

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**PAPEL DOS ÁCIDOS HÚMICOS NA REGULAÇÃO DO
CRESCIMENTO E IONOMA DE DUAS ESPÉCIES DE FUNGOS
ECTOMICORRÍZICOS CRESCENDO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE FERRO**

FREDERICO JACOB EUTRÓPIO

VILA VELHA
DEZEMBRO / 2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**PAPEL DOS ÁCIDOS HÚMICOS NA REGULAÇÃO DO
CRESCIMENTO E IONOMA DE DUAS ESPÉCIES DE FUNGOS
ECTOMICORRÍZICOS CRESCENDO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE FERRO**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutor em Ecologia.

FREDERICO JACOB EUTRÓPIO

VILA VELHA
DEZEMBRO / 2014

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

E91p Eutrópio, Frederico Jacob.

Papel dos ácidos húmicos na regulação do crescimento e ionoma de duas espécies de fungos ectomicorrízicos crescendo em diferentes concentrações de ferro / Frederico Jacob Eutrópio. – 2014.

61 f.: il.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

Tese (Doutorado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Substâncias húmicas. 2. Ectomicoriza. 3. Sulfato ferroso. I. Ramos, Alessandro Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

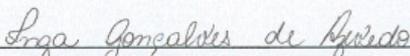
FREDERICO JACOB EUTRÓPIO

**PAPEL DOS ÁCIDOS HÚMICOS NA REGULAÇÃO DO
CRESCIMENTO E IONOMA DE DUAS ESPÉCIES DE FUNGOS
ECTOMICORRÍZICOS CRESCENDO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE FERRO**

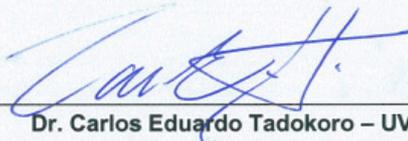
Tese apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em
Ecologia de Ecossistemas, para a
obtenção do título de Doutor em
Ecologia.

Aprovada em 19 de dezembro de 2014,

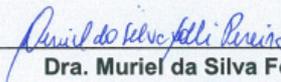
Banca Examinadora:



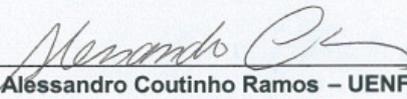
Dra. Inga Gonçalves de Azevedo – UENF



Dr. Carlos Eduardo Tadokoro – UVV



Dra. Muriel da Silva Folli Pereira – UVV



Dr. Aléssandro Coutinho Ramos – UENF
Orientador

Dedico este trabalho aos meus queridos avós maternos (*in memoriam*) Henrique Jacob e Laura Jacob e avós paternos (*in memoriam*) Duílio Eutrópio e Edith Eutrópio.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela proteção do dia-a-dia.

A Universidade Vila Velha – UVV, pela possibilidade de realização dos trabalhos de doutorado.

Aos meus familiares pelo apoio, incentivo e por entender minha ausência durante esta jornada, em especial ao meu pai José, minha mãe Vanilda e meus irmãos Arthur e José Rodolfo.

A minha querida Chuchuzinha Juliana por suportar minha ausência e me confortar nos momentos de pressão. TE AMO!

A minha querida sogra Marli e ao meu sogro Edson por todo carinho e atenção durante o meu doutorado e pelo doce de banana enviado a Portugal!

Ao Pablo, Gabriela, Isabela, Pedro, Araceli, Joselito, Mauro, Tânia, Sergio, Isaura e Maria Angela pelo apoio e incentivo!

Aos amigos do handebol, em especial Artur Ferron pelo companheirismo, pela amizade e pelo apoio durante meu doutorado sanduiche!

Ao meu querido orientador Alessandro Coutinho Ramos, com toda certeza, sem você nada disso teria acontecido. Obrigado por todo carinho, atenção, ensinamentos e principalmente pela AMIZADE! Serei eternamente grato por tudo o que fez por mim!

A Adriana e aos filhos Arthur e ao Andre (esposa e filhos do Alessandro), por sempre me receberem de braços abertos com um sorriso no rosto. Saibam que a ajuda de vocês foi primordial para a conclusão deste doutorado. Desculpa ter tomado tantas noites de trabalho do nosso querido Alessandro. Obrigado por todo carinho!

A minha querida orientadora de Portugal, Profa. Cristina Cruz, por ter me aceitado em seu laboratório, pela recepção em Portugal, pela oportunidade de trabalho, pelo constante otimismo com os resultados da pesquisa.

A Herculana Velez pelo carinho em me receber em sua casa durante a estadia em Portugal e pela excelente convivência no laboratório da profa Cristina. Você foi uma verdadeira mãe para mim! Obrigado por tudo!

A Marta Delgado, Raquel Costa, Patrícia Correia, Luiz, Idoia, professora Manuela Carolino, professora Margarida, Silvana, Florian, Catarina e todos da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa por todo carinho, atenção e amizade!

Ao meu querido amigo Cesar Abel Krohling e sua querida família (Dalva, Caio, Camila e Niele) pela amizade, pelas conversas e por todo apoio durante o doutorado.

Ao Marco Antônio Oliva Cano pelos ensinamentos sobre ferro. Obrigado por tudo!

Ao Leonardo Barros Dobbss pelos ensinamentos sobre substâncias húmicas. Muito obrigado!

A Zilma Maria Almeida Cruz por todo carinho, pelo apoio e pela amizade!

Ao Carlos Eduardo Tadokoro e a Muriel da Silva Folli Pereira, pela amizade e suporte durante o doutorado!

Aos professores do Doutorado em Ecologia de Ecossistemas pelo aprendizado e dedicação.

Ao Adriano e Dodora por me acolher em sua casa durante as idas a UENF.

Aos colegas Romildo, Sávio, Frederico Firme, Antônio, Juliana, Gabriela, Vivian, Ariane, Douglas, Marcelo Renan, Thécio, Janaina Biral, Érica, Gisele, Monique Cominote, Rayssa pela amizade que surgiu.

Aos Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB) e do Laboratório de imunobiologia (LIB)

A FAPES pela bolsa de doutorado concedida e a CAPES pela bolsa sanduiche. Sem esse suporte seria impossível o doutorado. Muito Obrigado!

*“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre
ombros de gigantes”*
Isaac Newton

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	5
1.1 REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO I: Influência da fonte de ferro no crescimento micelial de duas espécies de fungos ectomicorrízicos.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3. RESULTADOS.....	19
4. DISCUSSÃO.....	24
5.CONCLUSÃO.....	26
6. REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO II: Efeito do ferro e de ácidos húmicos no crescimento e ionoma de fungos ectomicorrízicos	32
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3. RESULTADOS.....	41
4. DISCUSSÃO.....	51
5. CONCLUSÃO.....	53
6. REFERÊNCIAS.....	54

RESUMO

EUTRÓPIO, Frederico Jacob. Universidade Vila Velha - ES, dezembro de 2014. **Papel dos ácidos húmicos na regulação do crescimento e ionoma de duas espécies de fungos ectomicorrízicos crescendo em diferentes concentrações de ferro.** Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

Os fungos ectomicorrízicos desempenham um papel importante nos ecossistemas florestais atuando na decomposição da matéria orgânica e disponibilização de nutrientes essenciais para as plantas hospedeiras, principalmente, em solos contaminados por metais. Além das associações ectomicorrízicas, os ácidos húmicos (AHs) também estimulam o crescimento vegetal por apresentar atividade tipo hormonal, disponibilizar nutrientes e atuar como agente quelante de metais. Isto sugere que os AHs e os fungos ectomicorrízicos possam ser aplicados não apenas na agricultura, mas também em programas de remediação de solos contaminados com metais. Por isso, o objetivo deste estudo foi verificar a influência de diferentes fontes de ferro (FeIII-citrate, FeIII-EDTA, FeCl₃ e FeSO₄) e da presença (200 mg.L⁻¹) ou ausência (0 mg.L⁻¹) de AHs, sob diferentes concentrações de ferro, no crescimento micelial e o ionoma de duas espécies de fungos ectomicorrízicos (*Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus*). Os resultados revelaram que para a mesma concentração de Fe o crescimento de *P. albus* e *P. tinctorius* foi afetado significativamente pela fonte de ferro presente no meio de cultura. A fonte que se dissocia no meio na forma de Fe²⁺ (FeSO₄) foi mais tóxica aos fungos que aquelas que se dissociaram na forma Fe³⁺ (FeIII-citrate, FeCl₃, FeIII-EDTA). Ambas as espécies fúngicas apresentaram maior crescimento em meio com FeIII-EDTA ou Fe-Citrato. A espécie *P. tinctorius* foi mais suscetível a elevadas concentrações de ferro (4 e 6 mM Fe) quando comparada a espécie *P. albus*, a qual apresentou crescimento compatível com tolerância a elevadas concentrações de ferro no meio (4 e 6 mM Fe), independente da fonte utilizada. Independente da presença de AHs o crescimento micelial de *P. tinctorius* e *P. albus* diminuiu com o aumento da concentração de Fe a partir de 4 mM. O tratamento com AHs estimulou o crescimento micelial de *P. tinctorius*, em todas as concentrações de ferro (0 - 6 mM). Por outro lado, o crescimento de *P. albus* não apresentou estimulação significativa com o tratamento com AHs, exceto na concentração de 2mM Fe. Em relação a biomassa fúngica, na concentração de 0 mM de ferro, os AHs estimularam em 37% e 105% a biomassa seca de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus*,

respectivamente e com o aumento das concentrações de ferro o efeito positivo dos AHs diminuiu para 20% em *P. tinctorius* e 6% em *P. albus* em 4 mM de Fe. O fungo *P. albus* tem potencial para ser utilizado na micorrização de plantas em zonas contaminadas com Fe. Em relação ao ionoma, os AHs aumentam as correlações de macro e micronutrientes principalmente em *P. albus*.

Palavras-chave: *P. tinctorius*; *P. albus*; toxicidade por ferro; sulfato ferroso; substâncias húmicas

ABSTRACT

EUTRÓPIO, Frederico Jacob. University Vila Velha - ES, december 2014. **Role of humic acids in the regulation of growth and ionome of two species of ectomycorrhizal fungi growing in different iron concentrations.** Advisor: Alessandro Coutinho Ramos.

The ectomycorrhizal fungi develop an important role in forest ecosystems acting on organic matter decomposition and nutrient availability to host plants, especially under soil metal contamination. Besides the Ectomycorrhizal association, the humic acids (HAs) also stimulate plant growth by its hormonal-like activity and providing essential nutrients or acting as metal chelating agent. This fact suggests that HAs and ectomycorrhizal fungi can be applied not only in agriculture, but also in remediation programs of contaminated soils with metals. Therefore, the objective of this study was to verify the influence of different iron sources (FeIII-citrate, FeIII-EDTA, FeCl₃ and FeSO₄) and the presence (200 mg.L⁻¹) or absence (0 mg.L⁻¹) of HAs under different iron concentrations, on mycelial growth and ionome of two species of ectomycorrhizal fungi (*Pisolithus tinctorius* and *Pisolithus albus*). The results showed that for the same concentration of Fe, the growth of *P. albus* and *P. tinctorius* was significantly affected by the iron source present in the culture medium. The source that dissociate in the middle in the form of Fe²⁺ (FeSO₄) showed to be more toxic to the fungus than those dissociated as Fe³⁺ (FeIII-citrate, FeCl₃, FeIII – EDTA). Both fungal species showed higher mycelial growth in medium with FeIII-Fe-EDTA or citrate. The *P. tinctorius* specie was more susceptible to high iron concentrations (4 and 6 mM Fe) when compared to the species *P. albus*, which presented growth compatible with tolerance to high iron concentrations (4 and 6 mM Fe), independently of the iron source. Regardless on the presence of Has, the mycelial growth of *P. tinctorius* and *P. albus* decreases with the increasing Fe concentration from 4 mM Fe. The treatment with HAs stimulated the mycelial growth of *P. tinctorius* in all iron concentrations. On the other hand, the growth of *P. albus* showed no significant stimulation with treatment with AHs, except at a concentration of 2 mm Fe. Fungal biomass, at 0 mM Fe, the AHs stimulated in 37% and 105% the dry biomass of *P. tinctorius* and *P. albus*, respectively, and with the increasing of iron concentrations in the medium reduced the positive effect of HAs about 20% for *P. tinctorius* and 6% for *P. albus* at 4 mM Fe. The fungus *P. albus* has the potential to

be used in the micorrização of plants in areas contaminated with Fe. The treatment with HAs changed the fungal ionome mainly in *P. albus*.

Keyword: *Pisolithus tinctorius*; *Pisolithus albus*; iron toxicity; ferrous sulphate; humic substance

1. INTRODUÇÃO GERAL

As emissões de poluentes atmosféricos por indústrias de minério de ferro podem afetar a vegetação do entorno da indústria em vários níveis de organização, desde indivíduos isolados até populações inteiras de várias espécies (Kuki et al. 2008; Neves et al. 2009).

Em condições aeróbicas no solo, o Fe está presente na forma de óxidos e hidróxidos ou na forma de quelatos orgânicos na forma de íon férrico (Fe^{3+}) que são insolúveis (Neubauer et al. 2013). Portanto, a concentração de Fe na solução do solo é muito baixa na maioria dos solos e, conseqüentemente, plantas e microrganismos desenvolveram mecanismos para mobilizá-lo e permitir a sua captação (Hell e Stephan 2003; Philpott 2006; Kim e Guerinot 2007).

O nível de toxicidade em uma planta ou microrganismo depende, geralmente, da concentração dos metais ou do seu papel nos processos bioquímicos (Hall 2002; Hall e Williams 2003; Rascio e Navari-Izzo 2011). 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 (Schützendübel e Polle 2002; Göhre e Paszkowski 2006; Nagajyoti et al. 2010; Ali et al. 2013; Ovečka e Takáč 2014; de Araújo et al. 2014), bloqueio de enzimas de grupos funcionais de moléculas biologicamente importantes, por exemplo, os sistemas de transporte de nutrientes essenciais (Philpott 2006; Kim e Guerinot 2007; Gusmão et al. 2013), 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 (remoção e tratamento do solo) ou biológicas (Khan et al. 2000; Ali et al. 2013), as duas técnicas são muito utilizadas entretanto, a biológica, preserva os microrganismos úteis, bactérias solubilizadoras e fungos micorrízicos, assim como a fauna existente no local, mantendo o equilíbrio ecológico e a funcionalidade do solo (Altieri 1999; Finlay 2008; Kuki et al. 2008).

As associações simbióticas mutualistas estabelecidas entre plantas superiores e fungos específicos são chamadas de ectomicorrizas (ECMs). Estas interações planta-fungo aumentam a área de solo explorada pelas raízes na captura

e fornecimento de água e nutrientes, principalmente do fósforo (P), através do prolongamento das hifas no solo e da modificação da arquitetura das raízes (Smith e Read 2008). Os fungos ectomicorrízicos se diferenciam na sua influência a 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 à *Laccaria laccata* em areia contendo NiCl (Jones e Hutchinson 1986). Já o fungo *Pisolithus tinctorius* é muito conhecido pela sua ampla distribuição mundial e ampla diversidade de hospedeiros num ecossistema florestal.

Os fungos ectomicorrízicos também participam de processos de degradação da matéria orgânica do solo e respondem positivamente ao incremento da relação C/N *in vivo* e *in vitro* (Plassard et al. 2011; Pritsch e Garbaye 2011). Deve-se destacar que a maior parte da matéria orgânica do solo é formada pelas substâncias húmicas, que compreendem compostos orgânicos heterogêneos sem classificação bioquímica clara, produzidos como subprodutos do metabolismo microbiano (Piccolo 2001).

As substâncias húmicas são amplamente reconhecidas como reguladoras do crescimento vegetal, tal como as associações micorrízicas, e têm destaque no desenvolvimento radicular (Nardi et al. 2002). Além do estímulo no crescimento radicular, as substâncias húmicas estão associadas a disponibilização de nutrientes e atuação como agente quelante de metais (Vallini et al. 1993; Canellas et al. 2002; Chen et al. 2004; Evangelou et al. 2007). Isto sugere que os AHs possam ser aplicados não apenas na agricultura, mas também em programas de remediação de solos contaminados com metais (Atiyeh et al. 2002; Nardi et al. 2002; Arancon et al. 2005; Arancon et al. 2006).

Nesse contexto, a seleção de fungos ECMs tolerantes a elevadas concentrações de ferro, apresenta-se como uma alternativa biotecnológica inovadora capaz de promover ganhos no setor florestal e também na recuperação de áreas degradadas. A hipótese deste trabalho é que a aplicação de substâncias húmicas em fungos ectomicorrízicos, via respostas ecofisiológicas, torne os fungos mais tolerantes a ambientes contaminados com ferro.

1.1 REFERÊNCIAS

- Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals--concepts and applications. *Chemosphere* 91:869–881.
- Altieri MA (1999) The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ* 74:19–31.
- Arancon NQ, Edwards C a., Bierman P, et al. (2005) Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field. *Pedobiologia (Jena)* 49:297–306.
- Arancon NQ, Edwards C a., Lee S, Byrne R (2006) Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. *Eur J Soil Biol* 42:S65–S69.
- Atiyeh RM, Lee S, Edwards C a, et al. (2002) The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresour Technol* 84:7–14.
- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha, Anna LFaçanha AR (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol* 130:1951–1957.
- Chen Y, Clapp CE, Magen H (2004) Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Sci Plant Nutr* 50:1089–1095.
- De Araújo TO, de Freitas-Silva L, Santana BVN, et al. (2014) Tolerance to iron accumulation and its effects on mineral composition and growth of two grass species. *Environ Sci Pollut Res Int* 21:2777–84.
- Evangelou MWH, Ebel M, Schaeffer A (2007) Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 68:989–1003.
- Finlay RD (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J Exp Bot* 59:1115–26.
- Göhre V, Paszkowski U (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223:1115–22.
- Gusmão E, Antonio M, Rosado-souza L, et al. (2013) Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Sci* 201-202:81–92.

- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53:1–11.
- Hall JL, Williams LE (2003) Transition metal transporters in plants. *J Exp Bot* 54:2601–13.
- Hell R, Stephan UW (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216:541–51.
- Jones MD, Hutchinson TC (1986) The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. *New Phytol* 102:429–442.
- Khan a. ., Kuek C, Chaudhry T., et al. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41:197–207.
- Kim S a, Guerinot M Lou (2007) Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett* 581:2273–80.
- Kuki KN, Oliva M a, Pereira EG (2008) Iron ore industry emissions as a potential ecological risk factor for tropical coastal vegetation. *Environ Manage* 42:111–21.
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8:199–216.
- Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, Vianello A (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol Biochem* 34:1527–1536.
- Neubauer E, Schenkeveld WDC, Plathe KL, et al. (2013) The influence of pH on iron speciation in podzol extracts: iron complexes with natural organic matter, and iron mineral nanoparticles. *Sci Total Environ* 461-462:108–16.
- Neves NR, Oliva MA, Centeno D da C, et al. (2009) Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. *Sci Environ* 407:3740–3745.
- Ovečka M, Takáč T (2014) Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. *Biotechnol Adv* 32:73–86.
- Philpott CC (2006) Iron uptake in fungi : A system for every source. *Biochim Biophys Acta* 1763:636–645.
- Piccolo A (2001) The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci* 166:810–832.
- Plassard C, Louche J, Ali M a., et al. (2011) Diversity in phosphorus mobilisation and uptake in ectomycorrhizal fungi. *Ann For Sci* 68:33–43.

- Pritsch K, Garbaye J (2011) Enzyme secretion by ECM fungi and exploitation of mineral nutrients from soil organic matter. *Ann For Sci* 68:25–32.
- Rascio N, Navari-Izzo F (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci* 180:169–81.
- Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351–65.
- Smith SE, Read D (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, Third Edit. 815.
- Vallini G, Pera A, Avio L, et al. (1993) Influence of humic acids on laurel growth, associated rhizospheric microorganisms, and mycorrhizal fungi. *Biol Fertil Soils* 16:1–4.

CAPÍTULO I

Influência da fonte de ferro no crescimento micelial de duas espécies de fungos ectomicorrízicos

EUTRÓPIO, Frederico Jacob. Universidade Vila Velha - ES, dezembro de 2014. **Influência da fonte de ferro no crescimento micelial de duas espécies de fungos ectomicorrízicos.** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

RESUMO

Fungos desenvolveram três mecanismos de absorção de ferro para evitar tanto a sua insolubilidade como sua toxidez: (1) acidificação do meio, (2) redução de ferro férrico (Fe^{3+}) para ferroso (Fe^{2+}) a forma mais solúvel, e (3) a secreção de moléculas ferro-quelantes solúveis. O objetivo deste estudo foi verificar qual a influência de diferentes fontes de ferro (FeIII-citrate, FeIII-EDTA, FeCl_3 e FeSO_4) e concentrações (0; 1; 2; 4; 6 mM) no crescimento micelial de duas espécies de fungos ectomicorrízicos (*Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus*). Os resultados revelaram que para a mesma concentração de Fe o crescimento de *P. albus* e *P. tinctorius* foi afetado significativamente pela fonte de ferro presente no meio de cultura. Foi observado que a fonte que se dissociou no meio na forma de Fe^{2+} (FeSO_4) foi mais tóxica aos fungos que aquelas que se dissociaram na forma Fe^{3+} (Fe III-citrate, FeCl_3 , FeIII-EDTA). Ambas as espécies fúngicas cresceram mais em meio com FeIII-EDTA ou Fe-Citrato. A espécie *P. tinctorius* foi mais suscetível a elevadas concentração de ferro (4 e 6 mM) quando comparada a espécie *P. albus*, a qual apresentou crescimento compatível com tolerância a elevadas concentrações de ferro no meio (4 e 6 mM), independente da fonte utilizada. Os resultados obtidos indicam que *P. Albus* tem potencial para ser utilizado na micorrização de plantas em zonas contaminadas com Fe, dado que a utilização de fungos micorrízicos tolerantes a elevadas concentrações de ferro é uma técnica viável para programas de

reflorestamento com inoculação controlada em áreas com elevadas concentrações de íon metálico.

Palavras-chave: *Pisolithus tinctorius*; *Pisolithus albus*; citrato de ferro (III); cloreto férrico; sulfato ferroso; Fe(III)-EDTA

1. INTRODUÇÃO

O ferro apresenta uma elevada demanda biológica sendo um elemento essencial tanto para seres eucariota como para procariota (Johnson 2008; Kobayashi e Nishizawa 2012). Ele está diretamente envolvido em processos fundamentais como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e de hormônios (Gurzau et al. 2003; Vigani 2012).

Apesar de abundante na natureza, a biodisponibilidade do ferro é limitada devido a formação de óxidos e hidróxidos, que são insolúveis em condições aeróbicas (Arantes e Milagres 2007; Marschner et al. 2011). Em condições fisiológicas, o ferro pode ser encontrado sob a forma reduzida (Fe^{2+}) ou oxidada (Fe^{3+}) sendo absorvido somente na forma reduzida (Krewulak e Vogel 2008). Entretanto, em solos ácidos, onde o baixo pH propicia um aumento da disponibilidade de Fe^{2+} (Lemanceau et al. 2009; Fodor et al. 2012) o ferro deixa de ser um nutriente essencial para ser um elemento tóxico, onde o excesso de Fe^{2+} é potencialmente prejudicial para a célula devido a formação de radicais livres gerados pela reação de Fenton (Ravet et al. 2009; Kobayashi e Nishizawa 2012; Gusmão et al. 2013).

Devido às suas propriedades redox, os microrganismos desenvolveram mecanismos para a manutenção e preservação da homeostase do ferro para evitar tanto uma deficiência (Quatrini et al. 2005; Legay et al. 2012) quanto um possível estresse oxidativo (Danièle Touati 2000; Philpott 2006; Haas et al. 2008; Adeleke et al. 2012).

Os fungos desenvolveram três mecanismos distintos para solubilização e captação de ferro, (1) acidificação do meio, (2) redução de ferro férrico (Fe^{3+}) para ferroso (Fe^{2+}) a forma mais solúvel, e (3) a secreção de moléculas ferro-quelantes solúveis. Cada espécie fúngica emprega estas estratégias em graus diferentes e de formas distintas (Yun et al. 2000; Kosman 2003; Machuca et al. 2007; Arantes e Milagres 2007; Kornitzer 2009; Adeleke et al. 2012).

Dentro dos limites de tolerância de cada espécie a fonte de ferro (Fe^{2+} , Fe^{3+} ou Fe-quelato) oferecida ao fungo não influencia o seu desenvolvimento, uma vez que o fungo ativa os mecanismos de solubilização e captação por forma a obter a homeostasia (Philpott 2006). Todavia o funcionamento destes mecanismos de captação em condições elevadas de ferro pode não ser suficiente para evitar a toxicidade férrica (Johnson 2008).

Ectomicorrizas podem aumentar a capacidade de crescimento das plantas na presença de metais tóxicos, acumulando esses contaminantes nas hifas reduzindo assim a absorção para a planta (Ray et al. 2005; Khade e Adholeya 2008). No entanto, os mecanismos envolvidos em conferir este aumento de tolerância têm-se revelado difíceis de resolver, pois espécies diferentes ou isolados diferentes de uma mesma espécie fúngica podem apresentar respostas distintas a diferentes contaminantes (Krpata et al. 2008; Bojarczuk e Kieliszewska-rokicka 2010; Reis et al. 2012). Por isso, o uso de diferentes fontes de um contaminante pode elucidar os mecanismos usados pelas ectomicorrizas para captar nutrientes e evitar a toxicidade. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi determinar a influência de diferentes fontes e concentrações de Fe no crescimento micelial de duas espécies de fungos ectomicorrízicos do gênero *Pisolithus* (*Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus*).

2. MATERIAL E METODOS

Material biológico

O fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Isolado Pt24) foi obtido da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). *Pisolithus albus* (isolado ES01) foi coletado em um latossolo vermelho-amarelo de um plantio de eucalipto em Biriricas (20°22'16"S/40°35'08") no município de Marechal Floriano-ES.

Preparo do meio de cultura

Para o preparo do meio MNM - Merlin Norkrans Modificado (Marx, 1969) foram adicionados os seguintes reagentes para 1L de meio: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g.L⁻¹), NaCl (0,025 g.L⁻¹), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,15 g.L⁻¹), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,15 g.L⁻¹), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g.L⁻¹), KH_2PO_4 (0,125 g.L⁻¹), Tiamina (300 µL.L⁻¹), 15 g de agar-ágar, 10 g de glicose, 2 g de peptona, 2 g de extrato de levedura, 100 µL.L⁻¹ de tampão MES (0,5 M) e 0,055 g.L⁻¹ de Cloranfenicol. Em seguida o pH foi ajustado para 5,5-5,6 e autoclavado a 121° C por 30 minutos. No preparo das placas foram adicionados 20 mL de meio de cultura em placas de Petri (10 x 100 mm), as quais foram incubadas na ausência de luz, à temperatura de 28±1°C em incubadora BOD. A cultura dos isolados foi transferida a cada 15 dias para meio fresco de igual composição. A biodisponibilidade dos nutrientes do meio MNM foi estimada pelo programa Visual Minteq 2.53 (Tabela 1) (Ward et al. 2008; Ramos et al. 2009).

Fontes de ferro e análise do crescimento

A fonte de ferro Fe²⁺ utilizada foi FeSO_4 (Sigma-Aldrich), para Fe³⁺ utilizaram-se FeCl_3 (Sigma-Aldrich) e Fe(III)-citrate (Sigma-Aldrich), e para Fe-quelato usou-se Fe(III)-EDTA (Sigma-Aldrich). Para todas as fontes de ferro, as concentrações utilizadas foram 0; 1; 2; 4 e 6 mM de Fe. A influência das distintas concentrações de Fe na disponibilidade dos restantes íons encontra-se na tabela 1. Em cada concentração de ferro utilizaram-se cinco repetições e duas espécies de fungos, o *Pisolithus tinctorius* (Isolado Pt24) e o *Pisolithus albus* (Isolado ES01). Como meio de cultura utilizou-se o meio Merlin Norkrans Modificado - MNM (Marx, 1969). O crescimento micelial foi aferido de dois em dois dias durante 13 dias por avaliação do diâmetro da colônia com auxílio de uma régua com precisão de 0,1 cm.

A porcentagem de inibição ou estimulação do crescimento micelial foi aferida de acordo com a fórmula: $PCM = [(CiFe - CfFe)/CiFe] \times 100$. onde:

PCM é a porcentagem do crescimento micelial, se negativo foi considerado inibição e se positivo considerado estimulação.

CiFe é a concentração inicial de ferro, no estudo foi de 0mM de Fe;

CfFe são as outras concentrações de ferro testadas (1; 2; 4; e 6 mM).

A concentração inibitória (IC50) e a concentração estimulatória (EC) foram as concentrações que inibiram o crescimento ou estimularam o crescimento em 50%

Tabela 1. Concentração iônica (mM) das diferentes fontes de ferro usadas no meio de cultura MNM (Marx, 1969). O estado não associado livre do íon é, na maioria dos casos, assumido ser a forma biodisponível do íon. As previsões foram realizadas pelo Visual Minteq v.2.53 (Ward et al. 2008; Ramos et al. 2009).

Fonte	Fe	Ca ²⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	H ₂ PO ₄ ⁻	NH ₄ ⁺	Mg ²⁺	SO ₄ ²⁻	Fe ²⁺
	(mM)	mM								
Fe-citrato	0	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	0.0
	1	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	1.0
	2	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	2.0
	4	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	4.0
	6	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	6.0
FeCl ₃	0	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	0.0
	1	0.38	4.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	1.0
	2	0.38	7.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	2.0
	4	0.38	13.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	4.0
	6	0.38	19.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	6.0
Fe-EDTA	0	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	0.0
	1	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	1.0
	2	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	2.0
	4	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	4.0
	6	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	6.0
FeSO ₄	0	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	0.0
	1	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	1.608	1.0
	2	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	2.608	2.0
	4	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	4.608	4.0
	6	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	6.608	6.0

Análise estatística

A influência das diferentes fontes de ferro no crescimento fúngico foi comparada por regressões não lineares e para a análise das diferenças entre as espécies fúngicas em cada concentração de Fe, utilizou-se o teste t de Student ($p < 0,05$). Foi determinada a concentração inibitória (IC_{50}) e a concentração estimulatória (EC) de cada espécie fúngica.

3. RESULTADOS

Duas espécies de fungos ectomicorrízicos do mesmo gênero, cultivadas na presença de diferentes fontes de ferro, apresentaram padrões de crescimento distintos (Figuras 1 e 2). Na presença de Fe(III)-citrate e FeCl₃, nas concentrações de 4 e 6 mM, a espécie *Pisolithus albus* apresentou um crescimento micelial significativamente superior ($p < 0,05$) ao da espécie *Pisolithus tinctorius* (Figura 1A, B). Por outro lado, apenas na concentração de 1 mM Fe(III)-citrate e FeCl₃, o crescimento micelial da espécie *P. tinctorius* foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao de *P. albus* (Figura 1A, B). Em todas as concentrações de Fe(III)-citrate e FeCl₃ analisadas, a espécie *P. albus* apresentou estimulação do crescimento micelial que oscilou de 4.49 a 35.15% (Tabela 3).

Em relação as concentrações de Fe-EDTA, a espécie *P. tinctorius* apresentou um maior crescimento se comparada a espécie *P. albus* ($p < 0.05$), além disso, esta espécie apresentou elevadas porcentagens de estimulação no crescimento que variou de 27.78 a 35.86% (Figura 1C, Tabela 3).

A disponibilidade de ferro na forma de FeSO₄ induziu uma inibição significativa ($p < 0.05$) no crescimento micelial da espécie *P. tinctorius* e nenhum efeito sobre a espécie *P. albus* ($p > 0.05$) na concentração de 6 mM Fe. A espécie *P. tinctorius* apresenta uma diminuição significativa ($p < 0.05$) do crescimento micelial com o aumento da concentração de Fe nas fontes Fe(III)-citrate, FeCl₃ e FeSO₄, o mesmo não ocorre com a espécie *P. albus* ($p > 0.05$). Os resultados revelaram que em fungos crescendo na presença da fonte FeSO₄, apresentaram uma maior produção de melanina (Figura 2).

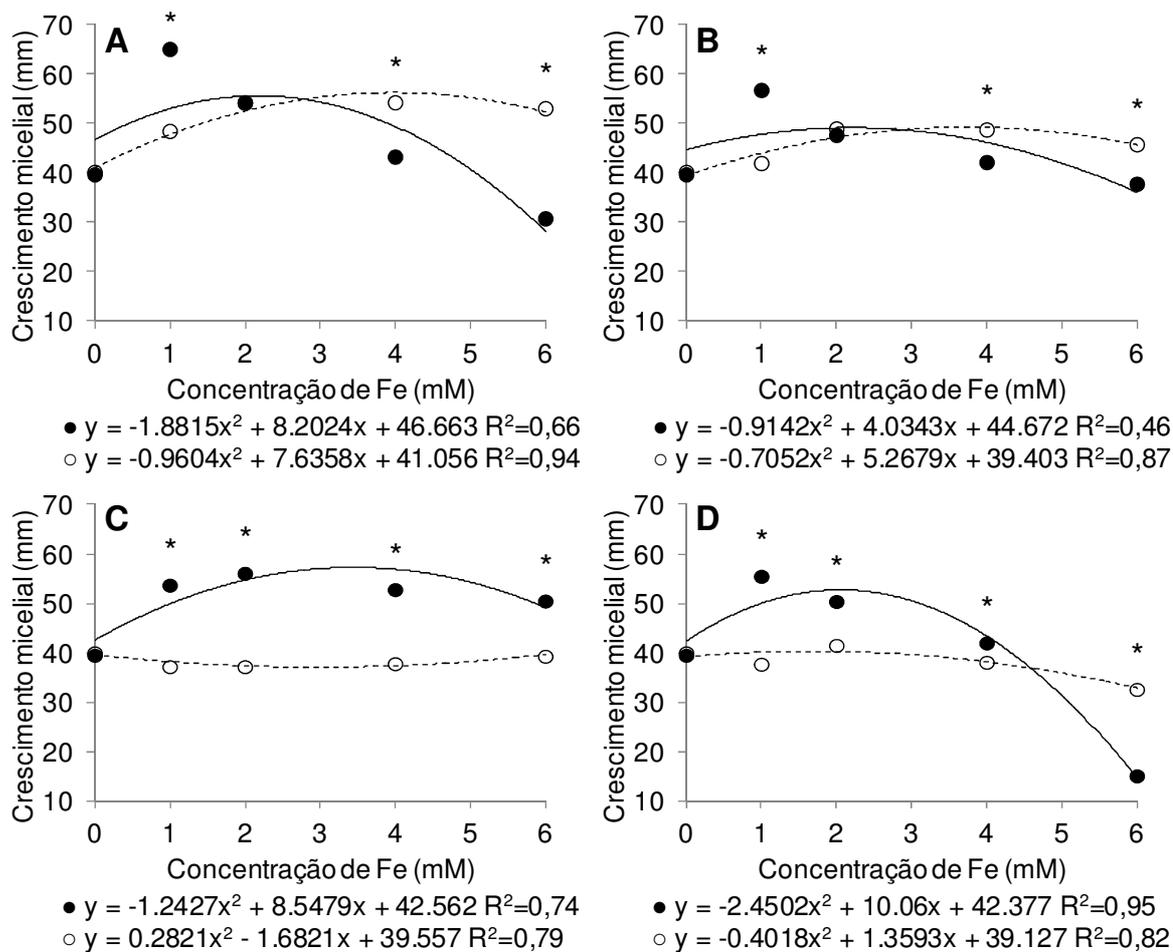


Figura 1. Média do crescimento micelial dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* (●) e *Pisolithus albus* (○) aos 13 dias em meio MNM contendo diferentes concentrações e fontes de íons ferro. A Fe(III)-citrato; B FeCl₃; C Fe(III)-EDTA; D FeSO₄. * Diferença significativa pelo teste t Student ($p < 0,05$; $n = 5$) entre *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* para cada fonte de ferro.

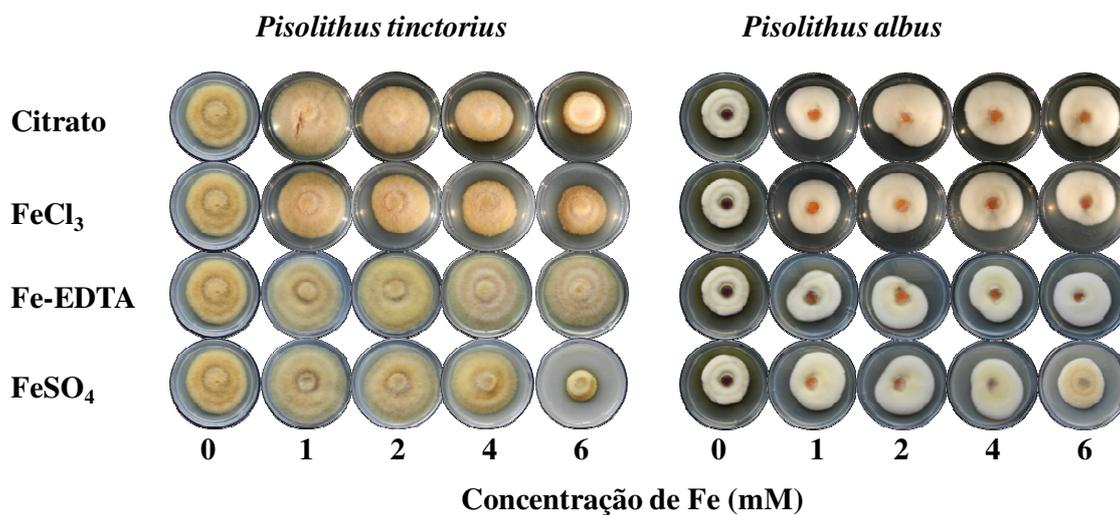


Figura 2. Experimento *in vitro* do crescimento dos fungos *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* por 13 dias em meio MNM sólido nas diferentes concentrações das fontes de íons ferro.

Os resultados da análise de especiação química no meio de cultura dos fungos evidenciam que o cálcio, o fósforo, o magnésio e o enxofre podem sofrer alterações na sua biodisponibilidade na fonte de ferro FeSO₄ (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativa de biodisponibilidade (%) das diferentes fontes de ferro usadas no meio de cultura MNM (Marx, 1969). O estado não associado livre do íon é, na maioria dos casos, assumido ser a forma biodisponível do íon. As estimativas foram realizadas pelo Visual Minteq v.2.53 (Ward et al. 2008; Ramos et al. 2009).

Fonte	Fe	Ca ²⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	H ₂ PO ₄ ⁻	NH ₄ ⁺	Mg ²⁺	SO ₄ ⁻²	Fe ²⁺
	(mM)	%								
Fe-citrato	0	89.99	99.72	99.36	99.32	95.30	99.57	93.12	89.65	0.00
	1	85.92	99.73	99.36	99.32	93.89	99.56	88.68	89.99	0.00
	2	84.25	99.73	99.36	99.32	93.31	99.56	86.87	90.13	0.00
	4	81.97	99.74	99.36	99.32	92.51	99.56	84.40	90.32	0.00
	6	80.28	99.75	99.36	99.32	91.92	99.56	82.57	90.46	0.00
FeCl ₃	0	89.99	99.72	99.36	99.32	95.30	99.57	93.12	89.65	0.00
	1	90.95	99.73	99.34	99.30	72.46	99.58	93.21	90.24	0.00
	2	91.59	99.74	99.30	99.25	55.84	99.59	93.15	90.76	0.00
	4	92.20	99.75	99.16	99.12	36.02	99.61	92.76	91.64	0.00
	6	92.33	99.77	99.00	98.95	25.88	99.63	92.20	92.35	0.00
Fe-EDTA	0	89.99	99.72	99.36	99.32	95.30	99.57	93.12	89.65	0.00
	1	90.15	99.73	99.36	99.32	95.29	99.57	93.24	89.84	0.00
	2	90.30	99.73	99.37	99.33	95.28	99.57	93.36	90.01	0.00
	4	90.58	99.73	99.38	99.34	95.26	99.58	93.58	90.34	0.00
	6	90.83	99.74	99.38	99.34	95.24	99.59	93.77	90.63	0.00
FeSO ₄	0	89.99	99.72	99.36	99.32	95.30	99.57	93.12	89.65	0.00
	1	84.68	99.72	99.14	99.01	78.71	98.99	88.29	86.11	55.61
	2	80.99	99.72	98.94	98.74	67.39	98.51	84.92	83.02	57.33
	4	76.04	99.70	98.60	98.28	53.29	97.73	80.39	78.18	58.89
	6	72.78	99.68	98.30	97.89	44.92	97.09	77.38	74.62	59.28

Tabela 3. Porcentagem de inibição(-) ou estimulação (+), concentração inibitória (IC₅₀) e concentração estimulatória (EC) do crescimento de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* em diferentes concentrações e fontes de íons ferro.

Fungos	Concentração de Fe (mM)	Fe(III)-citrate	FeCl ₃	Fe(III)-EDTA	FeSO ₄
		(%)			
<i>Pisolithus tinctorius</i>	0	-	-	-	-
	1	+64.14 a	+43.18 a	+35.86 a	+40.40 a
	2	+36.87 b	+20.20 b	+41.92 a	+27.53 a
	4	+9.09 c	+6.31 bc	+33.59 a	+6.31 b
	6	-22.47 d	-4.80 c	+27.78 a	-61.62 c
	IC ₅₀ (mM)	8	3.5	nd	2.4
	EC (mM)	2.18	2.21	nd	2.05
<i>Pisolithus albus</i>	0	-	-	-	-
	1	+20.70 a	+4.49 bc	-6.98 a	-5.74 a
	2	+34.91 a	+21.95 a	-6.98 a	+3.74 a
	4	+35.16 a	+21.45 a	-5.49 a	-4.74 a
	6	+32.17 a	+13.97 ab	-1.75 a	-18.45 b
	IC ₅₀ (mM)	nd	nd	nd	nd
	EC (mM)	nd	nd	nd	nd

Para cada espécie, letras minúsculas dentro de uma mesma coluna, indica diferença significativa pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$; $n = 5$) e Tukey ($p < 0,05$). nd - não determinado.

4. DISCUSSÃO

Tanto *P. tinctorius* como *P. albus* cresceram nas fontes de ferro testadas, entretanto somente a fonte FeSO_4 causou inibição no crescimento micelial nas duas espécies, porém em menor escala no espécie *P. albus*. A fonte de ferro FeSO_4 é a única que apresenta o ferro na sua forma biodisponível (Fe^{2+}) e que apesar dos fungos conseguirem captar o ferro em uma ampla variedade de formas, como íons livre (Fe^{2+} e Fe^{3+}), quelatos de ferro, sideróforo, etc (Philpott 2006), o Fe^{2+} quando em excesso é responsável pela formação de radicais livres pela reação de Fenton, causando estresse nos fungos e conseqüentemente uma inibição no crescimento micelial (Johnson 2008; Shah et al. 2013).

A diminuição da biodisponibilidade de íons Ca^{2+} com o aumento da concentração de ferro (Tabela 2) pode ser outro fator que contribuiria para um menor crescimento micelial na fonte FeSO_4 , já que o cálcio é um dos elementos responsáveis pelo transporte de ânions em células eucariotas e as hifas das ectomicorrizas necessitariam de elevado gradiente de Ca^{2+} para promover o crescimento das hifas (Ramos et al. 2009; Riquelme et al. 2011). Outro nutriente importante para o processo energético da célula e para o desenvolvimento micelial do fungo é o fósforo e para aumentar a biodisponibilidade de fósforo o fungo libera no meio ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido malônico, ácido láctico, etc.) e com isso aumenta a disponibilidade de Fe^{2+} e conseqüentemente agrava a toxicidade por ferro (Adeleke et al. 2010).

Em ectomicorrizas, um dos mecanismos descritos para captação do ferro é a formação de um quelato (sideróforo ou ácido orgânico) o que evitaria a formação de radicais livres e facilitaria a absorção do metal (Illmer e Buttinger 2006; Johnson 2008; Haselwandter 2008; Kobayashi e Nishizawa 2012; Gusmão et al. 2013). Das fontes estudadas, duas apresentam o ferro na forma quelada, Fe(III)-EDTA e Fe(III)-citrate e ambas promoveram um maior crescimento micelial em *P. tinctorius* e *P. albus*. O uso de agentes quelantes (sideróforo) beneficia a captação do ferro quando em escassez desse elemento no ambiente e também atuaria em condições de estresse, formando um complexo Fe^{3+} -sideróforo, facilitando assim o armazenamento do ferro intracelular (Arantes e Milagres 2007; Aliasgharad et al. 2009; Harrington et al. 2011).

Outra via possivelmente utilizada pelos fungos para complexar metais e evitar a toxicidade, é a utilização de melanina, fato observado na fonte FeSO_4 na

concentração de 6 mM para as espécies *P. tinctorius* e *P. albus*. A melanina é um pigmento que está associado a proteção dos organismos a estressores ambientais (Gonçalves et al. 2012), sendo primordial na ajuda ao fungo para tolerar elevadas concentrações de contaminantes (Fogarty e Tobin 1996; De Luca e Wood 2000; Branquinho et al. 2011). Apesar da melanina ser um mecanismo usado por fungos para quelar o ferro, o uso de sideróforos neste contexto é mais mencionado na literatura (De Luca e Wood 2000; Kosman 2003; Frey-Klett et al. 2005; Philpott 2006; Illmer e Buttinger 2006; Aliasghar zad et al. 2009; Harrington et al. 2011). Sendo a produção de sideróforo importante para aumentar a tolerância a toxicidade por ferro, o tipo de sideróforo produzido (hidroxamatos, hidroxicarboxilatos, ferricromo, ferricrocina por exemplo), com maior ou menor afinidade ao ferro, explicaria diferenças na tolerância ao ferro entre *P. tinctorius* e *P. albus* (Johnson 2008; Haselwandter 2008).

5. CONCLUSÕES

A fonte FeSO_4 foi a que apresentou maior toxicidade por apresentar mais de 59% do Fe^{2+} biodisponível (Tabela 1) aumentando assim a formação de radicais livres pela reação de Fenton. A produção de melanina é um mecanismo alterativo ao excesso de metal que não foi quelado.

P. tinctorius foi mais sensível ao ferro que *P. albus* entretanto mais estudos devem ser realizados a fim de identificar quais mecanismos estão envolvidos no processo de tolerância a toxidez por ferro.

6. REFERENCIAS

- Adeleke R a, Cloete TE, Bertrand A, Khasa DP (2012) Iron ore weathering potentials of ectomycorrhizal plants. *Mycorrhiza* 22:535–544. doi: 10.1007/s00572-012-0431-5
- Adeleke R a., Cloete TE, Bertrand a., Khasa DP (2010) Mobilisation of potassium and phosphorus from iron ore by ectomycorrhizal fungi. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1901–1913. doi: 10.1007/s11274-010-0372-0
- Aliasghar zad N, Shirmohamadi E, Oustan S (2009) Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. *Soil environmental* 28:119–123.
- Arantes V, Milagres AMF (2007) Identification of iron-regulated cellular proteins, Fe³⁺-reducing and -chelating compounds, in the white-rot fungus *Perenniporia medulla-panis*. *Can J Microbiol* 53:1323–1329. doi: 10.1139/W07-102
- Bojarczuk K, Kieliszewska-rokicka B (2010) Effect of Ectomycorrhiza on Cu and Pb Accumulation in Leaves and Roots of Silver Birch (*Betula pendula* Roth .) Seedlings Grown in Metal-Contaminated Soil. *Water Air Soil Pollut* 207:227–240. doi: 10.1007/s11270-009-0131-8
- Branquinho C, Matos P, Vieira AR, et al. (2011) The relative impact of lichen symbiotic partners to repeated copper uptake. *Environ Exp Bot* 72:84–92. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.09.016
- Danièle Touati (2000) Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Arch Biochem Biophys* 373:1–6.
- De Luca N, Wood P (2000) Iron uptake by fungi: contrasted mechanisms with internal or external reduction. *Adv Microb Physiol* 43:39–74.
- Fodor F, Kovács K, Czech V, et al. (2012) Effects of short term iron citrate treatments at different pH values on roots of iron-deficient cucumber: a Mössbauer analysis. *J Plant Physiol* 169:1615–1622. doi: 10.1016/j.jplph.2012.04.012
- Fogarty R V, Tobin JM (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb Technol* 19:311–317.
- Frey-Klett P, Chavatte M, Clause M-L, et al. (2005) Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytol* 165:317–328. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01212.x

- Gonçalves RCR, Lisboa HCF, Pombeiro-Sponchiado SR (2012) Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1467–1474. doi: 10.1007/s11274-011-0948-3
- Gurzau ES, Neagu C, Gurzau AE (2003) Essential metals - case study on iron. *Ecotoxicol Environ Saf* 56:190–200. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00062-9
- Gusmão E, Antonio M, Rosado-souza L, et al. (2013) Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Sci* 201-202:81–92.
- Haas H, Eisendle M, Turgeon BG (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol* 46:149–187. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094338
- Harrington JM, Winkelmann G, Haselwandter K, Crumbliss AL (2011) Fe(III)-complexes of the tripodal trishydroxamate siderophore basidochrome: potential biological implications. *J Inorg Biochem* 105:1670–1674. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.08.010
- Haselwandter K (2008) Structure and function of siderophores produced by mycorrhizal fungi. *Mineral Mag* 72:61–64. doi: 10.1180/minmag.2008.072.1.61
- Illmer P, Buttinger R (2006) Interactions between iron availability, aluminium toxicity and fungal siderophores. *Biometals* 19:367–377. doi: 10.1007/s10534-005-3496-1
- Johnson L (2008) Iron and siderophores in fungal – host interactions. *Mycol Res* 112:170–183. doi: 10.1016/j.mycres.2007.11.012
- Khade SW, Adholeya A (2008) Effects of heavy metal (Pb) on arbuscular mycorrhizal fungi in vitro. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1663–1668. doi: 10.1007/s11274-008-9681-y
- Kobayashi T, Nishizawa NK (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 63:131–152. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105522
- Kornitzer D (2009) Fungal mechanisms for host iron acquisition. *Curr Opin Microbiol* 12:377–383. doi: 10.1016/j.mib.2009.05.005
- Kosman DJ (2003) MicroReview Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *47:1185–1197*.
- Krewulak KD, Vogel HJ (2008) Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta* 1778:1781–1804. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.026

- Krpata D, Peintner U, Langer I, et al. (2008) Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. *Mycol Res* 112:1069–1079. doi: 10.1016/j.mycres.2008.02.004
- Legay S, Guignard C, Ziebel J, Evers D (2012) Iron uptake and homeostasis related genes in potato cultivated in vitro under iron deficiency and overload. *Plant Physiol Biochem* 60:180–189. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.08.003
- Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat J-F (2009) Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant Soil* 321:513–535. doi: 10.1007/s11104-009-0039-5
- Machuca A, Pereira G, Aguiar A, Milagres a MF (2007) Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations. *Lett Appl Microbiol* 44:7–12. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02046.x
- Marschner P, Crowley D, Rengel Z (2011) Soil Biology & Biochemistry Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis e model and research methods. *Soil Biol Biochem* 43:883–894. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.01.005
- Philpott CC (2006) Iron uptake in fungi : A system for every source. *Biochim Biophys Acta* 1763:636–645. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.008
- Quatrini R, Lefimil C, Holmes DS, Jedlicki E (2005) The ferric iron uptake regulator (Fur) from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* 151:2005–2015. doi: 10.1099/mic.0.27581-0
- Ramos AC, Lima PT, Dias PN, et al. (2009) A pH signaling mechanism involved in the spatial distribution of calcium and anion fluxes in ectomycorrhizal roots. *New Phytol* 181:448–462.
- Ravet K, Touraine B, Boucherez J, et al. (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J* 57:400–412. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03698.x
- Ray P, Tiwari R, Reddy UG, Adholeya A (2005) Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi in vitro. *World J Microbiol Biotechnol* 21:309–315. doi: 10.1007/s11274-004-3572-7
- Reis FS, Ferreira ICFR, Martins A (2012) Effect of the mycorrhizal symbiosis time in the antioxidant activity of fungi and *Pinus pinaster* roots, stems and leaves. *Ind Crops Prod* 35:211–216. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.06.038

- Riquelme M, Yarden O, Bartnicki-Garcia S, et al. (2011) Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha - a model cell for polarized growth. *Fungal Biol* 115:446–474. doi: 10.1016/j.funbio.2011.02.008
- Shah F, Rineau F, Canbäck B, et al. (2013) The molecular components of the extracellular protein-degradation pathways of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol* 200:875–887. doi: 10.1111/nph.12425
- Vigani G (2012) Discovering the role of mitochondria in the iron deficiency-induced metabolic responses of plants. *J Plant Physiol* 169:1–11. doi: 10.1016/j.jplph.2011.09.008
- Ward JT, Lahner B, Yakubova E, et al. (2008) The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiol* 147:1181–1191. doi: 10.1104/pp.108.118562
- Yun CW, Tiedeman JS, Moore RE, Philpott CC (2000) Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J Biol Chem* 275:16354–16359. doi: 10.1074/jbc.M001456200

CAPÍTULO II

Efeito do ferro e de ácidos húmicos no crescimento e ionoma de fungos ectomicorrízicos

EUTRÓPIO, Frederico Jacob. Universidade Vila Velha - ES, dezembro de 2014. **Efeito do ferro e de ácidos húmicos no crescimento e ionoma de fungos ectomicorrízicos.** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

RESUMO

Os fungos ectomicorrízicos e os ácidos húmicos (AHs) estimulam o crescimento vegetal por apresentar atividade tipo hormonal, disponibilizar nutrientes e atuar como agente quelante de metais. Isto sugere que os AHs e os fungos ectomicorrízicos possam ser aplicados não apenas na agricultura, mas também em programas de bioremediação de solos contaminados com metais. Por isso, o objetivo do presente trabalho foi verificar se a presença de AHs altera o crescimento e o ionoma de duas espécies de fungos ectomicorrízicos crescidas sob elevadas concentrações de ferro. Independente da presença de ácidos húmicos crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* diminui com o aumento da concentração de Fe a partir de 4 mM. O tratamento com AHs estimulou o crescimento micelial de *P. tinctorius*, em todas as concentrações de ferro (0 - 6 mM). Por outro lado, o crescimento de *P. albus* não apresentou estimulação significativa com o tratamento com AHs, exceto na concentração de 2mM Fe. Em relação a biomassa, na concentração de 0 mM de ferro, os AHs estimularam em 37% e 105% a biomassa seca de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus*, respectivamente e com o aumento das concentrações de ferro o efeito positivo dos AHs diminuiu chegando a 20% para o *P. tinctorius* e 6% para *P. albus* na concentração de 4 mM de Fe. Em relação ao ionoma, os AHs aumentam as correlações de macro e micronutrientes principalmente em *P. albus*.

Palavras-chave: *Pisolithus tinctorius*; *Pisolithus albus*; sulfato ferroso; substâncias húmicas; toxicidade por ferro

1. INTRODUÇÃO

Solos contaminados por metais tornaram-se um crescente problema ambiental global devido às atividades antropogênicas, sendo que, as maiores emissões ocorrem durante a produção de aço e ferro, e durante a combustão de combustíveis fósseis (Sharma e Reddy, 2004).

De fato, a atividade de mineração promove alterações ecológicas que varia desde a perda de habitat, pela retirada do minério, até a contaminação ambiental por Fe e Mn, causando alterações em populações de várias espécies (Kuki et al., 2008a, 2008b). Alguns metais pesados como o Fe, Zn, Cu, Ni, Co e Mn são micronutrientes essenciais para a vida nos ecossistemas, porém em altas concentrações podem ser extremamente tóxicos para os diversos organismos (Ott et al., 2002). No entanto, os fungos ectomicorrízicos são relativamente abundantes em algumas áreas contaminadas com metais (Gadd, 1993; Meharg, 2003), pelo que se tem associado este potencial dos fungos ectomicorrízicos à biorremediação de ambientes contaminados com metais Cd, Pb e Ni (Jones e Hutchinson, 1986; Colpaert e Assche, 1993; Van Tichelen et al., 2001; Blaudez et al., 2000; Huffman e Halloran, 2001; Hall, 2002; Krpata et al., 2008; Bojarczuk e Kieliszewska-Rokicka, 2010). Os mecanismos utilizados por estes fungos para tolerar as elevadas concentrações de metais são diversos e podem envolver processos de precipitação e complexação extracelular, adsorção do metal a parede celular, absorção e compartimentalização do metal dentro da célula fúngica (Gadd, 1993; Fomina et al., 2005; Kornitzer, 2009).

Os fungos ectomicorrízicos também desempenham um papel importante nos ecossistemas florestais atuando na decomposição da matéria orgânica e consequente disponibilização de nutrientes para as plantas hospedeiras (Plassard et al., 2011). Estes processos são muito importantes, uma vez que, o crescimento e desenvolvimento de plantas e fungos dependem da disponibilidade balanceada de macro e micronutrientes essenciais. Para lidar com as flutuações nutricionais do ambiente, estes organismos desenvolveram ao longo da sua evolução uma gama de mecanismos homeostáticos para garantir que este balanço seja mantido (Williams e Salt, 2009). Nesse contexto, o ionoma pode refletir o estado fisiológico dos organismos através do balanço iônico no tecido, portanto, a análise das mudanças no ionoma, em decorrência de alterações ambientais, auxilia na identificação das interações entre os estímulos ambientais e o controle da absorção e alocação de nutrientes (Lahner et al., 2003; Salt et al., 2008). Acredita-se que o ionoma de

fungos ectomicorrízicos possa ser modulado pela atividade de enzimas que contribuem não só para o funcionamento da simbiose, mas também para a mobilização de nutrientes e auxiliam no processo de humificação do solo (Pritsch e Garbaye, 2011; Rineau e Courty, 2011).

Os AHs (humina, ácido fúlvico e o ácido húmico; Piccolo, 2001). são macromoléculas com subunidades bioativas e que apresentam atividade tipo hormonal que estimula a atividade de H⁺-ATPase de membrana, disponibilização de nutrientes e atuação como agente quelante de metais (Vallini et al., 1993; Canellas et al., 2002; Chen et al., 2004; Evangelou et al., 2007). Isto sugere que os AHs possam ser aplicados não apenas na agricultura, mas também em programas de remediação de solos contaminados com metais (Nardi et al., 2002; Atiyeh et al., 2002; Arancon et al., 2005, 2006).

Estudos sobre a influência dos AHs sobre o crescimento e estabelecimento da simbiose ectomicorrízica são escassos (Vallini et al., 1993; Gryndler et al., 2005).

O presente trabalho teve como hipótese que a biorremediação de solos contaminados por Fe pode ser potenciada pela aplicação de fungos ectomicorrízicos estimulados com AHs, e como objetivo específico verificar se a presença de AHs interfere no crescimento e no ionoma de duas espécies de fungos ectomicorrízicos em cultura monoaxénica com um gradiente de concentrações de ferro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico e meio de cultura

O fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (isolado 24), originário de Michigan-EUA, foi obtido da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). *Pisolithus albus* (isolado ES01) foi coletado em um solo latossolo vermelho-amarelo de um plantio de eucalipto na cidade de Biriricas (20°22'16"S/40°35'08") no município de Marechal Floriano, estado do Espírito Santo, Brasil.

Discos de ágar de 11 mm contendo micélio de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* foram inoculados em placas de Petri (10 x 100 mm) contendo 25 ml de meio de cultura MNM - Merlin Norkrans Modificado (Marx, 1969), as quais foram incubadas na ausência de luz, à temperatura de 22±1°C em incubadora BOD. Os fungos foram replicados quinzenalmente para manutenção das culturas.

No preparo do meio MNM - Merlin Norkrans Modificado (Marx, 1969) foram adicionados os seguintes reagentes para 1L: CaCl₂.2H₂O (0,05 g.L⁻¹), NaCl (0,025 g.L⁻¹), (NH₄)₂HPO₄ (0,15 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,15 g.L⁻¹), FeCl₃.6H₂O (0,01 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0,125 g.L⁻¹), Tiamina (300 µL.L⁻¹), 15 g de ágar-ágar, 10 g de glicose, 2 g de peptona, 2 g de extrato de levedura, 100 µL.L⁻¹ de tampão MES (0,5 M) e 0,055 g.L⁻¹ de Cloranfenicol, em seguida o pH foi ajustado para 5,5-5,6.

Condições experimentais e especificação do meio de cultura

Micélios de 11 mm de diâmetro foram retirados das extremidades de culturas puras de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* com 20 dias de idade e transferidos para novas placas de Petri (um disco centralizado na placa de Petri) contendo 25 ml de meio MNM especiado para as concentrações de ferro: 0; 0,07, 2 e 4 mM Fe na forma de FeSO₄, com ou sem a presença de 200 mg.L⁻¹ de ácido húmico (88 mg.L⁻¹ de C ou 7,33 mM de C) extraído de vermicomposto. Em todos os tratamentos o pH do meio MNM foi ajustado para 5,5.

O crescimento micelial foi medido de dois em dois dias durante 13 dias através da avaliação do diâmetro da colônia com auxílio de uma régua com precisão de 0,1 cm. A biomassa fúngica foi avaliada pelo peso seco liofilizado.

A análise da especiação iônica de nutrientes e do metal ferro, em meio MNM, foi realizada através do programa Visual MINTEQ versão 2.53 (Ward et al., 2008) com as adaptações de Ramos et al. (2009). Com estas análises estimou-se a biodisponibilidade dos nutrientes no meio de crescimento dos fungos ectomicorrízicos. Por meio destas análises, obteve-se a porcentagem de biodisponibilidade de cada nutriente e de Fe^{2+} (Tabela 1).

Obtenção e caracterização dos AHs

O processo de extração dos AHs seguiu a metodologia descrita pela International Humic Substance Society (Canellas et al., 2002) e foi caracterizado pela composição elementar CHN em analisador elementar automático Perkin Elmer 2400 com amostras de 4 mg de material húmico em duplicata. O conteúdo de oxigênio foi determinado por diferença, descontado os teores de cinzas e de umidade. A acidez total foi determinada pelo método do $\text{Ba}(\text{OH})_2$ com titulação do excesso com HCl, a acidez carboxílica pelo tratamento com $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ e determinação do Ac liberado com NaOH e a fenólica por diferença, i.e. acidez total - carboxílica (Schnitzer e Gupta, 1965). A intensidade de fluorescência foi obtida em solução aquosa das SHs obtidas na concentração de 50 mg.L^{-1} equilibrada a 25°C e $\text{pH} = 8$. Foi utilizado um espectrofotômetro Hitachi F-4500 (Miori et al., 2002). A espectroscopia na região do infravermelho do AH foi realizada na faixa de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , utilizando-se pastilhas com 1 mg do material húmico em 100 mg de KBr, num aparelho Perkin Elmer 1420.

Tabela 1. Concentração iônica (mM) e estimativa de biodisponibilidade (%) das diferentes fontes de ferro usadas no meio de cultura MNM (Marx, 1969) realizada pelo Visual Minteq v.2.53.

Fe ion (mM)	Ca ²⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	H ₂ PO ₄ ⁻	NH ₄ ⁺	Mg ²⁺	SO ₄ ²⁻	Fe ²⁺
	Concentração iônica (mM)								
0	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.608	0
0.07	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	0.678	0.07
2	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	2.608	2
4	0.38	1.188	0.428	0.919	2.055	2.272	0.608	4.608	4
	Estimativa de biodisponibilidade (%)								
0	89.99	99.72	99.36	99.32	95.3	99.57	93.12	89.65	0
0.07	89.54	99.72	99.34	99.29	93.91	99.52	92.71	89.39	53.01
2	80.99	99.72	98.94	98.74	67.39	98.51	84.92	83.02	57.33
4	76.04	99.7	98.6	98.28	53.29	97.73	80.39	78.18	58.89

Isótopos de C/N

Com a finalidade de determinar potenciais efeitos da presença de distintas concentrações de Fe no metabolismo do C e do N dos fungos fez-se a determinação da assinatura isotópica natural do carbono e do azoto. Como fonte de ferro utilizou-se o FeSO₄. As análises de razão de isótopos estáveis foram levadas a cabo no SIAF (Stable Isotopes and Instrumental Analysis Facility) do Centro de Biologia Ambiental (CBA) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. As razões ¹³C/¹²C e ¹⁵N/¹⁴N foram determinadas por espectrometria de massa de razão de isótopos estáveis em modo de fluxo contínuo (CF-IRMS) (Preston e Owens, 1983), num espectrómetro de massas Hydra 20-22 (Sercon, Reino Unido), acoplado a um Analisador Elementar EuroEA (EuroVector, Itália), que efetua a preparação automática das amostras por combustão de Dumas. Foram utilizados os materiais de referência IAEA-CH6 e IAEA-CH7 para as determinações da razão isotópica do Carbono, ao passo que se utilizou os materiais de referência IAEA-N1 e USGS-35 nas determinações da razão isotópica do Nitrogênio; os valores de δ¹³C apresentam-se na escala determinada pelo PeeDee Belemnite (PDB), enquanto que

os valores de $\delta^{15}\text{N}$ se reportam ao Ar atmosférico. A precisão das análises, calculada a partir da análise de 6 a 9 réplicas de padrões de laboratório (Metionina OAS e L-Cistina OAS, Elemental Microanalysis, Reino Unido), intercaladas em cada conjunto de análises, foi igual ou inferior a 0.2%.

Acumulação de macro e micronutrientes na biomassa fúngica

As amostras das espécies *P. tinctorius* e *P. albus* foram crescidos em meio MNM líquido com a presença ou ausência de AHs sob diferentes concentrações de Fe (0; 0,07; 2 e 4 mM de Fe). A determinação do conteúdo de nutrientes no micélio de cada fungo, amostras do micélio foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 70°C até peso constante. As amostras de micélios fúngicos secos foram moidas em moinho e peneirados em peneira com malha de abertura 0,042 mm, para realização da análise química. Os materiais foram digeridos em solução nitroperclórica. Os teores dos nutrientes Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Mo, B, Cl e Zn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, o teor de K, Al e Na, por fotometria de chama (Cottenie, 1989) e o P, colorimetricamente pelo método de Murphy & Riley (1962). Os teores de nitrogênio total das amostras foram determinados pelo método micro Kjeldahl, segundo metodologia descrita por Bremmer & Mulvaney (1982).

Análise estatística dos dados

Para testar o efeito da concentração de Fe no crescimento micelial, utilizou-se o teste de variância (ANOVA) seguido de Tukey. Diferenças significativas do efeito do AH no crescimento micelial de *P. tinctorius* e *P. albus* crescidos em diferentes concentrações de Fe, foi determinado pelo teste t de Student ($p < 0.05$). Uma análise de variância multivariada (MANOVA) com teste de Wilks foi utilizada para comparar a influência da espécie fúngica com a ausência ou presença de AH e diferentes concentrações de Fe em relação ao conteúdo nutricional das espécies fúngicas (*P. tinctorius* e *P. albus*). Uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para relacionar o conteúdo nutricional do micélio fúngico com a concentração de Fe nas duas espécies fúngicas. Para todos os testes, a significância utilizada foi $p = 0.05$. Para as análises de ANOVA, MANOVA, t de Student foi usado o programa Statistica 12 e para a análise multivariada PCA foi usado o programa Fitopac 2.1.2.85.

3. RESULTADOS

O aumento da concentração de Fe para 4 mM diminuiu significativamente ($p < 0.001$) o crescimento micelial de *P. tinctorius* e *P. albus*, independente da presença ou ausência de AHs no meio (Tabela 2 e Figura 1). Entretanto, o tratamento com AHs estimulou o crescimento micelial de *P. tinctorius*, em todas as concentrações de ferro, exceto em 2 mM Fe. Mesmo com o estímulo no crescimento micelial na concentração de 4 mM de Fe, a presença dos AHs não conseguiu evitar a inibição do crescimento micelial causada pelo excesso de Fe. Por outro lado, o crescimento de *P. albus* não apresentou estímulo significativo na presença de AHs, exceto na concentração de 2mM Fe (Tabela 2 e Figura 1).

Ao analisar a biomassa fúngica foi observado que, na ausência de ferro no meio, o tratamento com 200 mg L⁻¹ de ácido húmico estimulou em 36,8 e 105% a biomassa seca de *P. tinctorius* e *P. albus*, respectivamente (Figura 2). Em levadas concentrações de ferro (2 e 4 mM) foi detectado uma inibição do efeito positivo do tratamento com AH na biomassa seca de ambas espécies (Figura 2).

Tabela 2. Crescimento micelial (mm) dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* em meio MNM na presença (AH+) ou ausência (AH-) de 200 mg.L⁻¹ de ácido húmico, em diferentes concentrações de Fe.

Fe (mM)	<i>P. tinctorius</i>		<i>P. albus</i>	
	AH-	AH+	AH-	AH+
0	52.3 a	59.2 b	41.6 ab	43.9 b
0.07	53.7 a	63.8 a	43.3 ab	41.5 b
2	52.6 a	52.7 c	44.9 a	49.7 a
4	22.3 b	26.3 d	38.7 b	40.4 b
F (p < 0.05)	289.0 (0.001)	302.2 (0.001)	11.3 (0.001)	19.2 (0.001)

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre sí, pelo teste de Tukey ($p < 0.05$; $n=5$).

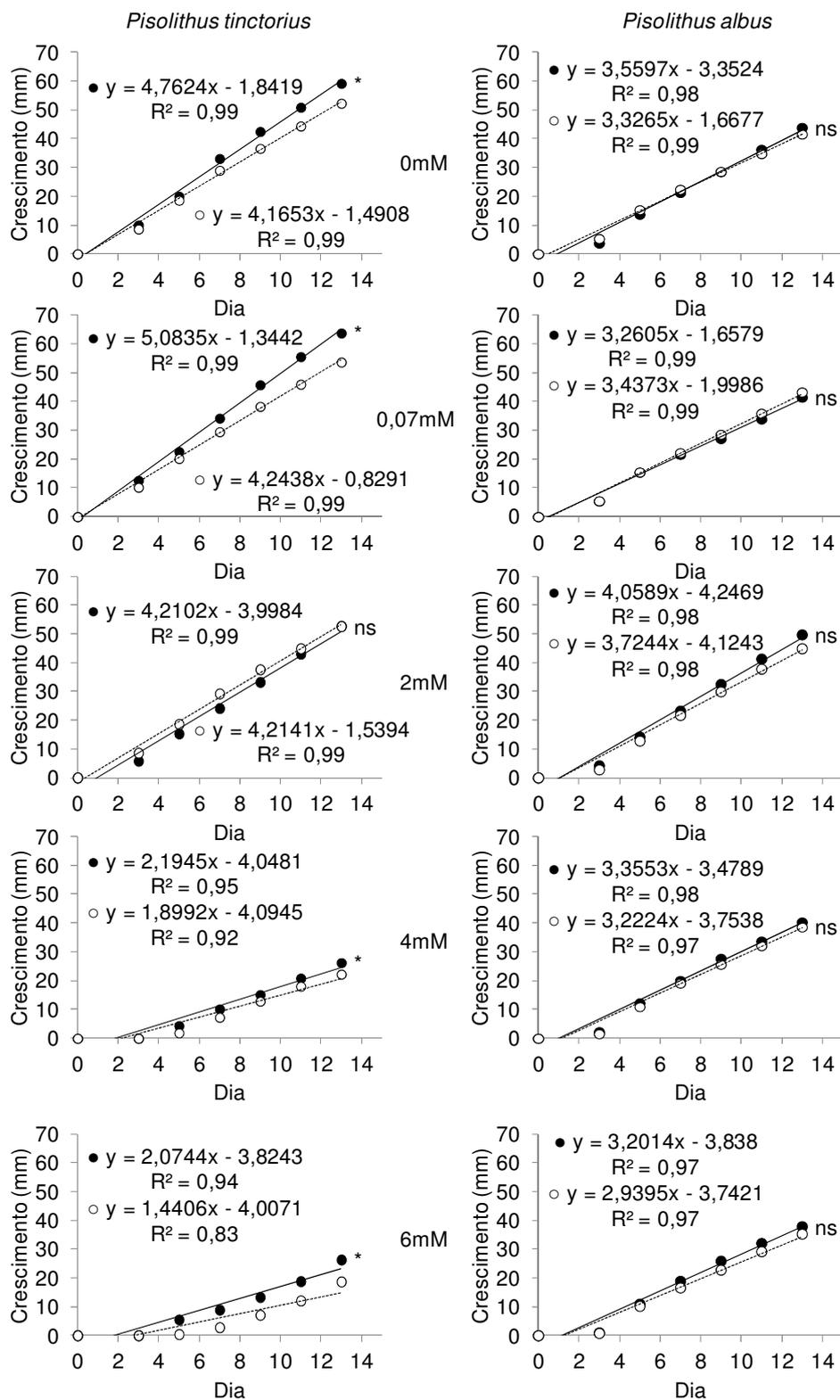


Figura 1. Análise temporal do efeito da presença AH+ (●) ou ausência AH- (○) de ácidos húmicos no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* em meio MNM sólido por 13 dias com diferentes concentrações de Fe (n=5). * indica diferença significativa pelo teste t de Student ($p < 0,05$) e ns = não significativo.

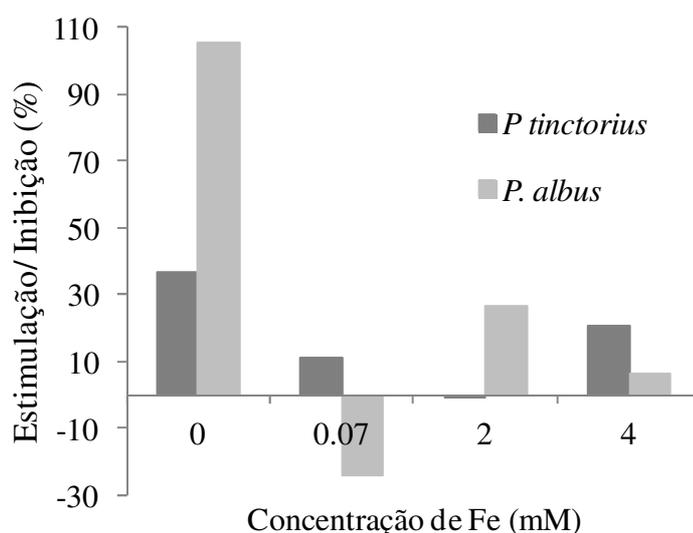


Figura 2. Porcentagem de estimulação ou inibição na biomassa seca de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* crescidos com a presença de 200 mg L⁻¹ de ácido húmico nas diferentes concentrações de Fe. Biomassa seca de fungos não tratados com ácido húmico foi considerada como controle.

As características dos AHs utilizados nos tratamentos indicam um alto grau de condensação estrutural (E4/E6) e a presença de compostos aromáticos e alifáticos, o que contribui para a hidrofobicidade dos AHs (Tabela 3 e Figura 3).

Tabela 3. Composição elementar (C, H, N), conteúdo de oxigênio, acidez total, acidez carboxílica, acidez fenólica e relação COOH/Fenólica dos AHs isolados de vermicomposto utilizados nos tratamentos com AHs.

C	H	N	O	Razões atômicas			IF u.a	E4/E6	Acidez (mmol H+/g)			Relação COOH/Fenólica
				C/N	H/C	O/C			Total	Carboxilica	Fenólica	
44	4,9	4,4	46,7	11,7	1,3	0,8	378,4	4,5	24,2	2,78	21,42	0,13

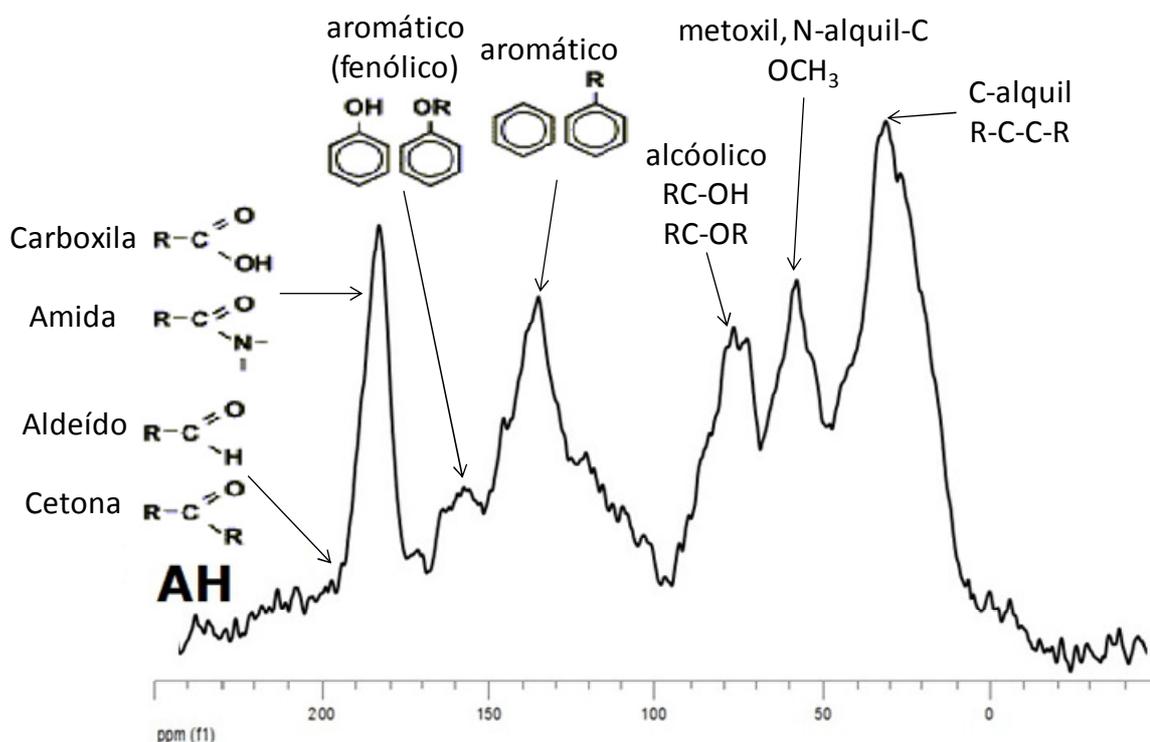


Figura 3. Espectros da região do infravermelho obtidos com transformada de Fourier dos ácidos húmicos (AH) isolados de vermicomposto.

Análise do ionoma dos fungos ectomicorrízicos e do carbono na biomassa fúngica seca revelou que estes foram regulados pela espécie fúngica, pelo AH e pela concentração de ferro, seja isoladamente ou em interações entre estas variáveis (Tabela 4 e 5 e Figura 4) como foi evidenciado pela MANOVA.

Em *Pisolithus albus*, o tratamento com AH nas concentrações de 0 e 2 mM Fe, induziu incrementos no conteúdo de todos os elementos analisados, por outro lado, em *Pisolithus tinctorius*, os maiores incrementos foram observados na dose de 0.07 mM Fe (Tabela 5). *Pisolithus tinctorius* apresentou os maiores conteúdos de N, P, K, S e C se comparado a *Pisolithus albus* (Tabela 5).

Em relação ao conteúdo de Ferro na biomassa fúngica foi observado que *Pisolithus albus* apresentou valores muito inferiores ao de *Pisolithus tinctorius* (Tabela 5, Figura 4).

Tabela 4. Análise de importância das interações entre as variáveis no ionoma das espécies fúngicas realizada pelo teste de MANOVA.

	Wilks	F	df	p
Intercept	0.000322	4772.317	13	0.000000
Fungo	0.027911	53.582	13	0.000000
AH	0.066205	21.700	13	0.000000
Ferro	0.000016	62.870	39	0.000000
Fungo*AH	0.049998	29.232	13	0.000000
Fungo*Ferro	0.000046	43.222	39	0.000000
AH*Ferro	0.000179	26.784	39	0.000000
Fungo*AH*Ferro	0.000054	40.824	39	0.000000

Tabela 5. Conteúdo de nutrientes inorgânicos na biomassa de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* crescidos sem (0 mg L⁻¹) ou com a presença de 200 mg L⁻¹ de ácido húmico em diferentes concentrações de Fe.

Espécie fúngica	AHs (mg.L ⁻¹)	Fe (mM)	Nutrientes (mg.fungo ⁻¹)										
			N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Mn	Zn	Fe
<i>P. tinctorius</i>	0	0	0,91	1,84	3,36	0,34	0,103	0,473	0,0009	0,0005	0,0005	0,011	0,050
		0,07	1,23	1,76	3,18	0,41	0,094	0,573	0,0012	0,0006	0,0005	0,009	0,185
		2	1,24	3,69	2,83	0,33	0,063	0,667	0,0266	0,0057	0,0036	0,010	5,967
		4	0,29	2,02	0,77	0,09	0,009	0,14	0,0202	0,0041	0,0016	0,004	4,665
	200	0	1,17	1,91	3,31	0,37	0,098	0,536	0,0015	0,0009	0,0004	0,011	0,083
		0,07	1,26	2,61	5,84	0,51	0,108	0,766	0,0015	0,0009	0,0008	0,012	0,172
		2	1,35	4,89	2,76	0,30	0,062	0,703	0,0264	0,0061	0,0035	0,010	2,831
		4	0,37	2,34	1,08	0,11	0,018	0,235	0,0222	0,005	0,0022	0,005	5,307
<i>P. albus</i>	0	0	0,30	0,37	0,45	0,08	0,020	0,121	0,0002	0,0003	0,0001	0,004	0,011
		0,07	0,55	0,86	1,23	0,15	0,048	0,222	0,0008	0,0004	0,0002	0,006	0,117
		2	0,30	1,42	0,68	0,09	0,018	0,186	0,0108	0,0025	0,0015	0,004	2,522
		4	0,24	1,55	0,59	0,07	0,012	0,216	0,0102	0,0023	0,0010	0,003	3,103
	200	0	0,52	1,01	1,46	0,17	0,047	0,269	0,0007	0,0007	0,0003	0,006	0,041
		0,07	0,42	0,62	0,76	0,10	0,032	0,174	0,0006	0,0006	0,0002	0,005	0,100
		2	2,18	9,40	5,05	0,55	0,163	1,205	0,0634	0,0093	0,0095	0,034	13,42
		4	0,27	1,56	0,63	0,07	0,013	0,202	0,0124	0,0013	0,0011	0,003	3,074
Teste t de Student *p<0,05													
<i>P. tinctorius</i>		0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*
		0,07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ns
		2	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
		4	ns	ns	*	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	*
<i>P. albus</i>		0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		0,07	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
		2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		4	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns

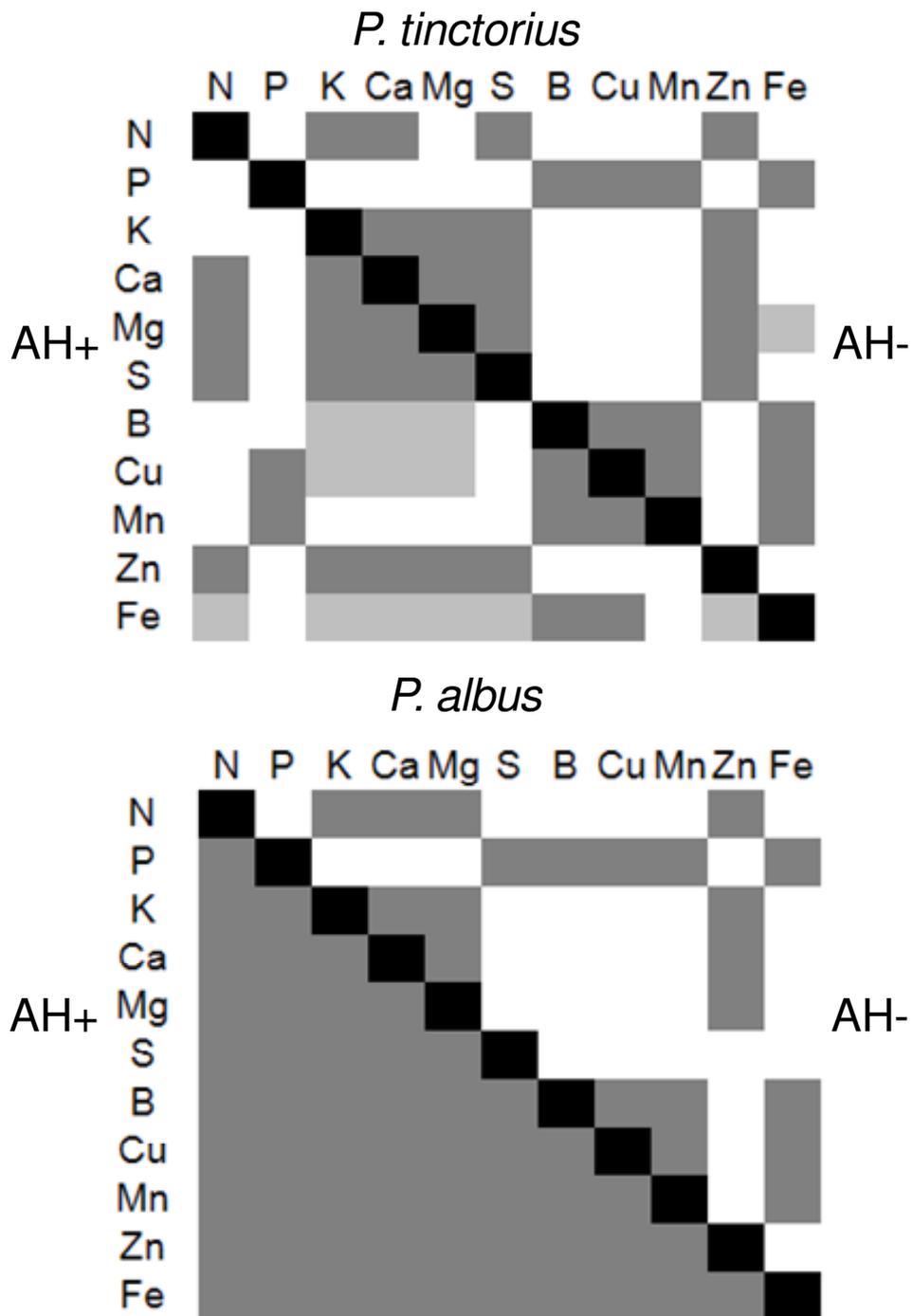


Figura 4. Avaliação do ionoma de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* crescidos com (AH+) ou sem (AH-) a presença de 200 mg L⁻¹ de ácidos húmicos (AH) em diferentes concentrações de Fe. Representação do valor de r das correlações de Pearson entre cada nutriente ■ correlação positiva (R= 1.0-0.5); ■ correlação negativa R=-0.5- -1.0; □ sem correlação (R=0.5 - -0.5)

A análise de isótopos do meio MNM não evidenciou uma discriminação isotópica dos nutrientes com o aumento da concentração de ferro, sendo que ambas as espécies absorvem todos os nutrientes do meio de cultura sem ter preferência por nenhum componente tanto na presença quanto na ausência de AH (Tabela 6).

Tabela 6. Valores dos isótopos no micélio de *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* nas diferentes concentrações de Fe, e na presença (200 mg.L⁻¹) e ausência (0 mg.L⁻¹) de AH em relação aos componentes do meio MNM modificado (Marx, 1969).

HA (mg.L ⁻¹)	Fe (mM)	<i>P. tinctorius</i>		<i>P. albus</i>	
		d15N	d13C	d15N	d13C
0	0	2.8	-13.8	1.7	-14.6
	0.07	2.1	-13.6	1.8	-14.3
	2	2.7	-14.3	2.5	-15.0
	4	3.4	-16.1	2.5	-14.4
200	0	2.3	-13.4	1.6	-13.9
	0.07	2.5	-13.6	1.6	-13.9
	2	2.3	-14.1	2.4	-14.8
	4	2.9	-16.1	2.9	-15.2
Culture Medium		3.0	-17.2	3.0	-17.2
Peptone		6.8	-17.2	6.8	-17.2
Thiamine		0.0	-27.4	0.0	-27.4
(NH ₄) ₂ HPO ₄		1.0	-25.0	1.0	-25.0
Humic Acid		12.2	-22.8	12.2	-22.8
Yeast Extract		0.0	-25.0	0.0	-25.0
Glucose		0.0	-10.9	0.0	-10.9

No micélio de *P. tinctorius* o maior acúmulo de P, Mn, Cu, B e Fe está relacionado com a concentração 2mM de Fe, tanto na presença quanto na ausência de AH, enquanto que os nutrientes S, N, C, Zn, Ca, K e Mg relacionam-se a concentração de 0.07 mM de Fe na presença de AH (Figura 5). Para a espécie *P. albus*, o maior acúmulo de todos os nutrientes está relacionado com a concentração de 2mM de Fe na presença de AH (Figura 6).

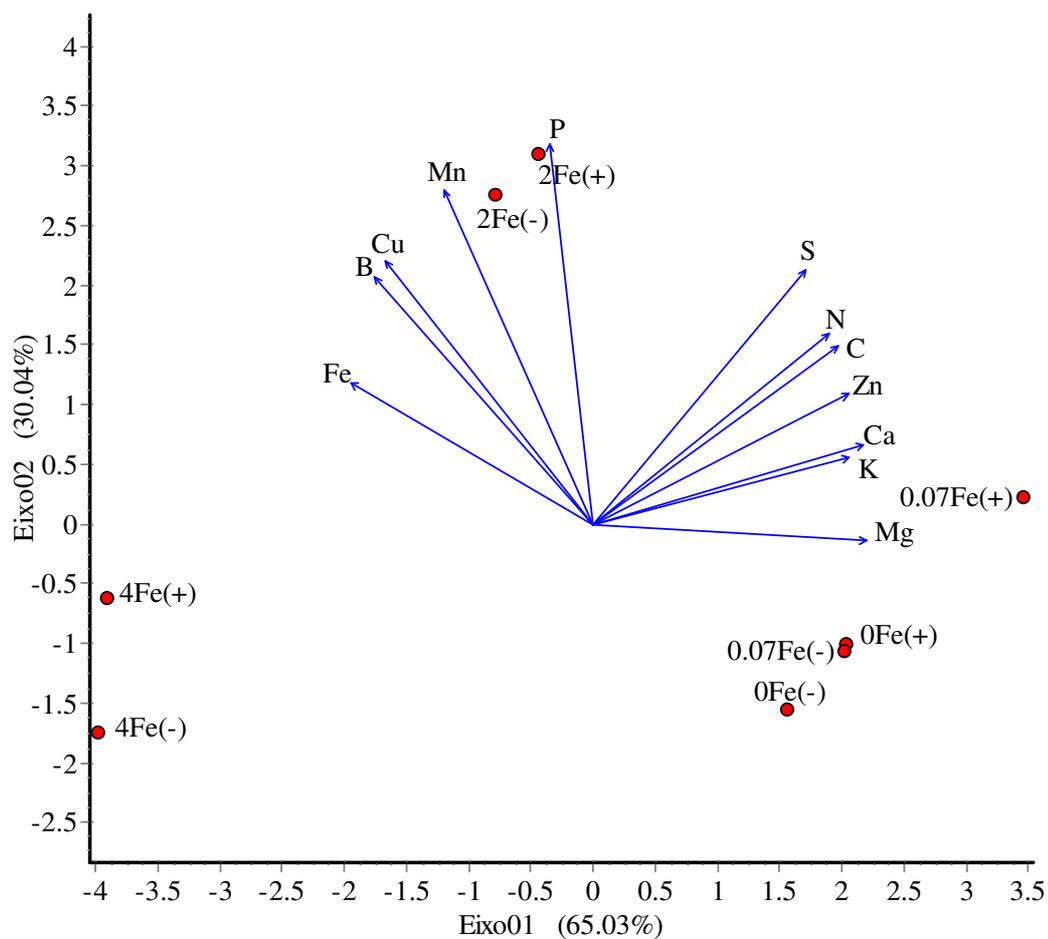


Figura 5. Análise de Componentes Principais para *P. tinctorius*, relacionando o conteúdo nutricional do micélio fúngico na presença (+) ou ausência (-) de ácido húmico nas diferentes concentrações de ferro (0; 0.07; 2 e 4 Mm). Pontos indicam a espécie fúngico com a respectiva concentração de Fe na presença ou ausência de AH e os vetores indicam os nutrientes.

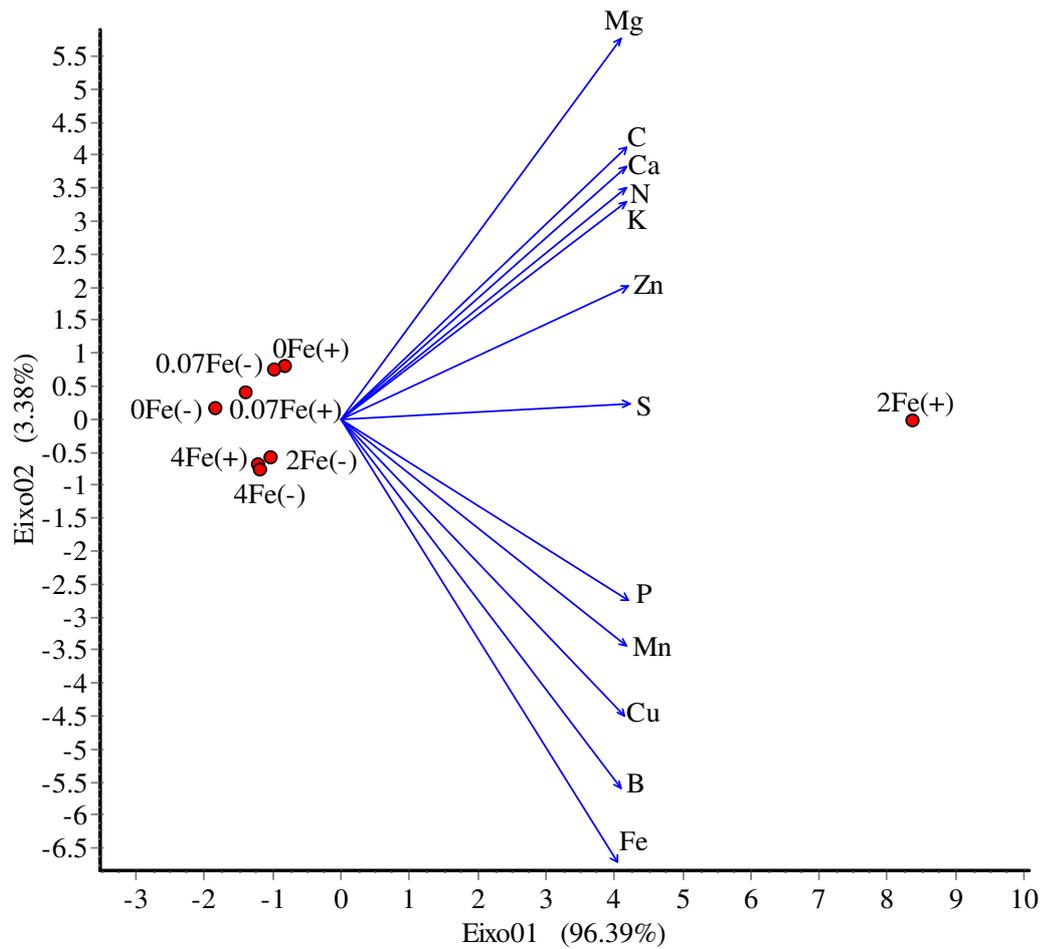


Figura 6. Análise de Componentes Principais para *P. albus*, relacionando o conteúdo nutricional do micélio fúngico na presença (+) ou ausência (-) de ácido húmico nas diferentes concentrações de ferro (0; 0.07; 2 e 4 Mm) na forma de FeSO_4 . Pontos indicam a espécie fúngica com a respectiva concentração do íon Fe na presença ou ausência de AH e os vetores indicam os nutrientes.

4. DISCUSSÃO

O ferro é um nutriente essencial para o crescimento do fungo, pois está envolvido na respiração, no transporte de oxigênio, na síntese de DNA, síntese de metabólitos e presente em sítios ativos de enzimas (Kosman 2003; Philpott 2006; Kornitzer 2009). Com o aumento da concentração de ferro no meio de cultura os níveis intracelulares de Fe^{2+} aumentam causando estresse e diminuição do crescimento micelial. O estresse ocorre pela reação de Fenton, que libera radicais hidroxila altamente reativos (OH^{\cdot}), causando danos ao DNA e membranas inibindo assim o crescimento micelial (Massé e Arguin 2005).

O uso de AH em processos de biorremediação são muito citados na literatura (Piccolo 2001; Evangelou et al. 2007), entretanto, sua influência no crescimento fúngico não é tão evidente assim (Vallini et al. 1993; Gryndler et al. 2005). No presente estudo o AH estimulou um maior crescimento micelial, principalmente, no fungo *P. tinctorius*, este estímulo no crescimento pode estar relacionado a atividade tipo hormonal, pela disponibilização de nutrientes ou como agente quelante (Fogarty e Tobin 1996; Piccolo 2001; Canellas et al. 2002; Chen et al. 2004), entretanto a inibição do crescimento de *P. tinctorius* na concentração de 4mM de Fe, mesmo na presença de 200 mg.L⁻¹ de AHs, indica uma baixa eficiência dessa concentração de AHs em amenizar os efeitos tóxicos do Fe.

O presente estudo utilizou AHs com alto grau de condensação e a presença de compostos aromáticos e alifáticos o que indica um maior grau de hidrofobicidade e uma maior capacidade de estimular sistemas biológicos (Dobbss et al. 2010). Entretanto, no presente trabalho, a discriminação isotópica não demonstrou preferência por nenhum nutriente específico o que indica que ambas as espécies fúngicas podem estar utilizando subunidades dos AHs. Como os AHs são macromoléculas e sua absorção é dificultada, fungos micorrizicos podem absorver unidades bioativas do AHs (Piccolo 2001). Em condição de toxidade ou deficiência por Fe, o AHs pode aumentar a atividade de H⁺-ATPases de membrana o que facilita tanto a captação de Fe para armazenamento, tanto a exudação de quelatinas (por exemplo sideróforos) para quelar moléculas de Fe (De Luca e Wood 2000; Chen et al. 2004; Philpott 2006; Aliasgharad et al. 2009; Harrington et al. 2011).

Além dos AHs facilitarem o acúmulo de nutrientes, fungos micorrízicos tem a habilidade natural para acumular nutrientes (Falandysz e Borovička 2013),

entretanto, o acúmulo de certos nutrientes em condições de toxicidade podem ser relacionados com mecanismos de detoxificação ou defesa do fungo. Por exemplo o boro (B) está envolvido em inúmeros processos metabólicos, como acúmulo de manitol nas hifas (Lehto et al. 2010), produção de esporóforo (Lavola et al. 2011), captação de nitrogênio (transformação de N_2 para NH_3) (Anderson et al. 2013) e com a integridade estrutural das biomembranas o que aumenta o transporte de cloro (Cl) e fósforo (P), como resultado de indução a ATPase de membrana (Blevins e Lukaszewski 1998; Hänsch e Mendel 2009).

Um dos mecanismos de reoxidação do ferro (Fe^{2+} para Fe^{3+}) em fungos é catalisado pela proteína de membrana Fet3 que utiliza o cobre (De Luca e Wood 2000; Philpott 2006). Além disso, tanto o Cu^{2+} quanto o Mn^{2+} competem pelo mesmo sítio ativo de proteínas de membrana transportadoras de Fe^{2+} (Hänsch e Mendel 2009) o que contribuiria para um aumento desses nutrientes no interior das hifas fúngicas das espécies *P. tinctorius* e *P. albus* em concentrações elevadas de Fe. Todavia, no presente estudo, pode-se relacionar o elevado acúmulo de Cu no micélio fúngico ao metabolismo do C e N e principalmente a proteção contra o estresse oxidativo causado pela toxicidade por Fe (Huffman e Halloran 2001; Hänsch e Mendel 2009).

Na análise de biodisponibilidade dos nutrientes do meio MNM (Tabela 1) a quantidade de P diminui com o aumento da concentração de Fe, com isso era esperado um acúmulo menor de P no micélio nas concentrações mais elevadas de Fe, entretanto o que se observa é um maior acúmulo de P no micélio. Nas ectomicorrizas, há diferentes mecanismos para estocar o Fe, dentre eles destaca-se a produção de sideróforo (Illmer e Buttinger 2006; Johnson 2008), proteínas tipo ferritina (Ravet et al. 2009; Bou-Abdallah 2010; Briat et al. 2010) e polifosfatos (Howard 1999; Ray et al. 2005; Adeleke et al. 2010).

5. CONCLUSÕES

A ação dos AHs em fungos ocorre em diferentes mecanismos, como agente quelante de Fe, influenciando na liberação e no acúmulo de nutrientes, como subunidades biotivas, entretanto, não é absorvido pelo fungo como macromolécula e sua atividade é dependente da espécie ou do isolado fungico utilizado. Estes mecanismos podem atuar de forma independente ou de forma sinérgica para mobilizar e armazenar o Fe. Nos fungos ectomicorrízicos, há diferentes mecanismos para a manutenção da homeostase do ferro e esses mecanismos podem atuar de forma sinérgica ou isolada (Massé e Arguin, 2005; Arantes e Milagres, 2007; Kornitzer, 2009; Adeleke et al., 2012), e o acúmulo de P, Mn, Cu e B no micélio fúngico em elevadas concentrações de Fe é um indício desses mecanismos utilizados por *P. tinctorius* e *P. albus* para tolerar ou evitar a toxidez por Fe.

6. REFERENCIAS

- Adeleke R a., Cloete TE, Bertrand a., Khasa DP (2010) Mobilisation of potassium and phosphorus from iron ore by ectomycorrhizal fungi. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1901–1913. doi: 10.1007/s11274-010-0372-0
- Aliasghar zad N, Shirmohamadi E, Oustan S (2009) Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. *Soil environmental* 28:119–123.
- Anderson JS, Rittle J, Peters JC (2013) Catalytic conversion of nitrogen to ammonia by an iron model complex. *Nature* 501:84–88. doi: 10.1038/nature12435
- Blevins DG, Lukaszewski KM (1998) Boron in Plant Structure and Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:481–500. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.481
- Bou-Abdallah F (2010) The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochim Biophys Acta* 1800:719–731. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.03.021
- Bremmer, J. M., & Mulvaney, C. S. (1982). Nitrogen total. In A. L. Page, R. H. Miller, & D. R. Keeney (Eds.), *Methods of soil analysis: Part 2, Chemical and microbiological properties* (pp. 595e624). Madison: Soil Science Society of America.
- Briat J-F, Duc C, Ravet K, Gaymard F (2010) Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta* 1800:806–814. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.12.003
- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha, Anna LFaçanha AR (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol* 130:1951–1957. doi: 10.1104/pp.007088.loosens
- Chen Y, Clapp CE, Magen H (2004) Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Sci Plant Nutr* 50:1089–1095. doi: 10.1080/00380768.2004.10408579
- Cottenie, A. (1980). *Soil and plant testing as a basis of fertilizers recommendation*. Rome: FAO Soil Bulletin 38/2.
- De Luca N, Wood P (2000) Iron uptake by fungi: contrasted mechanisms with internal or external reduction. *Adv Microb Physiol* 43:39–74.
- Dobbss LB, Pasqualoto Canellas L, Lopes Olivares F, et al. (2010) Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *J Agric Food Chem* 58:3681–8. doi: 10.1021/jf904385c

- Evangelou MWH, Ebel M, Schaeffer A (2007) Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 68:989–1003. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.01.062
- Falandysz J, Borovička J (2013) Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:477–501. doi: 10.1007/s00253-012-4552-8
- Fogarty R V, Tobin JM (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb Technol* 19:311–317.
- Gryndler M, Hrselová H, Sudová R, et al. (2005) Hyphal growth and mycorrhiza formation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum* BEG 23 is stimulated by humic substances. *Mycorrhiza* 15:483–488. doi: 10.1007/s00572-005-0352-7
- Hänsch R, Mendel RR (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol* 12:259–266. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.006
- Harrington JM, Winkelmann G, Haselwandter K, Crumbliss AL (2011) Fe(III)-complexes of the tripodal trishydroxamate siderophore basidichrome: potential biological implications. *J Inorg Biochem* 105:1670–1674. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.08.010
- Howard DH (1999) Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 12:394–404.
- Huffman DL, Halloran TVO (2001) Function, structure and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu Rev Biochem* 70:677–701.
- Illmer P, Buttinger R (2006) Interactions between iron availability, aluminium toxicity and fungal siderophores. *Biometals* 19:367–377. doi: 10.1007/s10534-005-3496-1
- Johnson L (2008) Iron and siderophores in fungal – host interactions. *Mycol Res* 112:170–183. doi: 10.1016/j.mycres.2007.11.012
- Kornitzer D (2009) Fungal mechanisms for host iron acquisition. *Curr Opin Microbiol* 12:377–383. doi: 10.1016/j.mib.2009.05.005
- Kosman DJ (2003) MicroReview Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *47:1185–1197.*
- Lavola A, Aphalo PJ, Lehto T (2011) Boron and other elements in sporophores of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi. *Mycorrhiza* 21:155–165. doi: 10.1007/s00572-010-0321-7

- Lehto T, Ruuhola T, Dell B (2010) Boron in forest trees and forest ecosystems. *For Ecol Manage* 260:2053–2069. doi: 10.1016/j.foreco.2010.09.028
- Massé E, Arguin M (2005) Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem Sci* 30:462–468. doi: 10.1016/j.tibs.2005.06.005
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for estimation of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36.
- Philpott CC (2006) Iron uptake in fungi : A system for every source. *Biochim Biophys Acta* 1763:636–645. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.008
- Piccolo A (2001) The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci* 166:810–832.
- Ravet K, Touraine B, Boucherez J, et al. (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J* 57:400–412. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03698.x
- Ray P, Tiwari R, Reddy UG, Adholeya A (2005) Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi in vitro. *World J Microbiol Biotechnol* 21:309–315. doi: 10.1007/s11274-004-3572-7
- Vallini G, Pera A, Avio L, et al. (1993) Influence of humic acids on laurel growth, associated rhizospheric microorganisms, and mycorrhizal fungi. *Biol Fertil Soils* 16:1–4.