sendo que o Cd oferece maior risco ambiental devido à sua elevada toxicidade. Para amenizar tais efeitos, estudos estão sendo realizados utilizando-se associações micorrízicas, as quais consistem em uma associação simbiótica entre fungos do solo (Basidiomicetos e Ascomycetos) e raízes de plantas vasculares, em que o fungo fornece água e nutrientes para a planta e esta fornece para o fungo carboidratos provenientes da fotossíntese. Elas são classificadas em diferentes tipos, dependendo da planta, do fungo e da característica da colonização. As ectomicorrizas representam um tipo de associação micorrízica e são caracterizadas pelo crescimento intercelular, formando um manto de hifas ao redor da raiz. Sua ocorrência generalizada em florestas de plantas hospedeiras e os efeitos sobre estas, tornam estas associações componentes importantes dos ecossistemas naturais e florestas plantadas. Diversos estudos demonstraram que as ectomicorrizas protegem as plantas contra poluentes típicos de solos como metais pesados, entre eles o Cd, Pb, Cu, Zn, Ni, entre outros, retirando-os do solo e impedindo que sejam absorvidos pelas raízes dos vegetais. Esta habilidade ocorre devido ao fato dos fungos micorrízicos possuírem diversos mecanismos que impedem a translocação dos metais para a planta. Entre eles estão a ligação dos metais a componentes da parede celular como quitina, celulose, derivados de celulose e melanina, certas proteínas como a metalotioneína, glutatona e fitoquelatinas e a grânulos de polifosfato. A capacidade de retenção do micélio e densidade do micélio extramatricial pode funcionar como uma barreira física contra metais, e a absorção intracelular e posterior detoxificação nos vacúolos fúngicos podem reduzir a absorção de metais na planta hospedeira. Outro processo envolvido na tolerância das ectomicorrizas a metais pesados é o transporte de íons e outros metabólitos mediados por proteínas de membrana. Entre elas destacam-se as H⁺-ATPases de membrana plasmática, responsáveis por gerar um gradiente

eletroquímico de H⁺ responsável por regular o transporte secundário de substâncias, como os metais pesados. Para o correto funcionamento desta enzima é necessário um mecanismo exato de regulação da mesma, nos quais vários fatores estão envolvidos principalmente pH ácido e glicose. Vários trabalhos já demonstraram um aumento da atividade da H⁺-ATPase em presença de fungos ectomicorrízicos. Dessa forma é necessária a realização de mais estudos a fim de elucidar os mecanismos de biorremediação proporcionados pelos fungos ectomicorrízicos, destacando-se um maior entendimento sobre a regulação das bombas de prótons e transportadores na membrana fúngica.

Palavras-chaves: micorriza, tolerância, transporte, H⁺-ATPase e mecanismos

Abstract The increase of natural and human activity has caused the migration of contaminants, such as heavy metals, to non contaminated areas. In general, their high availability causes serious problems to ecosystems, because when present in the form of soluble ions are absorbed by plants inhibiting a series of biological and physiological factors. High levels of zinc, cadmium and copper are responsible for areas degradation and difficulty of revegetation, and Cd offers greater environmental risk due to its high toxicity. To minimize such effects, studies are being conducted using mycorrhizal associations, which consist of a symbiotic association between soil fungi (Basidiomycetes and Ascomycota) and roots of vascular plants, whereas the fungus provides water and nutrients to the plant and the vegetable provides carbohydrates for the fungus produced from photosynthesis. They are classified into different types, depending on the plant, the fungus and the colonization characteristic. The ectomycorrhiza represent a type of mycorrhizal association and are characterized by intercellular

growth, forming a mantle of hyphae around the root. Its widespread occurrence in forests of host plants and the effects on these, make these associations important compounds of natural ecosystems and planted forests. Several studies have shown that ectomycorrhiza protect plants against typical soil pollutants such as heavy metals, including Cd, Pb, Cu, Zn, Ni, etc., removing them from the soil and preventing them from being absorbed by the plants roots. This ability is due to the fact that mycorrhizal fungi possess various mechanisms that prevent the translocation of metals to the plant. Among them are the binding of metals to cell wall components such as chitin, cellulose, cellulose derivatives and melanin, certain proteins such as metallothionein, glutathione and polyphosphate granules. The mycelium retention capacity and the extrametrical mycelium density can act as a physical barrier against metals, and the intracellular absorption and subsequent detoxification in the fungal vacuoles may reduce the metal absorption in the host plant. Another process involved in tolerance of ectomycorrhizal to heavy metals is the transport of ions and other metabolites mediated by membrane proteins. Among them is the plasma membrane H^+ -ATPases, responsible for generating an electrochemical gradient of H^+ responsible for regulate the transport of secondary substances such as heavy metals. For the correct operation of this enzyme an exact regulation mechanism is required, in which several factors are involved mainly acidic pH and glucose. Several studies have shown an increased activity of H^+ -ATPase in the presence of ectomycorrhizal fungi. Thus, it is necessary to perform further studies to elucidate the mechanisms of bioremediation provided by ectomycorrhizal fungi, especially a better understanding of the regulation of proton pumps and transporters in the fungal membrane.

Keywords: mycorrhiza, tolerance, transport, H^+ -ATPase and mechanisms

Introdução

Os metais pesados no solo

Os metais pesados foram definidos como elementos com densidade relativa maior que 5 g cm^3 e estão presentes em rochas em concentrações elevadas, em áreas com adição de rejeitos industriais, bio-sólidos e em alguns agroquímicos (Baker *et al.* 1994, Accioly 2001). Os metais podem ser altamente reativos e bio-acumulativos para alguns organismos, ou seja, não é capaz de eliminá-los (Bisinoti *et al.* 2004). A sua presença nos solos pode ter origem natural, dependendo do material de origem sobre o qual o solo se formou, dos processos de formação e da composição e proporção dos componentes da fase sólida do solo. A Origem antrópica vem sendo discutida com a principal razão do aumento crescente dos metais pesados nos solos, provocando distúrbios muitas vezes de

difícil recuperação do ambiente (Abreu *et al.* 2002).

Os problemas por contaminação de metais pesados de efeito antrópico, tiveram início na idade Média com as atividades mineradoras, mas foi acelerado no início do século XIX com o processamento de metais em plantas químicas e de fundição. Portanto, a atividade industrial aliada ao rápido crescimento populacional contribuiu para um aumento natural na concentração de íons metálicos, passando a representar uma importante fonte de contaminação de solos. O impacto do excesso dos metais nos ecossistemas tem sido bastante discutido pela possibilidade da contaminação da cadeia alimentar animal e humana (Bisinoti *et al.* 2004).

Os principais metais pesados presentes no solo e nos produtos utilizados na agricultura são Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn e Zn (Abreu *et al.* 2001). Muitos desses elementos formam complexos estáveis com biomoléculas e sua presença, mesmo em pequenas quantidades, pode causar prejuízos a animais e vegetais. Porém, alguns metais como o cromo, o cobre e o zinco, são importantes componentes funcionais e estruturais dos seres vivos por possuírem como característica a propensão em perder elétrons com facilidade formando íons com cargas positivas, que tendem a ser solúveis em fluidos biológicos. É na forma catiônica que os metais desempenham suas principais funções biológicas (Benite *et al.* 2007, Bisinoti *et al.* 2004).

Quando em excesso no solo, esses elementos podem inibir o crescimento das plantas e causar alterações nas comunidades vegetais e de microrganismos (Vangronsveld *et al.* 1997, Chen *et al.* 2003), como também exercer efeitos adversos sobre os microrganismos do solo (Carneiro *et al.* 2001), interferindo nas funções do ecossistema, com conseqüências ao meio ambiente e à saúde pública.

O nível de toxicidade em uma planta ou microrganismo depende, geralmente, da concentração dos metais ou do seu papel nos processos bioquímicos (Giller *et al.* 1998, Hall 2002). Diversos efeitos tóxicos já foram observados como: ligamento dos metais ao grupo sulfidril das proteínas, levando a uma inibição da atividade ou rompimento da estrutura (Van Assche e Clijsters 1990, Godbold *et al.* 1998), bloqueio de enzimas de grupos funcionais de moléculas biologicamente importantes, por exemplo, os sistemas de transporte de nutrientes essenciais e íons (Gadd 1993), inibição do crescimento da raiz de árvores e queda da integridade das membranas biológicas. Além disso, o excesso de metais pesados pode estimular a formação de radicais livres e espécies reativas do oxigênio, podendo resultar em um estresse oxidativo (Hall 2002).

Os solos contaminados podem ser remediados por técnicas físicas ou biológicas, agrupadas em duas categorias: ex-situ, que requerem a remoção do solo contaminado para tratamento dentro ou fora do local e in-situ, que remedia sem a escavação do solo contaminado (Khan *et al.* 2000). As duas técnicas são muito utilizadas, porém as tecnologias físico-químicas geralmente usadas no processo de descontaminação tornam o solo inútil como meio de crescimento para plantas, uma vez que todas as atividades biológicas do local são removidas, incluindo microrganismos úteis, bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos, assim como a fauna existente no local (Wheeler 1994).

Grandes esforços têm sido feitos para integrar conhecimentos que facilitem a reabilitação de solos poluídos com metais pesados, e assim, possibilitar o retorno da funcionalidade e estabilidade do ecossistema formado (Baker, 1987, Cunningham *et al.* 1996, Accioly e Siqueira 2000). Para isto, procura-se amenizar o efeito da fitotoxicidade dos metais no solo, visando ao estabelecimento da vegetação.

Zinco

O elemento Zinco (Zn), igualmente ao Cobre, é um micronutriente essencial, porém, quando presente em níveis tóxicos no ambiente pode afetar o crescimento e o metabolismo normal de espécies vegetais. Os sintomas de toxidez do Zinco, de maneira geral, são caracterizados por redução no crescimento e clorose de folhas (Soares *et al.* 2001).

As plantas apresentam concentrações tóxicas de Zn distintas em função da espécie (Natale *et al.* 2002). Entretanto, segundo estudo de Soares *et al.* (2001), existem espécies mais tolerantes à toxidez de Zn, como a espécie de eucalipto *E. urophylla*. Porém, no mesmo estudo, outras espécies de eucalipto se mostraram sensíveis às doses crescentes de Zn, exibindo sintomas como clorose, escurecimento das raízes e inibição do crescimento das plantas. Além de todos os sintomas de fitotoxidez, altas doses deste metal reduzem as concentrações de Ferro e Cálcio na parte aérea.

O acúmulo de Zinco na parte aérea e na raiz de mudas de goiabeiras foi observado por Natale *et al.* (2002) em que o excesso de Zn no solo provocou um decréscimo no acúmulo do metal na planta, sendo este fenômeno explicado pela redução linear do índice de translocação de Zn, que foi de 75% na testemunha para 48% na dose máxima do elemento. Portanto, doses excessivas de Zn prejudicam mais os processos de translocação que os de absorção. De acordo com discussão baseada em Vansteveninck *et al.* (1987), o fenômeno da redução de translocação do Zn pode ser explicado pelo mecanismo das plantas em aumentar a tolerância à toxidez de zinco, pois, nestas condições, tem-se maior acúmulo de Zn nos vacúolos das células do córtex da raiz.

Alguns trabalhos têm estudado a relação da simbiose ectomicorrízica com o excesso de Zinco. A tolerância de *Betula ssp.* a este metal, com redução da translocação do elemento da raiz para a parte aérea, foi uma das primeiras constatações para este tipo de estudo (Brown e Wilkins 1985).

Cobre

O cobre (Cu^{2+}), apesar de ser classificado como um metal pesado, está entre os elementos essenciais a plantas e microrganismos, sendo classificado como um micronutriente conhecido por desempenhar importante papel na nutrição mineral, bioquímica e fisiologia das plantas. Este elemento, em pequenas quantidades, participa como catalisador de reações bioquímicas, no metabolismo de carboidratos, do nitrogênio, na síntese de clorofila e na constituição de proteínas das plantas (Taiz e Zeiger 2004). Porém, em elevadas concentrações pode proporcionar efeitos tóxicos

contribuindo negativamente no crescimento e desenvolvimento das plantas e causar a deficiência de outros nutrientes essenciais através de interações antagonicas (Sodré *et al.* 2000).

Este metal não é biodegradável apresentando uma dinâmica bastante complexa no solo, alterada diretamente por fatores do meio, principalmente pela quantidade de matéria orgânica e pH. Solos com elevado grau de intemperismo, onde o pH permanece acima de 6, favorecem a retenção deste metal, enquanto solos ácidos determinam uma maior mobilidade. A deficiência de cobre geralmente ocorre em plantas cultivadas em solos com alto teor de matéria orgânica, especialmente em solos turfosos recentemente postos em cultura, em turfas com pH elevado bem como em solos arenosos (Sodré *et al.* 2000).

O cobre ocorre na solução do solo quase que exclusivamente na forma de Cu^{2+} (Sodré e Lenzi 2001, Abreu *et al.* 2001) e a concentração na solução é geralmente muito baixa (2 a 100 $mg\ kg^{-1}$) sendo governada pela adsorção as partículas do solo (Abreu *et al.* 2001).

A associação de fungos ectomicorrízicos com plantas pode ser uma alternativa promissora para colocar áreas contaminadas com cobre de volta ao processo produtivo. Esses fungos apresentam alguns mecanismos de tolerância a metais, e a produção de pigmentos extracelulares como a melanina, tem sido considerada o principal mecanismo de precipitação extracelular de metais pesados, sendo relacionada principalmente à adsorção de cobre (Gadd e De Rome 1988). O cobre é considerado um elemento essencial para a formação da melanina e na falta desse elemento a síntese de melanina poderá ser bloqueada (Bell e Werler 1986).

Cádmio

O cádmio é um elemento traço considerado como metal pesado e está disperso em ambientes naturais e agrícolas, principalmente através de atividades antrópicas como mineração, incineradoras de resíduos urbanos e fontes de combustão de combustíveis fósseis, além de ser amplamente utilizado para revestimento de materiais, em pigmentos de tintas, alcalinas cádmio/níquel e na indústria plástica (Rivera-Bacerril *et al.* 2002).

Embora não seja essencial ao desenvolvimento vegetal, o cádmio é facilmente absorvido e translocado nas plantas (Macedo e Morril 2008) podendo influenciar na nutrição mineral provocando clorose, necrose foliar e da raiz e uma diminuição geral no crescimento e no tecido de tamanho (Rivera-Bacerril *et al.* 2002).

A principal causa da toxidez pelo cádmio parece ser devida a sua combinação com grupos tiólicos (-SH) de enzimas e proteínas, o que provoca um desconcerto no metabolismo vegetal. Nas plantas, o cádmio substitui o zinco em diversas metaloenzimas alterando sua atividade, promove a expansão de camadas de fosfolípidos e desacopla a fosforilação oxidativa; inibe a fotossíntese, gera distúrbios respiratórios e na fixação de CO_2 , altera a permeabilidade das membranas celulares, entre outros efeitos (Macedo e Morril 2008).

Manganês

O manganês encontra-se no solo em concentração que varia

de 20 a 3.000 mg kg⁻¹. É absorvido principalmente como Mn²⁺ e translocado como cátion bivalente livre no xilema, a partir da raiz. Em solos tropicais e subtropicais ácidos ocorre maior disponibilidade uma vez que esta é reduzida cem vezes com o aumento de uma unidade de pH (Rosolem e Ferelli 2000). A erosão do solo é umas das mais importantes fontes naturais de manganês, porém, diversas fontes antrópicas são responsáveis por sua emissão no solo como lodo de esgoto, resíduos de produtos comerciais, da agricultura e de combustíveis, dejetos urbanos e fertilizantes (Martins e Lima 2001).

Apesar do manganês ser um elemento essencial ao desenvolvimento vegetal ele é pouco móvel na planta (Hocking *et al.* 1977), porém possui importante papel na síntese de proteínas, permeabilidade de membranas, absorção iônica, respiração, síntese de amido, controle hormonal (Teixeira *et al.* 2005), metabolismo do nitrogênio, produção de aminoácidos, hormônios, fenóis e lignina (Melarato *et al.* 2002).

Em elevadas concentrações este metal pode ser tóxico para a planta limitando o seu desenvolvimento. O manganês não afeta diretamente as raízes, mas indiretamente, mediante dano provocado na parte aérea. Entre os sintomas de toxicidade, os quais são mais pronunciados nas folhas, estão clorose marginal e franzimento das folhas, clorose nas folhas mais jovens semelhante à deficiência de ferro e manchas necróticas principalmente nas folhas mais velhas. Apenas em situações severas de toxicidade as raízes tornam-se de coloração castanha (Soratto *et al.* 2005).

Ectomicorrizas e recuperação de áreas degradadas

O termo micorriza foi de início, proposto pelo botânico alemão Albert Bernard Frank, em 1885, originado do grego em que “mico” significa fungo e “riza” raízes (Souza *et al.* 2006). Estas consistem em associações simbióticas mutualistas entre fungos do solo e a maioria das plantas vasculares (Santos 2006). Cerca de 90% das plantas terrestres formam associações micorrízicas, as quais foram estabelecidas há mais de 400 milhões de anos e hoje são encontradas em quase todos os habitats no mundo (Kistner e Parniske 2002, Smith e Read 1997).

As micorrizas só foram reconhecidas e tratadas cientificamente em meados do século XIX, quando foram publicados os primeiros relatos detalhados da associação entre células radiculares e micélios fúngicos (Matos *et al.* 1999). Existem dois grupos principais de micorrizas: ectomicorrizas e micorrizas arbusculares. As ectomicorrizas são caracterizadas pelo crescimento intercelular, formando um manto de hifas ao redor da raiz, enquanto que as micorrizas arbusculares possuem um crescimento inter e intracelular no córtex da raiz.

O estabelecimento da simbiose ectomicorrízica se inicia pela ativação dos propágulos do fungo (esporos) que germinam e formam um tufo de hifas na rizosfera. Quando as hifas no solo reconhecem uma fina raiz emergindo da planta hospedeira, elas direcionam

o seu crescimento em direção a estas raízes e colonizam a sua superfície formando um manto de hifas, cercando-as e isolando-as do solo ao redor. Os pelos das raízes, normalmente formados por células rizodérmicas, são suprimidos pela formação da ectomicorriza (Nehls 2008). Paralelamente a formação do manto, as hifas fúngicas penetram a raiz infectada através das junções celulares na Zona de Infecção Micorrízica, que se localiza logo atrás da zona meristemática apical da raiz. Após a penetração, as hifas colonizam o córtex intercelularmente, por meio da digestão enzimática da lamela média com ocupação de todo o espaço intercelular, dando origem à rede de Hartig, que é intra-radicular ao manto e ao rizomorfo, que são extra-radulares (Souza *et al.* 2006).

As associações ectomicorrízicas possuem um alto grau de especificidade com o seu hospedeiro, sendo este mecanismo governado por uma interação genética entre o fungo e a planta hospedeira. Além disto, a formação de ectomicorrizas no campo depende de vários fatores do ambiente, tais como, disponibilidade de nutrientes, pH do solo, temperatura, disponibilidade de água, aeração, intensidade luminosa, fisiologia da planta hospedeira, interações com os microorganismos do solo, e a toxicidade de certos pesticidas (Santos 2006).

As ectomicorrizas aumentam a área de absorção radicular, permitindo que nutrientes como P, N e K, e a água, sejam mais bem aproveitados. Portanto, contribuem para o crescimento da planta mesmo em solos pobres em nutrientes e degradados. Além disso, conferem maior resistência a aumento de temperatura, acidez do solo, estresses hídricos e maior tolerância à patógenos da raiz e substâncias tóxicas presentes no solo (Souza *et al.* 2004). Plantas com esse tipo de associação produzem maior quantidade de massa vegetal e absorvem e acumulam mais metais que plantas sem esses fungos (Silva *et al.* 2006).

Em programas de recuperação de solos contaminados com vários metais, a introdução de espécies vegetais é uma alternativa promissora principalmente se acoplada aos potenciais de microrganismos bioacumuladores de metais como os fungos micorrízicos (Jones e Hutchinson, 1986; Dixon, 1988; Dixon e Buschena, 1988). Diferenças na tolerância, no ciclo biológico, na rusticidade e na facilidade de estabelecimento em áreas desprovidas de vegetação e seleção de fungos inoculantes específicos são características que podem contribuir para o sucesso da estabilização de plantas em áreas com solos poluídos por metais pesados (Carneiro *et al.* 2001).

A grande pergunta é: porque os fungos micorrízicos? Especificamente, os fungos ectomicorrízicos podem aumentar a tolerância das plantas a metais tóxicos mesmo em solos com baixo P (Jones e Hutchinson 1986, Dixon 1988, Dixon e Buschena 1988). Eles se diferenciam na sua influência na tolerância ao metal pelo hospedeiro. Podemos afirmar que esta tolerância é baseada numa interação fungo-hospedeiro eficiente, mas para isso uma análise *in vitro* é de crucial importância. Por exemplo, algumas espécies de *Escleroderma* spp. estimulam mais o crescimento do hospedeiro (*Betula papyrifera*) do que *Laccaria laccata* em areia contendo NiCl (Jones e Hutchinson, 1986). Já o fungo *Pisolithus microcarpus* é muito conhecido pela sua ampla distribuição mundial e ampla

diversidade de hospedeiros num ecossistema florestal. Estirpes de *P. microcarpus* podem tolerar amplas faixas de estresses ambientais, incluindo altas temperaturas do solo (Marx 1991) e presença de altas doses de metais pesados como níquel, cromo e ferro.

Os reflorestamentos no Brasil têm se concentrado em solos com baixas reservas de nutrientes (Sgarbi e Silveira 2001, Bellote e Ferreira 1993). No entanto, a aplicação de fósforo tem sido essencial para o aumento e manutenção da produtividade das florestas implantadas, bem como associações biológicas com micorrizas, que podem potencializar o aproveitamento do pouco fósforo disponível nestas áreas (Bellei 1987, Bellei e Carvalho 1992).

Sendo assim, a seleção de ectomicorrizas eficientes na promoção do crescimento de mudas de eucalipto apresenta-se como uma alternativa biotecnológica capaz de promover ganhos na produção e aumento da oferta de madeira, através de produção e uso de inoculantes em programas de controle de micorrização para reflorestamentos. Além disso, pode auxiliar na redução de uso de fertilizantes fosfatados solúveis nos viveiros e no campo.

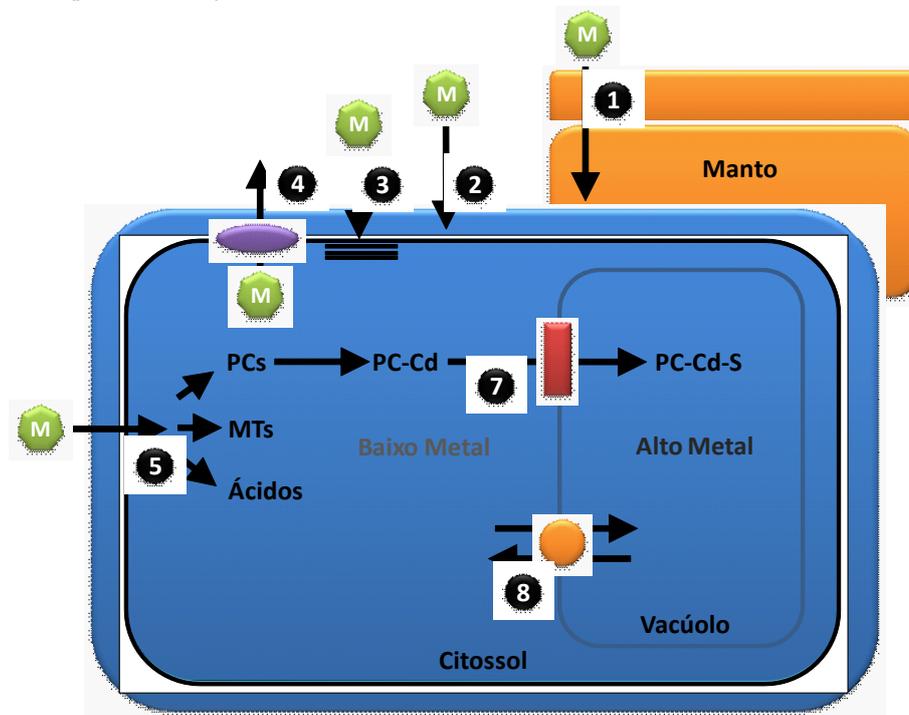
Mecanismos de tolerância a metais pesados em ectomicorrizas

Existe uma necessidade crescente de desenvolver técnicas biológicas de remediação, como a fitoremediação, que se trata de plantas com a capacidade de remover, transferir, estabilizar e/ou degradar metais pesados do solo ou a micorremediação, que consiste no uso de fungos micorrízicos para acumulação de metais, evitando

que estes sejam absorvidos pelos seus hospedeiros. Utilizando estes métodos de remediação, as propriedades biológicas e a estrutura física do solo são mantidas, além desta técnica ser não impactante, de baixo custo, visualmente desobstrutiva e ainda oferece a possibilidade de bio-recuperação dos metais pesados (Khan *et al.* 2000).

Quando se fala em desenvolvimento de fungos ectomicorrízicos em presença de metais pesados, termos como tolerância e resistência são comumente usados, porém se distinguem pelo mecanismo de ação. A resistência pode ser definida como sendo a habilidade de sobreviver em presença de metal, por ação de um mecanismo produzido como resposta direta aos metais. Tolerância pode ser definida como a capacidade de um organismo sobreviver em presença de doses elevadas de metais por propriedades intrínsecas e/ou modificações ambientais, como parede celular impermeável e excreção de metabólitos que levam à detoxificação dos metais. Entretanto, é muito difícil distinguir exatamente qual o mecanismo envolvido no processo de detoxificação dos metais, uma vez que inúmeros fatores físico-químicos (pH, matéria orgânica solúvel, ânions e cátions) e biológicos (biosorção e bioacumulação) estão envolvidos na biodisponibilidade do metal e influenciam diretamente o mecanismo utilizado no processo de tolerância (Gadd 1993, Godbold *et al.* 1998, Bellion *et al.* 2006).

As micorrizas em geral, e particularmente as ectomicorrizas, já foram testadas e aprovadas em relação ao melhoramento dos efeitos da toxicidade do metal na planta hospedeira, como foi relatado por Silva *et al.* (2007), cujo trabalho mostrou que mudas de canafístula inoculada com fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* apresentam menor teor de cobre em seu tecido e reduzem a absorção de cobre em dose



Alto Metal

Figura 1 Resumo dos potenciais mecanismos de detoxificação dos metais pesados em uma célula fúngica. Manto atuando como uma barreira física (1), biosorção da parede celular (2), diminuição do fluxo através da membrana plasmática (3), efluxo dos metais através de proteínas de membrana (4), quelatação dos metais no citossol por compostos como pitoquelatinas, metalotioneínas ou ácidos (5), transporte do complexo PC-metal para dentro do vacúolo (7) e transporte e acumulação dos metais no vacúolo (8). Adaptado de Hall 2002.

mais elevada. Plantas colonizadas por isolados fúngicos provenientes de áreas contaminadas apresentam maior crescimento quando comparadas àquelas colonizadas por isolados de solos não afetados. Contudo, não são todas as associações micorrízicas que conferem estes benefícios (Jones e Hutchinson 1986).

No entanto, os mecanismos envolvidos em aumentar essa tolerância são diversos e possuem uma alta especificidade entre metais, plantas e fungos (Hartley *et al.* 1997). Por exemplo, em um estudo feito por Ray *et al.* (2005), foi testado o nível de tolerância de oito ectomicorrizas em relação a várias concentrações de seis diferentes metais pesados (Al, As, Cd, Cr, Ni e Pb), concluindo que apenas três isolados (*Hysterangium incarcerationum*, *Laccaria fraterna* e *Pisolithus tinctorius*) possuíam tolerância considerável aos metais em questão. Dois fungos ectomicorrízicos *Thelephora terrestris* e *Suillus bovinus* testados por Van Tichelen *et al.* (2001), protegeram o *Pinus sylvestris* contra a toxicidade do cobre, porém os dois fungos acumularam quantidades diferentes de Cu e demonstraram sensibilidades também diferentes.

Weissenhorn *et al.* (1994) sugerem que a tolerância pode ser adquirida com maior rapidez quando os fungos já são retirados de regiões contaminadas do que em situações normais de tolerância ao longo do tempo. Segundo os autores, esporos de micorrizas, um ano após o tratamento de exposição ao Cd, mostram-se mais tolerantes à adição de Cd e Zn, comparativamente a esporos provenientes de áreas não contaminadas.

É possível que a proteção das ectomicorrizas contra os metais pesados seja devido ao manto formar uma barreira física impedindo a absorção dos metais pela planta hospedeira (Khan *et al.* 2000). Também existem os mecanismos biológicos, os quais incluem processos de precipitação extracelular, bioadsorção da parede celular através de troca iônica, adsorção, complexação e cristalização, e processos internos nas células dos fungos, onde os metais podem ser complexados, compartimentalizados ou volatilizados (Gadd 1993).

A parede celular do fungo possui uma importante propriedade de proteção, pois controla a absorção dos solutos na célula, incluindo metais potencialmente tóxicos, e também afeta, indiretamente, a composição iônica intracelular pelo fato de restringir a água celular (Gadd 1993). Muitos produtos fúngicos extracelulares podem complexar ou precipitar os metais. O ácido cítrico pode ser um eficiente quelante metal-íon e o ácido oxálico pode interagir com os metais na sua forma iônica e formar insolúveis cristais de oxalato ao redor da parede celular e no meio externo (Murphy e Levy 1983, Sutter *et al.* 1983).

A produção de pigmentos extracelulares como melaninas tem sido considerada o principal mecanismo de precipitação extracelular de metais pesados. As melaninas são pigmentos de alto peso molecular, marrom-escuros ou pretos formados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (Fogarty e Tobin 1996). Além disso, possuem grupos carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos e aminas, os quais fornecem muitos sítios potenciais para ligação ou bioadsorção dos metais (Gadd e De Rome 1988, Gadd 1993). Em fungos, estas estão localizadas na parede celular ou como polímeros extracelulares. Graziotti *et al.* (2001) confirmando tal fato, demonstrou que um

isolado de *Pisolithus tinctorius* teve sua produção de pigmentos extracelulares aumentada com a adição de solo contaminado ao meio de cultura, e esta produção foi máxima na mistura próxima àquela em que ocorreu a produção máxima de micélio.

O transporte de metais na membrana plasmática acontece devido a presença de proteínas de membrana, sendo a H⁺-ATPase e a V-ATPase as principais. O mecanismo de ação da H⁺-ATPase (detalhado anteriormente) consiste no bombeamento de prótons do interior para o exterior da célula. Os prótons bombeados retornam ao meio intracelular através de proteínas carreadoras e juntamente a eles, através do co-transporte, os metais entram na célula. No citosol ocorre a quelação dos metais por ligantes de alta afinidade, os quais podem ser aminoácidos, ácidos orgânicos e duas classes de peptídeos, as fitoquelatinas e as metalotioneínas (Rauser 1999, Clemens 2001). Em seguida o complexo metal-quelante é transportado em direção ao vacúolo, onde a V-ATPase também gera um gradiente de prótons possibilitando a entrada deste complexo no vacúolo, por meio de um transporte do tipo antiporte. No interior deste compartimento o metal é acumulado e posteriormente será eliminado (Hall 2002).

Dessa forma, estudos de tolerância a metais devem ser feitos, tanto com isolados de fungos provenientes de áreas contaminadas por metais, como, ainda, com isolados não expostos a suas altas concentrações para resolver contradições. Existe um potencial no estudo e utilização de fungos micorrízicos na tolerância de plantas ao excesso de metais. A idéia de que a associação simbiótica está relacionada com a tolerância ao excesso de metais é uma hipótese deslumbrante e que se faz necessário um melhor entendimento.

Agradecimentos

À FAPES pela bolsa de iniciação científica de Amanda A. Bertolazi e de Mestrado de Gabriela C. Canton e Wolmen O. Santos. O Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia é suportado com recursos dos projetos universais FAPES/45434484/09 e CNPq/475436/2010-5 e também FUNADESP 07/2010.

Referências

- Abreu CA, Abreu MF e Andrade JC. Determinação de cobre, ferro, manganês, zinco, cádmio, cromo, níquel e chumbo em solos usando a solução DTPA em pH 7,3. In: Raij V (Ed) **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo.
- Accioly AMA e Siqueira JO (2000) Contaminação química e biorremediação do solo. In: Novaes RF, Alvarez VHV e Schaefer CEGR **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: UFV, pp 299-352.
- Accioly AMA (2001) **Amenizantes e estratégias para estabelecimento de vegetação em solos de áreas contaminadas por metais pesados**. Tese

- de Doutorado. Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.
- Bago B, Donaire JP e Azcón-Aguilar C (1997) ATPase activities of root microsomes from mycorrhizal sunflower (*Helianthus annuus*) and onion (*Allium cepa*) plants. **New Phytologist**. 136: 305-311.
- Baker AJM (1987) Metal tolerance. **New Phytologist**. 106: 93-111.
- Baker AJM, McGrath SP, Sodoli CMD e Reeves RD (1994) The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metalaccumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**. 11: 41-49.
- Bell AA e Wheeler MH (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Phytopathology**. 24: 411-451.
- Bellei M e Carvalho MS (1992) Ectomicorrizas. In: Cardoso EJBN, Tsai SM e Neve MCP **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, pp. 297-318.
- Bellei M (1987) **Micorrizas de Eucalyptus spp. em viveiros e florestas de Santa Catarina**. Florianópolis: UFSC.
- Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez, D e Chalot M (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **Microbiology Letters**. 254: 173-181.
- Bellote AFJ e Ferreira CA (1993) Nutrientes minerais e crescimento de árvores adubadas de *Eucalyptus grandis*, na região do cerrado, no Estado de São Paulo. **Boletim Pesquisa Florestal**. 26/27: 17-28.
- Benite AMC, Machado SP e Barreiro EJ (2007) Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Química Nova**. 30: 2062-2067.
- Bisinoti MC, Yabe MJS e Gimenez SMN (2004) Avaliação da influência de metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina – PR. **Revista Analytica**. 8: 22-27.
- Brown MT e Wilkins DA (1985) Zinc tolerance of mycorrhizal Betula. **New Phytologist**. 99: 101-106.
- Carneiro MAC, Siqueira JO e Moreira FMS (2001) Estabelecimento de plantas herbáceas em solos com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 36: 1443-1452.
- Chen BD, Li XL, Tao HQ, Christie P e Wong MH (2003) The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. **Chemosphere**. 50: 839-846.
- Colpaert JV e Van Assche JA (1992) Zinc toxicity in ectomycorrhizal Pinus sylvestris. **Plant and Soil**. 143: 201-211.
- Colpaert JV e Van Assche JA (1993) The effects of cadmium on ectomycorrhizal Pinus sylvestris L.. **New Phytologist**. 123: 325-333.
- Courbot M, Diez L, Ruotolo R, Chalot M e Leroy P (2004) Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Environmental Microbiology**. 70: 7413-7417.
- Cunningham SD, Anderson TA, Schwab AP e Hsu FC (1996) Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advance in Agronomy**. 56: 55-114.
- Dixon RK e Buschena CA (1988) Response of ectomycorrhizal Pinus banksiana and Picea glauca to heavy metals in soil. **Plant Soil**. 105: 265-271.
- Ferrol N, Pozo MJ, Antelo M e Azcón-Aguilar C (2002) Arbuscular mycorrhizal symbioses regulate plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**. 53: 1683-1687.
- Fogarty RV e Tobin JM (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. **Enzyme and Microbial Technology**. 19: 311-317.
- Gadd GM e De Rome L (1988) Biosorption of Cooper by fungal melanin. **Applied Microbiology Biotechnology**. 29: 610-617.
- Gadd GM (1993) Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**. 124: 25-60.
- Galli U, Schuepp H e Brunold C (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. **Plant Physiology**. 92: 364-368.
- Giller KE, Witter E e McGrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**. 30: 1389-1414.
- Godbold DL, Jentschke G, Winter S e Marschner P (1998) Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees. **Chemosphere**. 36: 757-762.
- Grazziotti PH, Siqueira JO, Moreira FM e Carvalho D (2001) Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 25: 839-848.
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of experimental Botany**. 53: 1-11.
- Hartley J, Cairney JWG e Meharg AA (1997) Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptative tolerance to potentially toxic metals in the environment?. **Plant and Soil**. 189: 303-319.
- Hocking PJ, Pate JS, Wee SC e McComb AJ (1977) Mn nutrition of Lupins spp. Especially in relation to developing seeds. **Ann Bot**. 41: 677-688.
- Jones MD e Hutchinson TC (1986) The effect of mycorrhizal infection on the response of Betula papyrifera to nickel and copper. **New Phytologist**. 102: 429-442.
- Khan AG, Kuek C, Chaudhry TM, Khoo CS e Hayes WJ (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**. 41: 197-207.
- Kistner C e Parniske M (2002) Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. **Trends in Plant Science**. 7: 511-518.
- Macedo LS e Morril WBB (2008) Origem e comportamento dos metais fitotóxicos: revisão de literatura. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**. 2: 29-38.
- Martins I e Lima IV (2001) Ecotoxicologia do manganês e seus compostos. **Cadernos de referencia ambiental**. 7: 1-122.
- Marx D. **Forest application of the ectomycorrhizal fungus Pisolithus tinctorius**. Stockholm: The Marcus Wallenberg Prize.
- Matos RMB, Silva EMR e Lima E. **Fungos micorrízicos e nutrição de plantas**. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, 1999.
- Melariato M, Panobianco M, Vitti GC e Vieira RD (2002) Manganês e potencial fisiológico de sementes de soja. **Ciência Rural**. 32: 1069-1071.
- Morselt AFW, Smits WTM e Limonard T (1986) Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**. 96: 417-420.
- Murphy RJ e Levy JF (1983) Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. **Transactions of the British Mycological Society**. 81: 165-168.
- Natale W, Prado RM, Corrêa MCM, Silva MAC e Pereira L (2002) Resposta de mudas de goiabeira à aplicação de zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 24: 770-773.
- Nehls U (2008) Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. **Journal of Experimental Botany**. 59: 1097-1108.
- Portillo F (2000) Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1469: 31-42.
- Ramos AC, Martins MC e Façanha AR (2005) Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microsomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. 29: 207-213.
- Rausser WE (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants – the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. **Cell Biochemistry and Biophysics**. 31: 19-48.

- Ray P, Tiwari R, Reddy UG e Adholeya A (2005) Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi in vitro. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**. 21: 309-315.
- Requena N, Breuninger M, Franken P e Ocón A (2003) Symbiotic Status, Phosphate, and Sucrose Regulate the Expression of Two Plasma Membrane H⁺-ATPase Genes from the Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. **Plant Physiology**. 132: 1540-1549.
- Rivera-Bacerril F, Calantzis C, Turnau K, Caussanel JP, Belimov AA, Gianinazzi S, Strasser RJ e Gianinazzi-Pearson V (2002) Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. **Journal of Experimental Botany**. 53: 1177-1185.
- Rosolem CA e Ferelli L (2000) Resposta diferencial de cultivares de algodão ao manganês em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 24: 355-361.
- Santos LC (2006) **Efeito do cobre na população de bactérias e fungos do solo, associação ectomicorrizica e no desenvolvimento de mudas de Eucalipto e Canafístula**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências do Solo, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.
- Sgarbi F e Silveira RLVA. **Monitoramento nutricional e da fertilidade do solo em plantios de eucalipto na Votorantim Celulose e Papel, no sul do estado de São Paulo**. Relatório de pesquisa da Votorantim Celulose e Papel, 2001.
- Silva RF, Salles AS, Leal LT, Lupatini M, Moro CAJ e Antonioli ZI (2007) Ectomicorriza na Tolerância de Mudas de Canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. a Solo Contaminado por Cobre. In: **XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, Gramado.
- Silva S, Siqueira JO e Soares CRFS (2006) Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 41: 1749-1757.
- Smith SE e Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis. **Biologia Plantarum**. 40: 154-154.
- Soares CRFS, Graziotti PH, Siqueira JO, Carvalho JG e Moreira FMS (2001) Toxicidade de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 36: 339-348.
- Sodré FF e Lenzi, E (2001) Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. **Química Nova**. 24: 324-330.
- Sodré FF, Lenzi E e Costa ACS (2001) Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. **Química Nova**. 24: 324-330.
- Soratto RP, Silva TRB, Borghi E, Silva LM e Rosolem CA (2005) Resposta de quatro cultivares de feijão ao manganês em solução nutritiva. **Revista Brasileira Agrociência**. 11: 235-240.
- Souza LAB, Filho GNS e Oliveira VL (2004) Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 39: 349-355.
- Souza VC, Silva RA, Cardoso GD e Barreto AF (2006) Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. 10: 612-618.
- Sutter HP, Jones EBG e Walchli O (1983) The mechanism of copper tolerance in *Poria placenta* (Fr.) Cke and *Poria caillantii* (Pers.) Fr. **Material und Organismen**. 18: 243-263.
- Taiz L e Zeiger E (2004) **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed.
- Tam PCF (1995) Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. **Mycorrhiza**. 5: 181-187.
- Targhetta BL (2008) **Tolerância de fungos ectomicorrízicos e plantas associadas a níveis tóxicos de metais**. Monografia. Curso de graduação em Ciências Biológicas, Universidade federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
- Teixeira IR, Borém A, Araújo GAA e Andrade MJP (2005) Teores de nutrientes e qualidade fisiológica de sementes de feijão em resposta à adubação foliar com manganês e zinco. **Bragantia**. 64: 83-88.
- Van Assche F e Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell and Environment**. 13: 195-206.
- Van Tichelen KK, Colpaert JV e Vangronsveld J (2001) Ectomycorrhiza protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. **New Phytologist**. 150: 203-213.
- Vangronsveld J, Colpaert JV e Tichelen KK (1997) Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physicochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. **Environmental Pollution**. 94: 131-140.
- Vansteveninck RFM, Vansteveninck ME, Fernando DR, Goldbold DL, Horst WJ e Marschner H (1987) Identification of zinc-containing glogules in roots of a zinc-tolerant ecotype of *Deschampsia caespitosa*. **Journal of Plant Nutrition**. 10: 1239-1246.
- Weissenhorn I, Glashoff A, Leyval C e Berthelin J (1994) Diferencial tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. **Plant and Soil**. 167: 189-196.
- Wheeler W (1994) Site Remediation: An Australian perspective on best practice. In: Cole J (Ed) **Environmental Management Industry Association of Australia Year Book**. Waterloo: Executive Media Pty. Ltd. pp 156-160.