

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

Natielo Almeida Santana

**FITORREMEDIÇÃO DO COBRE EM VINHEDOS: EFEITO DO
FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR, MINHOCAS E
VERMICOMPOSTO**

Santa Maria, RS
2018

Natielo Almeida Santana

**FITORREMEDIAÇÃO DO COBRE EM VINHEDOS: EFEITO DO FUNGO
MICORRÍZICO ARBUSCULAR, MINHOCAS E VERMICOMPOSTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e manejo do solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciência do Solo**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

Santa Maria, RS

2018

Santana, Natielo Almeida
FITORREMEDIAÇÃO DO COBRE EM VINHEDOS: EFEITO DO FUNGO
MICORRÍZICO ARBUSCULAR, MINHOCAS E VERMICOMPOSTO /
Natielo Almeida Santana.- 2018.
123 p.; 30 cm

Orientador: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência do Solo, RS, 2018

1. Metal pesado 2. Adubo orgânico 3. Micorrização 4.
Fitoextração 5. Fitoestabilização I. , Rodrigo Josemar
Seminoti Jacques II. Título.

© 2018

Todos os direitos autorais reservados a Natielo Almeida Santana. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte

E- mail: natielo_sm@hotmail.com

Natielo Almeida Santana

**FITORREMEDIAÇÃO DO COBRE EM VINHEDOS: EFEITO DO FUNGO
MICORRÍZICO ARBUSCULAR, MINHOCAS E VERMICOMPOSTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e manejo do solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciência do Solo**

Aprovado em 16 de julho de 2018:

Rodrigo Josemar Seminoti Jacques
(Presidente/Orietador)

Danni Maisa da Silva, Dra (UERGS)

Paulo Ademar Avelar Ferreira, Dr (UFSM)

Tadeu Luis Tiecher, Dr (IFFar)

Zaida Inês Antonioli, Dra (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luis Dagoberto Arruda Santana e Norma Almeida Santana, pelos ensinamentos, compreensão e entusiasmo, meus eternos orientadores. À minha irmã Tiele Giovana e ao meu cunhado Ricardo Domingues pelo carinho e força em toda minha trajetória. Ao meu sobrinho Murilo Luis por alegrar cada dia de minha vida. À Bruna Morais, minha namorada, pelo apoio, carinho e exemplo, por me incentivar a cada passo e mostrar que podemos alcançar nossos sonhos. Aos meus familiares pelo carinho.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Rodrigo Josemar Seminoti Jacques que com paciência me mostrou os caminhos da Ciência e me incentivou a buscar todos os meus objetivos. Os dias sob sua orientação, desde a iniciação científica, foram de grande aprendizado. Obrigado professor Rodrigo.

À Professora Dra. Zaida Inês Antonioli, por todos os ensinamentos e apoio em toda a minha trajetória desde a iniciação científica.

Aos professores Danni Maisa da Silva, Paulo Ademar Avelar Ferreira e Tadeu Luis Tiecher por contribuírem de forma a aumentar a qualidade deste trabalho. Agradeço ao Dr. Fernando Teixeira Nicoloso, pela colaboração e cessão do laboratório de Fisiologia Vegetal para realização das análises bioquímicas. À Dra. Hilda Hildebrand Soriani e Dra Camila Peligrinotti Tarouco pela disponibilidade e auxílio em diversas análises laboratoriais.

Ao amigo e pesquisador Marcelo Aloisio Sulzbacher pelos momentos de descontração, conselhos e conversas produtivas durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. Jorge Dominguez, Dr. Javier Diaz-Real, Dr. Hugo Martinez-Cordeiro, Dr. Marimar Costa, Alberto da Silva e demais pesquisadores e amigos do Laboratório de Biologia e Ecologia Animal de Vigo, Espanha.

Aos colegas diretamente envolvidos neste trabalho, Valdemir Bittencourt, Francisco Wesz, Willian Braga, Caroline Rabuske, Anderson Moro, Fernanda Cantoni, Guilherme Padilha, Joice Freiberg, Helena Trombeta, Igor schardong, Reylis Unfer, Mariana Dossin, Juliane Schmitt e Hazael Almeida.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Biologia do Solo e Ambiente pela amizade e companheirismo, que tornam o ambiente de trabalho alegre e agradável. Aos colegas de laboratório e amigos desde o início da iniciação científica Ricardo Steffen, Gerusa Steffen, Marcos Leandro, Sabrina Dahmer, Diogo Vendruscolo, Daniel Pazzini, Deisy Morales.

Aos colegas dos laboratórios de Química, Física e Fertilidade do Solo e Biotransformações do N e C.

Aos amigos, em especial, Cedinara Morales, Otavio Dias, Juliano Barreto, Marcos Madalosso, José Bastianello pela amizade durante todo o doutorado.

Aos professores do Departamento de Solos pelo aprendizado durante o curso. Ao Héverton, secretário do curso de Pós-graduação, a Eunice Figuera, secretária do Departamento de Solos da UFSM e ao Antonio Carlos Bassaco técnico do laboratório de Biologia do Solo, com que aprendi muito deste a iniciação científica.

À Vinícola Almadén pela permissão para a coleta de solo em suas dependências.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria por ter oferecido a oportunidade da realização de mais um sonho. Obrigado às escolas Castro Alves e Professora Maria Rocha por toda minha educação fundamental e básica.

A CAPES, pela concessão bolsa de estudos. Agradeço ao CNPq pela oportunidade de realização do doutorado Sanduíche.

Obrigado a ELE que sempre me guiou em todos os caminhos.

Muito Obrigado!

*“Se quer alguma coisa, vá e lute por ela.
Ponto final.”
(Filme À procura de felicidade)*

*“É hoje que tem que acontecer, é hoje que
devemos fazer acontecer. Buscar o nosso
máximo sempre, só que quando
chegarmos ao máximo vamos notar que
ainda podemos ir um poquinho mais
longe.
(Fernando Lúcio da Costa)*

RESUMO

EFEITO DO FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR, VERMICOMPOSTO E MINHOCAS NA FITORREMEDIAÇÃO DO COBRE EM SOLO ARENOSO

AUTOR: Natielo Almeida Santana

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

Os solos arenosos da Campanha Gaúcha que são utilizados para a viticultura em sua maioria estão contaminados com cobre devido as aplicações sucessivas de fungicidas cúpricos. Esta contaminação causa toxicidade às plantas de cobertura dos vinhedos, às videiras jovens e degradação do ecossistema. A fitorremediação é uma alternativa para reduzir a contaminação destes solos e sua eficiência pode ser aumentada pelo uso de fungos micorrízicos arbusculares e adubos orgânicos. A adição destes adubos tende a aumentar a abundância das minhocas no solo, porém pouco se sabe sobre o efeito delas na biodisponibilidade e absorção do cobre por plantas fitorremediadoras. O objetivo da tese foi avaliar a interação entre o fungo micorrízico arbuscular e vermicomposto ou minhocas na fitorremediação de um solo arenoso contaminado com altos teores de cobre. Foram conduzidos dois estudos em casa de vegetação para o cultivo de feijão de porco (*Canavalia ensiformis* L.). O solo arenoso foi coletado em área de pastagem natural adjacente a um vinhedo e contaminado com 100 mg kg^{-1} de cobre. No experimento I, o solo foi adubado com cinco doses de vermicomposto de esterco bovino e inoculado ou não com o fungo micorrízico arbuscular (*Rhizoglyphus clarum*). No experimento II, o feijão de porco foi cultivado no solo contaminado com e sem a inoculação de minhocas (*Eisenia andrei*) e do fungo micorrízico arbuscular. Foi avaliado a disponibilidade do cobre e de outros nutrientes na fase sólida e na solução do solo, o acúmulo de cobre e de outros nutrientes na parte aérea e nas raízes, o crescimento vegetal e a fitotoxicidade deste metal pesado, através da eficiência fotoquímica, da concentração de pigmentos fotossintéticos e da atividade de enzimas do estresse oxidativo. Avaliou-se também a reprodução das minhocas e a concentração do cobre em seus tecidos. Os resultados mostram que as doses mais baixas do vermicomposto aumentam o poder fitoestabilizador das plantas enquanto doses mais altas elevam o poder fitoextrator. O fungo micorrízico arbuscular reduz os danos fitotóxicos do cobre, o que resulta em maior crescimento da planta. As minhocas reduzem o teor de cobre na solução do solo, mas aumentam a translocação do cobre para a parte aérea da planta. A interação entre o fungo micorrízico e o vermicomposto promove a fitoestabilização do cobre, enquanto que a interação do fungo micorrízico com minhocas promove a fitoextração do cobre no solo arenoso. Desta forma, a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares, a adição de vermicomposto ou a adoção de sistemas de manejos que aumentem a abundância de minhocas em solos arenosos é uma estratégia para aumentar a fitorremediação do cobre por plantas de *Canavalia ensiformis* e reduzir a contaminação ambiental causada por este metal.

Palavras-chave: Metal pesado. Adubo orgânico. Micorrização. Fitoextração. Fitoestabilização.

ABSTRACT

EFFECT OS ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI, VERMICOMPOST AND EARTHWORM IN COPPER PHYTORRRREMEDIATION IN SANDY SOIL

AUTHOR: Natielo Almeida Santana

ADVISOR: Prof. Dr. Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

The high copper level in sandy soils of the Campanha Gaúcha, resulting from the successive copper-based fungicides application, lead to environmental contamination and toxicity in cover crops and young vines. The phytoremediation is an alternative to reduce contamination of these soils, but little is known about the interaction of arbuscular mycorrhizal fungi, organic fertilizers and earthworms on the bioavailability and absorption of copper by phytoremediation plants in sandy textured soils. In this context, the objective of the thesis was to evaluate the interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost or earthworms in the phytoremediation of sandy soil contaminated with high copper level. Two studies were conducted under greenhouse conditions. For that, samples of an uncontaminated sandy soil were collected in an area adjacent to a vineyard. In the experiment I, the soil was contaminated with 100 mg kg⁻¹ of copper, fertilized with five doses of bovine manure vermicompost to grow jack bean (*Canavalia ensiformis* L.) and inoculated or not with the arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizogloinus clarum*). In experiment II, jack bean's were grown in the sandy soil with addition of 100 mg kg⁻¹ of copper with and without inoculation of earthworms (*Eisenia andrei*) and mycorrhizal fungi. The availability of copper and other nutrients in the soil and in solution, the accumulation of copper and other nutrients in shoots and roots, plant growth and phytotoxicity of copper were evaluated through photochemical efficiency, the concentration of photosynthetic pigments and of the activity of oxidative stress enzymes. The reproduction of earthworms and the concentration of copper in their body compartments were also evaluated. The results show that the vermicompost reduces the availability of copper in the soil and lower doses increase the phytostabilization of the plants while higher doses increase the phytoextractor. The mycorrhizal fungi increase plant biomass and reduce the translocation of copper to shoot by concentrating it in the roots. The interaction between mycorrhizal fungi and vermicompost occurs mainly in lower doses of vermicompost and is reflected in higher phytostabilization of copper. The earthworms reduce the copper content in the soil solution, but increase copper translocation to the shoot. The arbuscular mycorrhizal fungi increase plant biomass and reduce the phytotoxic damage of copper. The interaction between mycorrhizal fungi and earthworms promotes the phytoextraction of copper in the sandy soil. In this way, the inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and the addition of vermicompost, or the adoption of management systems that increase the earthworm population in sandy soils of vineyards is a strategy to increase the phytoremediation of copper by cover crops such as *Canavalia ensiformis* and reduce the levels of metal in the soils.

Keywords: Heavy metal. Organic fertilizer. Mycorrhization. Phytoextraction. Phytostabilization.

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	12
1.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
1.1.1	Contaminação por cobre em solos de vinhedos	14
1.1.2	Cobre no solo e na planta	15
1.1.3	Efeito do cobre na fisiologia das plantas	17
1.1.4	A fitorremediação de cobre	19
1.1.5	<i>Canavalia ensiformis</i>	21
1.1.6	Fungos micorrízicos na fitorremediação	22
1.1.7	Vermicomposto como amenizante da toxicidade do cobre	24
1.1.8	Efeito das minhocas na especiação do cobre	25
1.1.9	Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto ou minhocas na fitorremediação	27
1.2	PROPOSIÇÃO	28
1.2.1	Problema científico	28
1.2.2	Hipóteses	29
1.2.3	Objetivos	29
1.2.3.1	<i>Objetivo Geral</i>	29
1.2.3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	29
2	RESULTADOS	30
2.1	ARTIGO I - VERMICOMPOST DOSE AND MYCORRHIZATION DETERMINE THE EFFICIENCY OF COPPER PHYTOREMEDIATION BY CANAVALIA ENSIFORMIS	30
2.2	ARTIGO II- A INTERAÇÃO ENTRE MINHOCAS E FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR AUMENTA A FITORREMEDIAÇÃO DO COBRE EM SOLO ARENOSO	73
3	DISCUSSÃO GERAL	104
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
5	PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS	110
	REFERÊNCIAS	112

1 APRESENTAÇÃO

A contaminação por cobre é um grave problema ambiental que afeta os solos de diversas regiões agrícolas no mundo (SANTIAGO-MARTÍN et al., 2016; BALABIO et al., 2018). Uma das principais causas desta contaminação é a aplicação sucessiva e em altas doses de fungicidas cúpricos em vinhedos. No Brasil, este problema é observado em solos de vinhedos do RS, que é o estado com maior produção de uvas (59,2% da produção total brasileira) (IBGE, 2018). A vitivinicultura gaúcha iniciou no final do século XIX na região nordeste (Serra Gaúcha), com os imigrantes italianos, e há poucas décadas se expandiu para a região da Campanha, no sul do estado (SILVA et al., 2018). Nesta região, a vitivinicultura é empresarial, com alta utilização de capital, mão de obra e maquinários (DUARTE; DIAZ, 2015), o cultivo ocorre em longas áreas e normalmente sobre solos arenosos. A vitivinicultura é uma atividade de grande importância para o RS, somente para vinhos e espumantes a comercialização anual é de aproximadamente 33 milhões de litros (IBRAVIN, 2018).

O clima da região da Campanha é bastante favorável ao cultivo da uva (EMBRAPA, 2015), no entanto durante o verão ocorrem problemas fitossanitários, como o míldio e oídio, provocados pelos fungos *Plasmopara vitícola* e *Uncinula necator*, respectivamente. Devido ao baixo custo, a calda bordalesa é utilizada para o controle destas doenças (COMIN et al., 2018). Este produto é resultado da mistura de 100 g hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e 100 g de sulfato de cobre (CuSO_4) em 10 litros de água. Os produtores fazem até 10 aplicações durante o ciclo das plantas, resultando na adição de até 10 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de cobre nos solos dos vinhedos (MIOTTO et al., 2012). Teores de 68 mg kg⁻¹ (método EDTA) e 80 mg kg⁻¹ (método EDTA) já foram encontrados em solos arenosos de vinhedos da Campanha (BRUNETTO et al. 2014; GIROTTTO et al. 2016). Esta situação é bastante crítica, pois os teores médios naturais estão abaixo de 4 mg kg⁻¹ e segundo Caetano et al. (2016) teores médios de 28 mg kg⁻¹ (método USEPA) já são prejudiciais para o desenvolvimento de plantas e outros organismos.

O cobre em excesso no solo é um grave problema ambiental e em solos arenosos torna-se ainda mais grave. Os solos da Campanha apresentam baixa porcentagem de argila, óxidos e MO, resultando em reduzida capacidade de retenção de cátions (MIOTTO et al., 2014). Com isso, a maior parte do cobre adicionado ao solo resulta em formas disponíveis (BRUNETTO et al., 2014). Em alguns solos, o teor de cobre já está tão alto que as plantas de cobertura cultivadas nas entrelinhas dos vinhedos não se desenvolvem e já há relatos de sintomas de toxidez do cobre nas videiras jovens cultivadas sob solos de antigos vinhedos

(MELO et al., 2015). Outro cenário importante é que após a erradicação das vinhas antigas, os solos são preparados, revolvidos e cultivados com plantas de cobertura. No entanto, o cobre que até então estava complexado à matéria orgânica fica disponível, provocando toxidez nas plantas de cobertura (FERREIRA et al., 2018). O resultado disso são solos desprotegidos e com graves processos erosivos, onde o cobre pode contaminar as águas superficiais, subsuperficiais, os animais e o Homem. Outro grave problema é que já se detectou a migração do cobre para as camadas mais profundas. Isto remete a possibilidade de que, num futuro próximo, o cobre possa causar toxicidade às videiras adultas que estão em produção, o que traria consequências econômicas e sociais desastrosas para o Rio Grande do Sul.

O cobre é um micronutriente essencial para as plantas, no entanto o seu excesso pode provocar diversos sintomas de toxidez como clorose, necrose, baixa produção de biomassa e morte. Estes sintomas são derivados principalmente da alta produção das espécies reativas do oxigênio (EROs), que provocam alterações na respiração, na atividade fotossintética e enzimática das plantas (GONZÁLEZ-MENDOZA et al. 2013; GOSWAMI; DAS, 2016). Além disso, o excesso do Cu causa alterações no conteúdo de água, potencial osmótico e na produção de algumas proteínas desencadeando respostas fisiológicas negativas como redução na fotossíntese e em funções proteicas vitais ao desenvolvimento da planta (ADREES et al., 2015; RUSCITTI et al., 2017). Devido a isso, devem ser buscadas alternativas para remediar estes solos a fim de evitar problemas de poluição ambiental.

A fitorremediação é uma técnica de remediação que utiliza plantas, associadas ou não a microrganismos, para descontaminar o solo (DUDAI et al., 2018) sendo amplamente utilizada para reduzir os teores ou até mesmo extinguir metais pesados do solo (RIZWAN et al., 2018). Entre as técnicas mais conhecidas de fitorremediação estão a fitodegradação, a fitovolatilização, a fitoestimulação, a fitoestabilização e a fitoextração (PILON-SMITS, 2005). Neste estudo, somente as técnicas de fitoextração e fitoestabilização serão abordadas. A fitoextração baseia-se no acúmulo do contaminante na parte aérea da planta a fim de retirá-lo do local de origem (LIANG et al., 2017). Já a fitoestabilização consiste na manutenção do metal na raiz da planta ou em zonas próximas, evitando assim sua dispersão no ambiente (LEBRUN et al., 2018).

A maior eficiência da fitorremediação pode ser conseguida através da adição de amenizantes ao solo. Os amenizantes são materiais que servem para reduzir os efeitos tóxicos dos metais às plantas. O vermicomposto é um adubo orgânico que pode contribuir para o sucesso da fitoestabilização através da redução da disponibilidade dos metais, devido à grande concentração de grupos funcionais com capacidade de complexação (BUSATO et al., 2015).

Desta forma, poderá ocorrer redução na migração do cobre no solo, além das plantas produzirem maior biomassa devido a menor disponibilidade do metal, ao fornecimento de nutrientes e as melhorias de outras propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (FERREIRA et al., 2018). Por outro lado, após a adição do vermicomposto poderá ocorrer o aumento das formas solúveis de carbono no solo (SINGH; KAUR, 2015), favorecendo a dessorção do cobre para a solução do solo, o que aumentaria a absorção pelas plantas e a eficiência da fitoextração.

Além da adição de amenizantes, a interação de plantas com os organismos do solo pode auxiliar na fitorremediação. Os fungos micorrízicos arbusculares têm reconhecida capacidade de aumentar a resistência de plantas aos altos níveis de metais nos solos (FERREIRA et al., 2015). Eles formam associação simbiótica com as plantas, aumentando a captação de nutrientes, além de protegê-las frente aos efeitos fitotóxicos do cobre. Estes fungos podem modificar a disponibilidade do metal, dependendo do tipo de solo, teor do metal e nutrientes, espécie de fungo e planta (SANTANA et al., 2015;). As minhocas também podem contribuir para o sucesso da fitorremediação. Estes organismos modificam as formas do cobre no solo através da elevação do pH da solução do solo, modificações na MO, aumento do teor de nutrientes e pela própria bioacumulação do metal em seu corpo (LI et al., 2018). A fitorremediação é uma tecnologia relativamente nova e pouco se conhece sobre os efeitos interativos entre as plantas fitorremediadoras, fungos micorrízicos, vermicomposto e minhocas na fitorremediação do cobre em solos arenosos.

1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1.1 Contaminação por cobre em solos de vinhedos

A vitivinicultura é uma atividade de grande importância para o estado do Rio Grande do Sul, que em 2017 produziu aproximadamente 957 mil toneladas de uva, o que representa 57% da produção nacional (IBGE, 2018). A vitivinicultura gaúcha está concentrada principalmente na região da Serra Gaúcha, que fica localizada no nordeste do RS e na região da Campanha, localizada no sul do estado. Estas regiões possuem características edáficas, topográficas e sócio-econômicas bem distintas. A Serra Gaúcha é a região tradicional da vitivinicultura, que teve início com a chegada dos imigrantes italianos a partir do ano de 1860 e baseia-se na pequena propriedade, predomínio da mão-de-obra familiar e pouca utilização

de maquinário, devido a topografia acidentada. Nesta região, os solos são normalmente argilosos e apresentam níveis altos de matéria orgânica. Na região da Campanha, encontra-se um pólo vitivinícola implantado há somente 30 anos, sendo o local de expansão da vitivinicultura gaúcha (RADUNZ et al., 2015). A produção da Campanha baseia-se em grandes áreas e na aplicação maciça de capital durante a produção (DUARTE; DIAZ, 2015). Ao contrário da Serra, os vinhedos da Campanha Gaúcha estão localizados sob solos arenosos, que naturalmente apresentam-se ácidos, com baixos teores de argila, de óxidos e de matéria orgânica (MIOTTO et al., 2014).

Os vinhedos de ambas as regiões são manejados de forma muito semelhante, uma vez que muitas das vinícolas da Campanha são originárias da Serra e mantiveram o mesmo manejo de solo e fitossanitário que lhes era rotineiro (MIOTTO et al., 2014). Devido a isso, o controle das doenças fúngicas das videiras é feito principalmente pela aplicação do fungicida cúprico denominado de calda bordalesa, uma suspensão obtida pela mistura de 100 g de sulfato de cobre e 100 g de hidróxido de cálcio. Devido ao clima úmido, favorável a incidência de doenças fúngicas, principalmente o míldio e o oídio, causados pelo fungo *Plasmopara vitícola* e *Uncinula necator*, respectivamente, os produtores realizam até 10 aplicações de calda bordalesa durante um ciclo das videiras. A maior parte da calda aspergida sob as folhas tem como destino o solo, devido a unidirecionabilidade da aplicação, ao escoamento causado pela chuva e até mesmo pela senescência das folhas, o que resulta em introdução de até 10 kg ha⁻¹ ano de cobre no solo (MIOTTO et al., 2012).

Elevados teores de cobre já foram observados em solos de vinhedos da Serra e da Campanha Gaúcha (ANDREAZZA et al., 2013; BRUNETTO et al., 2014; MIOTTO et al., 2014; GIOTTO et al., 2016, MIOTTO et al., 2017). No entanto, na Campanha este problema é agravado devido às características físico-químicas destes solos. Os relatos de produtores da região informam sobre o menor desenvolvimento das plantas de cobertura e das mudas de videiras estabelecidas sobre áreas de antigos vinhedos, o que pode ser causado pela fitotoxicidade do cobre, presente em elevados teores nestes solos. Além disto, o menor crescimento vegetal nestas áreas aumenta as possibilidades de migração do cobre pela erosão superficial ou lixiviação, o que pode comprometer a qualidade das águas superficiais e subsuperficiais, e aumentar a dispersão deste metal pesado nas cadeias tróficas.

1.1.2 Cobre no solo e na planta

O teor do Cu na superfície de alguns vinhedos da Campanha Gaúcha é tão alto que já ultrapassou a capacidade de sorção destes solos (ARIAS et al., 2004). Girotto et al. (2016) quantificou na camada de 0-5 cm de um Argissolo, utilizado para o cultivo da videira, teores disponíveis de cobre de 63 mg kg^{-1} (Método EDTA). Miotto et al (2014) nos primeiros 5 cm de um vinhedo da mesma região observou teores pseudo-totais (método EPA 3050B) de $119,5 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo que os teores naturais de cobre nestes solos estão próximos a 14 mg kg^{-1} para os teores totais e de 3 mg kg^{-1} para os teores pseudo-totais. Neste mesmo solo, Brunetto et al (2014) observou que os teores disponíveis de cobre (método EDTA) na camada 0-10 cm estão 70 vezes maiores, e na camada de 10-20 cm estão 40 vezes maiores, que os teores naturais observados no solo adjacente sem cultivo da videira. Estes resultados indicam que o tratamento fitossanitário no cultivo das videiras por um longo período elevou drasticamente os teores de cobre nestes solos, que comparativamente aos solos da Serra Gaúcha possuem menor teor de argila, menor teor de matéria orgânica e altos teores de areia, e conseqüentemente, menor capacidade de sorção do cobre, o que potencializa a migração do cobre para a subsuperfície e para outros compartimentos ambientais (GIROTTTO, 2010).

No solo, o cobre pode estar na forma solúvel, trocável, adsorvido especificamente aos óxidos metálicos, ligado a materiais orgânicos solúveis e insolúveis ou formando precipitados (Mc LAREN; CRAWFORD; 1973). Grande parte dos estudos aponta que o Cu é ligado à matéria orgânica ou óxidos amorfos, sendo que a sua sorção depende principalmente do pH e do teor de matéria orgânica (McBRIDE, 1994; LÓPEZ-PERIAGO et al., 2008). Devido a sua forte ligação com a matéria orgânica e óxidos, formando complexos de superfície de esfera interna, principalmente em solos com pH muito próximo da neutralidade, o cobre é pouco biodisponível (MARTINS, 2005). Porém, nos solos de Campanha, Girotto (2010) quantificou em um Argissolo Vermelho, sob campo nativo adjacente ao vinhedo, a concentração de cobre total de $14,46 \text{ mg kg}^{-1}$ e o extrator EDTA $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ dessorveu apenas 15% deste total. No solo com videira, com $91,51 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cu total, foram dessorvidos mais de 73 % deste teor. Miotto et al. (2017) neste mesmo solo, após 25 anos de cultivo, verificaram que a concentração total (extraído por $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HF}$) de Cu foi de 90 mg kg^{-1} na camada 0-10 cm, sendo que aproximadamente 80% estavam disponíveis para as plantas. Assim, a presença de altos teores de Cu disponíveis na camada superficial indica uma provável saturação dos sítios de ligação da MO e dos minerais, permanecendo significativa quantidade do cobre fracamente ligado ao solo, o que potencializa sua migração no perfil com a água da chuva. A migração do cobre para as camadas mais profundas foi observado também por Girotto (2010) num Argissolo da Campanha, onde os teores de cobre disponível (método HCl 0,1 M) na camada

de 15 a 20 cm estão 12 vezes maiores e na camada de 30-40 cm estão 4 vezes maiores nos vinhedos se comparado ao campo nativo adjacente.

O cobre é um micronutriente essencial para as plantas, participando de diversos processos fisiológicos, como a fotossíntese, a respiração, a redução e a fixação do nitrogênio (YRUELA, 2005; FEKIACOVA et al., 2015). Em concentração ideal no solo para a absorção pelas plantas, o Cu atua na formação de membranas, cloroplastos e clorofila (AHMAD et al., 2015). Nos animais, o Cu é essencial para o funcionamento de diversas enzimas envolvidas na formação da hemoglobina, componente de metaloenzimas, como a citocromo oxidase, superóxido dismutase e hidrolase, além de aumentar a estabilidade de algumas proteínas (BUND et al., 2010; DEL CLARO et al., 2013). Entretanto, em altas concentrações no solo e na água este elemento é considerado um grave problema ambiental (SHUTCHA et al., 2015). Para o Homem, o excesso de cobre no metabolismo pode provocar a inativação de algumas enzimas e ocasionar grandes reflexos na saúde, como doenças relacionadas a degeneração hepato-lenticular, problemas no fígado, dores musculares, alterações nervosas, vômito e, em casos de superexposição de ratos a este metal, o resultado foi a morte (SARGENTELLI et al., 1996; CAMARGO et al., 2007). Além disso, o alto nível de cobre no organismo está associado ao comprometimento cognitivo e neurodegeneração, o que aumenta os riscos de Alzheimer (VAZ et al., 2017).

1.1.3 Efeito do cobre na fisiologia das plantas

Nas plantas, o cobre em grande concentração provoca redução do crescimento, clorose e necrose foliar (ANJUM et al., 2015; QIN et al., 2018, BALDI et al., 2018). A toxicidade do metal reflete em redução do comprimento das raízes, alteração da produção de importantes pigmentos fotossintéticos, além de reduzir a absorção de nutrientes essenciais pelas plantas (KELLER et al., 2015).

As plantas cultivadas em solos com alto teor de cobre apresentam estresse bioquímico, redução na taxa fotossintética e na respiração, o que resulta no menor comprimento de raiz e parte aérea, área superficial radicular e biomassa (MARQUES et al., 2018). Tiecher et al. (2016) verificaram que as plantas de milho cultivadas em solo com teor de 120.8 mg kg⁻¹ de cobre reduziram seu crescimento devido ao comprometimento do aparato fotossintético e desequilíbrio na atividade enzimática. Doubková e Sudová et al. (2016) observaram que o teor de clorofila diminuiu e de carotenóides aumentou em folhas de *Agrostis capillaris* a medida que o teor de cobre aumentava em um substrato contaminado. A bioquímica das plantas é

modificada pelo excesso do cobre (CAMBROLLÉ et al., 2015), pois ele induz o estresse oxidativo através do aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e da peroxidação lipídica, estimulando a produção de enzimas antioxidantes (THOUNAOJAM et al., 2012).

A própria germinação das plantas é afetada pela alta concentração do cobre. Este metal retarda o alongamento do hipocótilo, aumenta a mortalidade da planta e reduz o índice de germinação em mais de 90%, dependendo da concentração (CHAÂBENE et al., 2018). A redução do crescimento do sistema radicular e da parte aérea das plantas em solos contaminados por cobre é consequência dos danos causados no nível celular (BERNAL et al., 2006). Uma das consequências da elevada concentração de cobre nos tecidos da planta pode ser o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tanto nas raízes como na parte aérea das plantas, o que gera estresse oxidativo (BENAVIDES et al., 2005). Um dos principais representantes de EROs é o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual é produzido através de uma redução monoeletrônica do oxigênio. Nas células, o $O_2^{\bullet-}$ é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através de sua dismutação espontânea ou enzimática, pela ação da enzima superóxido dismutase (ALSCHER et al., 2002; FATIMA; AHMAD, 2005). O H_2O_2 é menos reativo que o $O_2^{\bullet-}$, porém na presença de metais como Fe^{2+} ou Cu^{2+} , ele pode gerar radicais hidroxil (OH^{\bullet}) (MITHÖFER et al., 2004). O OH^{\bullet} é provavelmente um dos radicais mais reativos dentre os EROs. A geração de radical hidroxil a partir de superóxido e peróxido de hidrogênio é o principal mecanismo de toxicidade do Cu, que envolve a reação de Fenton, catalisada pela presença do metal livre na célula (BRIAT; LEBRUN, 1999).

As EROs possuem potencial para interagir de forma não específica com muitos componentes celulares, causando várias ações deletérias, tais como aumento nos níveis de peroxidação de lipídios das membranas e aumento na carbonilação de proteínas, o que afeta diretamente a atividade de muitas enzimas e de outras macromoléculas essenciais, como pigmentos fotossintéticos e ácidos nucleicos (FOYER et al., 1994). Com isso, pode ocorrer a paralisação do metabolismo celular (LIN et al., 2005). As alterações na atividade de vários antioxidantes enzimáticos, como as enzimas ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT); e na concentração de antioxidantes não-enzimáticos, como ácido ascórbico (AsA) e grupos tióis não protéicos (NPSH), são utilizadas como indicativo da produção excessiva de EROs em plantas devido a absorção excessiva dos metais pesados (MITTLER, 2002; FATIMA; AHMAD, 2005).

Além dessas alterações, as plantas quando expostas as altas concentrações dos metais pesados ou pela deficiência de fósforo apresentam alterações no estado funcional das membranas dos tilacóides dos cloroplastos. Com isto, ocorrem mudanças nas características dos sinais de fluorescência e nos valores normais das variáveis da fluorescência da clorofila *a* (ROSENQVST; VAN KOOTEN, 2003). A presença do cobre em elevadas concentrações na planta provoca o fechamento de estômatos, desnaturação de complexos de proteínas, formação de complexos Cu-clorofila, modificações em feofitinas e inibição do centro de reação do fotossistema II (BAZIHIZINA et al., 2015). Estas alterações provocam perturbações na eficiência fotossintética resultando em baixo crescimento das plantas (ROSA et al., 2014).

1.1.4 A fitorremediação de cobre

O alto teor de cobre em solos de vinhedos da Campanha Gaúcha já tem resultado em fraco ou ausente crescimento das plantas de cobertura ou espontâneas que se desenvolvem nas entrelinhas das videiras. Por consequência, o solo do vinhedo permanece descoberto e, por se tratar de solos muito arenosos, os processos erosivos causados pela água da chuva ou vento são potencializados. A erosão nesta situação é especialmente grave, tendo em vista que além do transporte de sedimentos, nutrientes, água e agrotóxicos dos vinhedos, ocorre possível grande dispersão do cobre, uma vez que há altos teores disponíveis deste metal pesado na camada superficial destes solos. Além disto, os técnicos das vinícolas do RS já relataram que os altos teores de cobre do solo estão reduzindo o crescimento das novas mudas de videiras que estão sendo implantadas sobre solos de vinhedos erradicados, indicando que os altos teores de cobre já estão prejudicando a viticultura gaúcha ao impedir/prejudicar a reutilização de áreas.

Diante deste cenário, , alternativas para a remediação destes solos devem ser buscadas como forma de reduzir o risco de contaminação do subsolo, das águas superficiais e subsuperficiais, dos animais e das pessoas da região; e se possível, manter estes solos produtivos, para que a atividade da vitivinicultura não seja impedida de se manter. Da mesma forma, alternativas para o manejo fitossanitário dos vinhedos devem ser buscadas. Por exemplo, utilizar fungicidas alternativos sem o cobre na constituição, reduzir o número de aplicações e respeitar a dose específica de cada produto.

A grande biodisponibilidade do cobre na camada de 0 a 20 cm de profundidade observada em estudos prévios nos solos arenosos da Campanha do RS constitui-se numa

condição propícia à utilização e ao sucesso da fitorremediação, que pode ser definida como o processo em que as plantas e os microrganismos da rizosfera sequestram, degradam ou imobilizam poluentes do solo (PILON-SMITS, 2005). Sob o termo fitorremediação estão incluídas diferentes técnicas com objetivos específicos e dentre essas, é interesse deste projeto a fitoextração e a fitoestabilização.

A fitoextração baseia-se no uso de plantas para remoção de metais dos solos mediante a absorção pelas raízes, transporte e concentração na parte aérea. Para sucesso desta técnica é essencial que o solo não apresente altos níveis de contaminação e que a planta seja tolerante ao metal, tenha um sistema radicular abundante, uma taxa de crescimento rápido, potencial de produzir alta biomassa no campo e acumule na parte aérea elevadas quantidades de metal (MARQUES et al., 2009). Além da utilização de plantas transgênicas, outras duas abordagens práticas podem ser utilizadas na fitoextração: a utilização de plantas com capacidade natural de acumulação de altas quantidades de metais, mas normalmente com baixa produção de biomassa (plantas hiperacumuladoras); ou a utilização de plantas com alta produção de biomassa, mas com menor capacidade de acumulação de metais, normalmente associada a aplicação de agentes quelantes (NASCIMENTO et al., 2009). Após o crescimento no campo as plantas podem ter seu volume reduzido por compostagem, compactação ou incineração e posteriormente, serem recicladas (biomineração) ou depositadas em aterro sanitário. Outra alternativa emergente é a utilização das plantas fitoextratoras para a produção de bioenergia (BLAYLOCK; HUANG, 2000).

Por outro lado, alguns solos podem estar tão contaminados que a fitoextração não seria uma abordagem adequada e o tempo necessário para remediação seria muito longo. Nestes casos, uma forma alternativa de diminuir o risco ambiental pode ser a fitoestabilização, onde plantas são utilizadas para estabilizar o metal no solo, reduzindo assim sua movimentação pela erosão e percolação, a exposição aos animais e a probabilidade de entrarem na cadeia alimentar (WONG, 2003). Além disso, as raízes das plantas também podem oferecer superfícies de precipitação ou adsorção de contaminantes metálicos (LAPERCHE et al., 1997). As plantas adequadas para fitoestabilização devem ser tolerantes às condições de solo, crescer rapidamente para estabelecer densa cobertura vegetal, ter sistemas radiculares bem desenvolvidos, absorver grandes quantidades do metal mantendo-o nas raízes (baixa translocação raiz-parte aérea), ser fáceis de estabelecer e manter em condições de campo, e ter ciclos de vida longos ou serem capazes de auto-propagar (BERTI; CUNNINGHAM, 2000, SANTIBÁÑEZ et al., 2008).

As plantas fitorremediadoras, em resposta a grande concentração de metais no solo, podem desencadear uma série de processos que resultam na redução da toxidez do metal. Entre estes mecanismos estão: o aumento da produção de pigmentos da clorofila, como os carotenóides e betacarotenos; a complexação do metal em compartimentos celulares, como o vacúolo; o aumento na produção de ácidos orgânicos, redução do fator de translocação do metal, além de outras alterações não específicas no metabolismo celular (FERREIRA et al., 2015; SANTANA et al., 2015; NANDA et al., 2016;). Além disso, plantas submetidas a altas doses de metais podem sofrer alterações na produção de algumas enzimas envolvidas no estresse antioxidativo, como a superóxido dismutase, as peroxidases não específicas e a catalase (CLEMENS, 1999; BOWLER; FLUHR, 2000; RESENDE et al., 2003; ANDRADE et al., 2009; SANTANA et al., 2015).

Nos vinhedos do RS, a maioria dos viticultores cultiva plantas de cobertura, como forma de proteção do solo e melhoria dos atributos físicos, químicos e biológicos. Esta prática poderia ser utilizada também para a fitorremediação destes solos. Inicialmente através da fitoestabilização se buscaria o cultivo dos solos que, devido aos altos teores de cobre, têm permanecido sem vegetação, uma vez que as plantas de cobertura atualmente utilizadas e as plantas espontâneas já não crescem nestes solos. Num segundo estágio, nos solos onde a fitoestabilização já estivesse estabelecida com sucesso e nos solos com menores concentrações de cobre se buscaria o cultivo de plantas fitoextratoras, como forma de se reduzir as concentrações de cobre no solo.

1.1.5 *Canavalia ensiformis*

A *Canavalia ensiformis* D.C., nome comum feijão-de-porco ou jack-bean, é uma planta da família Fabaceae, arbustiva anual ou bianual, herbácea, muito rústica, com crescimento ereto e determinado podendo atingir 1,2 m de altura, apresenta folhas alternadas trifolioladas (SILVA LÓPEZ, 2012). É cultivada em diferentes solos do mundo, bastante adaptada às diferentes condições de manejo, sendo resistente às altas temperaturas e à seca, porém não suporta as geadas e é tolerante ao sombreamento parcial (EIRAS, 2010).

O feijão-de-porco é utilizado como planta de cobertura do solo, devido a boa ciclagem de nutrientes, capacidade de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio e grande produção de matéria seca (CARGNELUTTI FILHO et al., 2012). A planta apresenta muitas propriedades alelopáticas e capacidade de reduzir a abundância de fitopatógenos no solo devido a produção de algumas substâncias, tais como enzimas, glicoproteínas, polipeptídeos e

compostos provenientes do metabolismo de aminoácidos (SOUZA FILHO, 2002; PORTO et al. 2016). Além disso, esta planta já demonstrou potencial para ser utilizada em programas de fitorremediação, conforme demonstrado nos trabalhos de SANTOS et al., 2006; ANDRADE et al., 2009; ANDRADE et al., 2010; VENDRUSCULO, 2013; SILVA et al., 2018.

1.1.6 Fungos micorrízicos na fitorremediação

A fitorremediação é uma tecnologia relativamente nova e pouco se conhece sobre o efeito das simbioses radiculares no aumento ou redução da absorção de metais pesados pelas plantas. Por um lado é reconhecido o papel das micorrizas no aumento da absorção de alguns micronutrientes e por outro sabe-se que elas desempenham importante papel na proteção das plantas ao excesso de metais pesados, reduzindo a absorção pelas plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CORNEJO et al., 2017; FERREIRA et al., 2018).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) formam associação simbiótica com a maioria das espécies vegetais, são cosmopolitas, com ocorrência abundante mesmo em áreas com elevadas concentrações de metais pesados (KLAUBERG-FILHO et al., 2005; STÜRMER; SIQUEIRA, 2006) e são encontrados em quase todas as famílias de espécies herbáceas e arbóreas, especialmente aquelas de interesse para recuperação ambiental. Os estudos têm demonstrado a ocorrência de isolados de FMAs em solos com elevada poluição e a ação fitoprotetora da simbiose micorrízica ao excesso de metais pesados no solo (KLAUBERG-FILHO et al., 2005; SANTANA et al., 2015; FERREIRA et al., 2018). Silva et al. (2006) relatam os benefícios da inoculação de FMAs para o crescimento da *Brachiaria decumbens* em solos multicontaminados por metais pesados, sendo este efeito atribuído à redução na concentração destes elementos na parte aérea das plantas micorrizadas. Por outro lado, Castillo et al. (2011) relataram que a associação simbiótica com FMAs eleva o poder fitoextrator de cobre das plantas de *Tagetes erecta* L. Do mesmo modo, Hassan et al. (2013) verificaram que o girassol micorrizado com *Rhizophagus irregularis* apresentou maior teor de Cu na raiz, quando comparado ao tratamento sem inoculação em um solo com grande quantidade de metais

Desta forma, evidencia-se que os mecanismos envolvidos na interação planta fitorremediadora e fungos micorrízicos necessitam ainda de maiores estudos. A espécie fúngica *Rhizoglyphus clarum* (antigo *Glomus clarum* e *Rhizophagus clarus*) que foi utilizada neste estudo têm demonstrado capacidade diferenciada na retenção de Cu, Zn, Cd e Pb em seus tecidos. Por atuarem como agentes de proteção às plantas e também por favorecerem a

extração de metais pesados do solo (SILVA et al., 2006), estes fungos podem desempenhar importante papel na fitorremediação e isto se reveste de extremo interesse, visto que a maioria das plantas forma a simbiose micorrízica mesmo em condições de elevada contaminação (KLAUBERG-FILHO et al., 2005).

Os fungos arbusculares desempenham papel fundamental na proteção de plantas frente ao estresse provocado pelos metais em alta concentração no solo. O aumento na tolerância ao Cu em plantas micorrizadas é resultado de muitos fatores como o acúmulo do metal em órgãos não vitais, manutenção da integridade das membranas celulares, retenção do metal no micélio fúngico ou em paredes celulares com posterior fixação por grânulos de polifosfato celular (RUSCITTI et al., 2017). Além disso, a maior absorção de fósforo por parte do fungo para a planta favorece a formação de complexos fosfato-metal nas raízes também reduzindo a mobilidade e toxidez do elemento para a planta. De forma semelhante, as plantas micorrizadas podem absorver certos elementos em troca de outros. É o caso do Fe, que pode inibir a absorção do Cu, por exemplo, em solos com alto teor do metal (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Algumas proteínas que podem reduzir o efeito tóxico do cobre também são expressas apenas na presença de fungos micorrizicos. É o caso da Vacuolar ATP sintase subunidade B (V-ATPase) e da Anexina que apresentam grande afinidade pelo cobre e reduzem sua toxidez na planta. Segundo Repetto et al. (2003) os fungos promovem o aumento na expressão de V-ATPase expostas ao alto teor de metal pois esta proteína está relacionada ao transporte do metal por vias não tóxicas dentro da planta e armazenamento no vacúolo. O aumento da síntese de anexina em plantas com fungos está relacionado a atividade de enzimas peroxidases, como forma de defesa enzimática das plantas frente ao excesso do metal no solo. Outras proteínas também são expressas com função de transporte do metal para locais que não provocam toxidez para as plantas (MICHALAK et al., 2006). Assim ocorre a compartimentalização e distribuição diferenciada do elemento tóxico. Andrade et al. (2009) verificaram que o feijão de porco inoculado com FMA apresentou maior capacidade de se desenvolver em solo com alto teor de zinco, devido a maior capacidade da planta em eliminar radicais superóxidos pela maior produção da enzima superóxido dismutase. Segundo Meier et al. (2012) os fungos micorrízicos arbusculares fornecem características fisiológicas que permitem que a planta sobreviva a níveis elevados de metais no solo, através de mecanismos que reduzem o estresse oxidativo ocasionado por este elemento no seu metabolismo.

1.1.7 Vermicomposto como amenizante da toxicidade do cobre

O uso de materiais amenizantes da toxicidade de metais para as plantas é uma das várias técnicas de remediação de solos contaminados (SALT et al., 1998). A técnica consiste da aplicação de materiais que alterem o pH do solo ou apresentem capacidade de precipitar, adsorver, complexar ou dessorver o metal pesado no solo. Nesse sentido, vários produtos têm sido testados como amenizantes da toxicidade de metais pesado para as plantas: calcário (HAN et al., 2013), silicatos (RIBEIRO-FILHO et al., 2011), fosfatos (SIQUEIRA et al., 2008), zeólitas (TULOD et al., 2012), compostos orgânicos (KARAMI et al. 2008), entre outros. A intensidade do efeito de cada amenizante pode variar conforme o mecanismo envolvido (alteração do pH, sorção, dessorção, etc), a composição químico-física do solo e da dose aplicada. Contudo, a viabilidade do uso desta técnica depende também da disponibilidade e custo do material a ser aplicado como amenizantes.

A adição de adubos orgânicos ao solo a ser descontaminado pode ser uma alternativa para aumentar a eficiência da fitorremediação (JADIA; FULEKAR, 2008). O vermicomposto é um tipo de adubo orgânico produzido a partir de resíduos que normalmente apresentam-se como problemas ambientais (dejetos de animais, resíduos agrícolas e industriais, etc) e estabilizado pela atuação de minhocas e microrganismos. A vermicompostagem é uma biotecnologia que permite dar um destino ambientalmente correto para os resíduos orgânicos, que apresentam alta disponibilidade na região.

O RS possui um rebanho efetivo de bovinos com aproximadamente 14 milhões de cabeças (IBGE, 2016), sendo que a região da Campanha contribui com aproximadamente 8,21% deste total (FILHO et al., 2012). Considerando que um bovino adulto produz diariamente cerca de 10 kg de esterco (CAMPOS, 2003), a produção potencial diária seria de 12 mil toneladas de esterco apenas na região da Campanha. No entanto, o esterco bovino “*in natura*” não é considerado um bom fertilizante para as plantas (ECKHARDT et al., 2018), mas pode ser utilizado no processo de vermicompostagem.

A adição de materiais orgânicos estabilizados ao solo pode promover a diminuição ou aumento da disponibilidade de metais pesados às plantas. O aporte de carbono promove o aumento da matéria orgânica do solo, que por apresentar muitos grupos funcionais de superfície pode complexar grande quantidade de metais pesados, como o Cu (STEVENSON, 1994). Ferreira et al (2018) ao utilizarem o vermicomposto na adubação de videiras jovens em solo contaminado com cobre verificaram que houve redução dos níveis de Cu na solução do solo e aumento na produção de biomassa das plantas. Porém, a adição de materiais orgânicos

cuja composição resulte no aumento substancial de formas solúveis de carbono no solo pode promover a dessorção e maior biodisponibilidade do Cu. Mani et al. (2016) ao usarem vermicomposto para amenizar o efeito tóxico de Cd e Pb observaram maior produção de matéria seca e também maior absorção destes metais pelas plantas de *Gladiolus grandiflorus*. Karami et al. (2011) ao usar composto orgânico para amenizar o efeito tóxico de Cu e Pb observaram maior produção de matéria seca e também maior absorção destes metais pelas plantas de azevém. Os autores atribuem este efeito ao aumento do carbono solúvel no solo, que atuou como um agente quelante, aumentando a disponibilidade dos metais na solução.

Assim, os dados da literatura são controversos quanto aos efeitos da adição de amenizantes orgânicos na fitorremediação de metais e como os vinhedos da Campanha estão estabelecidos sobre solos muito arenosos, a adição do vermicomposto produzido a partir dos resíduos da bovinocultura, disponíveis em grande quantidade na região, é uma alternativa para a melhoria de muitas propriedades químicas, físicas e biológicas destes solos, porém necessita ser melhor estudado, em especial em relação aos seus efeitos na biodisponibilidade de metais e, por consequência, na fitorremediação.

1.1.8 Efeito das minhocas na especiação do cobre

As minhocas aumentam a biodisponibilidade de alguns nutrientes no solo, principalmente fósforo, potássio e nitrogênio, modificam a estrutura do solo e promovem o maior crescimento de plantas (FERREIRA et al., 2013; BITYUTSKII et al., 2016). Os mecanismos pelos quais estes organismos modificam a fertilidade dos solos deve-se a capacidade que estes possuem de ingerir e excretar os materiais, dispersando íons, aumentando a mineralização de nutrientes (MASSEY et al., 2013) e modificando características químicas, como o pH e o teor de carbono orgânico solúvel (LI et al., 2014).

Além destes benefícios amplamente documentados na literatura, estudos demonstram que as minhocas podem auxiliar no desenvolvimento de plantas em solos contaminados (CHENG; WONG, 2002; DANDAN et al., 2007; LU; LU, 2015; LI et al., 2018), tornando-se uma importante ferramenta para programas de fitorremediação. Yang et al. (2013) demonstraram que as minhocas alteram a disponibilidade de cromo, zinco, chumbo e cobre modificando a especiação dos elementos. Mesmo que os teores totais dos metais não sejam influenciados pelas minhocas, alguns elementos podem reduzir suas formas solúveis ou trocáveis devido a ação das minhocas no solo (DUARTE et al., 2012). Sizmur et al., (2011) verificaram que as minhocas da espécie *Lumbricus terrestris* reduziram a disponibilidade de

chumbo, zinco e cobre em solo contaminado, devido às alterações no pH e no teor de carbono orgânico solúvel. Liu et al (2005) demonstraram que as minhocas promoveram o aumento na produção de biomassa de *Brassica rapa* e reduziram o acúmulo de Cd e Cu na planta, principalmente devido ao acúmulo dos metais em seu próprio organismo.

Por outro lado, Dandan et al. (2007) concluíram que as minhocas ingerem o metal com a matéria orgânica e promovem o aumento da sua disponibilidade, potencializando a fitoextração de Cu em diferentes níveis. Dandan et al. (2006) verificaram que a presença de minhocas aumentou a concentração de zinco nos tecidos de *Lolium multiflorum* e *Brassica juncea* cultivadas em solo contaminado pelo metal. Leveque et al. (2014) verificaram que a bioperturbação de minhocas das espécies *Lumbricus terrestris* e *Aporrectodea caliginosa* provoca maior absorção de chumbo, cobre, zinco e cádmio por *Lactuca sativa* em um solo com elevadas concentrações destes metais. Para Li et al. (2018) a presença de minhocas facilita o processo de fitorremediação já que as minhocas favorecem o crescimento das plantas e a absorção de metais, devido ao aumento da disponibilidade em solução, resultado da atividade de alimentação e excreção, redução do pH do solo, decomposição da matéria orgânica do solo e aumento do conteúdo de ácidos orgânicos de baixo peso molecular.

As minhocas podem contribuir também com a tolerância das plantas frente ao excesso de metais no solo. Segundo Kaur et al. (2017a) a capacidade antioxidante das plantas frente ao estresse provocado pelo metal é aumentada pela presença de minhocas no solo. Kaur et al (2017b) relataram também que as minhocas contribuem para a recuperação do metabolismo das plantas frente ao excesso de metais, justificado pelo recuperação dos níveis normais de pigmentos fotossintéticos (clorofila) e parâmetros de trocas gasosas (taxa fotossintética, condutância estomática, concentração interna de CO₂ e taxa de transpiração).

As minhocas toleram grande quantidade de metais pesados no solo e podem modificar as formas do elemento e acumulá-los em seu próprio corpo (IORDACHE; BORZA, 2012). O acúmulo do cobre no tecido das minhocas aumenta de acordo com os níveis em que o metal se encontra no solo (DU et al., 2014). No entanto, para González-Alcaraz e Van Gestel (2016) as minhocas podem controlar a absorção dos metais através da redução na captação, ou seja, o organismo absorve o metal até certo limite e após cessa o seu acúmulo. Além disso, segundo os autores a minhoca tem a capacidade de armazenar o metal em formas não lábeis ou promover sua rápida excreção.

1.1.9 Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto ou minhocas na fitorremediação

A fitorremediação é uma técnica relativamente nova e são poucos os estudos envolvendo a inoculação de fungos arbusculares na presença de adubação orgânica. Gardezi et al. (2014) avaliaram o efeito da adição de vermicomposto e inoculação de *Glomus intraradices* sob o crescimento de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em solo contaminado por lodo de esgoto e verificaram que a presença do vermicomposto e do fungo arbuscular promoveram maior taxa fotossintética na planta, resultando no maior crescimento das raízes, parte aérea e produção de grãos. Em solo não contaminado, Inocencio (2013) verificou que a inoculação de plantas de limão com *Glomus clarum* e adição de vermicomposto aumentou a quantidade de nutrientes e clorofila total no tecido, área foliar, massa seca e fresca de raiz e da parte aérea, em relação ao tratamento controle sem o fungo e o vermicomposto. Fernández-Gómez et al. (2012) não verificaram efeitos da inoculação com FMA em um solo enriquecido com vermicomposto na fitorremediação de metais pesados por *Trifolium repens*. Tal comportamento pode ser atribuído a menor colonização micorrízica afetada pela adição de nutrientes, em particular as elevadas quantidades de fósforo presentes nos compostos orgânicos (MARQUES et al., 2009). Porém, são escassos os estudos que se dedicaram a estudar a sinergia entre a aplicação de vermicomposto e a inoculação de fungos arbusculares na fitorremediação de metais em áreas contaminadas.

Da mesma forma, poucos são as pesquisas sobre a interação entre minhocas e fungos micorrízicos na absorção de metais pesados pelas plantas e na fitorremediação. Xiang e Li (2014) demonstraram que as minhocas podem modificar a biodisponibilidade de nutrientes no solo e com isto favorecer a interceptação destes pelas hifas dos fungos micorrízicos, aumentando a absorção pelas plantas. Outra possibilidade de interação entre estes organismos é que na presença dos fungos arbusculares, as minhocas alimentam-se das hifas fúngicas, aumentam de peso e por consequência tornam-se mais ativas (WURST et al., 2011). Os mesmos autores demonstraram que os fungos micorrízicos também são beneficiados através da maior dispersão dos esporos e pela bioperturbação que as minhocas provocam no solo, o que promove aumento da densidade de hifas (WURST et al., 2011). Em experimento com milho, Aghababaei et al. (2014a) verificaram que na presença de fungos micorrízicos arbusculares da espécie *Funneliformis mosseae* e das minhocas da espécie *Lumbricus rubellus* houve aumento da biomassa aérea de milho e da absorção de Cd em diferentes níveis do metal no solo. A associação entre plantas de *Festuca arundinacea*, fungos da espécie *Glomus*

caledoniun e minhocas da espécie *Eisenia foetida* aumentou significativamente o número de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em um experimento de Lu e Lu (2015). Por outro lado, Aghababaei et al. (2014b) não observaram efeitos interativos entre os fungos arbusculares e as minhocas na disponibilidade de Cd em um solo com elevada concentração deste metal. Da mesma forma, Eisenhauer et al. (2009) e Dehghanian et al. (2018) não apontaram evidências para os efeitos interativos de minhocas e fungos arbusculares sobre a absorção de nutrientes e crescimento de plantas em solo não contaminado e contaminado com Zn, respectivamente. Como visto, os estudos sobre a interação entre fungos micorrízicos e minhocas na fitorremediação são raros na literatura, controversos e inexistentes em relação ao cobre.

1.2 PROPOSIÇÃO

1.2.1 Problema científico

As frequentes aplicações de fungicidas cúpricos para o controle das doenças das videiras cultivadas no Rio Grande do Sul resultaram na contaminação do solo por cobre. Esta situação é mais grave na região vitivinícola da Campanha Gaúcha, que possui solos muito arenosos. A fitorremediação é uma alternativa para a descontaminação destes solos, porém devido a alta disponibilidade do metal, o estabelecimento das plantas e/ou o desenvolvimento de seu potencial fitorremediador são fortemente prejudicados quando somente plantas são utilizadas. Por isto, são necessárias alternativas para aumentar a eficiência da fitorremediação nestes solos. Para isto, deve se conhecer de forma adequada os efeitos isolados e interativos dos fungos micorrízicos arbusculares, do vermicomposto de esterco bovino e das minhocas na biodisponibilidade do cobre no solo, na absorção radicular, na translocação à parte aérea e nos efeitos celulares fitotóxicos do cobre às plantas fitorremediadoras. Por isto, este trabalho busca responder as seguintes questões:

- A fitoextração e a fitoestabilização do cobre em solos arenosos de vinhedos é potencializada quando são utilizadas, de forma isolada ou conjunta, a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e a adubação com vermicomposto de esterco bovino?
- A atividade das minhocas nos solos arenosos contaminados com cobre influencia a fitorremediação com plantas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares?

1.2.2 Hipóteses

1. A utilização, de forma isolada ou conjunta, da inoculação do fungo micorrízico *Rhizoglyphus clarum* e da adubação com vermicomposto de esterco bovino no solo arenoso de vinhedo contaminado com cobre resultará em maior eficiência da fitorremediação por *Canavalia ensiformis* (L.) D.C., devido a maior absorção de cobre e maior crescimento da planta;
2. A inoculação isolada de minhocas da espécie *Eisenia andrei* ou em conjunto com o fungo micorrízico *Rhizoglyphus clarum* resultará em maior eficiência da fitorremediação do cobre em solo arenoso de vinhedo por *Canavalia ensiformis* (L.) D.C., devido a maior absorção de cobre e maior crescimento da planta.

1.2.3 Objetivos

1.2.3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos isolados e interativos do fungo micorrízico arbuscular *R. clarum*, do vermicomposto ou das minhocas na fitorremediação por *C. ensiformis* de um solo arenoso contaminado com cobre.

1.2.3.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar o efeito isolado ou interativo da inoculação do fungo *R. clarus* e da adição do vermicomposto de esterco bovino na fitorremediação por *C. ensiformis* de um solo arenoso com alto teor de Cu;

b) Avaliar o efeito da inoculação isolada de minhocas da espécie *Eisenia andrei* ou em conjunto com o fungo micorrízico *R. clarum* na fitorremediação de cobre por *C. ensiformis* em um solo arenoso.

2 RESULTADOS

2.1 ARTIGO I - VERMICOMPOST DOSE AND MYCORRHIZATION DETERMINE THE EFFICIENCY OF COPPER PHYTOREMEDIATION BY *CANAVALIA ENSIFORMIS*

Natielo Almeida Santana ^a, Caroline Maria Rabuscke ^a, Valdemir Bittencourt Soares ^a, Hilda Hildebrand Soriani ^b, Fernando Teixeira Nicoloso ^c, Rodrigo Josemar Seminoti Jacques ^a

Publicado pela Revista: Environmental Science and Pollution Research

DOI: 10.1007/s11356-018-1533-1

Enviado em 10 de Novembro de 2017

Aceito para publicação em 9 de Fevereiro de 2018

Publicado em 12 de Maio de 2018

Vermicompost dose and mycorrhization determine the efficiency of copper phytoremediation by *Canavalia ensiformis*

Natielo Almeida Santana ^a, Caroline Maria Rabuscke ^a, Valdemir Bittencourt Soares ^a, Hilda Hildebrand Soriani ^b, Fernando Teixeira Nicoloso ^c, Rodrigo Josemar Seminoti Jacques ^a

^aFederal University of Santa Maria, Department of Soil Science, 97119-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, natielo_sm@hotmail.com; carolinerabuscke@hotmail.com; bittencourtagro@gmail.com; rodrigo@ufsm.br

^bFederal University of Santa Maria, Higher Education Center North, 98400-000, Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brazil, hildasoriani@gmail.com

^cFederal University of Santa Maria, Department of Biology, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, ftnicoloso@yahoo.com

Corresponding author:

Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, Department of Soil Science, Federal University of Santa Maria, 97119-900, +55 55 3220-8157 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, rodrigo@ufsm.br

Abstract

The phytoremediation of copper (Cu)-contaminated sandy soils can be influenced by the addition of vermicompost to the soil and the mycorrhization of plants. The objective of this study was to evaluate the effects of inoculation with the mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* and the addition of different doses of bovine manure vermicompost on the phytoremediation of a sandy soil with a high Cu content using *Canavalia ensiformis*. Soil contaminated with 100 mg kg⁻¹ Cu received five doses of vermicompost and was cultivated with *C. ensiformis*, with and without inoculation with mycorrhizal fungus, and the Cu and nutrients in the soil and soil solution were evaluated. The concentrations of Cu and other nutrients and the biomass and Cu phytotoxicity in the plants were quantified by gauging the photochemical efficiency, concentration of photosynthetic pigments and activity of oxidative stress enzymes. The vermicompost increased the soil pH and nutrient concentrations and reduced the Cu content of the solution. When the vermicompost was applied at a dose equivalent to 80 mg phosphorus (P) kg⁻¹, the phytoextraction efficiency was higher, but the phytostabilization efficiency was higher for vermicompost doses of 10 and 20 mg P kg⁻¹. The presence of mycorrhizal fungi increased Cu phytostabilization, especially at vermicompost doses of 10 and 20 mg P kg⁻¹. The use of vermicompost at low doses and inoculation with mycorrhizal fungi increase the phytostabilization potential of *C. ensiformis* in sandy soil contaminated by Cu.

Keywords: heavy metal; trace elements; phytoextraction; phytostabilization; *Rhizophagus clarus*

1. Introduction

The application of copper (Cu)-based phytosanitary products has led to the accumulation of this heavy metal in the soil of several wine-producing regions around the world (Gómez-Armesto et al. 2015; Santiago-Martín et al. 2016; Miotto et al. 2017). An aggravating factor of this problem is the sandy characteristic of some of these soils, which have low clay and organic matter contents as well as low cation exchange capacities, all of which increase the bioavailability of Cu (Giroto et al. 2016). Thus, there is a high probability that this metal can be absorbed by the vines or cover crops grown between rows, or it could migrate and contaminate the subsoil, water, plants, animals and humans (Brunetto et al. 2014; Rabiet et al. 2015).

Copper is an essential micronutrient for plants, but when present at high levels in soil, it can dramatically reduce plant growth (He et al. 2016). Excess Cu can increase the production of reactive oxygen species (ROS), resulting in lipid peroxidation and membrane damage (Briat; Lebrun, 1999; Adrees et al. 2015), and free Cu ions in tissues can alter the formation of enzymes, modify the function of carrier proteins and cause imbalanced nutrient absorption (Cambrollé et al. 2015; Tiecher et al. 2016a). As a consequence, excess Cu can affect the respiration, photosynthetic activity, nutrient and water absorption, and dry mass production of plants, and in extreme cases, it can lead to death (Meier et al. 2015; Ruscitti et al. 2017).

However, phytoremediation can reduce the problems caused by Cu in the environment. The jack bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC) is a promising plant for use in phytoremediation programs because it produces a large amount of biomass and accumulates significant amounts of Cu in its roots and shoots (Andrade et al. 2009; Zancheta et al. 2011;

Santana et al. 2015). In addition, the jack bean is adapted to adverse environmental conditions and can be grown in different regions of the world (Junior et al. 2015).

However, when Cu availability in the topsoil is high, it may be difficult for even phytoremediation plants to become established. Rodríguez-Vila et al. (2005) found that *Brassica juncea*, a species with known Cu phytoremediation potential (Novo et al. 2016), was not able to develop in a soil containing 149 mg kg^{-1} Cu (extracted by CaCl_2), a concentration approximately 50 times greater than the natural soil content. Under these conditions, the phytoremediation efficiency can be increased by soil softeners and/or plant growth-promoting microorganisms. Fertilization with vermicompost can favor biomass production, consequently increasing the accumulation of metals by plants (Mani et al. 2016). However, vermicompost application can reduce the bioavailable forms of Cu in the soil and Cu absorption by the plants (Gul et al. 2015).

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) exhibit phyto-protective activity against excess heavy metals in soil (Klauber-Filho et al. 2005) and can increase the phytoremediative power of plants (Ferreira et al. 2015). Hassan et al. (2013) verified that sunflowers mycorrhized with *Rhizophagus irregularis* exhibited a higher Cu content in the roots compared to a treatment without inoculation in a soil with a high content of heavy metals.

Despite these results, the interaction of AMF and vermicompost during phytoremediation has rarely been studied, although AMF are associated with practically all plants and the addition of organic fertilizers in vineyards is a very common practice around the world. Thus, our hypothesis is that the vermicompost dose and mycorrhization determine the amount of Cu absorbed by plants in sandy soil. To test this hypothesis, the objective of this work was to evaluate the effect of inoculation with the mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* and the addition of different doses of bovine manure vermicompost on the phytoremediation of sandy soil contaminated with Cu by *C. ensiformis*.

2 Material and methods

2.1 Soil

Soil was collected from the 0-20-cm layer in a natural pasture area with no history of cultivation that was adjacent to a vineyard in the wine-producing region of Campanha Gaúcha in far southern Brazil (30°48'27"S and 55°22'42"W). This sandy soil was classified as Typic Hapludalf (Soil Survey Staff, 2014), and it was autoclaved to eliminate the spores of native AMF. The soil solution was then reinoculated with autochthonous microorganisms without arbuscular fungi spores without autoclaving, but it was filtered to remove the mycorrhizal spores (Haymann and Mosse, 1971). The soil moisture was maintained at field capacity for 60 days, and then, 100 mg kg⁻¹ Cu was added using Cu sulfate (33.34%) and Cu chloride (66.33%), resulting in a contamination greater than the prevention values (>60.0 mg kg⁻¹ Cu) according the Brazilian legislation (CONAMA, 2009). The field capacity was 0.22 m³ m⁻³, as determined on a tension table with soil samples that were saturated for 48 hours and subjected to a potential of 10 kPa for 4 days (Klute, 1986). The soil moisture was again maintained at field capacity for 30 days and then analyzed with the following results: clay (densimeter), 54.0 g kg⁻¹; sand (densimeter), 894.0 g kg⁻¹; silt (densimeter), 52.0 g kg⁻¹; organic matter (Walkley-Black), 9.0 g kg⁻¹; pH (water 1:1), 5.6; phosphorus (P) (Mehlich-1), 4.5 mg dm⁻³; potassium (K) (Mehlich-1), 84.0 mg dm⁻³; magnesium (Mg) (Mehlich-1), 0.7 mg dm⁻³; calcium (Ca) (Mehlich-1), 0.8 mg dm⁻³; zinc (Zn) (Mehlich-1), 1.6 mg dm⁻³; base saturation, 44.8%; and aluminum (Al) saturation, 0%. The Cu concentration (Mehlich-1) was 1.1 mg dm⁻³ in the uncontaminated soil and 94.2 mg dm⁻³ in the contaminated soil.

2.2 Vermicompost

Manure was obtained from beef cattle in confinement and composted for 25 days by manually aerating the pile whenever the temperature reached 60°C. After 30 days at mesophilic temperature, the manure was inoculated with earthworms, *Eisenia andrei* Bouché (1972), at a density of 5,000 ind m⁻². The vermicompost was ready after 55 days, and it was dried, sifted and analyzed. The nitrogen (N) and carbon (C) contents were determined in an elemental analyzer (Flash 1112, *Thermo Finnigan*, Italy), and the P and K were extracted by digestion in sulfuric acid and quantified in an atomic absorption spectrophotometer (GBC, 932 AA, USA). Copper, Zn, cadmium (Cd), nickel (Ni), chromium (Cr), lead (Pb), molybdenum (Mo) and mercury (Hg) contents were determined using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES; PerkinElmer, Optima 7000DV, USA) following extraction with nitric acid and hydrogen peroxide according to the EPA3050 method.

2.3 Arbuscular mycorrhizal fungus

The AMF *Rhizophagus clarus* (TH Nicolson and NC Schenck) C. Walker & A. Schüßler (formerly *Glomus clarum*) was used because it has shown promising results in recovery studies from areas contaminated with heavy metals (Silva et al. 2006). The spores were multiplied in *Brachiaria brizantha* culture traps in 500-g plastic pots containing sterile substrate and *R. clarus*. The spores were extracted by wet sieving (Gerdemann and Nicolson, 1963) followed by centrifugation in water at 412 g for 3 min and in 45% (w/v) sucrose solution at 309 g for 2 min. Viable spores were selected and counted under a stereoscopic microscope.

2.4 Plant cultivation and experimental design

The summer cover plant *Canavalia ensiformis* (L.) DC (jack bean) was grown in a greenhouse in 4-L pots with sealed bottoms containing 3.5 kg of soil. Five seeds were inoculated with the N-fixing bacteria recommended for this crop (*Bradyrhizobium elkanii*), and after 8 days of germination, thinning was performed, leaving 2 plants per pot. The mycorrhizal fungus (100 spores plant⁻¹) was inoculated at the time of sowing at approximately 3 cm below the seeds. The pots were weighed daily, and distilled water was added to maintain the humidity at 70% field capacity.

The experiment was installed in a completely randomized design that consisted of a factorial 5x2 scheme with 3 replicates. Based on the P content of the leguminous plant, 5 doses of vermicompost were incorporated into soil contaminated with 100 mg kg⁻¹ Cu, and the compost provided N fertilization. The P levels did not inhibit mycorrhization (Ferreira et al. 2015), and the vermicompost provided 0, 10, 20, 40 and 80 mg of P per kg of soil (0 PV, 10 PV, 20 PV, 40 PV and 80 PV), corresponding to the addition of 0, 0.62, 1.24, 2.48 and 4.96 g of vermicompost kg⁻¹ of soil, respectively. All the treatments were either inoculated or not with the AMF (+AMF or -AMF, respectively). Based on a previous experiment, 6.38 mg kg⁻¹ P was added to the treatment without vermicompost (0 PV) via KH₂PO₄ solution to allow for the growth of the jack beans and the production of sufficient dry matter for the analyses.

2.5 Fluorescence and chlorophyll

The fluorescence parameters were evaluated at 40 days post-emergence on the 4th expanded leaf of one plant in each pot using a modulated pulse fluorometer (Junior-Pam,

Walz, Germany) between 4 h and 6 h 30 min (in the total absence of light). The initial fluorescence (F_o) was determined, and the leaves were then subjected to a pulse of saturating light ($10,000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) for 0.6 seconds, which was used to determine the maximum fluorescence (F_m).

Afterward, the maximum photochemical efficiency of Photosystem II (PSII) was obtained by finding the ratio of variable fluorescence (F_v) to maximum fluorescence (F_m) (F_v/F_m) (Lichtenthaler et al. 2005). The PSII basal quantum yield (F_v/F_o) was obtained from the relationship between F_v ($F_m - F_o$) and F_o .

The electron transport rate (ETR_{1500} , $\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was measured using light curves (ETR versus PAR, or photosynthetic active radiation), which were constructed by subjecting each sample to 9 levels of radiation (0, 125, 190, 285, 420, 625, 820, 1,150 and $1,500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 10 seconds. Electron transport rates are calculated as $\text{ETR} = \text{PAR} \times 0.84 \times 0.5 \times Y(\text{II})$, with PAR being the applied radiation, the value 0.84 corresponding to the proportion of photons absorbed by the photosynthetic pigments, the value 0.5 corresponding to the proportion of photons absorbed by PSII in relation to the total photons absorbed by the photosynthetic pigments and $Y(\text{II})$ corresponding to the effective photochemical quantum yield of PSII (Edwards and Baker, 1993), which is an estimate of the photon flux density absorbed by PSII that is calculated as $Y(\text{II}) = (F_m' - F') / F_m'$, where F_m' and F' correspond to F_m and F_o after a second pulse of saturating light (Genty et al. 1989).

The same leaf was used to determine the concentrations of chlorophyll *a* (Chl*a*), chlorophyll *b* (Chl*b*), carotenoid and beta carotene (*B*-carotene). Leaf tissue samples were collected and placed in liquid N_2 for laboratory storage at -80°C and then macerated with liquid N_2 , homogenized in 5 mL of 80% acetone (v/v), transferred to 15-mL tubes and centrifuged at $4,000 g$ for 4 min at 25°C . The supernatant was subjected to absorbance

spectrophotometer readings (SF325NM, Bel Engineering, Italy) at 480, 663, 645, 454 and 468 nm, and the pigment concentration was calculated according to Hendry and Price (1993).

2.6 Antioxidative stress enzymes

The samples of the plant shoots that were stored to determine the photosynthetic pigments were also used to determine the oxidative stress enzymes. The tissue was macerated in liquid N₂ and homogenized with 5.0 mL of 100 mmol L⁻¹ K phosphate buffer at pH 7.5 that contained 1.0 mmol L⁻¹ EDTA, 3.0 mmol L⁻¹ DTT and 2% PVPP (m/v), in accordance with Azevedo et al. (1998). Next, the supernatant was centrifuged at 14,000 g for 30 minutes at 4°C, and 0.5 mL was collected in microtubes and stored at -80°C.

The activity of the superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) was determined according to Giannopolitis and Ries (1977). One SOD unit was defined as the amount of enzyme that inhibits the photoreduction of nitroblue tetrazolium (NBT 50%) (Beauchamp; Fridovich, 1971). The activity of the non-specific peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) in the extract was determined according to Zeraik et al. (2008) by using guaiacol as the substrate and a molar extinction coefficient of 26.6 mmol L⁻¹ cm⁻¹ (Chance and Maehly, 1955). One POD unit was defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion reaction of guaiacol and hydrogen peroxide to form 1 µmol of tetraguaiacol min⁻¹ mL⁻¹ of extract at 470 nm. The catalase activity (CAT, EC 1.11.1.6) was determined according to Azevedo et al. (1998) using a molar extinction coefficient of 40.0 M⁻¹ cm⁻¹ to calculate the activity. A CAT unit was defined as the amount of enzyme that catalyzes the decomposition of 1 mol of H₂O₂ µmin⁻¹ mL⁻¹ of extract at 240 nm.

2.7 Dry mass, mycorrhization and chemical elements

The plants were harvested at flowering, 45 days after emergence, and the roots were manually separated from the soil and washed in running water, 0.02 mol L⁻¹ EDTA solution and distilled water. The mycorrhizal colonization rate was evaluated by tracking the presence of hyphae and vesicles in 20 1-cm-long root segments that were cleared in KOH, stained with 0.05% trypan blue and mounted on glass slides for microscopy (Giovannetti and Mosse, 1980). The shoots, roots and nodules were dried in a convection oven at 65°C until a constant mass was reached.

The Cu, P, K, Fe and Zn contents of the shoots were determined following nitric-perchloric digestion in an atomic absorption spectrophotometer (932 AA, GBC, Australia) (EMBRAPA, 1997). The N content of the shoots was determined after sulfur digestion by the Kjeldahl-1 method (Bremner and Mulvaney, 1982). The Cu, Zn, P and K contents of the soil were extracted by Mehlich-1. Copper and Zn were determined in an atomic absorption spectrophotometer (932 AA, GBC, Australia); K was determined by a flame photometer (DM-62, DIGIMED, Brazil); and P was determined by colorimetry according to Murphy and Riley (1962).

At the end of the experiment, the soil solution was obtained by saturation extraction according to Raij et al. (2001). The pH was determined in 1 aliquot of the solution, and the concentrations of Cu (Cu) and P (P solution) in the rest were determined in an ICP-OES (Perkin-Elmer, Optima 7000DV, USA).

2.8 Statistical analysis

The results were subjected to analysis of variance (ANOVA), and when the effects of the AMF inoculation and vermicompost doses were significant according to the F test

($p < 0.01$), the means were compared by the Scott-Knott test ($p < 0.01$). The analyzed variables were subjected to a Pearson correlation analysis and grouped in a principal components analysis (PCA) using the STATISTICA 7 program.

3. Results

3.1 Chemical attributes of the vermicompost and soil

The vermicompost presented the following chemical composition: pH, 8.1; total C, 206.5 g kg⁻¹; total N, 21.8 g kg⁻¹; C/N ratio, 9.47; total P, 16.1 g kg⁻¹; total K, 14.5 g kg⁻¹; Cu, 64.7 mg kg⁻¹; Zn, 38.8 mg kg⁻¹; Cd, <0.2 mg kg⁻¹; Ni, 7.0 mg kg⁻¹; Cr, 1.6 mg kg⁻¹; Pb, 5.0 mg kg⁻¹; Mo, 0.9 mg kg⁻¹; and Hg, <0.01 mg kg⁻¹. All these values are in accordance with the limits established by the Brazilian legislation for organic fertilizers (Brasil, 2011).

The addition of increasing doses of vermicompost to a soil contaminated with 100 mg kg⁻¹ Cu increased the pH and P in the solution and the total N and available contents (Mehlich-1) of P, K and Zn. In some cases, there were no significant differences between the doses because of the high coefficient of variation (Table 1). The Cu in solution was reduced with increasing vermicompost doses in the soil, but the available Cu contents were not altered.

Table 1. Soil chemical characteristics after cultivating *Canavalia ensiformis* in a sandy soil contaminated with 100 mg kg⁻¹ Cu with doses of bovine manure vermicompost equivalent to 0, 10, 20, 40 and 80 mg kg⁻¹ P.

Attributes	Treatments					
	0 PV	10 PV	20 PV	40 PV	80 PV	CV (%)
pH solution	6.05 c ⁽¹⁾	6.57 b	6.82 a	6.97 a	7.07 a	2.35

P Mehlich-1 (mg kg ⁻¹)	2.53 e	7.10 d	9.90 c	13.64 b	29.92 a	12.58
P solution (mg L ⁻¹)	0.28 c	0.50 c	1.11 c	2.30 b	7.47 a	23.52
N total (mg kg ⁻¹)	12.78 c	43.45 c	39.33 c	84.34 b	147.82 a	41.96
K Mehlich-1 (mg kg ⁻¹)	46.80 a	61.20 a	66.00 a	73.20 a	92.40 a	27.08
Zn Mehlich-1 (mg kg ⁻¹)	3.58 a	2.07 a	2.33 a	4.56 a	5.64 a	60.79
Cu Mehlich-1 (mg kg ⁻¹)	81.23 a	83.89 a	79.53 a	80.16 a	77.59 a	12.24
Cu solution (mg L ⁻¹)	3.52 a	2.08 b	1.10 c	1.03 c	1.24 c	24.58

⁽¹⁾Means followed by the same letter within the same row were not significantly different according to the Scott-Knott test ($p < 0.01$).

3.2 Mycorrhizal colonization and nodulation

The vermicompost doses did not significantly influence ($p=0.6179$) the colonization by mycorrhizal fungi (Figure 1a), and treatments without fungal inoculation did not exhibit mycorrhizal colonization. The application of low doses of vermicompost (10 PV and 20 PV) reduced the dry mass of the nodules (Figure 1b). Nodule production similar to that of the control only occurred with the application of the 40 PV dose (0 PV, 6.38 mg kg⁻¹ P). At the highest vermicompost dose (80 PV), there was a large increase in nodulation and a significant effect ($p=0.0379$) of mycorrhization on nodule production.

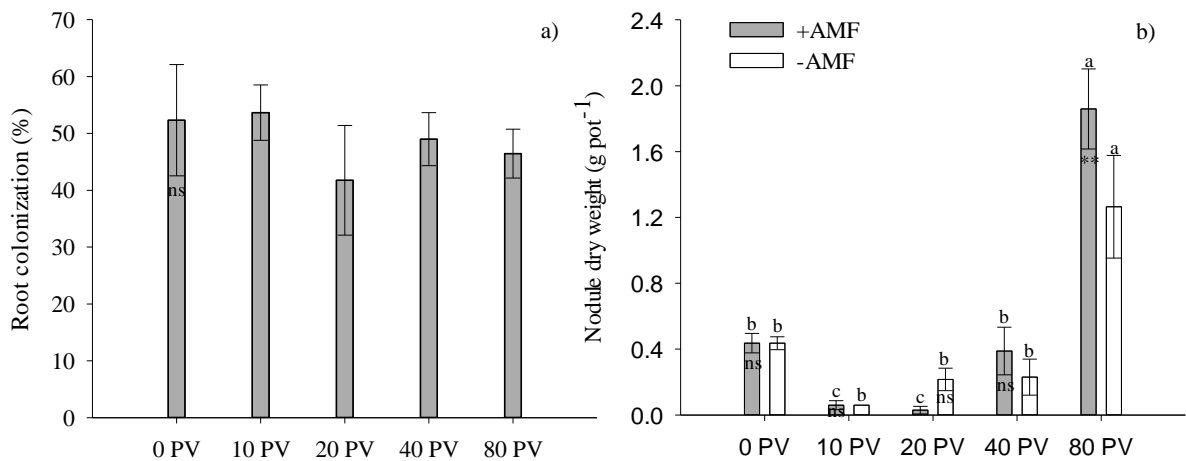


Fig. 1 Mycorrhizal colonization (a) and dry matter production of nodules (b) in *Canavalia ensiformis* plants with or without arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) inoculation. The plants were grown for 45 days in a sandy soil to which 100 mg kg⁻¹ copper (Cu) was added and with different levels of added vermicompost. Letters indicate differences between vermicompost levels within each inoculation treatment. Means followed by the same letter were not significantly different according to the Scott–Knott test. ns, non-significant; **significant effect of AMF inoculation within each vermicompost level (F test; $p < 0.01$).

3.3 Growth and nutrient contents of the plant shoots

There was an increase in the dry mass production of the shoots and roots from *C. ensiformis* with increasing vermicompost doses ($p < 0.0001$) (Figure 2a and Figure 2b). Inoculation with AMF resulted in a significant increase in the shoot and root dry masses in all the vermicompost treatments, except for the roots in the 80 PV treatment (Figure 2a and Figure 2b). The mean increases under mycorrhization were 18% and 27% dry mass for the shoots and roots, respectively.

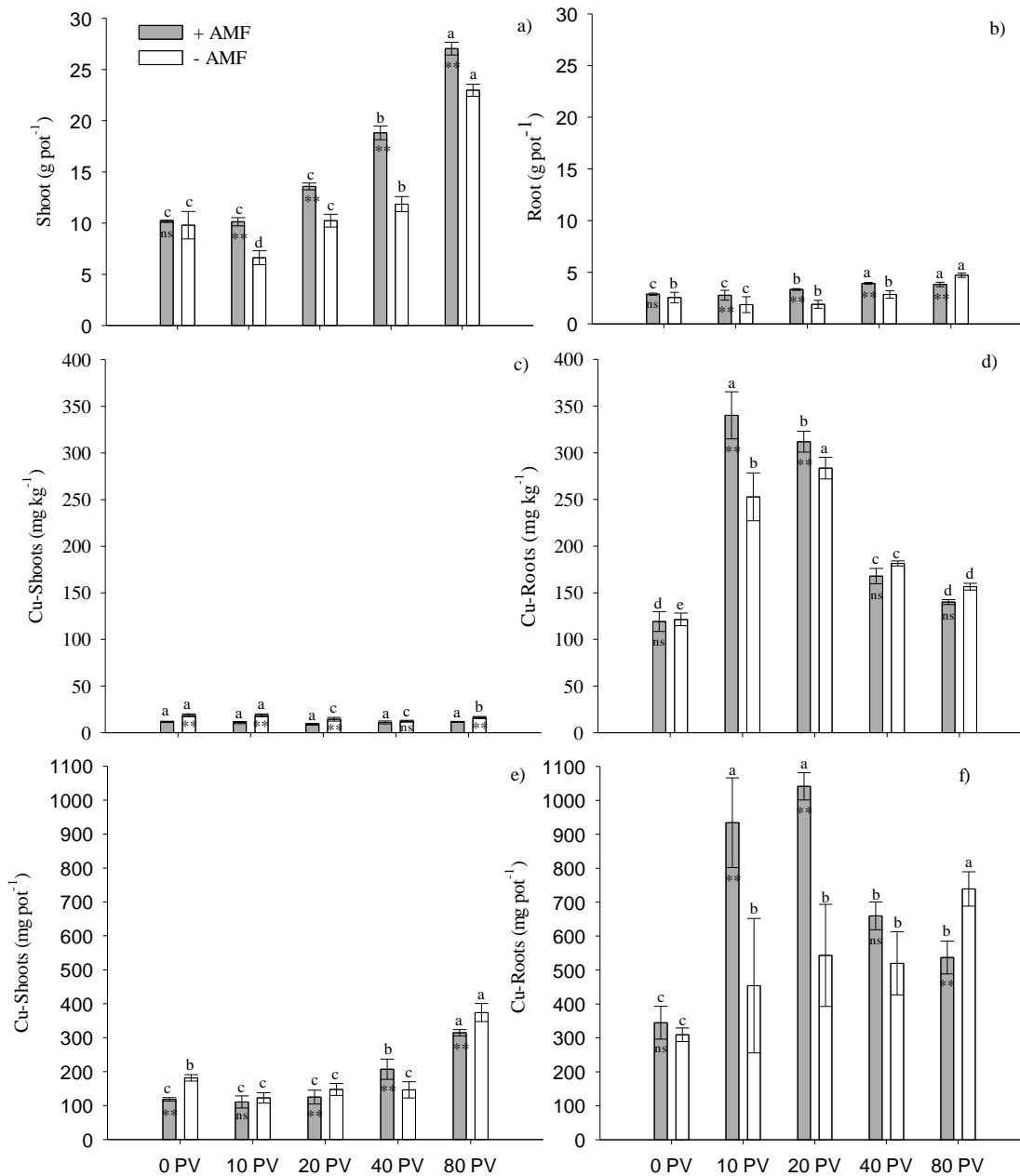


Fig. 2 Dry mass (a, b), copper (Cu) concentration in the tissues (c, d) and cumulative concentration of Cu per pot (e, f) in *Canavalia ensiformis* plants with or without arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) inoculation. The plants were grown for 45 days in a sandy soil to which 100 mg kg^{-1} Cu was added and with different levels of added vermicompost. Letters indicate differences between vermicompost levels within each inoculation treatment. Means followed by the same letter were not significantly different according to the Scott–Knott test.

ns, non-significant; **significant effect of AMF inoculation within each vermicompost level (F test; $p < 0.01$).

The highest Cu levels in the shoots of the non-mycorrhized plants were observed in the control treatments (0 PV) and with the lowest dose of vermicompost (10 PV) (Figure 2c). This behavior may be a consequence of the concentration effect due to lower growth. In the mycorrhized plants, the Cu content of the shoots was not influenced by the vermicompost doses, but mycorrhization reduced the Cu content by 36%, on average, in the shoots of the plants, except for in the 40 PV treatment.

In the root system, the behaviors of mycorrhized and non-mycorrhized plants were similar (Figure 2d). In the treatments receiving the lowest doses of vermicompost (10 PV and 20 PV), there were significant increases ($p < 0.0001$) in the Cu contents of the roots, but with increased doses (40 PV and 80 PV), the Cu concentration in the root system was reduced. This behavior was related to the higher availability of Cu in the soil solution (Table 1) in the treatments receiving the lowest doses (10 PV and 20 PV). There was also a significant ($p = 0.0028$) increase in the Cu absorption of mycorrhized roots compared to non-mycorrhized roots in these treatments.

The total Cu content accumulated in the shoots of the plants per pot was greater at higher vermicompost doses (Figure 2e) (40 PV and 80 PV), which was due to the higher growth of these plants. Mycorrhization reduced the concentration of Cu per pot (mg pot^{-1}) in the 0 PV, 20 PV and 80 PV treatments due to the reduced Cu contents in the shoots (mg kg^{-1}). In the root system of the non-mycorrhized plants, the total Cu content in the pots increased with increasing vermicompost dose (Figure 2f), but the highest Cu contents were observed in the 10 PV and 20 PV treatments of mycorrhized plants due to the higher concentration of Cu

in the roots (mg kg^{-1}). In these treatments, mycorrhization increased the Cu accumulated in the roots by 106% and 97%, respectively, relative to non-mycorrhizal plants.

The increased vermicompost doses in the soil increased the concentrations of P in the shoots and reduced those of Fe and Zn (Table 2). Mycorrhization increased the average P concentration in the shoots by 14%, whereas the N and Mg contents were not significantly influenced by the vermicompost doses ($p=0.2148$ for N, $p=0.2099$ for Mg) or inoculation with AMF ($p=0.0519$ for N, $p=0.1763$ for Mg).

Table 2. Nutrient contents of the shoots of *Canavalia ensiformis* grown in a sandy soil contaminated with 100 mg kg^{-1} Cu with doses of bovine manure vermicompost equivalent to 0, 10, 20, 40 and 80 mg kg^{-1} P.

Nutrients	Inoculation	0 PV	10 PV	20 PV	40 PV	80 PV
P (mg kg^{-1})	-AMF	38.07Ad ⁽¹⁾	54.25Ac	50.44Ac	108.51Ab	184.65Aa
	+AMF	51.39Ac	72.34Ac	77.10Ac	111.36Ab	183.70Aa
N (g kg^{-1})	-AMF	10.76 ^{ns}	12.14 ^{ns}	9.80 ^{ns}	10.48 ^{ns}	9.99 ^{ns}
	+AMF	11.09 ^{ns}	9.14 ^{ns}	10.22 ^{ns}	7.00 ^{ns}	9.40 ^{ns}
K (g kg^{-1})	-AMF	11.88Ab	15.06Aa	13.23Ab	12.44Ab	11.71Ab
	+AMF	11.53Ab	13.41Aa	13.49Aa	13.52Ab	11.55Ab
Fe (mg kg^{-1})	-AMF	29.00Aa	28.28Aa	14.40Bc	20.50Ab	17.44Ac
	+AMF	31.66Aa	24.33Bb	20.63Ab	13.42Bc	11.12Bc
Zn (mg kg^{-1})	-AMF	25.04Ba	26.06Aa	25.84Ba	20.94Aa	14.81Ab
	+AMF	31.06Aa	23.89Ab	32.77Aa	11.35Bc	16.85Ac

⁽¹⁾Means followed by the same uppercase letter (the effect of AMF inoculation for each level of vermicompost) and lowercase letter (effect of vermicompost levels for treatments with and without AMF inoculation) were not significantly different according to the Scott-Knott test. ns, non-significant (F test; $p<0.01$).

3.4 Photosynthetic pigments

The highest vermicompost dose yielded a 37% increase in the Chl a content compared to the control (Figure 3a). The carotenoid and B -carotene pigments showed a tendency toward reduced concentrations at higher vermicompost doses and with the mycorrhization of the plants (Figure 3c and Figure 3d), which was probably due to the dilution effect since there was a higher concentration of these pigments in the treatments with lower biomasses. The Chl b content was not altered by the vermicompost doses or by AMF (Figure 3b).

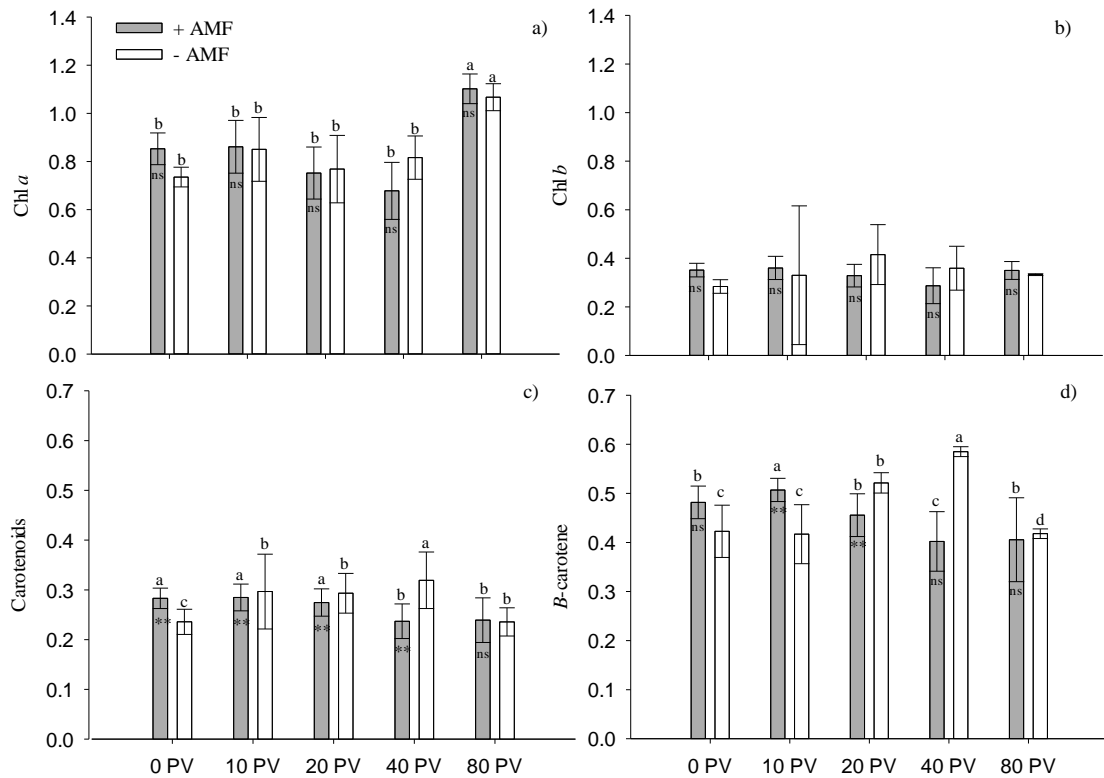


Fig. 3 Concentrations (mg g⁻¹ fresh weight) of chlorophyll a (Chl a) (a), chlorophyll b Chl b (b), carotenoids (c) and beta carotene (B -carotene) (d) in the leaves of *Canavalia ensiformis* plants with or without arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) inoculation. The plants were grown for 45 days in a sandy soil to which 100 mg kg⁻¹ copper (Cu) was added and with

different levels of added vermicompost. Letters indicate differences between vermicompost levels within each inoculation treatment. Means followed by the same letter were not significantly different according to the Scott–Knott test. ns, non-significant; **significant effect of AMF inoculation within each level of vermicompost (F test; $p < 0.01$).

3.5 Photochemical efficiency

The effects of Cu toxicity on the *Chl a* fluorescence parameters were only ameliorated when vermicompost was applied at the highest dose (80 PV) (Figure 4). The 80 PV treatment had a lower F_o (41%) and higher $Y(II)$ (118%), ETR (61%) and F_v/F_o (66%) relative to the average values of the other treatments. No treatment effects were observed on the F_v/F_m ratio (Figure 4C), and the mycorrhiza did not change any of the *Chl a* fluorescence parameters assessed here (Figure 4).

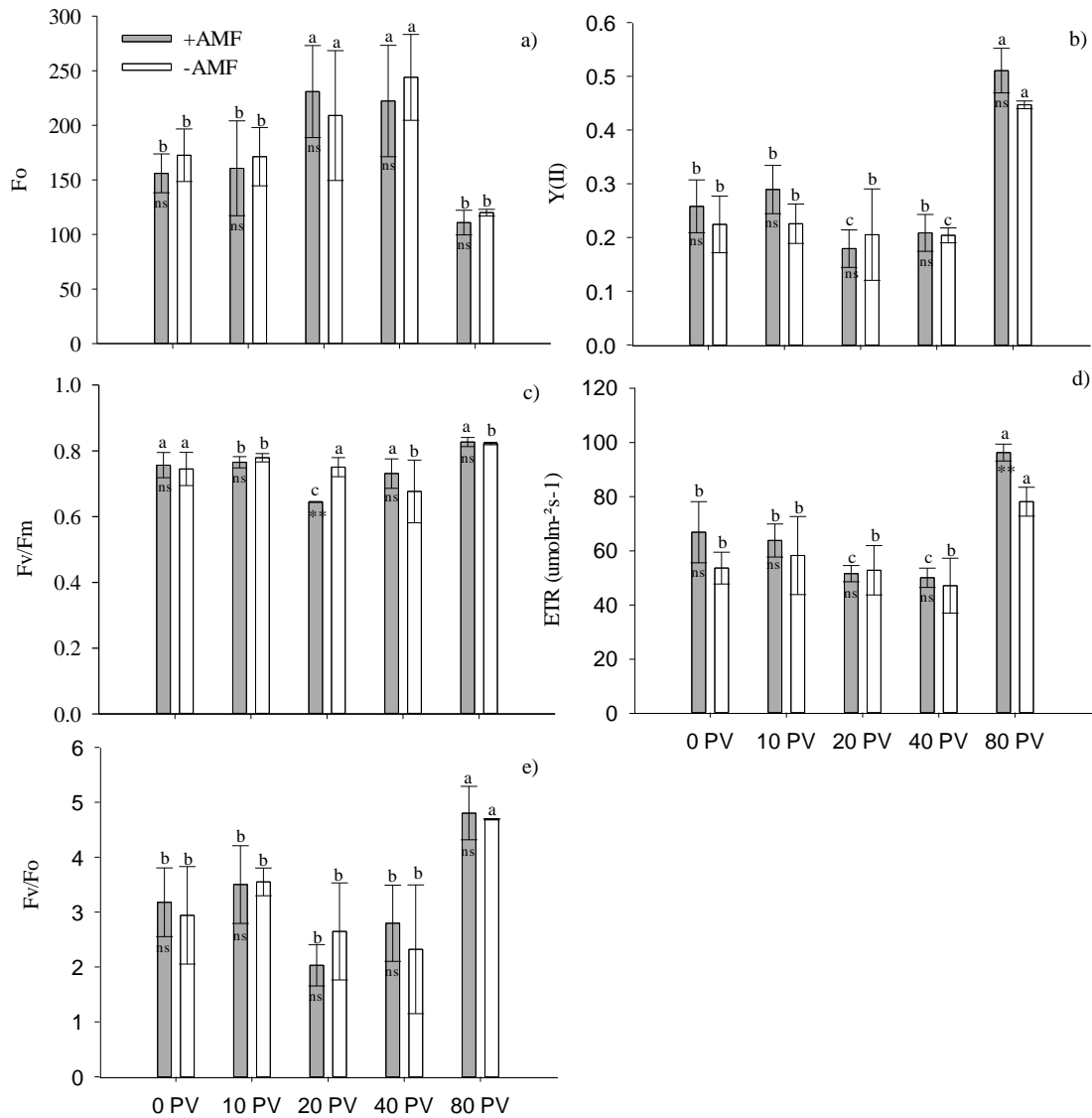


Fig. 4 Initial fluorescence (F_o) (a), effective quantum efficiency of PSII ($Y(II)$) (b), maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m) (c), electron transport rate at the highest radiation (ETR_{1500}) (d) and PSII basal quantum yield (F_v/F_o) (e) for *Canavalia ensiformis* plants with or without arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) inoculation. The plants were grown for 45 days in a sandy soil to which 100 mg kg⁻¹ copper (Cu) was added and with different levels of added vermicompost. Letters indicate differences between vermicompost levels within each inoculation treatment. Means followed by the same letter were not significantly different according to the Scott-Knott test. ns, non-significant; **significant effect of AMF inoculation within each level of vermicompost (F test; $p < 0.01$).

3.6 Activity of oxidative stress enzymes

The addition of vermicompost to the soil attenuated the oxidative stress caused by Cu in the plants, reducing the activity of POD and SOD enzymes (Figure 5a and Figure 5b). The only exception was the POD activity in the 80 PV treatment, which was greater than that in the 40 PV treatment. The CAT activity was quite high in the 80 PV treatment, approximately 50% above the average of the other treatments. Mycorrhization affected the enzymatic activity of POD and SOD in some treatments, but there was no obvious trend.

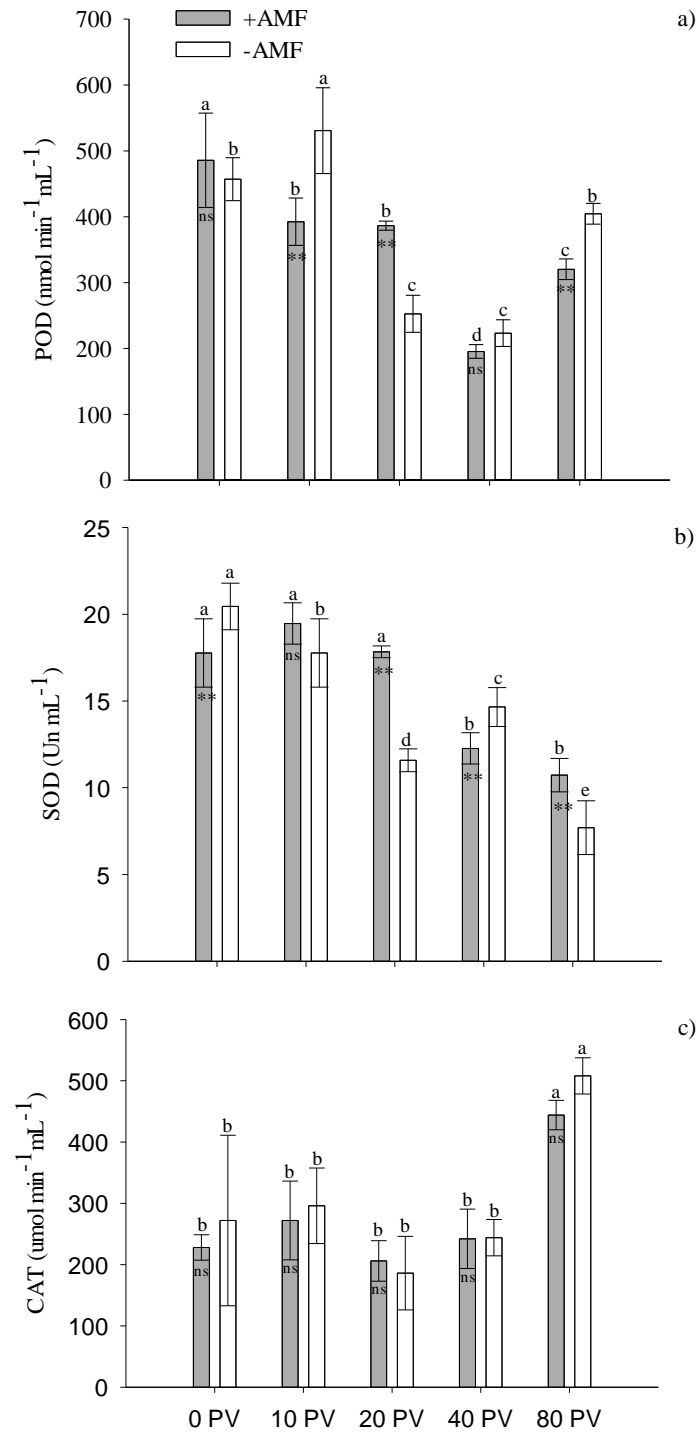


Fig. 5 Activities of the peroxidase (POD) (a), superoxide dismutase (SOD) (b) and catalase (CAT) (c) enzymes in *Canavalia ensiformis* plants with or without arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) inoculation. The plants were grown for 45 days in a sandy soil to which 100 mg kg⁻¹ copper (Cu) was added and with different levels of added vermicompost. Letters

indicate differences between vermicompost levels within each inoculation treatment. Means followed by the same letter were not significantly different according to the Scott–Knott test. ns, non-significant; **significant effect of AMF inoculation within each level of vermicompost (F test; $p < 0.01$).

3.7 Correlation matrix and principal component analysis

The Cu content in solution was reduced by the elevation in the pH and the addition of P via vermicompost with strong and moderate positive correlations, respectively (Table 3). In the treatments receiving small vermicompost additions, this attribute negatively influenced the biomass production of *C. ensiformis*. By contrast, plant growth was favored by the higher pH, P content in the solution, dry mass production of nodules and P absorption. Plant growth increased the production of CAT, primarily due to the increased P levels in the tissue. In addition, increases in fluorescence parameters such as (Y(II)), the maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm), ETR₁₅₀₀, Fv/Fo and Chla production indicate that plants with greater growth suffered less stress. Reduced plant growth was correlated with high levels of iron (Fe) and Zn, carotenoids, B-carotene and Fo in the shoots.

Table 3. Pearson correlation coefficients (r) as calculated from three replicates of each sampling situation (n=30). *= $p < 0.01$.

Variables	Shoot	Root	Nodule	Cu-Shoot	Cu-Root	P-Shoot	N	K	Fe	Zn	POD	SOD	CAT	Fo	Fv/Fm	YII	ETR	Fv/Fo	chl a	chl b	chl(a+b)	caroten	B-caroten	pH solut	Cu solut
Root	0.81*																								
Nodule	0.88*	0.65*																							
Cu-Shoot	-0.17ns	-0.02ns	-0.03ns																						
Cu-Root	-0.42*	-0.44*	-0.51*	-0.25ns																					
P-Shoot	0.88*	0.69*	0.78*	0.01ns	-0.37*																				
N	-0.37*	-0.52*	-0.14ns	0.45*	0.00ns	-0.17ns																			
K	-0.42*	-0.45*	-0.45*	0.06ns	0.55*	-0.31ns	0.06ns																		
Fe	-0.77*	-0.62*	-0.50*	0.32ns	-0.03ns	-0.66*	0.56*	0.05ns																	
Zn	-0.70*	-0.66*	-0.50*	0.02ns	0.34ns	-0.65*	0.43*	0.14ns	0.59*																
POD	-0.42*	-0.46*	-0.11ns	0.44*	-0.02ns	-0.33ns	0.58*	0.12ns	0.74*	0.47*															
SOD	-0.81*	-0.80*	-0.65*	0.01ns	0.26ns	-0.81*	0.28ns	0.23ns	0.74*	0.60*	0.52*														
CAT	0.66*	0.52*	0.70*	0.25ns	-0.35ns	0.75*	0.00ns	-0.36ns	-0.27ns	-0.48*	0.16ns	-0.52*													
Fo	-0.41*	-0.33*	-0.55*	-0.25ns	0.29ns	-0.39*	-0.09ns	0.45*	-0.02ns	0.20ns	-0.40*	0.21ns	-0.76*												
Fv/Fm	0.47*	0.45*	0.55*	0.34ns	-0.30ns	0.45*	0.00ns	-0.20ns	-0.12ns	-0.37*	0.25ns	-0.39*	0.68*	-0.82*											
YII	0.77*	0.59*	0.84*	0.04ns	-0.33ns	0.75*	-0.11ns	-0.48*	-0.37*	-0.45*	0.05ns	-0.54*	0.87*	-0.80*	0.67*										
ETR	0.64*	0.39*	0.81*	0.01ns	-0.28ns	0.61*	0.04ns	-0.36ns	-0.23ns	-0.24ns	0.19*	-0.38*	0.70*	-0.69*	0.52*	0.89*									
Fv/Fo	0.57*	0.50*	0.65*	0.20ns	-0.30ns	0.56*	-0.05ns	-0.29ns	-0.20ns	-0.40*	0.23ns	-0.43*	0.81*	-0.87*	0.92*	0.83*	0.65*								
chl a	0.54*	0.38*	0.72*	0.11ns	-0.20ns	0.58*	0.16ns	-0.38*	-0.20ns	-0.25ns	0.19ns	-0.43*	0.74*	-0.70*	0.60*	0.82*	0.75*	0.72*							
chl b	-0.21ns	-0.24ns	-0.15ns	0.06ns	0.27ns	-0.19ns	0.37*	0.01ns	0.13ns	0.16ns	0.06ns	0.09ns	-0.09ns	-0.04ns	-0.07ns	-0.10ns	-0.03ns	-0.09ns	0.27ns						
chl (a+b)	0.28ns	0.14ns	0.44*	0.11ns	0.00ns	0.32ns	0.31ns	-0.27ns	-0.08ns	-0.09ns	0.17ns	-0.26ns	0.49*	-0.52*	0.39*	0.54*	0.52*	0.47*	0.86*	0.72*					
caroten	-0.43*	-0.47*	-0.35ns	0.01ns	0.34ns	-0.28ns	0.47*	0.11ns	0.23ns	0.31ns	0.04ns	0.23ns	-0.30ns	0.14ns	-0.18ns	-0.30ns	-0.24ns	-0.23ns	0.17ns	0.77*	0.53*				
B-caroten	-0.40*	-0.45*	-0.30ns	0.03ns	0.25ns	-0.28ns	0.47*	0.04ns	0.26ns	0.28ns	0.07ns	0.26ns	-0.26ns	0.09ns	-0.16ns	-0.26ns	-0.20ns	-0.20ns	0.21ns	0.84*	0.59*	0.97*			
pH solut	0.62*	0.50*	0.35ns	-0.32ns	0.20ns	0.66*	-0.39*	0.06ns	-0.78*	-0.55*	-0.64*	-0.68*	0.36ns	0.01ns	0.10ns	0.35ns	0.15ns	0.25ns	0.26ns	-0.01ns	0.18ns	-0.09ns	-0.13ns		
Cu solut	-0.40*	-0.26	-0.15	0.23ns	-0.30ns	-0.49*	0.30ns	-0.23ns	0.75*	0.44*	0.59*	0.59*	-0.20ns	-0.26ns	0.12ns	-0.10ns	0.03ns	0.02ns	-0.08ns	0.05ns	-0.03ns	0.00ns	0.07ns	-0.81*	
P soluti	0.92*	0.69*	0.88*	-0.04ns	-0.38*	0.91*	-0.17ns	-0.33ns	-0.64*	-0.61*	-0.24ns	-0.79*	0.76*	-0.46*	0.49*	0.82*	0.70*	0.64*	0.68*	-0.16ns	0.40*	-0.31ns	-0.29ns	0.62*	-0.43*

The PCA, which addressed the variable doses of bovine manure vermicompost and inoculation with *R. clarus*, explained 59.20% of the variability in the data (Figure 6). Most of the variation in the original dataset (40.43%) was explained by the first component (Factor 1), which was primarily associated with the dry mass of roots, shoots and nodules; P in solution (Psol); K, P, Zn and Mg in the tissue; Cu in the roots (Cu-root); CAT; the total chlorophyll, Chla and carotenoid production; Y(II); ETR; Fv/Fm; and Fv/Fo. Regardless of inoculation with AMF, the 80 PV treatment was related to the dry mass of the roots, shoots and nodules; P in solution; and P in tissue, which were highly positively correlated with one another (Figure 6). In contrast, the 0 PV and 10 PV treatments, with or without inoculation, were related to the variables of Cu in the solution and shoots; Mg, N, Fe and Zn in the tissue; carotenoid production and SOD activity. The 20 PV treatments with and without inoculation and the 40 PV without inoculation were related to the K content of the tissue, B-carotene production, Cu in the roots and Fo. The pH of the solution was related to the 40 PV treatment without *R. clarus* inoculation.

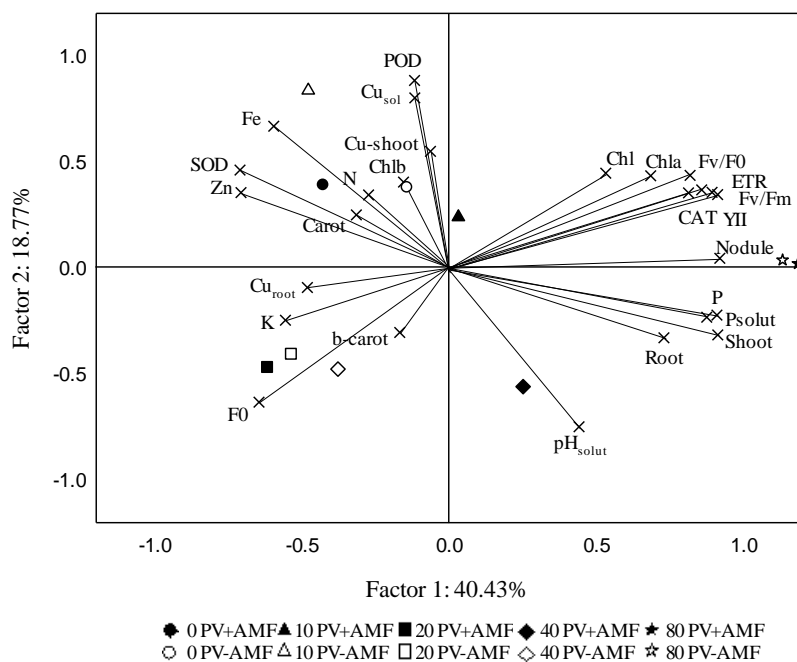


Fig. 6 Principal components analysis (PCA) of copper (Cu) (Cu-shoot), iron (Fe), zinc (Zn), nitrogen (N), potassium (K) and phosphorus (P) concentrations in the shoots; root Cu (Cu-root); soil solution Cu^{2+} (Cusolut), P (Psolut) and pH; shoot (Shoot), root (Root) and nodule (Nodule) dry weight; superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) activity; minimal fluorescence (Fo), PSII maximum quantum yield (Fv/Fm), PSII basal quantum yield (Fv/Fo), PSII effective quantum efficiency (YII) and ETR at the highest radiation; and Chla, Chlb, chlorophyll (a + b), carotenoid and B-carotene concentrations in *Canavalia ensiformis* with or without arbuscular mycorrhizal fungus (AMF). The plants were grown for 45 days in a sandy soil to which 100 mg kg^{-1} Cu soil was added and at different levels of added vermicompost.

4. Discussion

Adding increasing doses of bovine manure vermicompost to sandy soil with a high Cu content increased the pH and P of the solution and the contents of other nutrients in the soil, but it reduced the Cu content in solution. The presence of functional groups with negative charges causes Cu adsorption (Singh and Kaur, 2014), which increases the pH value, Cu precipitation and the availability of P in the soil and in solution, thus contributing to the formation of phosphate-metal complexes (Valipour et al. 2016) and reducing the availability of Cu. In poor sandy soils, vermicompost is a good source of nutrients and organic matter (Zacarías-Toledo et al. 2016) in addition to being an alternative for reusing organic wastes that could pose an environmental hazard otherwise. In addition, earthworms and vermicomposts can independently reduce heavy metal contamination in soil or organic waste. After vermicomposting, Gogoi et al. (2015) found a significant reduction in Cu, and Goswani et al. (2016) observed significantly reduced Cr, Cd, Pb and Zn contents in some organic residues. It is probable that a fraction of the heavy metals of the vermicomposts is absorbed by earthworms through dermal contact (Saxe et al. 2001; Yang et al. 2013).

Plants grown with low doses of vermicompost (10 PV and 20 PV) concentrated greater amounts of Cu in the roots. Thus, the hypothesis was partially confirmed, so the dose of vermicompost determines the amount of Cu absorbed by the plant. The addition of low doses of vermicompost (<20 PV) may increase the low-molecular-weight organic acids in the soil solution, favoring plant uptake (Pérez-Esteban et al. 2014), and the solubility of metals (Cu, Fe, Zn, Cd, etc.) may increase after adding organic fertilizers due to the formation of chelates that prevent sorption, thus promoting migration to the solution through soluble complexes (Ribeiro-Filho et al. 2001; Diaz-Barrientos et al. 2003).

Even with the greater availability of Cu in the 10 PV treatment, the plants were able to produce a reasonable amount of root dry matter compared to the higher doses of vermicompost. In this treatment and with 20 PV, the phytostabilization was more efficient,

especially in mycorrhized plants. One of the likely mechanisms underlying the phytotoxicity reduction observed in the plants exposed to the lowest doses (10 PV and 20 PV) was the increase in Fe concentration in the tissues, especially in mycorrhized plants. The toxic effects of Cu are considerably reduced with increasing Fe concentrations in tissues due to the antagonistic interaction between these two metals (Pätsikkä, 2002).

Better plant nutrition due to vermicompost nutrients and reduced Cu bioavailability favored plant growth at the 80 PV dose. Even with the reduced concentration of the metal in the shoots, the high dry mass production resulted in a large amount of accumulated Cu per pot, increasing the phytoextraction efficiency. In addition, the reduced Fe concentration in the tissues contributed to the higher absorption of Cu by the plant. According to Perea-García et al (2016), the Fe deficiency is ameliorated by the higher absorption of Cu since it participates in the supply of enzymatic cofactors that substitute for Fe, as in SOD.

Copper contamination greatly damages nodulations, and only the addition of vermicompost at high doses stimulated the production of nodule dry mass in *C. ensiformis*. Although higher amounts of N were added to the soil via the 80 PV dose, nodule production was greatly increased, probably due to a reduction in the Cu concentration and an increase in the availability of P in the soil solution (Tavares et al. 2012). Significant nodulation stimulus promoted by mycorrhization at the highest evaluated dose of vermicompost was also observed.

The vermicompost doses (and, consequently, the P doses) added to the soil did not affect mycorrhizal colonization. Similar results were found by Oliveira et al. (2015) in *Passiflora alata* inoculated with *Gigaspora albida* and grown with increasing vermicompost doses. Most likely, the addition of P via vermicompost or mineral fertilization stimulated colonization through increased root growth and supply of photoassimilates (Cavender et al. 2003), and it did not reach the limits necessary to inhibit mycorrhization. Ferreira et al. (2015)

verified that P levels up to 7.4 mg L^{-1} in solution did not reduce the rate of *Crotalaria juncea* colonization by *R. clarus* in soil contaminated with Cu. Arbuscular mycorrhizal fungi significantly increased the biomass production in all the treatments, except for roots under 80 PV, due to better plant nutrition and protection against excess Cu in the soil (Ferreira, et al. 2015). Meier et al. (2015) found that *Oenothera picensis* plants were only able to develop in a soil with high Cu contents after inoculation with AMF (500 mg kg^{-1}).

The mycorrhized plants subjected to the lowest doses of vermicompost (10 PV and 20 PV) exhibited higher Cu contents in the roots and lower contents in the shoots. Thus, the hypothesis that the vermicompost dose and mycorrhization determine the amount of Cu absorbed by plants is fully confirmed. The mycorrhizal fungus binds to the metal by forming bonds with phytochelatins and metallothioneins as well as other organic compounds present on the external surface of the hyphae, such as some glycoproteins (Gonzalez-Chávez et al. 2002), thus reducing metal transport to the shoots of the plants (Doubková and Sudová, 2016). Ruscitti et al. (2017) found that AMF inoculation increased the growth, membrane stability and photosynthetic activity of *Capsicum annuum* plants cultivated in soil with high Cu contents due to the reduced translocation of the metal to the shoot. However, Xiao et al. (2016), cultivating *Trifolium repens*, inoculated *Glomus intraradices* into a soil with high levels of Cu and found that the AMF increased the total Cu concentrations in the shoots and roots as well as the Cu translocation factor. This finding confirms that the effect of mycorrhizal fungi on Cu phytoremediation is dependent on the plant species, fungal species, soil characteristics and fertilization type, as previously described by Santana et al. (2015).

The highest concentration of Chla was observed in the treatment receiving the greatest dose of vermicompost (80 PV), and this effect was attributed to P since the plant did not absorb more of the other nutrients. Phosphorus contributes to chlorophyll synthesis through its presence in the coenzyme NADPH, which is essential for reducing the protochlorophyll *a*

molecule to Chl a during phase III of chlorophyll synthesis (Wettstein et al. 1995). The effect of vermicompost on the production of carotenoids and B -carotene was dependent on the presence of AMF. Because it resulted in greater plant growth, mycorrhization diluted these pigments in the shoots, as evidenced by the negative correlation between these two attributes (Tiecher et al. 2016b). Carotenoids are pigments that provide protection to plants, and increased production is related to the presence of excess Cu (Singh; Nath 2015).

Only the highest dose of vermicompost was able to reduce the symptoms of Cu toxicity in plants, such as chlorosis, necrosis and reduced growth. The chlorophyll fluorescence parameters indicated that the plants were subjected to severe stress. The increased F_o indicated that there was a loss of excitation energy during the transmission of energy from the antenna complex to the PSII reaction center (Możdżeń et al. 2016). The $Y(II)$ parameter is related to the CO_2 assimilation rate and can be inhibited by a high concentration of heavy metals in tissue (Yaghoubian et al. 2016).

The ETR and F_v/F_o were directly correlated with plant growth, demonstrating that the plants subjected to the treatments with lower doses of vermicompost ($<40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}$ via vermicompost) suffered chronic photoinhibition, which was probably caused by excess Cu. The F_v/F_o ratio exhibits greater amplitude under stress conditions since it immediately reflects all changes in F_v and/or F_o (Lichtenthaler et al. 2005). According to Micheli-Lopez et al. (2016), F_v/F_o is one of the most sensitive Cu damage parameters of the electron transport chain and indicates a decline in the photochemistry rate due to the oxidation of the stock of electron acceptors or a reduction in the size of the stock of the primary electron acceptors associated with PSII. The reduction in the ETR indicates chronic photoinhibition resulting in light dissipation in the form of heat as a way of protecting plants from damage from solar radiation (Ferreira et al. 2015).

The decline in chlorophyll production in plants subjected to the lowest vermicompost doses followed the decrease in the ETR, demonstrating that Cu affects PSII activity in these plants (Almeida-Rodriguez et al. 2015). Similarly, only the 80 PV treatment produced Fv/Fm values above 0.80; lower values indicate failures in the PSII (Bjorkman and Demmig, 1987).

The elevation of the activity of antioxidative enzymes, POD and SOD in plants subjected to Cu stress is a phytoprotection mechanism that was demonstrated in this study. Increasing vermicompost doses reduced the activity of these enzymes, probably by reducing the availability and absorption of Cu and increasing the supply of P to the plants. The concentration of this nutrient in the plant tissue had a strong positive correlation with the CAT enzyme, explaining its high activity at the highest vermicompost dose (80 PV). Similar results were found by Ferreira et al. (2015), who observed increased activity of the CAT enzyme in *C. juncea* plants provided with increasing doses of P in a Cu-contaminated soil.

The high levels of available and solution Cu showed the low sorption capacity of sandy soil after contamination. The vermicompost reduced the Cu content in the solution and increased the supply of nutrients to the plants, which resulted in higher biomass production and reduced phytotoxic/physiological damage compared to treatments without vermicompost. Thus, Cu phytoextraction was significantly higher with the 80 PV dose, and phytostabilization occurred at the 10 PV and 20 PV doses.

Inoculation with mycorrhizal fungi allowed for higher biomass production and a reduction in the translocation of the metal to the shoots of the plants. Thus, the Cu content in the roots of inoculated plants was higher than that in non-inoculated plants. These fungi can be used in Cu phytostabilization programs and are more efficient when inoculated in plants subjected to vermicompost doses equivalent to 10 and 20 mg P kg⁻¹.

Canavalia ensiformis can be used for Cu phytoremediation programs in sandy soils, but it is not a suitable for phytoextraction programs, as the Cu content in the shoots did not

exceed 100 mg kg^{-1} even after the addition of the different doses of vermicompost and inoculation with mycorrhizal fungi. Plants that accumulate Cu values below this level are not appropriate for phytoextraction (Boyd, 2007) because of the long time that would be needed for soil recovery. Instead, *C. ensiformis* cultivation can be used in soils that are contaminated with Cu for phytostabilization purposes. Under this condition, the addition of vermicompost in doses equivalent to 10 and 20 mg P kg^{-1} and inoculation with mycorrhizal fungus increases the phytostabilization potential of the plant.

5. Conclusions

The application of vermicompost doses and AMF inoculation were used to increase the phytoremediation efficiency of *C. ensiformis* in sandy soil contaminated by Cu. The addition of high doses of vermicompost to soil provides greater plant growth, thus reducing physiological damage from Cu and leading to a greater accumulation of Cu in the shoots, but *C. ensiformis* is not suitable for Cu phytoextraction programs. Mycorrhization and the addition of low doses of vermicompost to the soil increase Cu absorption in the root systems of the plants, so *C. ensiformis* can be used for Cu phytostabilization in sandy soils.

6. Acknowledgements

We are grateful to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Foundation for Research Support of the State of Rio Grande do Sul; FAPERGS), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development; CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento

de Pessoal de Nível Superior (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel; CAPES) for providing scholarships and financial support for this study.

7. References

Adrees M, Ali S, Rizwan M, Ibrahim M, Abbas F, Farid M, Zia-Ur-Rehman M, Irshad, MK, Bhawana SA (2015) The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 8148–8162.

Almeida-Rodríguez AM, Gomes MP, Loubet-Hudon A, Joly S, Labrecque, M (2015) Symbiotic association between *Salix purpurea* L. and *Rhizophagus irregularis*: modulation of plant responses under copper stress. *Tree Physiol.* 6: 1-14.

Andrade SAL, Gratão PL, Schiavinato MA, Silveira APD, Azevedo RA, Mazzafera P (2009) Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. *Chemosphere* 75: 1363–1370.

Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104: 280-292.

Beauchamp CO, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.

Björkman O, Demmig B (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.

Bouché M (1972) Lombriciens de France. Ecologie et systématique. INRA. Annales de Zoologie-écologie animale, Paris, pp. 671.

Boyd RS (2007) The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: Status, challenges and new directions. *Plant Soil* 293: 153-176.

Brasil (2011) Instrução Normativa N_46, de 06 de outubro de 2011. Estabelece o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal [Normative Instruction N_46, from 6 October 2011. It provides technical regulation for organic systems of animal and plant production]. Available in: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/ivegetal/bebidas-arquivos/instrucao-normativa-no-46-de-6-de-outubro-de-2011.pdf/view>. Accessed 18 August 2017.

Bremner JM, Mulvaney CS, 1982. Methods of soil analysis, part 2 chemical and microbiological properties. pp. 595-624.

Briat JF, Lebrun M (1999). Plant responses to metal toxicity. *C. R. Acad. Sci*, 322: 43-54.

Brunetto G, Miotto A, Ceretta CA, Schitt DE, Heinzen J, Moraes MP, Canton L, Tiecher TL, Comin JJ, Girotto E (2014) Mobility of copper and zinc fractions in fungiciden amended vineyard sandy soils. *Arch. Agron. Soil Sci.* 60: 609-624. 2014.

Cambrollé J, García JL, Figueroa ME, Cantos M (2015) Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. *Chemosphere* 120: 171–178.

Cavender ND, Atiyeh RM, Knee M (2003) Vermicompost stimulates mycorrhizal colonization of roots of *Sorghum bicolor* at the expense of plant growth. *Pedobiologia* 47: 85–89.

Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalase and peroxidases. *Methods in Enzymol*, 11: 764-775.

CONAMA (2009) Conselho Nacional do Meio Ambiente Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas [It provides criteria and guiding values of soil quality for the presence of chemical substances and establishes guidelines for the environmental management of areas contaminated by these substances as a result of anthropic activities]. Brasília: CONAMA, 2009. Available at: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>. Accessed 07 January 2018

Diaz-Barrientos E, Madrid L, Maqueda C, Morillo E, Ruiz-Cortés E, Basallote E, Carrillo M (2003) Copper and zinc retention by an organically amended soil. *Chemosphere*, 50: 911-917.

Doubková P, Sudová R (2016) Limited impact of arbuscularmycorrhizal fungi on clones of *Agrostis capillaris* with different heavy metal tolerance. *Appl. Soil Ecol.*, 99: 78–88.

Edwards GE.; Baker NR (1993) Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? *Photosynthesis Research*, 37: 89–102.

EMBRAPA, 1997. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solo [Manual of soil analysis methods]. Rio de Janeiro, Brasil.

Ferreira PAA, Ceretta CA, Soriani HH, Tiecher TL, Soares CRFS, Rossato LV, Cornejo P (2015) *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. *Appl. Soil Ecol.* 91: 37–47.

Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol Soc.* 2: 235-244.

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 990: 87–92.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59: 309-314.

Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytology*, 84: 489-500.

Giroto E, Ceretta CA, Rossatto LV, Farias JG, Brunetto G, Miotto A, Tiecher TL, De Conti L, Lourenzi CR, Schmatz R, Giachini A, Nicoloso FT (2016) Biochemical changes in black

oat (*Avena strigosa* Schreb) cultivated in vineyard soils contaminated 604 with copper. *Plant Phys. Biochem.* 103: 199–207.

Gómez-Arnesto A, Carballeira-Díaz J, Pérez-Rodríguez P, Fernández-Calviño D, Arias-Estévez M, Nóvoa-Muñoz JC, Álvarez-Rodríguez E, Fernández-Sanjurjo MJ, Núñez-Delgado A (2015) Copper content and distribution in vineyard soils from Betanzos (A Coruña, Spain). *Span. J. Agric. Res.* 5: 60-71.

Gogoi A, Biswas S, Bora J, Bhattacharya SS, Kumar M (2015). Effect of vermicomposting on copper and zinc removal in activated sludge with special emphasis on temporal variation. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 15: 101-107.

Gonzalez-Chávez C, D'Haen J, Vangronsveld J, Dodd JC (2002) Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant Soil*, 240: 287-297.

Goswami L, Pratihari S, Dasgupta S, Bhattacharyya P, Mudoji P, Bora J, Bhattacharya SS, Kim KH (2016) Exploring metal detoxification and accumulation potential during vermicomposting of Tea factory coal ash: sequential extraction and fluorescence probe analysis. *Scientific Reports*6:30402.

Gul S, Naz A, Fareed I, Irshad M (2015) Reducing Heavy Metals Extraction from Contaminated Soils Using Organic and Inorganic Amendments – a Review. *Pol. J. Environ. Stud.* 24: 1423-1426.

Hassan SE, Hijri M, St-Arnaud M (2013) Effect of arbuscularmycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grow on cadmium contaminated soil. *New Biotechnology*, 30: 780-787.

Haymann DS, Mosse B (1971) Plant growth response to vesicular-arbuscularmycorrhiza. I. growth of endogone inoculated plants in phosphate deficient soils. *New Phytologist*, 70: 19-27.

Hendry GAF, Price AH (1993) Stress indications: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, GAF, Grime JP (Ed.). *Methods in comparative plant ecology: A laboratory manual*. London: Chapman e Hall, pp148-152.

He, J, Ji, Z, Wang, Q, Liu, C, Zhou, Y, 2016. Effect of Cu and Pb pollution on the growth and antionxidant enzyme activity of *Suaeda heteroptera*. *Ecol Engin.* 87, 102–109.

Junior JBT, Santos TMM, Souza EGA, Meneses CHSG, Sores CS (2015) Produção de fabaceas para adubação verde no agreste paraibano [Fabaceae production for green manure in paraiba's agreste]. *Biofarm*, 11: 47-58.

Klauberg-Filho O, Siqueira JO, Moreira FMS, Soares CR, Silva S (2005) Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: Vidal-Torrado, P, Alleoni, LRF, Cooper, M, Silva, AP, Cardoso, EJ. (Eds.). *Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. pp. 85-144.

Klute A (1986) Water retention: Laboratory methods. In: Klute A(ed). Methods of soil analysis: Physical and mineralogical methods, 2^a ed. Madison, American Society of Agronomy, p. 635-660.

Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{Fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*. 43: 379-393.

Mani D, Kumar C, Patel NK (2016) Integrated micro-biochemical approach for phytoremediation of cadmium and lead contaminated soils using *Gladiolus grandiflorus* L cut flower. *Ecotoxicol Environ Saf*. 124: 435-446.

Meier S, Cornejo P, Cartes P, Borie F, Medina J, Azcon R (2015) Interactive effect between Cu-adapted arbuscularmycorrhizal fungi and biotreated agrowaste residue to improve the nutritional status of *Oenothera picensis* growing in Cu-polluted soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 178: 126–135.

Micheli-Lopez CY, Espadas-Gil F, Fuentes-Ortiz G, Santamaria JM, González-Mendoza D (2016). Bioaccumulation and changes in the photosynthetic apparatus of *Prosopis juliflora* exposed to copper. *Botanical Sciences*, 94: 323-330.

Miotto A, Ceretta CA, Girotto E, Trentin G, Kaminski J, De Conti L, Toselli M, Brunetto G (2017) Copper Accumulation and Availability in Sandy, Acid, Vineyard Soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal*. 48: 1167-1183.

Możdżeń K, Wanic TG, Rut G, Laciak T, Rzepka A (2016) Toxic effect on the physiological processes in *Pinus sylvestris* L. grown under high copper content. *Photosynthetica* 54: 1-8.

Murphy J, Riley JPA (1962) Modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27: 31-36.

Novo LAB, Covelo EF, González L (2013) Phytoremediation of amended copper mine tailings with *Brassica juncea*. *Int J Min Reclam Env.* 27: 215-226.

Oliveira S, Campos MAS, Silva FSB (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost to maximize the production of foliar biomolecules in *Passiflora alata* Curtis seedlings. *J. Sci. Food Agric*, 95: 522–528.

Pätsikkä E, Kairavuo M, Šeršen F, Aro EM, Tyystjärvi E (2002) Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant physiology*, 129: 1359-1367.

Perea-García A, Andrés-Bordería A, Mayo de Andrés S, Sanz A, Davis AM, Davis SJ.

Huijser P, Peñarrubia L(2016) Modulation of copper deficiency responses by diurnal and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot*, 67: 391-403.

Pérez-Esteban J, Escolástico C, Masaguer A, Vargas C, Moliner A (2014) Soluble organic carbon and pH of organic amendments affect metal mobility and chemical speciation in mine soils. *Chemosphere*, 103: 164–171.

Rabiet M, Coquery M, Caluer N, Gahou N, Gouy V (2015) Transfer of metal (loid)s in a small vineyard catchment: contribution of dissolved and particulate fractions in river for contrasted hydrological conditions. *Environ Sci Pollut R*. 22: 19224-19239.

Raij B Van, Andrade JC, Cantarella H, Quaggio JÁ (2001) Análise Química Para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. [Chemical Analysis for Evaluation of Fertility of Tropical Soil] Campinas Instituto Agrônômico (2001), p. 285.

Ribeiro-Filho MR, Siqueira JO, Curi N, Simão JBP (2001) Fracionamento e biodisponibilidade de metais pesados em solo contaminado, incubado com materiais orgânicos e inorgânicos. [Fractioning and bioavailability of heavy metals in contaminated soil, incubated with organic and inorganic materials]. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 25: 495-507.

Rodríguez-Vila A, Covelo EF, Forján R, Asensio V (2015). Recovering a copper mine soil using organic amendments and phytomanagement with *Brassica juncea* L. *J. Environ. Manage*, 147: 73-80.

Ruscitti M, Arango M, Beltrano J (2017) Improvement of copper stress tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Theor. Exp. Plant Physiol*. 29: 37-49.

Santana NA, Ferreira PAA, Soriani HH, Brunetto G, Nicoloso FT, Antonioli ZI, Jacques RJS (2015) Interaction between arbuscularmycorrhizal fungi and vermicompost on copper phytoremediation in a sandy soil. *Appl. Soil Ecol*. 96: 172–182.

- Santiago-Martín A, Vaquero-Perea C, Valverde-Asenjo I, Nieto JRQ, González-Huecas C, Lafuente AL, De La Cueva AV (2016) Impact of vineyard abandonment and natural recolonization on metal content and availability in Mediterranean soils. *Sci. Total Environ*, 551: 57-65.
- Saxe JK, Impellitteri CA, Peijnenburg, WJ, Allen, HE (2001) Novel model describing trace metal concentrations in the earthworm, *Eiseniaandrei*. *Environ. Sci. Technol.* 35 : 4522-4529.
- Silva S, Soares CRFS, Siqueira JO (2006) Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados pela *Brachiaria decumbens* Stapf. em solo multicontaminado [Mycorrhizal fungi influence on brachiaria grass growth and heavy metal extraction in a contaminated soil]. *Pesq. Agropec. Bras*, 41: 1749-1757.
- Singh, J, Kaur, A, 2014. Vermicompost as a strong buffer and natural adsorbent for reducing transition metals, BOD, COD from industrial effluent. *Ecol Eng*, 74, 13–19.
- Singh D, Nath K (2015) Evaluation of copper toxicity in alluvial soil for growth and yield in maize using special reference to iron. *Res. Environ. Life Sci.* 8: 841-844.
- Soil Survey Staff (2014) *Keys to Soil Taxonomy* USDA, Natural Resources Conservation Service. Washington, DC.
- Tavares RC, Filho PFM, Lacerda CF, Silva J (2012) Mycorrhizal colonization and root nodulation in sabiá seedlings (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) at different salinity levels. *Rev. Ciencia Agron* 43: 409-416.

Tiecher TL, Ceretta CA, Tiecher T, Ferreira PA, Nicoloso FT, Soriani HH, Rossato LV, Mimmo T, Cesco S, Lourenzi CR, Giachini AJ, Brunetto G (2016a) Effects of zinc addition to a copper-contaminated vineyard soil on sorption of Zn by soil and plant physiological responses. *Ecotox. Environ. Safe.* 129: 109-119.

Tiecher TL, Ceretta CA, Ferreira PAA, Lourenzi CR, Tiecher T, Girotto E, Nicoloso FT, Soriani HH, De Conti L, Mimmo T, Cesco S, Brunetto G (2016b) The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc contaminated soils for grapevine production. *Geoderma* 262: 52–61.

Valipour M, Shahbazi K, Khanmizaei A (2016) Chemical Immobilization of Lead, Cadmium, Copper, and Nickel in Contaminated Soils by Phosphate Amendments. *Clean* 44: 451-586.

Wettstein DV, Gough S, Kannangara CG (1995) Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1039-1057.

Yaghoubian Y, Siadat SA, Telavat MRM, Pirdashti H (2016) Quantify the Response of Purslane Plant Growth, Photosynthesis Pigments and Photosystem II Photochemistry to Cadmium Concentration Gradients in the Soil. *Russ. J. Plant Physiol.* 63: 77–84.

Yang J, Zhao, C, Xing M, Lin Y (2013) Enhancement stabilization of heavy metals (Zn, Pb, Cr and Cu) during vermifiltration of liquid-state sludge, *Bioresour. Technol.* 146: 649–655.

Xiao JX, An J, Chen YY, Hu CY (2016). Improved growth and Cu tolerance of Cu excessstressed white clover after inoculation with arbuscularbmycorrhizal fungi. *J. Plant Nutr.* 39: 227-234.

Zacarias-Toledo R, González-Mendoza D, Mendiola MAR, Villalobos-Maldonado J J, Gutiérrez-Oliva VF, Dendooven L, Abud-Archila M, Arias-Castro C, Gutiérrez-Miceli FA (2016). Plant Growth and Sugars Content of *Agave americana* L. Cultivated with Vermicompost and Rock Phosphate and Inoculated with *Penicillium* sp. And *Glomus fasciculatum*. *Compost Sci. Util.* 24: 259-265.

Zancheta ACF, Abreu CA, Zambrosi FCB, Erismann MN, Lagôa AMMA (2011) Fitoextração de cobre por espécies de plantas cultivadas em solução nutritiva [Copper phytoextraction by different plant species grown in nutrient solution]. *Bragantia* 70: 737-744.

Zeraik AE, Souza FS, Fatibello-Filho O, Leite OD (2008) Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação [Development of a spot test for peroxidase activity monitoring during a purification procedure]. *Quím. Nova* 31: 731-734.

2.2 ARTIGO II- A INTERAÇÃO ENTRE MINHOCAS E FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR AUMENTA A FITORREMEDIAÇÃO DO COBRE EM SOLO ARENOSO

The interaction between earthworm and arbuscular mycorrhizal fungus improve copper phytoremediation in a sandy soil

Resumo

A contaminação do solo por cobre ocorre em diversos países devido às atividades agrícolas e industriais, e este problema é mais grave em solos arenosos. A fitorremediação é uma alternativa para remediar estes solos e sua eficiência foi aumentada quando fungos micorrízicos arbusculares e minhocas foram inoculados no solo de forma isolada. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito interativo da minhoca e do fungo micorrízico arbuscular na fitorremediação de cobre em um solo arenoso. As plantas de *Canavalia ensiformis* foram cultivadas em casa de vegetação em um solo contaminado com 100 mg kg⁻¹ de Cu, com e sem a inoculação do fungo micorrízico arbuscular *Rhizoglyphus clarum* e de minhocas *Eisenia andrei*. Foram avaliados a disponibilidade do cobre e demais nutrientes na fase sólida e na solução do solo, o crescimento vegetal e a fitotoxicidade do Cu, através da eficiência fotoquímica e da atividade de enzimas do estresse oxidativo. Também foram avaliados o acúmulo de cobre e dos outros nutrientes na parte aérea e nas raízes, a colonização micorrízica, a nodulação, e a reprodução e o acúmulo de cobre nos tecidos das minhocas. O cobre provocou danos fotossintéticos e bioquímicos que resultaram em redução do crescimento da planta. O fungo micorrízico arbuscular reduziu a toxicidade do cobre na planta e aumentou o crescimento da parte aérea. A minhoca aumentou a absorção do cobre e a translocação para a parte aérea. A presença conjunta do fungo micorrízico arbuscular e das minhocas no solo contaminado aumenta o crescimento e o teor de cobre nos tecidos aéreos, o que resulta em maior fitoextração do metal por *Canavalia ensiformis* no solo arenoso.

Palavras-chave: metal pesado, feijão de porco, micorrização, oligoquetas, fitoextração.

Abstract

The soil copper contamination occurs in several countries due to agricultural and industrial activities, and this problem is more serious in sandy soils. The phytoremediation is an alternative to remedy these soils. Arbuscular mycorrhizal fungi and worms alone have been shown to increase the efficiency of phytoremediation. The objective of this study is to evaluate the interactive effect of earthworm and arbuscular mycorrhizal fungi on copper phytoremediation in a sandy soil. The sandy soil was contaminated with 100 mg kg⁻¹ of Cu for the *Canavalia ensiformis* in a greenhouse cultivation with and without the inoculation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizoglyphus clarum* and earthworm *Eisenia andrei*. The availability of copper and other nutrients in the soil and soil solution, the accumulation of copper and other nutrients in shoot and root, plant growth and phytotoxicity of Cu, through photochemical efficiency and enzymes of oxidative stress were evaluated. Mycorrhizal colonization, nodulation, reproduction and the accumulation of copper in the earthworm tissues were also evaluated. The copper caused photosynthetic and biochemical damage, which resulted in reduced plant growth. When inoculated together, earthworms increased the availability of copper and the translocation of the metal to the aerial part of the plant and the arbuscular mycorrhizal fungus increased the shoot biomass and reduced the phytotoxic damages of copper in the plants. The interaction between the mycorrhizal fungus and earthworms increases the copper content in the shoot while promoting greater growth, favoring the phytoextraction process of the metal in sandy soil.

Keywords: heavy metal, jack bean, mycorrhization, oligochaetes, phytoextraction.

Introdução

Muitos solos do mundo estão contaminados por cobre devido às atividades agrícolas e industriais (YANG et al., 2016; BALLABIO et al., 2018). Esta situação é mais grave nos solos arenosos devido a menor sorção do cobre na fase sólida do solo, maior biodisponibilidade e dispersão no ambiente (GIROTTO et al. 2014). A fitorremediação é uma alternativa para reduzir os problemas ambientais causados pelo cobre. O feijão de porco (*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.) é uma planta que apresenta potencial para ser utilizada em programas de fitorremediação, pois acumula altos teores de metais na raiz e na parte aérea, produz grande quantidade de matéria seca, estabelece simbiose com fungos micorrízicos e

com bactérias fixadoras de nitrogênio, e é cultivada em diversas regiões do planeta (SANTANA et al., 2015, SILVA et al., 2018).

No entanto, em solos muito contaminados até as plantas fitorremediadoras podem não se estabelecer. O excesso de cobre pode provocar o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (e.g. peróxido de hidrogênio, radical superóxido, radical hidroxila, entre outros) que danificam proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e membranas nos tecidos vegetais (PILON; TAPKEN, 2013). Como consequência, ocorre desequilíbrio na produção de enzimas de defesa antioxidativas, a exemplo da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (POD) (HANAKA et al., 2016). Os sintomas de toxidez deste metal também podem ser verificados através das modificações nos teores dos pigmentos fotossintéticos e redução da fotossíntese (ZANCHETA et al., 2011; ISLAN et al., 2016; YUSUF et al., 2016). Por tudo isto, as plantas apresentam redução no crescimento, clorose, necrose, que as leva a morte (MEIER et al., 2015, SANTANA et al., 2015; SANTANA et al., 2018).

Para superar estas dificuldades e aumentar a eficiência da fitorremediação, pode-se inocular fungos micorrízicos arbusculares que aumentam a absorção de nutrientes e protegem a planta do excesso de cobre no solo (FERREIRA et al., 2015). Os fungos micorrízicos também podem reduzir os teores de metais nos tecidos vegetais, através do acúmulo em suas hifas ou da complexação em compostos orgânicos externos às hifas (ZHANG et al., 2018). Porém, este efeito depende da espécie da planta, da espécie do fungo e das condições ambientais, pois outros autores já demonstraram que a associação micorrízica pode aumentar o teor de cobre nos tecidos das plantas (MEIER et al., 2012; SANTANA et al., 2018).

Uma prática comumente recomendada para aumentar o crescimento das plantas em solos contaminados por metais é a adição de amenizantes orgânicos (FERREIRA et al., 2018; FRESNO et al., 2018). Esta prática tende a aumentar a abundância das minhocas no solo (LIMA et al., 2007; FREITAS; DIONÍSIO, 2014) e o efeito destas sobre a disponibilidade dos metais pesados e sua absorção pelas plantas tem sido pouco estudado. As minhocas modificam diversas características químicas, físicas e biológicas do solo e por consequência a biodisponibilidade do cobre (JUSSELME et al., 2015; ZHANG et al., 2016). Apesar disto, poucos trabalhos demonstraram o efeito das minhocas na fitorremediação de metais (CHENG; WONG, 2002; DANDAN et al., 2007; LU; LU, 2015). Em alguns casos foi verificado que minhocas podem aumentar a disponibilidade do metal (DU et al., 2014), e consequentemente aumentar o poder fitoextrator das plantas (LEMITIRI et al., 2015). Em outros, as minhocas reduziram a disponibilidade dos metais pelo aumento das cargas negativas do solo ou pela absorção do metal no seu corpo (DANDAN et al., 2007).

As minhocas e os fungos micorrízicos arbusculares coexistem há milhares de anos em todos os solos do mundo, porém o conhecimento do efeito interativo destes indivíduos na fitorremediação de cobre ainda é incipiente. Aghababaei e Raesi (2015) verificaram que a ação conjunta de minhocas e fungos micorrízicos arbusculares aumentou a tolerância do milho e do girassol ao cádmio, reduziu a concentração do metal e o estresse oxidativo nos tecidos vegetais. De forma mais ampla, outros trabalhos demonstram que existe interação entre as minhocas e os fungos arbusculares no desenvolvimento de diferentes espécies de plantas (TUFFEN et al., 2002; EISENHAUER et al., 2009; CAO et al., 2015; YANG et al., 2016). Devido a carência de estudos neste assunto, o presente trabalho testou se a inoculação conjunta de minhocas e fungo micorrízico arbuscular resulta em maior eficiência da fitorremediação do cobre por *Canavalia ensiformis* em um solo arenoso.

Material e métodos

Solo

Um Argissolo Vermelho (EMBRAPA, 2013) ou Typic Hapludalf (SOIL SURVEY STAFT, 2010) foi coletado na camada de 0-20 cm em área de pastagem natural, sem histórico de cultivo, na região vinícola da Campanha, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (30°48'27"S e 55°22'42"W). O solo foi autoclavado e a comunidade microbiana do solo foi restabelecida após a autoclavagem, através da reinoculação da solução do próprio solo não autoclavado, porém filtrada para remoção dos esporos de fungos micorrízicos nativos (HAYMANN; MOSSE, 1971). Após a incubação de 60 dias foi realizada a correção do pH para 5,5 e a contaminação com 100 mg Cu kg⁻¹ através da adição de sulfato de cobre (33,34%) e cloreto de cobre (66,33%). O solo foi incubado por mais 30 dias e analisado: matéria orgânica (Walkley-Black) 9.0 g kg⁻¹; pH (água 1:1) 5.6; P (Mehlich-1) 4.5 mg dm⁻³; K (Mehlich-1) 84.0 mg dm⁻³; Zn (Mehlich-1) 1.6 mg dm⁻³; Saturação por bases 44,8%; Saturação por Al 0%; Cu (Mehlich-1) 1.27 mg kg⁻¹ (teor natural, dose 0) e 107.03 mg kg⁻¹ (dose 100), granulometria (método da pipeta) 54 g kg⁻¹ de argila, 894 g kg⁻¹ de areia e 52 g kg⁻¹ de silte. A capacidade de campo foi de 0.22 m³ m⁻³, determinada em mesa de tensão (as amostras de solo foram saturadas por 48 horas e submetidas ao potencial de 10 kPa por 4 dias, conforme Klute, 1986).

Minhocas

As minhocas da espécie *Eisenia andrei* (Bouché 1972) cresceram em substrato a base de esterco bovino e palha. Quando adultas foram colocadas em placa de Petri com água destilada por 24 horas para esvaziar o seu intestino. Antes da inoculação nos vasos, as minhocas foram lavadas com água corrente para retirar propágulos de fungos arbusculares aderidos na superfície do corpo (AGHABABAEI et al., 2014b).

Fungo micorrízico arbuscular

O fungo micorrízico arbuscular *Rhizoglyphus clarum* (T.H. Nicolson; N.C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler (antigo *Rhizophagus clarus* e *Glomus clarum*) foi escolhido por apresentar desempenho promissor em estudos de recuperação de áreas degradadas contaminadas com metais (SILVA et al., 2006). Os esporos foram multiplicados por culturas armadilhas de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf em vasos plásticos com capacidade para 500g, contendo substrato estéril e o *R. clarum*. Os esporos foram extraídos por peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963), seguido de centrifugação em água (412 g) por três minutos e em solução de sacarose 45% (m/v) a 309 g por dois minutos. A seleção e a contagem de esporos viáveis foram realizadas em microscópio estereoscópico.

Cultivo das plantas e delineamento experimental

A planta de cobertura de verão feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.) foi cultivada em casa de vegetação, em vasos com capacidade para 4 litros, com 3,5 kg de solo. Foram semeadas 5 sementes inoculadas com as bactérias fixadoras de nitrogênio *Bradyrhizobium elkanii*. Após 8 dias da germinação foi realizado o desbaste, deixando-se 2 plantas por vaso.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em um fatorial 2 x 2 x 2, com três repetições, correspondendo a dois teores de cobre (dose 0 e 100 mg kg⁻¹ de cobre), solo inoculado e não inoculado com o fungo micorrízico arbuscular da espécie *Rhizoglyphus clarum* e na presença ou ausência de minhocas da espécie *Eisenia andrei*. Os fungos micorrízicos foram inoculados (100 esporos planta⁻¹) no momento da semeadura, cerca de 3 cm abaixo das sementes. As minhocas adultas foram inoculadas na superfície do solo logo após o desbaste das plantas na quantidade de 3 por vaso (massa média de 0.50 g ind⁻¹). Como forma de alimentar as minhocas, na superfície do vaso foram adicionadas 7 gramas da

mistura de resíduos vegetais de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.) e ervilhaca (*Vicia sativa* L.) (LEVEQUE et al., 2014). Cerca de 70% da superfície dos vasos foi coberta com tecido escuro (tipo TNT), a fim evitar que a incidência da luz prejudicasse o desenvolvimento das minhocas e/ou causasse fuga do vaso.

Como o teor de nutrientes no solo era muito baixo, todos os tratamentos receberam a adição de 40 mg kg⁻¹ de fósforo e 50 mg kg⁻¹ de potássio, na forma de solução de fosfato de potássio. Conforme estudos anteriores, esta adubação não prejudica a micorrização (SOARES; SIQUEIRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2015). Diariamente foram realizadas pesagens dos vasos e adição de água destilada para manutenção da umidade em 80% da capacidade de campo.

Análise fisiológica e enzimática das plantas

Aos 60 dias após a emergência foram determinadas a taxa fotossintética ($A - \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a condutância estomática de vapores de água ($G_s - \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a concentração interna de CO_2 ($C_i - \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol air}^{-1}$), a taxa transpiratória ($E - \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a eficiência do uso da água ($\text{EUA} - \text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$, obtida pela relação entre quantidade de CO_2 fixado pela fotossíntese e a quantidade de água transpirada) e a eficiência da carboxilação da rubisco ($A/C_i - \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, obtida pela relação entre quantidade de CO_2 fixado pela fotossíntese e a concentração interna de CO_2). Para isto, o terço médio da quarta folha expandida de cada planta foi avaliada pelo medidor portátil Infra Red Gas Analyzer (IRGA) (LI-COR, LI-6400 XT, USA), utilizando radiação fotossintética de 1.500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$.

Nesta data, a mesma folha foi coletada, imediatamente congelada em N_2 líquido e armazenada a -80°C para determinação das enzimas do estresse oxidativo. Para isto, a folha foi macerada em N_2 líquido e homogeneizado com 5,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} em pH 7,5; contendo EDTA 1,0 mmol L^{-1} , DTT 3,0 mmol L^{-1} e 2% de PVPP (m/v) (AZEVEDO et al. 1998). Após foi transferido para tubos falcon para centrifugação a 14.000 g por 30 minutos a 4°C , e 0,5 mL do sobrenadante foi estocado em microtubos a -80°C . A concentração de proteínas totais de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976).

A atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a fotorredução do azul de tetrazólio (NBT 50%) (BEAUCHAMP;

FRIDOVICH, 1971). A atividade das peroxidases não específicas (POD, EC 1.11.1.7) foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato e o coeficiente de extinção molar de $26,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHANCE; MAEHLI, 1955). Uma unidade de POD foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a reação de conversão do guaiacol e do peróxido de hidrogênio para a formação de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de tetraguaicol $\text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ de extrato avaliado em espectrofotômetro a 470 nm (UPADHYAYA et al., 1985).

Crescimento da planta, micorrização e nutrientes

No florescimento, aos 60 dias após a emergência, a parte aérea das plantas foi removida, as raízes separadas do solo manualmente e lavadas em água corrente, solução de EDTA $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e água destilada, respectivamente. A taxa de colonização micorrízica foi avaliada pela presença de hifas e vesículas em 20 segmentos de raízes com 1 cm de comprimento, clarificadas em KOH e coradas com azul tripan 0,05%, montadas em lâminas de vidro para microscopia (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980).

A parte aérea, as raízes e os nódulos de fixação biológica foram secos em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C até massa constante. Os teores de P, K, Zn, Ca, Mg e Fe na parte aérea foram determinados após a digestão nítrico-perclórica em espectrofotômetro de absorção atômica (GBC, 932 AA, Austrália), conforme Embrapa (2017). O teor de N na parte aérea foi determinado após a digestão sulfúrica pelo método de Kjeldahl-1 (BREMNER; MULVANEY, 1982).

Reprodução e teor de cobre no tecido das minhocas

No final do experimento foi avaliado o número e a massa fresca das minhocas. O teor de Cu no tecido foi determinado de acordo com Vijver et al. (2006). Uma minhoca de cada tratamento foi seca em estufa (65°C) até peso constante e uma alíquota de 0.25 g foi submetida a digestão nítrico-perclórico (2:1). O teor de Cu quantificado em Espectrômetro de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AOS) (Perkin-Elmer, Optima 7000DV, USA).

Análise química do solo

As amostras de solo coletadas após o cultivo das plantas foram submetidas a extração por Mehlich-1 para determinação dos teores de P, K, Zn, Cu e Fe em espectrofotômetro de absorção atômica (GBC, 932 AA, Austrália) e o teor de N foi determinado pelo método Kjeldahl (BREMNER; MULVANEY, 1982). Os teores de nitrogênio e carbono total no solo foram determinados em analisador elementar (*Thermo Finnigan, Flash 1112, Italy*).

Em todos os tratamentos foi realizada a extração da solução do solo pela técnica da pasta de saturação do solo (RAIJ et al., 2001). Para isto foi adicionada água destilada até a saturação das amostras de solo. A suspensão permaneceu em descanso por 16 h até atingir o equilíbrio. O solo foi acondicionado em funis de Büchner, de 20 cm de diâmetro, com filtro de papel no fundo. A solução do solo foi extraída com o auxílio de um frasco de sucção (Kitassato) com o funil acoplado e uma bomba de sucção. A determinação do pH da solução do solo foi realizada imediatamente e após as amostras foram filtradas (0,22 µm), transferidas para tubos Falcon estéreis e armazenadas em freezer (-80°C). Os teores de nitrogênio e carbono orgânico solúvel total quantificados em analisador elementar (*Thermo Finnigan, Flash 1112, Italy*) (SILVA; BOHNEN, 2001). Os teores P, Zn e Cu na solução do solo foram quantificados em ICP-AOS.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk com $p < 0,05$) e à análise de variância (ANOVA). Os valores médios estatisticamente significativos foram comparados pelo teste *Tukey*, com $p < 0,05$.

Resultados

Teores de elementos no solo

O teor médio de Cu disponível (Mehlich-1) no solo contaminado foi de 101,21 mg kg⁻¹ (Tabela 1). A contaminação por cobre aumentou a disponibilidade de P e K, e reduziu a de Fe na fase sólida do solo. Na solução do solo, o teor do cobre foi aumentado pela contaminação, que também proporcionou aumento no teor de Zn. Os tratamentos não modificaram significativamente ($p = 0.433$) o teor de cobre disponível no solo contaminado, mas observou-se redução de 15% deste teor no solo inoculado somente com FMA (Tabela 1). Já em solução, o cobre foi reduzido significativamente ($p = 0.004$) por todos os tratamentos,

sendo de 55% na presença do fungo, de 47% na presença das minhocas e de 64% na presença de fungo+minhocas. A presença do fungo, isolado ou com minhocas, no solo contaminado aumentou os teores de P Mehlich-1 e as minhocas aumentaram os teores Zn Mehlich-1, mas reduziram os teores de Zn em solução.

Tabela 1- Características químicas do solo não contaminado (0) e contaminado com 100 mg kg⁻¹ de Cu após o cultivo de *Canavalia ensiformis* por 60 dias na presença e ausência do fungo micorrízico arbuscular (FMA) e minhocas (M)

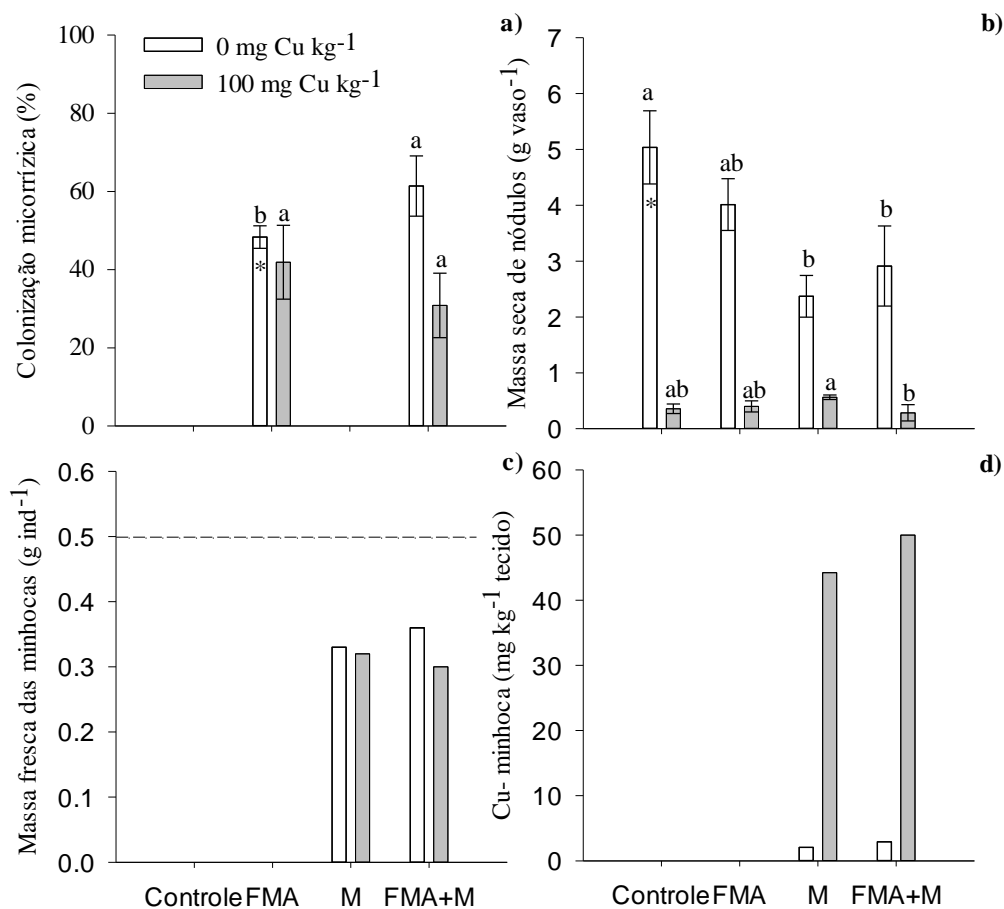
	0				100 mg Cu kg ⁻¹				CV(%)
	Controle	FMA	M	FMA+M	Controle	FMA	M	FMA+M	
pH solução	5,38 ^{nss}	5,27	5,01	5,54	5,10	5,13	5,10	5,19	4,55
P Mehlich-1 (mg kg ⁻¹)	7,31Bd ^{**}	10,01Adc	11,82Abc	9,46ABdc	12,12Bbc	16,93Aa	12,77Bbc	14,36ABab	9,75
P solução (mg L ⁻¹)	0,01Cb ^{NS}	0,04Bb	0,02BCb	0,10Aa	0,03b	0,02b	0,05ab	0,02b	52,60
K Mehlich-1 (g kg ⁻¹)	0,10b ^{**ns}	0,11b	0,13b	0,12b	2,42ab	3,83a	2,78ab	1,53ab	0,93
Cu Mehlich-1 (mg kg ⁻¹)	1,27b ^{**ns}	1,46b	1,15b	1,30b	105,52a	91,12a	106,87a	101,36 ^a	15,69
Cu solução (mg L ⁻¹)	0a ^{**ns}	0a	0a	0a	3,65Aa	1,64Bb	1,95Bb	1,28Bb	32,15
Zn Mehlich-1 (mg kg ⁻¹)	4,19a ^{NS ns}	4,48 ^a	4,71a	4,60 ^a	4,00ABa	3,94Ba	4,74Aa	4,68Aba	6,49
Zn solução (mg L ⁻¹)	0,67Bc ^{**}	0,63Bc	1,12Abc	0,39Bc	2,74Aa	2,21ABab	1,42ABbc	1,10Bc	31,87
Fe Mehlich-1 (mg kg ⁻¹)	211,81ab ^{**ns}	212,37 ^a	205,27ab	209,12ab	182,12c	189,19bc	201,05abc	203,94abc	3,91
C total (mg kg ⁻¹)	4,01	3,93	4,32	4,50	4,37	4,57	4,51	3,79	14,26
C solução (mg L ⁻¹)	31,46	30,44	39,17	39,23	62,95	69,21	58,97	43,93	3,17
N total (mg kg ⁻¹)	0,24	0,24	0,28	0,30	0,28	0,31	0,30	0,23	9,23
N solução (mg L ⁻¹)	22,05	19,46	30,64	14,79	33,62	45,19	41,39	14,97	2,36
Relação C:N	16,36 ⁽¹⁾	16,17	15,49	15,13	15,60	14,93	15,14	16,45	26,16

⁽¹⁾A amostragem para determinação dos teores de N, C (total e em solução) e relação C:N foram do tipo compostas, assim optou-se por não realizar análise estatística. Letras minúsculas na linha comparam todos os tratamentos, independente da contaminação; letras maiúsculas na linha comparam os tratamentos em apenas um cenário de contaminação (0 ou 100 mg kg⁻¹); pelo teste *Tukey* com $p < 0,05$. ** efeito significativo da adição de 100 mg kg⁻¹ de cobre, com $p < 0,05$; ^{NS} efeito não significativo da adição de 100 mg kg⁻¹ de cobre, com $p < 0,05$; ^{ns} efeito não significativo dos tratamentos em apenas um cenário de contaminação; ^{nss} efeito não significativo dos tratamentos, independente da contaminação, com $p < 0,05$.

Colonização micorrízica, nodulação e minhocas

A colonização micorrízica média foi de 42% nos tratamentos onde houve a inoculação com *R. clarum* (Figura 1a). Nos tratamentos não inoculados não foram verificadas estruturas micorrízicas (hifas, vesículas ou arbúsculos) nas raízes das plantas. A adição do cobre ao solo reduziu a colonização micorrízica e a presença das minhocas estimulou a micorrização no solo não contaminado. A contaminação por cobre reduziu drasticamente a nodulação das plantas de todos os tratamentos, e a presença das minhocas isoladas ou com o fungo reduziu a nodulação no solo não contaminado (Figura 1b).

Figura 1 - Colonização micorrízica arbuscular (a), massa seca de nódulos (b), massa fresca das minhocas (c) e teor de cobre nos tecidos das minhocas (d) após 60 dias de cultivo do feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) em solo arenoso não contaminado ou contaminado com 100 mg kg⁻¹ de cobre, com e sem a inoculação do fungo micorrízico *Rizoglyphus clarum* e das minhocas *Eisenia andrei*.



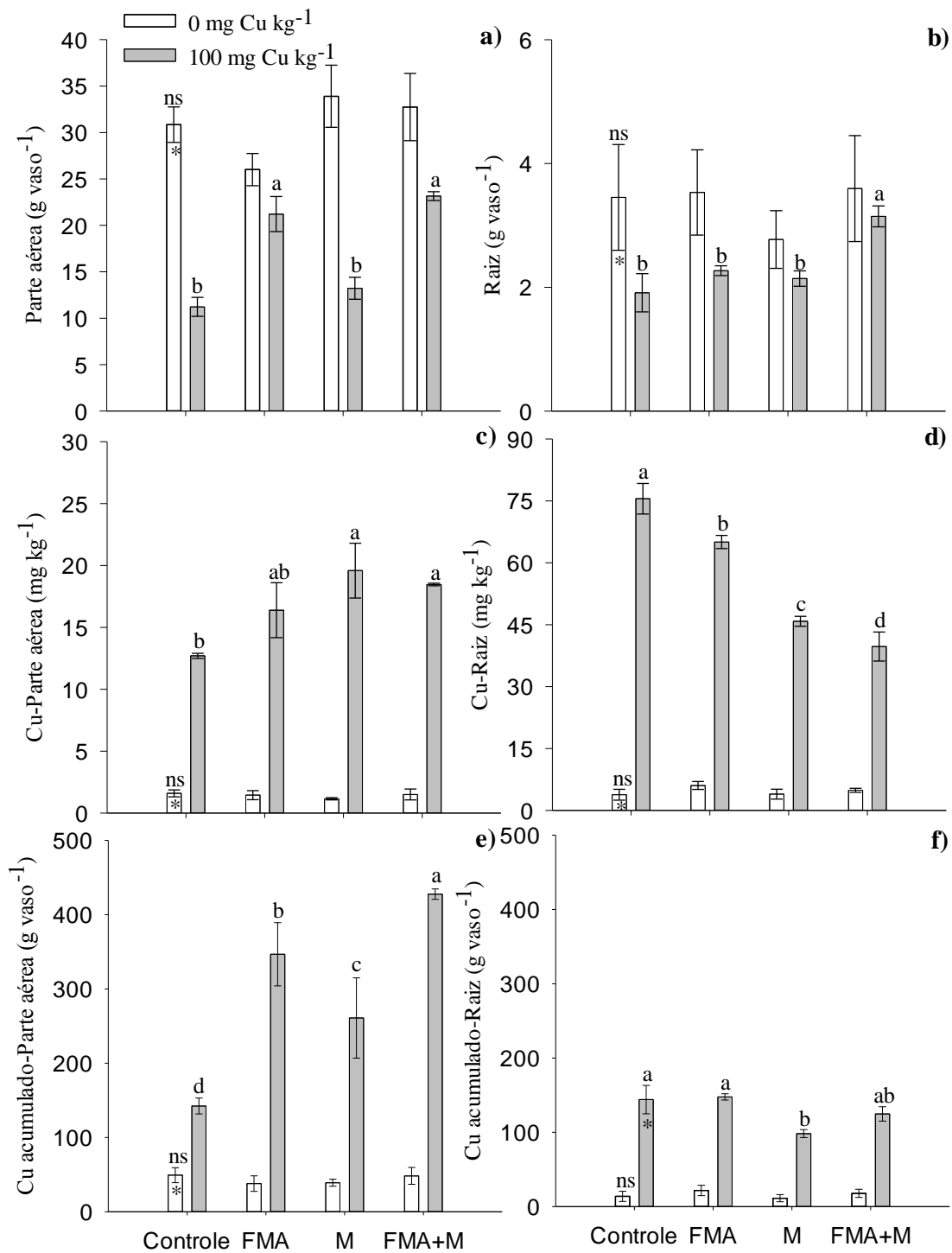
As letras indicam diferenças entre os tratamentos dentro de cada condição de contaminação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferenças significativas pelo teste de *Tukey*, com $p < 0,05$. Efeito significativo (*) e não significativo (ns) da contaminação com cobre (teste F; $p < 0,05$). A linha tracejada na Figura 1c indica a massa fresca das minhocas no início do experimento.

A sobrevivência das minhocas foi prejudicada no solo contaminado por cobre. No solo não contaminado, as três minhocas inoculadas por repetição permaneceram até o final do experimento. Já no solo contaminado foram quantificadas duas minhocas por repetição em todos os tratamentos (dados não apresentados). Além disto, a massa fresca das minhocas foi reduzida em 31% no solo não contaminado e em 38% no solo contaminado em relação ao início do experimento (Figura 1c). O aumento no teor de cobre no tecido das minhocas foi de aproximadamente 20 vezes no solo contaminado (Figura 1d), o que resultou em um acúmulo $14,53 \text{ mg ind}^{-1}$ no tratamento com minhocas e de $17,27 \text{ mg ind}^{-1}$ no tratamento com minhocas+fungo.

Crescimento e nutrição da planta

A contaminação do solo com 100 mg kg^{-1} de cobre reduziu a massa seca da parte aérea em 44% e da raiz em 29% (Figura 2a e Figura 2b). Houve interação significativa ($p_{\text{raiz}} = 0,01$; $p_{\text{parte aérea}} = 0,03$) entre fungos e minhocas para o aumento da massa seca da parte aérea e da raiz no solo contaminado. Neste solo, os tratamentos com FMA e FMA+M produziram os maiores acúmulos de massa seca da parte aérea, em média 81% maior que os demais tratamentos. Na raiz, o tratamento FMA + minhocas produziu massa seca 33% maior que a média dos demais tratamentos.

Figura 2 - Massa seca de parte aérea (a) e raízes (b), teor de cobre na parte aérea (c) e raízes (d), e cobre acumulado na parte aérea (e) e raízes (f) do feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) cultivado em solo arenoso contaminado ou não com 100 mg kg⁻¹ de cobre, inoculado ou não com fungo micorrízico *R. clarum* (FMA) e minhocas *E. andrei* (M).



As letras indicam diferenças entre os tratamentos dentro de cada condição de contaminação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey, com $p < 0,05$. Efeito significativo (*) e não significativo (ns) da contaminação com cobre (teste F; $p < 0,05$).

A presença das minhocas no solo contaminado (M e FMA+M) aumentou os teores de cobre na parte aérea de *C. ensiformis* (Figura 1c). A inoculação do FMA também aumentou este teor, porém em menor grau, o que não resultou em diferença estatística em relação ao controle. Já no sistema radicular o efeito dos tratamentos foi contrário do observado na parte aérea. No solo contaminado houve redução do teor de cobre em todos os tratamentos com fungo ou minhoca, sendo que na presença das minhocas as reduções foram maiores (Figura 1d).

O acúmulo do cobre (teor do metal x biomassa) na parte aérea das plantas de *C. ensiformis* cultivadas no solo contaminado foi aumentado pela presença do fungo (143%) e das minhocas (83%) (Figura 1e). Porém, o maior acúmulo ocorreu no tratamento onde os dois organismos estavam presentes, com aumento de 200% em relação ao controle. Nas raízes, a presença isolada das minhocas reduziu o acúmulo de cobre em 32% em relação ao controle e os demais tratamentos não apresentaram efeito (Figura 1f).

A menor produção de massa seca das plantas cultivadas no solo contaminado resultou em aumentos dos teores de N, K, Zn e Fe nos tecidos aéreos, provavelmente devido ao efeito de concentração (Tabela 2). Houve redução da absorção de Mg e não alteração da absorção do P ($p = 0.5308$) e do Ca ($p = 0.5987$) pela adição do cobre ao solo. De forma geral, a presença do FMA melhorou a nutrição da planta cultivada no solo contaminado, com aumentos, em relação aos tratamentos sem FMA, de 49, 31, 18, 28 e 6% nos teores de N, P, K, Mg e Fe, respectivamente. Porém, houve redução da absorção de Zn e não alteração da absorção do Ca. Já a presença das minhocas no solo reduziu os teores de N, P, K e Ca nos tecidos aéreos de *C. ensiformis* em 21, 27, 4, 13 e 12% respectivamente, em relação a média dos demais tratamentos, independente do cenário de contaminação (Tabela 2). Este efeito também foi observado no tratamento FMA+M, porém em menor grau.

Tabela 2 - Teores de nutrientes nos tecidos aéreos (mg kg^{-1}) de *Canavalia ensiformis* cultivada em um solo arenoso não contaminado (0) ou contaminado com 100 de Cu, na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e minhocas (M)

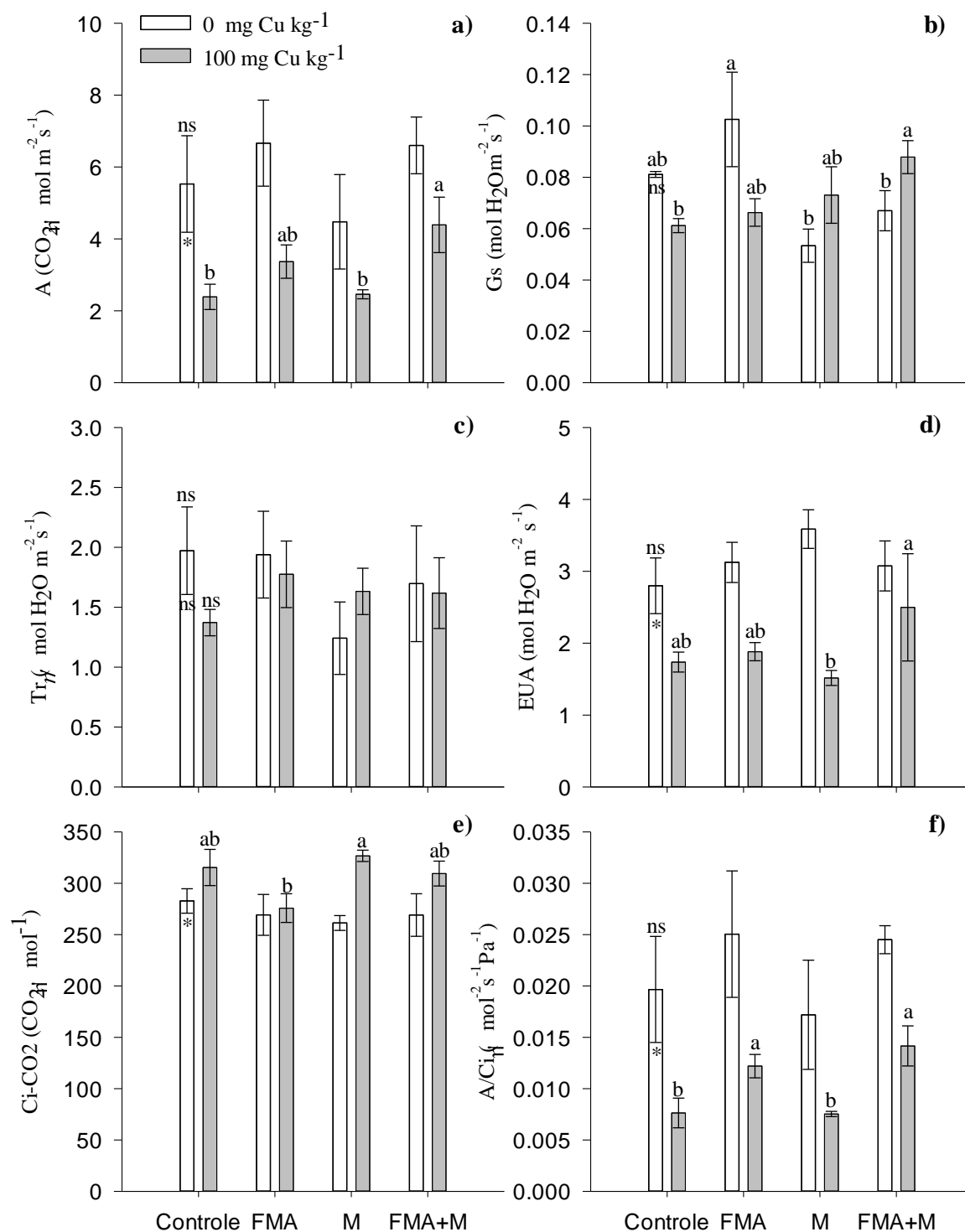
Atributos	0				100				CV(%)
	Controle	FMA	M	FMA+M	Controle	FMA	M	FMA+M	
N (g kg ⁻¹)	14,62ab ^{**ns}	15,90ab	11,52b	14,03b	19,39ab	24,13a	15,45ab	13,83b	21,14
P (mg kg ⁻¹)	102,90Bab ^{NS}	106,90Aab	66,90Bc	107,70Bab	98,90Bab	120,60Aa	85,90Bbc	92,3Babc	10,35
K (g kg ⁻¹)	23,70Abc ^{**}	17,12Bd	20,69ABcd	21,82ABc	27,63ABab	30,11Aa	25,30BCbc	23,69Ccb	6,81
Ca (g kg ⁻¹)	7,62ab ^{NSns}	8,18 ^a	6,75ab	6,09b	8,00Aab	7,82ABab	5,94Cb	6,22BCab	10,19
Mg (g kg ⁻¹)	0,56ab ^{**ns}	0,6 ^a	0,52ab	0,57ab	0,47ab ^{ns}	0,58a	0,51ab	0,38b	12,60
Zn (mg kg ⁻¹)	11,50b ^{**ns}	11,95b	10,65b	14,01b	22,12a ^{ns}	15,50ab	15,58ab	14,15b	17,93
Fe (mg kg ⁻¹)	47,93ab ^{**ns}	52,19ab	39,87b	55,88ab	55,10ab ^{ns}	61,77a	58,91ab	69,19a	11,41

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na linha, comparando todos os tratamentos independente da contaminação, e maiúsculas na linha comparando os tratamentos em apenas um cenário de contaminação (0 ou 100 mg kg⁻¹), não diferem pelo teste *Tukey* com $p < 0,05$; ** efeito significativo da adição de 100 mg kg⁻¹ de cobre, com $p < 0,05$; ^{NS} efeito não significativo da adição de 100 mg kg⁻¹ de cobre, com $p < 0,05$; ^{ns}efeito não significativo dos tratamentos em apenas um cenário de contaminação; ^{nss}efeito não significativo dos tratamentos, independente da contaminação, com $p < 0,05$;

Atributos fisiológicos e enzimáticos das plantas

A contaminação por cobre prejudicou a maioria dos atributos fisiológicos de *C. ensiformis* (Figura 3). Às exceções foram a condutância estomática ($p = 0,302$) e a taxa transpiratória ($p = 0,395$) (Figura 3b e 3c) que não foram alteradas pela adição do cobre no solo. Em relação as plantas cultivadas no solo não contaminado, destaca-se que a toxicidade provocada pelo metal pesado provocou reduções médias de 46% na taxa fotossintética e de 52% na eficiência instantânea de carboxilação. De modo geral, os atributos fisiológicos (Figura 3) mostraram um comportamento semelhante a produção de massa seca da parte aérea das plantas cultivadas em solo contaminado (Figura 2a) (a concentração interna de CO₂ deve apresentar comportamento inverso aos demais parâmetros). A exceção da taxa transpiratória, observou-se que a inoculação do fungo ou inoculação do fungo+minhoca amenizou em parte os efeitos deletérios do cobre sobre as plantas. Quando da inoculação somente das minhocas, as plantas não apresentaram melhorias significativas em relação ao controle, porém para a condutância estomática o desempenho foi melhor na neste tratamento (Figura 3b).

Figura 3 - Taxa fotossintética (a), condutância estomática de vapores de água (b), taxa transpiratória (c), eficiência do uso da água (d), concentração interna de CO₂ (e) eficiência instantânea de carboxilação pela rubisco (f) em folhas de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) cultivado em solo arenoso sem contaminação ou contaminado com 100 mg kg⁻¹ de cobre, inoculado ou não com fungo micorrízico *R. clarum* (FMA) e minhocas *E. andrei* (M).

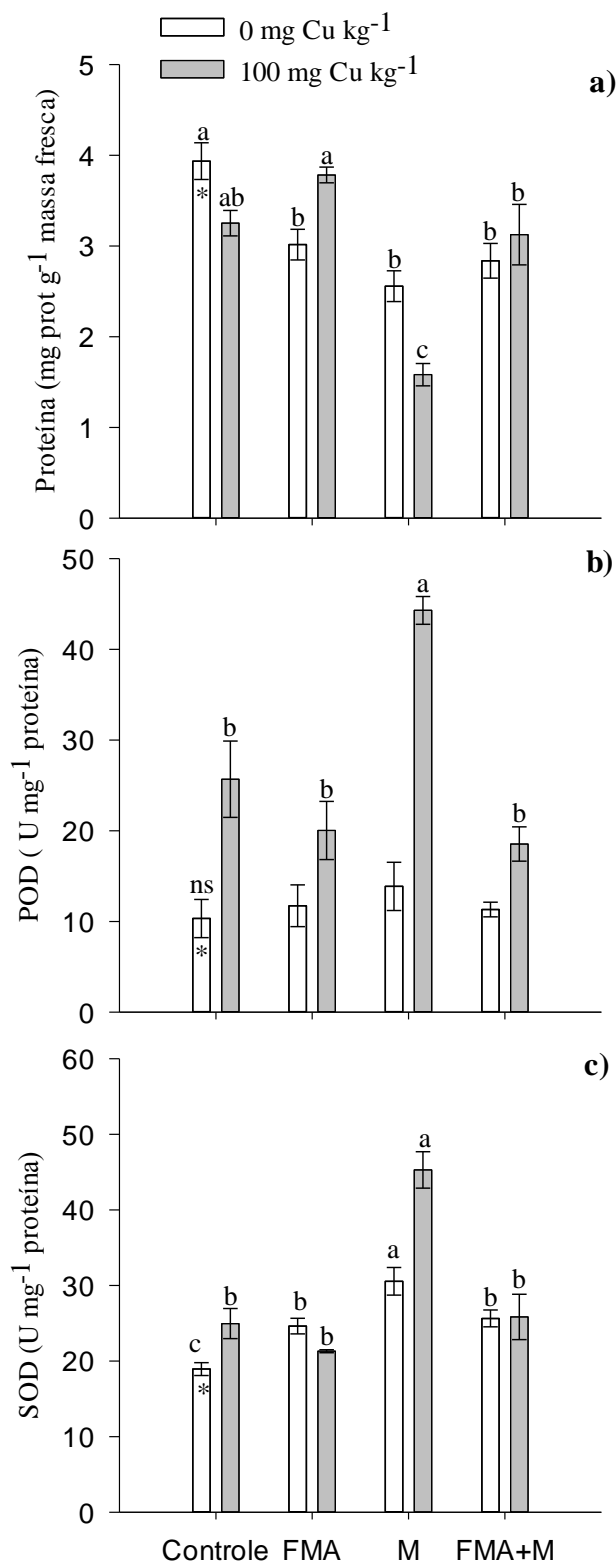


As letras indicam diferenças entre os tratamentos dentro de cada condição de contaminação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferenças significativas pelo teste de *Tukey*, com $p < 0,05$. Efeito significativo (*) e não significativo (ns) da contaminação com cobre (teste F; $p < 0,05$).

O teor de proteína nas folhas não apresentou um comportamento característico em resposta a adição do cobre no solo ($p = 0.0674$) (Figura 4a). No entanto, foi significativamente alterado pelos tratamentos, apresentando novamente uma resposta semelhante a produção de

massa seca da parte aérea, com maiores valores nos tratamentos FMA e FMA+M. A inoculação isolada das minhocas resultou em valores até menores que os observados no controle.

Figura 4. Teor de proteína (a), atividade da peroxidase (b) e da superóxido dismutase (c) em folhas de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) cultivado em solo arenoso contaminado e não com 100 mg kg^{-1} de cobre, inoculado ou não com fungo micorrízico *R. clarum* (FMA) e minhocas *E. andrei* (M).



As letras indicam diferenças entre os tratamentos dentro de cada condição de contaminação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferenças significativas pelo teste de *Tukey*, com $p < 0,05$. Efeito significativo (*) e não significativo (ns) da contaminação com cobre (teste F; $p < 0,05$).

As enzimas envolvidas na atenuação do estresse oxidativo, peroxidases não específicas (POD) e superóxido dismutase (SOD), apresentaram maior atividade no solo contaminado com cobre (ambas com $p < 0,001$) (Figura 4a e Figura 4b). O efeito dos tratamentos claramente evidencia que as plantas cultivadas na presença somente das minhocas apresentaram alto estresse oxidativo causado pelo cobre, maior até que as plantas do tratamento controle. Por outro lado, as plantas cultivadas nos tratamentos FMA e FMA+M apresentaram os menores estresses oxidativos, ainda que sem diferenciarem-se estatisticamente do controle.

Discussão

A adição de 100 mg kg^{-1} de Cu no solo arenoso resultou em alto teor disponível deste metal para as plantas, já que estes solos apresentam baixo teor de argila e de matéria orgânica. Os teores de Cu disponível e em solução verificados neste estudo estão próximos dos observados em vinhedos estabelecidos sobre este tipo de solo. Miotto et al. (2017) determinaram teores de 98 mg kg^{-1} de Cu disponível (EDTA) e $0,62 \text{ mg kg}^{-1}$ em solução em um vinhedo da mesma região. A elevada quantidade de cobre adicionada ao solo provocou aumento nos teores disponíveis de K, P e Zn no solo como consequência da ligação do cobre nos sítios de adsorção e liberação dos nutrientes que estavam em formas trocáveis (ELLIOT et al., 1985; GOMES et al., 1999). Por outro lado, no solo com alto teor de cobre houve redução no teor de Fe em solução, provavelmente devido a formação de compostos amorfos de ferro e cobre (KUO et al., 1983).

A *C. ensiformis* é uma planta com características adequadas para a fitorremediação, pois produz alta biomassa, acumula grandes quantidades de metais em seus tecidos, é agressiva e altamente resistente aos estresses bióticos e abióticos (ZANCHETA et al., 2014; FERRAÇO et al., 2017; MADALÃO et al., 2017). No entanto, a contaminação do solo com 100 mg kg^{-1} afetou severamente diversos parâmetros das plantas, como a micorrização e a nodulação. O cobre reduz o desenvolvimento radicular, favorece a formação de raízes curtas, grossas e com poucos pelos radiculares, o que dificulta a formação da micorriza e dos nódulos de fixação de nitrogênio (KONG et al., 2015). A absorção dos nutrientes N, K, Mg, Zn e Fe

foi desbalanceada e houve acúmulo de 700 e 1.900% mais cobre nos tecidos aéreos e radiculares, respectivamente. Keller et al. (2015) também observou que a toxicidade do cobre reflete em redução do comprimento das raízes e da absorção de nutrientes pelas plantas. Esta maior concentração de cobre nos tecidos resultou em prejuízos a diversos parâmetros fisiológicos fundamentais para o metabolismo vegetal: taxa fotossintética, eficiência do uso da água, concentração interna de CO₂ e eficiência instantânea de carboxilação pela rubisco. Além disto, nas plantas cultivadas nos solos contaminados quantificaram-se reduções nos teores de proteínas nas folhas e aumento do estresse oxidativo celular, avaliado pela atividade das enzimas peroxidase e superóxido dismutase. A toxidez pelo cobre em atributos fisiológicos e bioquímicos das plantas foi relatada nos trabalhos de Apodaca et al. (2017), Marques et al. (2018) e Noreen et al. (2018). Como o crescimento é a expressão final de todos os processos que acontecem na planta, a contaminação por cobre resultou na redução da produção de massa seca da parte aérea e das raízes.

Como alternativa para tornar a fitorremediação por *C. ensiformis* mais eficiente neste solo arenoso contaminado com cobre, utilizou-se a micorrização com um fungo arbuscular e avaliou-se o efeito das minhocas presentes no solo de forma isolada ou conjuntamente com o fungo. A inoculação com o FMA reduziu a concentração de cobre na solução do solo e o teor de cobre disponível na fase sólida do solo. O FMA pode acumular o Cu no micélio externo às raízes devido, na parede celular e dentro do citoplasma, associado a compostos férricos ou através da ligação estável do metal ao arsenato (GONZÁLEZ-CHAVEZ et al., 2002). Além disso, as excreções produzidas por hifas externas, como a glomalina, podem reter o cobre e reduzir a sua disponibilidade no solo (ROLLON et al., 2017). Isto pode ter contribuído para a redução do teor de cobre no sistema radicular da planta (ZHOU et al., 2018). Porém, a presença do fungo aumentou a quantidade de cobre nos tecidos aéreos, como já demonstrado em outros estudos (MERLOS et al., 2017; RUSCITTI et al., 2017). Este efeito não comprometeu processos fisiológicos essenciais para a planta (LI et al., 2017), pois os atributos taxa fotossintética, condutância estomática, eficiência do uso da água, concentração interna de CO₂, eficiência instantânea de carboxilação pela rubisco e o teor de proteínas nos tecidos foliares apresentaram desempenho igual ou superior às plantas não inoculadas (RUSCITTI et al., 2017) que apresentavam menores teores de cobre nos tecidos aéreos.

Com a inoculação do fungo também houve aumentos dos teores de P, N, K, Mg e Fe na parte aérea e redução de 45 e 33% na atividade das enzimas peroxidases e superóxido

dismutase, o que indica menor estresse oxidativo nas folhas. O fungo micorrízico aumenta os teores de nutrientes no solo, principalmente o teor de P disponível no solo contaminado com cobre, provavelmente pela solubilização do P inorgânico e mineralização do P orgânico do solo pelas enzimas fúngicas extracelulares (KUMAR et al., 2017). A micorrização também pode resultar no enriquecimento de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera (principalmente bactérias), estimulados por substâncias orgânicas originadas na micorriza (ZHANG et al., 2016b; LIU et al., 2018). Como já demonstrado por Ruscitti et al. (2017), no presente estudo o FMA aumentou em 37% o teor de Cu em parte aérea e ainda contribuiu para a maior tolerância da planta aos estresses causados pelo metal. Além da melhor nutrição em P, que induz a formação de ligações estáveis entre fosfato e o metal, os FMAs contribuem para a redução do estresse oxidativo e podem aumentar a expressão das fitoquelatinas, que reduzem a quantidade de íons Cu^{+2} livres na célula (GARÓFALO-CHAVES et al., 2010; GARG et al., 2012).

Como consequência da melhor nutrição e da redução dos efeitos tóxicos em atributos fisiológicos (FERREIRA et al., 2018), as plantas inoculadas com o FMA produziram 81% mais massa seca de parte aérea, o que somado ao aumento do teor de cobre nestes tecidos, resultou em um teor acumulado de 387,07 mg por vaso deste metal, muito superior ao valor de 201,59 mg por vaso observado nas plantas não inoculadas. Desta forma, a inoculação com FMA demonstrou ser uma alternativa para aumentar a fitoextração do cobre pelas plantas de *C. ensiformis*, pois aumentou a concentração de cobre e o crescimento da parte aérea. De forma semelhante, Cornejo et al. (2017) verificaram que o fungos micorrízicos arbusculares nativos aumentaram o poder fitoextrator de *Oenothera affinis* em um solo contaminado com cobre.

As minhocas podem habitar os solos contaminados e sua abundância pode ser aumentada pelo uso de amenizantes orgânicos na fitorremediação. Neste solo, a alta biodisponibilidade do cobre resultou em elevado teor do metal nos tecidos das minhocas, o que provocou morte de parte das minhocas e também pode ter contribuído para a redução do teor de cobre em solução. Segundo Sahariah et al. (2015), as minhocas absorvem o metal no corpo ou potencializam a sua imobilização no intestino pela ação de proteínas complexantes ou ao húmus através da ingestão do solo contaminado. Além disto, a ação das minhocas pode aumentar os sítios de ligação na matéria orgânica e por consequência a complexação do metal no solo (SIZMUR et al., 2011; BHAT et al., 2018). A alta concentração do metal no tecido

das minhocas resulta na combinação de íons de Cu com proteínas, alterando suas funções fisiológicas. O metal também pode reagir com grupos tiol de proteínas de membrana, afetando negativamente o seu funcionamento ou até mesmo destruindo-a, o que paralisa o crescimento, reduz as taxas reprodutivas e pode levar a morte das minhocas (BEDNARSKA et al., 2017; MIRMOSEF et al., 2017).

A atividade das minhocas no solo também pode ter reduzido o teor de zinco em solução, porém neste caso parece ter havido indução da sorção do zinco, provavelmente devido às alterações promovidas pelas minhocas na fase sólida do solo. Esta atividade também resultou em aumento de 44% no teor de N da solução do solo, o que não foi suficiente para prejudicar a nodulação, que apresentou aumento de 58% em relação as plantas do tratamento controle. Além disso, as minhocas promoveram a maior colonização micorrízica no solo não contaminado, provavelmente devido a sua ação dispersora dos esporos e pela bioperturbação, o que promove aumento da densidade de hifas (WURST et al., 2011).

A presença das minhocas no solo estimulou a translocação do cobre para a parte aérea de *C. ensiformis*, pois o teor nestes tecidos foi 35% maior e nas raízes foi 44% menor que os quantificados nas plantas cultivadas no controle. Os motivos pelos quais as minhocas estimulam a translocação do cobre das raízes para a parte aérea das plantas ainda não estão claros na literatura. Segundo Lemtiri et al (2016) e Li et al. (2018) as minhocas induzem as plantas a produzir maior quantidade de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, que funcionam como moléculas orgânicas transportadoras de elementos químicos das raízes para a parte aérea. Esta maior translocação do cobre, associada à redução da absorção de nutrientes (N, P, K e Ca) resultou em prejuízos ao desempenho dos atributos fisiológicos como taxa fotossintética, taxa transpiratória, eficiência do uso da água, concentração interna de CO₂, eficiência instantânea de carboxilação pela rubisco e teor de proteínas nos tecidos foliares. O Cu em excesso resulta em competição por sítios em transportadores de outros nutrientes (e.g. Zn, Fe, Ni) e na substituição de elementos estruturais em enzimas, como na ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisco). Estes fatores levam a diminuição da fixação de carbono, da produção de energia, do aproveitamento da água e conseqüentemente na inibição do crescimento (MARQUES et al., 2018). Os altos teores de cobre nos tecidos aéreos também resultaram em maior atividade das enzimas peroxidase e superóxido dismutase, indicando maior estresse oxidativo. Segundo Cao et al. (2018) as enzimas

antioxidantes, tais como SOD e a POD, são os removedores essenciais de espécies reativas de oxigênio e apresentam suas atividades elevadas na presença de altas concentrações de Cu no tecido das plantas. Devido ao prejuízo a todos estes processos, o crescimento da parte aérea das plantas foi reduzido e muito semelhante ao observado para as plantas do tratamento controle, ainda que o teor acumulado de cobre tenha sido 83% maior.

Buscando-se aliar os benefícios proporcionados pelo fungo (proteção aos processos fisiológicos e alta produção de biomassa aérea) com os benefícios proporcionados pelas minhocas (maior translocação do cobre para a parte aérea) foi estabelecido um tratamento com a inoculação conjunta do fungo micorrízico arbuscular e das minhocas. Não houveram prejuízos ao estabelecimento da micorrização ou ao crescimento das minhocas pela presença conjunta dos dois organismos no solo. A nodulação das plantas de *C. ensiformis* foi a menor neste tratamento, ainda que a diferença para os demais tratamentos tenha sido pequena. Por outro lado, a presença de ambos resultou na redução de 64% na concentração de cobre na solução do solo e isto pode explicar em parte o baixo teor de cobre no sistema radicular do *C. ensiformis*. Outra possível explicação para este fato é a elevada translocação do cobre para a parte aérea, que resultou em teores 31% superiores às plantas do tratamento controle. Dehghanian et al. (2018) verificaram que a presença de minhocas e fungos micorrízicos arbusculares aumentaram a massa seca de milho e absorção de Zn e Mn na parte aérea em um solo multicontaminado. Yu et al. (2005) verificaram que inoculação conjunta das minhocas com FMA aumentou a produtividade de parte aérea e a absorção de Cd em solo contaminado, promovendo a fitoextração do metal.

Mesmo com altos teores de Cu na parte aérea, a presença do fungo juntamente com as minhocas resultou na melhoria no desempenho de todos os processos fisiológicos da planta, incluindo os relacionados à fotossíntese, ao uso da água e à produção de proteínas, e ainda reduziu o estresse oxidativo nas folhas. Esta fitoproteção permitiu que as plantas deste tratamento produzissem a maior biomassa aérea e radicular, fato que pode ter contribuído para explicar a redução observada na concentração de nutrientes da parte aérea das plantas (efeito de diluição). De forma semelhante, Aghababaei et al. (2014a) verificaram que a presença de fungos micorrízicos arbusculares da espécie *Funneliformis mosseae* e das minhocas da espécie *Lumbricus rubellus* promoveu aumento da biomassa aérea de milho e da absorção de Cd em diferentes níveis do metal no solo.

Na presença do fungo e da minhoca o conteúdo de cobre acumulado na parte aérea da planta foi o maior entre os tratamentos e 200% maior que o observado nas plantas do tratamento controle, o que indica que este sistema tem possibilidades de utilização quando o objetivo é a fitoextração. Este desempenho parece resultar do estímulo à translocação do cobre para a parte aérea propiciado pelas minhocas e da fitoproteção e maior produção de biomassa aérea proporcionada pela inoculação do fungo micorrízico arbuscular.

Conclusões

A inoculação de um fungo micorrízico arbuscular e de minhocas foi utilizada para aumentar a eficiência da fitorremediação do cobre por *Canavalia ensiformis* em solo arenoso. O fungo micorrízico arbuscular reduz a toxicidade do cobre na planta e aumenta o crescimento da parte aérea. A minhoca aumenta a absorção e a translocação do cobre para a parte aérea. A presença conjunta do fungo micorrízico arbuscular e das minhocas no solo contaminado aumenta o crescimento e o teor de cobre nos tecidos aéreos, o que resulta em maior fitoextração do metal por *Canavalia ensiformis* no solo arenoso.

Referências

- AGHABABAEI, F., RAIESI, F., HOSSEINPUR, A. The significant contribution of mycorrhizal fungi and earthworms to maize protection and phytoremediation in Cd-polluted soils. **Pedobiologia**, v. 57, n. 4-6, p. 223-233, 2014a.
- AGHABABAEI, F.; RAIESI, F.; HOSSEINPUR, A. The influence of earthworm and mycorrhizal co-inoculation on Cd speciation in a contaminated soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 78, p. 21-29. 2014b.
- AGHABABAEI, F.; RAIESI, F. Mycorrhizal fungi and earthworms reduce antioxidant enzyme activities in maize and sunflower plants grown in Cd-polluted soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 86, p. 87-97. 2015.
- APODACA, S. A. et al. Physiological and biochemical effects of nanoparticulate copper, bulk copper, copper chloride, and kinetin in kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Science of the Total Environment**, v. 599-600, n.1, p. 2085-2094. 2017.
- AZEVEDO, R. A. et al. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292. 1998.

BALLABIO, C. et al. Copper distribution in European topsoils: An assessment based on LUCAS soil survey. **Science of The Total Environment**, v. 636, n.1, p. 282-298. 2018.

BEDNARSKA, A. J. et al. Combined effects of chlorpyrifos, copper and temperature on acetylcholinesterase activity and toxicokinetics of the chemicals in the earthworm *Eisenia fetida*. **Environmental Pollution**, v. 220, n.1, p. 567-576. 2017.

BHAT, S. A. et al. Bioremediation and Detoxification of Industrial Wastes by Earthworms: Vermicompost as Powerful Crop Nutrient in Sustainable Agriculture. **Bioresource technology**. v. 252, n. 1, p. 172-179. 2018.

BEAUCHAMP, C. O.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. **Analytical Biochemistry**. v. 44, p. 276-287, 1971.

BOUCHÉ, M. Lombriciens de France. Ecologie et systématique. INRA. **Annales de Zoologie-écologie animale**, Paris, p. 67. 1972.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. **Methods of soil analysis**, part 2 chemical and microbiological properties. p. 595-624. 1982.

CAO, J.; HUANG, Y.; WANG, C. Rhizosphere interactions between earthworms (*Eisenia fetida*) and arbuscular mycorrhizal fungus (*Funneliformis mosseae*) promote utilization efficiency of phytate phosphorus in maize. **Applied Soil Ecology**. v. 94, p. 30–39. 2015.

CAO, Y. et al. Growth, physiological responses, and copper accumulation in seven willow species exposed to Cu—a hydroponic experiment. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 25, p. 1-12. 2018.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalase and peroxidases. **Methods in Enzymology**. v. 11, p. 764-775. 1955.

CHENG, J.; WONG, M. Wong Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. **Biology and Fertility of Soils**, p. 36:72–78. 2002.

CORNEJO, P. et al. Contribution of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi to the bioremediation of a copper contaminated soil using *Oenothera picensis* **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v. 17, n. 1, p. 14-21. 2017.

DANDAN, W.; HUIXIN, L.; FENG, H.; XIA, W. Role of earthworm-straw interactions on phytoremediation of Cu contaminated soil by ryegrass. **Acta Ecologica Sinica**, v. 27, p. 1292-1299. 2007.

- DEHGHANIAN, H. et al. The effect of earthworm and arbuscular mycorrhizal fungi on availability and chemical distribution of Zn, Fe and Mn in a calcareous soil. **Applied Soil Ecology**. No prelo. 2018.
- DU, Y. L. et al. Interactive effects between earthworms and maize plants on the accumulation and toxicity of soil cadmium. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 72, p. 193-202. 2014.
- ELLIOTT, H. A., M. R. et al. Competitive adsorption of heavy metals by soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 15, p. 214-219. 1986.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013, 353p.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. Brasília, DF, Embrapa, 2017.
- EISENHAUER, N. et al. Impacts of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) on plant performance are not interrelated. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, n.3, p. 561–567. 2009.
- FERRAÇO, M. et al. Efeito da densidade populacional de *Canavalia ensiformis* na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 48, n.1, p. 32-40. 2017.
- FERREIRA, P.A.A. et al. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. **Applied Soil Ecology**, v. 91, p. 37–47. 2015.
- FERREIRA, P. A. et al. Soil amendment as a strategy for the growth of young vines when replanting vineyards in soils with high copper content. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 126, p. 152-162. 2018.
- FREITAS, M. P.; DIONÍSIO, J. A. (2014). Oligoquetos edáficos em sistemas de cultivo orgânico e convencional. **Estudos de Biologia**. v. 36, n. 86, p. 92-102. 2014.
- FRESNO, T. et al. Aided phytostabilisation of As-and Cu-contaminated soils using white lupin and combined iron and organic amendments. **Journal of environmental management**, v. 205, p. 142-150. 2018.
- GARG, N.; CHANDEL, S. Role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on growth, cadmium uptake, osmolyte, and phytochelatin synthesis in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. under NaCl and Cd stresses. **Journal of plant growth regulation**. v. 31, n.3, p. 292-308. 2012.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235–244. 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500. 1980.

GARÓFALO CHAVES, L. H. et al. Crescimento, distribuição e acúmulo de cobre e zinco em plantas de pinhão-manso. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2. 2010.

GIROTTO, E. et al. Copper availability assessment of Cu-contaminated vineyard soils using black oat cultivation and chemical extractants. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, n.12, p. 9051-9063. 2014.

GOMES, P. C. et al. Selectivity Sequence and Competitive Adsorption of Heavy Metals by Brazilian Soils. **Soil Science Society of America Journal** . v. 65, p.1115-1121. 2001.

GONZALEZ-CHAVEZ, C. et al. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp.(arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. **Plant and Soil**, v. 240, n.2, p. 287-297. 2002.

HANAKA, A. et al. Does methyl jasmonate modify the oxidative stress response in *Phaseolus coccineus* treated with Cu?. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 124, p. 480–488. 2016.

HAYMANN, D. S.; MOSSE, B. Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. growth of endogone inoculated plants in phosphate deficient soils. **New Phytologist**, v. 70, p. 19-27. 1971.

ISLAM, F. et al. Copper-resistant bacteria reduces oxidative stress and uptake of copper in lentil plants: potential for bacterial bioremediation. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 23, p. 220–233. 2016.

JONES, S. et al. Biochar and compost amendments enhance copper immobilisation and support plant growth in contaminated soils. **Journal of Environmental Management**. p. 1-12. 2016.

JUSSELME, M. D. et al. Role of Earthworms on Phytoremediation of Heavy Metal-Polluted Soils. **Heavy Metal Contamination of Soils, Soil Biology**. v. 44, p. 279-298. 2015.

KELLER, C. et al. Effect of silicon on wheat seedlings (*Triticum turgidum* L.) grown in hydroponics and exposed to 0 to 30 μ M Cu. **Planta**. v. 241, p. 847–860. 2015.

KLUTE, A. **Water retention: Laboratory methods**. In: Klute A(ed). Methods of soil analysis: Physical and mineralogical methods, 2a ed. Madison, American Society of Agronomy, p. 635-660. 1986.

KONG, Z. et al. Rhizobial symbiosis effect on the growth, metal uptake, and antioxidant responses of *Medicago lupulina* under copper stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 16, p. 12479-12489. 2015.

KUMAR, R.; SINGH, M.; KUMAR, S. B. Evaluation of Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi on availability of soil nutrient and yield under Direct Seeded Rice (DSR). **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences** . v. 6, n.1. 2017.

KUO, S. A.; HEILMAN, P. E.; BAKER, A. S. Distribution and forms of copper, zinc, cadmium, iron, and manganese in soils near a copper smelter1. **Soil Science**, v. 135, n. 2, p. 101-109. 1993.

LEMTIRI, A. et al. Earthworms *Eisenia fetida* affect the uptake of heavy metals by plants *Vicia faba* and *Zea mays* in metal-contaminated soils. **Applied Soil Ecology**, v. 104, p. 67-78, 2015.

LEMTIRI, A. et al. Earthworms *Eisenia fetida* affect the uptake of heavy metals by plants *Vicia faba* and *Zea mays* in metal-contaminated soils. **Applied Soil Ecology**, v. 104, p. 67-78. 2016.

LEVEQUE, T. et al. Earthworm bioturbation influences the phytoavailability of metals released by particles in cultivated soils. **Environmental Pollution**. v. 191, p. 199-206. 2014.

LI, J. et al. Arbuscular mycorrhiza fungi facilitate rapid adaptation of *Elsholtzia splendens* to copper. **Science of The Total Environment**, v. 599, p. 1462-1468. 2017.

LI, Y. et al. Improvement of the phytoremediation efficiency of *Neyraudia reynaudiana* for lead-zinc mine-contaminated soil under the interactive effect of earthworms and EDTA. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, 6417. 2018.

LIMA, V. H. et al. Indicadores de qualidade do solo em sistemas de cultivo orgânico e convencional no semi-árido cearense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 5. 2007.

LIU, X. et al. Partitioning of soil phosphorus among arbuscular and ectomycorrhizal trees in tropical and subtropical forests. **Ecology letters**, v. 21, n. 5, 713-723. 2018.

LU, YF; LU, M. Remediation of PAH-contaminated soil by the combination of tall fescue, arbuscular mycorrhizal fungus and epigeic earthworms. **Journal of Hazardous Materials**. v. 285, p. 535–541. 2015.

MADALÃO, J. C. Action of *Canavalia ensiformis* in remediation of contaminated soil with sulfentrazone. **Bragantia**, v. 76, n. 2, p. 292-299. 2017.

MARQUES, D. M. et al. Copper Toxicity on Photosynthetic Responses and Root Morphology of *Hymenaea courbaril* L.(Caesalpinioideae). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 5, 138. 2018.

MEIER, S. et al. Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 741–775. 2012.

MEIER, S. et al. Interactive effect between Cu-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and biotreated agrowaste residue to improve the nutritional status of *Oenothera picensis* growing in Cu-polluted soils. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.178, p. 126–135. 2015.

MERLOS, M. A. et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* differentially regulates the copper response of two maize cultivars differing in copper tolerance. **Plant Science**, v. 253, p. 68-76. 2016.

MIOTTO A. et al. Copper accumulation and availability in sandy, acid, vineyard soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. v. 48, p. 1167–1183. 2017.

MIRMONSEF, H. et al. Effects of an aged copper contamination on distribution of earthworms, reproduction and cocoon hatchability. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 135, p. 267-275. 2017.

NOREEN, S. et al. The ameliorative effects of exogenously applied proline on physiological and biochemical parameters of wheat (*Triticum aestivum* L.) crop under copper stress condition. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 221-230. 2018.

PILON, M.; TAPKEN, W. **Regulation of Copper Homeostasis**. In: Culotta, V.; Scott, R. A.(ed) Metals in cells. John Wiley & Sons ltd. 2013.

ROLLON, R. J. C. et al. Growth and nutrient uptake of *Paraserianthes falcataria* (L.) as affected by carbonized rice hull and arbuscular mycorrhizal fungi grown in an artificially copper contaminated soil. **Advances in Agriculture & Botanics**, v. 9, n. 2. 2017.

RAIJ, B. et al. **Análise Química Para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais**. Instituto Agrônômico. p. 285. 2001.

RUSCITTI, M.; ARANGO, M.; BELTRANO, J. Improvement of copper stress tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**. v. 29, p. 37-49. 2017.

SANTANA, N. A. et al. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost on copper phytoremediation in a sandy soil. **Applied Soil Ecology**. v. 96, p.172–182. 2015.

SANTANA, N. A. et al. Vermicompost dose and mycorrhization determine the efficiency of copper phytoremediation by *Canavalia ensiformis*. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-15, 2018.

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to soil taxonomy USDA. Natural**. Resources Conservation Service, Washington, DC. 2014.

SAHARIAH, B. et al. Metal remediation and biodegradation potential of earthworm species on municipal solid waste: A parallel analysis between *Metaphire posthuma* and *Eisenia fetida*. **Bioresource Technology**. v. 180, p.230-236. 2015.

SILVA, L.S.; BOHNEN, H. Mineralização de palha de milho e adsorção de carbono, cálcio, magnésio e potássio em substratos com caulinita natural e goethita sintética. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 289-296, 2001.

SILVA, S.; SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados pela *Brachiaria decumbens* Stapf. em solo multicontaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p.1749-1757. 2006.

SILVA, M. et al. Phytoremediation potential of jack bean plant for multi-element contaminated soils from ribeira Valley, Brazil. **CLEAN–Soil, Air, Water**. V. 46, n.6, p. 1-11. 2018.

SIZMUR, T. et al. Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.) on As, Cu, Pb and Zn mobility and speciation in contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 742-748. 2011.

SOARES, C.R.F.S., SIQUEIRA, J.O., ; SILVA, C.A. **Matéria orgânica em solos de áreas degradadas**. In: Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo. 2ª ed. Porto Alegre: Metrópole, p. 495-524. 2008.

TUFFEN, F.; EASON, W. R.; SCULLION, J. The effect of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of and ³²P transfer between *Allium porrum* plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 7, p. 1027–1036. 2002.

UPADHYAYA, A. et al. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**. v. 121, n. 5, p. 453-461. 1985.

VIJVER, M. G., et al. Biological significance of metals partitioned to subcellular fractions within earthworms (*Aporrectodea caliginosa*). **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.25, n.3, p. 807-814. 2006.

WURST, S.; GEBHARDT, K.; MATTHIAS C. RilligIndependent effects of arbuscular mycorrhiza and earthworms on plant diversity and newcomer plant establishment. **Journal of Vegetation Science**. n. 22, p. 1021–1030. 2011.

YANG, J. et al. Bioimmobilization of heavy metals in acidic copper mine tailings soil. **Geomicrobiology Journal**, v. 33, p. 3-4. 2016.

YUSUF, M.; KHAN, T. A.; FARIDUDDIN, Q. Interaction of epibrassinolide and selenium ameliorates the excess copper in *Brassica juncea* through altered proline metabolism and antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 129, p. 25–34. 2016.

YU, X.; CHENG, J.; WONG, M. H. Earthworm–mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n.2, 195-201. 2005.

ZANCHETA, A.C.F. et al. Fitoextração de cobre por espécies de plantas cultivadas em solução nutritiva. **Bragantia**, v. 70, 2011.

ZANCHETA, A. C. F. et al. Cadmium accumulation by jack-bean and sorghum in hydroponic culture. **International journal of phytoremediation**, v. 17, n.3, p. 298-303. 2015.

ZHANG, C. et al. Earthworm and organic amendment effects on microbial activities and metal availability in a contaminated soil from China. **Applied Soil Ecology** , v. 104, p. 54-66, 2016.

ZHANG, L. et al. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. **New Phytologist**. v. 210, n. 3, 1022-1032. 2016b.

ZHANG, Y. et al. Arbuscularmycorrhizal fungi alleviate the heavy metal toxicity on sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants cultivated on a heavily contaminated field soil at a WEEE-recycling site. **Science of The Total Environment**, v. 628, p. 282-290. 2018.

ZERAIK A. E. et al. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, p. 731-734. 2008.

ZHOU, X. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance the copper tolerance of *Tagetes patula* through the sorption and barrier mechanisms of intraradical hyphae. **Metallomics**, v. 9, n.7, p. 936-948. 2017.

3 DISCUSSÃO GERAL

A contaminação por cobre é um grave problema ambiental e já afeta diversos solos do Brasil e de outros países do mundo. Os solos de vinhedos (devido à aplicação de fungicidas cúpricos) e os locais de disposição de rejeitos de mineração, cortume, lodo de esgoto e dejetos de suínos são os que mais comumente encontram-se contaminados por este metal pesado. Este cenário é agravado em solos arenosos com baixa porcentagem de argila, óxidos e matéria orgânica, onde a disponibilidade do cobre é aumentada (GIROTTTO et al., 2014; MIOTTO et al., 2017). Nestes locais o potencial de migração e contaminação do subsolo, das águas superficiais e subsuperficiais, dos animais, plantas e dos seres humanos é potencializada. Diante deste cenário, além da correta gestão dos resíduos, alternativas para a remediação destes solos devem ser buscadas como forma de reduzir a contaminação ambiental e, se possível, manter estes solos produtivos para que as atividades econômicas não sejam impossibilitadas. Neste contexto, foram realizados dois estudos a fim de potencializar a fitorremediação do cobre no solo arenoso.

Nos dois estudos, a adição do cobre no solo arenoso resultou no alto teor disponível e na solução do solo. Os teores de cobre verificados nestes estudos, aproximadamente 100 mg kg^{-1} de cobre, estão próximos dos observados em outros trabalhos realizados com este mesmo tipo de solo. Girotto et al., (2014) verificaram níveis de cobre 98 mg kg^{-1} de cobre, acima dos teores naturais nestes solos. Miotto et al. (2017) quantificaram teores de 67 mg kg^{-1} de cobre (EDTA), enquanto que os teores naturais são de aproximadamente 3 mg kg^{-1} (EDTA).

O cobre é um metal de transição e devido a sua capacidade de alternar entre os estados de cobre (II) e cobre (I) é essencial ao metabolismo das plantas, estando envolvido em processos biológicos como fotossíntese, respiração, absorção de oxigênio, detecção de etileno, metabolismo da parede celular e lignificação (LANGE et al., 2016). As exigências de cobre para o crescimento das plantas depende da espécie e do tipo de cultivar sendo que teores de aproximadamente 5 mg kg^{-1} de cobre no tecido já são suficientes para suprir as deficiências da plantas (ADREES et al., 2015). Porém, quando em excesso o cobre provoca uma série de danos ao organismo das plantas resultando em redução do crescimento, necrose, clorose e morte (YRUELA et al., 2005). Para Caetano et al. (2016), o estresse pelo cobre nas plantas já se inicia em teores de 28 mg kg^{-1} de cobre. Nesta tese, observou-se que a alta disponibilidade do metal provocou a redução do crescimento devido aos danos fisiológicos e bioquímicos do

metal às plantas. Os parâmetros da eficiência fotoquímica, das trocas gasosas e a atividade das enzimas antioxidativas foram desequilibrados pelo excesso do cobre no tecido das plantas.

A fitotoxicidade do cobre depende da espécie da planta e do teor no solo, sendo que em algumas plantas, teores entre 15-20 mg cobre kg^{-1} já ocasionam redução no desenvolvimento (KABATA-PENDIAS, 2011). A variação nos teores de cobre no tecido das plantas em ambos os estudos foi de 2 mg kg^{-1} na parte aérea (dose 0 de cobre) até 50-350 mg kg^{-1} em parte aérea e raízes, respectivamente. Os íons livres de cobre provocam o desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio que promovem a peroxidação lipídica, rompimento de membranas e danos celulares irreversíveis (HABIBA et al., 2015; MARQUES et al., 2016). Adicionalmente, íons livres de cobre podem formar ligações com proteínas e alterar suas funções na planta. Além disso, o cobre pode reduzir o aproveitamento de outros nutrientes com Fe, Mn e Zn devido a sua capacidade de ocupar o mesmo sítio destes nutrientes em transportadores e sítios de absorção nas raízes. Isto provoca uma deficiência destes nutrientes devido ao excesso do cobre.

Para remediar o cobre no solo arenoso foi proposta a técnica de fitorremediação com *Canavalia ensiformis*. Esta planta é uma leguminosa, com potencial para ser utilizada em programas de fitorremediação (VENDRUSCULO, 2013; SANTANA et al., 2015; SILVA et al., 2018) e adaptada a diferentes solos e condições climáticas. Também foram avaliadas estratégias para aumentar o poder fitorremediador da planta.

No estudo I, a maior eficiência da fitorremediação por *C. ensiformis* foi observada quando da adição conjunta de fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto de esterco bovino. A adição das doses crescentes do vermicomposto de esterco bovino no solo arenoso com alto teor de cobre aumentou o pH e o teor de nutrientes no solo. Além disso, o vermicomposto aumentou a quantidade de cargas negativas no solo, promovendo a adsorção do metal e reduzindo a sua disponibilidade. Da mesma forma, a maior disponibilidade de fósforo devido à adição do vermicomposto contribuiu para a redução significativa da concentração do cobre na solução, devido a formação de complexos fosfato-metal. Assim, no solo com as maiores doses de vermicomposto (acima de 40 mg kg^{-1} de P via vermicomposto) as raízes das plantas estavam menos expostas aos efeitos do cobre e com maior quantidade de nutrientes disponíveis, favorecendo a produção de biomassa. Este efeito foi comprovado pela atividade das enzimas antioxidativas e pelos parâmetros da fotossíntese.

O sucesso da fitorremediação foi obtido somente com a adição de doses baixas de vermicomposto ($<20 \text{ mg kg}^{-1}$ de P via vermicomposto). Devido a menor quantidade de vermicomposto, ocorreu a predominância de ligações de baixa energia do cobre a compostos carbonados mais solúveis na solução do solo, aumentando a disponibilidade para a planta em relação aos tratamentos com doses mais altas (PÉREZ-ESTEBAN et al., 2014). Desta forma, as plantas absorveram maior quantidade de cobre no sistema radicular, apresentaram maiores sintomas de toxidez, com redução na eficiência fotoquímica, desencadeando danos bioquímicos que afetaram o seu crescimento da parte aérea. No entanto, a presença do fungo micorrízico arbuscular reduziu a translocação do cobre para parte aérea da planta e aumentou a tolerância das plantas ao excesso do cobre, o que promoveu o incremento na biomassa das plantas nestes tratamentos. O fungo micorrízico melhora a nutrição, retém o metal nas raízes através da formação de quelatos dos compostos orgânicos das hifas e promove o crescimento da planta (DOUBKOVÁ; SUDOVÁ, 2016). Por isto, a inoculação do fungo micorrízico em plantas cultivadas no solo com adição de doses mais baixas de vermicomposto promoveu incremento na biomassa, no acúmulo do cobre nas raízes e na fitoestabilização no solo arenoso.

A adição de adubos orgânicos nos solos incrementa a abundância das minhocas. Desta forma, o estudo II buscou avaliar o papel das minhocas e dos fungos micorrízicos arbusculares na fitorremediação do cobre. As minhocas reduziram o teor de cobre na solução do solo através da absorção do metal nos seus tecidos ou através da modificação na matéria orgânica do solo, promovendo a complexação do metal. Além disso, as minhocas aumentaram a mineralização do N e houve promoção da colonização micorrízica.

A formação de compostos orgânicos lábeis pela ação das minhocas favoreceu a complexação do cobre e sua absorção pelas plantas e translocação para a parte aérea. Devido a isso, as plantas cultivadas no solo somente com a presença das minhocas absorveram maior quantidade de cobre na parte aérea, provocando maiores sintomas de toxidez. O cobre provocou redução na taxa fotossintética, condutância estomática, eficiência no uso da água e na carboxilação, e aumento na concentração interna de CO_2 . Além disso, a atividades das enzimas SOD e POD neste tratamento foi aumentada, resultado da maior produção de espécies reativas de oxigênio devido a toxidez pelo metal.

O fungo micorrízico reduziu os danos fitotóxicos do metal e promoveu o crescimento da planta no solo arenoso contaminado. O aumento da tolerância ao cobre neste estudo foi

diferente do observado no estudo I. O FMA não reduziu o cobre na parte aérea da planta, mas promoveu outros mecanismos de tolerância, como a maior absorção de nutrientes como P, N, K, Mg, Fe e Mn. O FMA contribuiu para a redução da formação de espécies reativas de oxigênio. A interação entre o fungo micorrízico arbuscular e as minhocas favoreceu a fitoextração do cobre. A minhoca aumenta a translocação do cobre para parte aérea enquanto o fungo aumento o crescimento da parte aérea e reduz os efeitos tóxicos do cobre no metabolismo da planta.

Os estudos propostos nesta Tese são alternativas para remediar o cobre em solos arenosos de vinhedos. Especificamente, o *Canavalia ensiformis* pode ser uma planta de cobertura utilizada em solos de vinhedos erradicados, que apresentam altos teores de cobre ou até mesmo nas entre linhas de vinhedos jovens onde já se tem níveis altos do metal. A adubação com vermicomposto é uma alternativa sustentável e economicamente viável para o cultivo da uva. Diversos estudos já demonstram o efeito do vermicomposto em parâmetros do crescimento da videira e de qualidade das uvas, o que comprova a qualidade deste adubo orgânico (DOMINGUEZ et al., 2014; FERREIRA et al., 2018; MARTÍNEZ-CORDEIRO, 2016). Aliado a isso, em solos arenosos de vinhedos contaminados com cobre, o vermicomposto incrementa os nutrientes, pH, matéria orgânica e reduz os níveis de cobre quando adicionado em doses mais altas.

O fungo micorrízico arbuscular promove o crescimento das plantas no solo contaminado e em algumas situações aumenta o teor de cobre no sistema radicular. Desta forma, estes organismos são eficientes para ser utilizada na recuperação de solos contaminados com cobre. A inoculação dos FMA é fácil e atualmente já existem inóculos comerciais destes fungos, o que facilita a sua adoção por produtores e empresas. A adoção de manejos que aumentem a abundância e a diversidade de minhocas nos solos de vinhedos devem ser adotadas como estratégias para reduzir os níveis de cobre nestes solos. As minhocas podem interagir com fungos micorrízicos arbusculares promovendo a fitoextração do cobre em solos contaminados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstram que o cobre em excesso no solo provoca danos fisiológicos, bioquímicos e de crescimento em plantas *Canavalia ensiformis*. É possível utilizar o esterco bovino no processo de vermicompostagem, para a obtenção de um adubo orgânico de alta qualidade. A adição de doses crescentes do vermicomposto reduz o teor de cobre disponível no solo, eleva os teores de nutrientes nas plantas e reduz os efeitos tóxicos do cobre, o que favorece o crescimento de *Canavalia ensiformis*. O fungo micorrízico arbuscular promove o crescimento da planta. A adição do vermicomposto e a inoculação da planta com fungo micorrízico arbuscular favorece a fitoestabilização pela maior absorção do cobre pelo sistema radicular e proteção dos danos fitotóxicos pelo fungo micorrízico. As minhocas reduzem o cobre na solução do solo, mas promovem a maior translocação do cobre para a parte aérea da planta. A interação entre fungos e minhocas aumenta a fitoextração do cobre.

5 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS

- I) Estudar os efeitos do cobre no organismo das plantas através da expressão de proteínas transportadoras de metais;
- II) Detalhar as características químicas, físicas e biológicas do vermicomposto a ser utilizado em programas de fitorremediação e verificar se o tempo de maturação do vermicomposto influencia na adsorção do cobre;
- III) Avaliar o efeito da utilização do vermicomposto em cultivos realizados em condições de campo em solos contaminados com cobre;
- IV) Verificar as espécies de minhocas habitantes em solos de vinhedo e determinar a sua tolerância ao excesso de cobre no solo através de testes ecotoxicológicos;
- V) Isolar espécies de fungos micorrízicos nativos de solos de vinhedos tolerantes ao excesso de cobre no solo.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. A. et al. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. **Chemosphere**, v. 75, n. 10, p. 1363-1370. 2009.
- ADREES, M. et al. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 11, p. 8148-8162. 2015.
- AGHABABAEI, F.; RAIESI, F.; HOSSEINPUR, A. The significant contribution of mycorrhizal fungi and earthworms to maize protection and phytoremediation in Cd-polluted soils, **Pedobiologia**, v. 57, n. 4-620, p. 223-233, 2014a.
- AGHABABAEI, F.; RAIESI, F.; HOSSEINPUR, A. The influence of earthworm and mycorrhizal co-inoculation on Cd speciation in a contaminated soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 78, p. 21-29. 2014b.
- AGHABABAEI, F.; RAIESI, F. Mycorrhizal fungi and earthworms reduce antioxidant enzyme activities in maize and sunflower plants grown in Cd-polluted soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 86, p. 87-97. 2015.
- AHMAD, N., et al. Effect of copper and zinc on the in vitro regeneration of *Rauvolfia serpentina*. **Biologia Plantarum**, v. 59, p. 11-17. 2015.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n. 372, p.1331-1341, 2002.
- ANDRADE, S. A. L. et al. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. **Chemosphere**, v. 75, p. 1363–1370. 2009.
- ANDREAZZA, R. et al. Copper Phytoextraction and Phytostabilization by *Brachiaria decumbens* Stapf. in Vineyard Soils and a Copper Mining Waste. **Open Journal of Soil Science**, v. 3, p. 273-282. 2013.
- ANJUM, N.A. et al. Too much is bad—an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 3361–3382. 2014.
- ARIAS, M. et al. Copper distribution and dynamics in acid vineyard soils treated with copper-based fungicides. **Soil Science**, v.169, p.796-805, 2004.
- BALDI, E. et al. Soil-applied phosphorous is an effective tool to mitigate the toxicity of copper excess on grapevine grown in rhizobox. **Scientia Horticulturae**, v. 227, p. 102-111, 2018.

BAZIHIZINA, N. et al. Photosynthesizing on metal excess: Copper differently induced changes in various photosynthetic parameters in copper tolerant and sensitive *Silene paradoxa* L. populations. **Plant Science**, v. 232, p. 67-76. 2015.

BALLABIO, C. et al. Copper distribution in European topsoils: An assessment based on LUCAS soil survey. **Science of The Total Environment**, v. 636, p. 282-298. 2018.

BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.2, p.21-34, 2005.

BERNAL, M. et al. Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in *Glycine max* cell suspensions. **Physiologia Plantarum**, v. 127, p. 312–325, 2006.

BERTI, W.R.; CUNNINGHAM, S.D. **Phytostabilization of metals**. In: RASKIN, I. & ENSLEY, B. D. (eds.). *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*. New York: Wiley, p.71-88, 2000.

BITYUTSKII, N.; K Aidun, P.; YAKKONEN, K. Can earthworms alleviate nutrient disorders of plants subjected to calcium carbonate excess?. **Applied Soil Ecology**, p.1-10 2015.

BLAYLOCK, M. J.; HUANG, J. W. Phytoextraction of metals. In RASKIN, I.; ENSLEY, B. D. (Eds.). **Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment**. New York: Wiley. p. 53-70.2000.

BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Sciences**, v. 5, p. 241-246. 2000.

BRIAT J.F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.322, n.1, p.43-54,1999.

BRUNETTO, G. et al. Mobility of copper and zinc fractions in fungiciden amended vineyard sandy soils, **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, p. 609-624. 2014.

BUND, T. et al. Copper uptake induces self-assembly of 18.5kDa myelin basic protein (MBP). **Biophysical Journal**, v. 99, p.3020- 3028, 2010.

BUSATO, J. G. et al. Phosphatase activity and its relationship with physical and chemical parameters during vermicomposting of filter cake and cattle manure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 4, p. 1223-1230, 2015.

CAETANO, A. L. et al. Copper toxicity in a natural reference soil: ecotoxicological data for the derivation of preliminary soil screening values. **Ecotoxicology**, v. 25, p. 163–177. 2016.

CAMARGO, F.A.O. et al. Uso de microrganismos para a remediação de metais. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 5, p. 467-496, 2007.

- CAMBROLLÉ, J. et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, v.120, p. 171–178. 2015.
- CAMPOS, A. T. et al. **Tratamento de águas residuárias em sistema intensivo de produção de leite**. In: Circular Técnica, 75. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, p. 1-5, 2003.
- CASTILLO, O. S. et al. The effect of the symbiosis between *Tagetes erecta* L. (marigold) and *Glomus intraradices* in the uptake of Copper (II) and its implications for phytoremediation. **New Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 156-164. 2011.
- CHAÂBENE, Z., et al. Copper toxicity and date palm (*Phoenix dactylifera*) seedling tolerance: monitoring of related biomarkers. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 37, n. 3, p. 797-806. 2018.
- CHENG, J.; WONG, M. Wong Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. **Biology and Fertility of Soils**, p. 36:72–78. 2002.
- CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, v. 212, p. 475-486. 1999.
- COMIN, J. A. et al. Liming as a means of reducing copper toxicity in black oats. **Ciência Rural**, v. 48, n. 4. 2018.
- CORNEJO, P. et al. Contribution of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi to the bioremediation of a copper contaminated soil using *Oenothera picensis*. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 14-21. 2017 .
- DANDAN, W. et al. Effect of earthworms on the phytoremediation of zinc-polluted soil by ryegrass and Indian mustard. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43: p. 120–123. 2006.
- DANDAN, W. et al. Role of earthworm-straw interactions on phytoremediation of Cu contaminated soil by ryegrass. **Acta Ecologica Sinica**, v. 27, p. 1292:1299. 2007.
- DEHGHANIAN, H. et al. The effect of earthworm and arbuscular mycorrhizal fungi on availability and chemical distribution of Zn, Fe and Mn in a calcareous soil. **Applied Soil Ecology**, No prelo. 2018.
- DEL CLARO, G. R. et al. Efeito da suplementação de cobre e selênio na dieta de novilhos Brangus sobre o desempenho e fermentação ruminal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootectecnia**, v. 65, p. 255-261. 2013.
- DOUBKOVÁ, P.; SUDOVÁ, R. Limited impact of arbuscular mycorrhizal fungi on clones of *Agrostis capillaris* with different heavy metal tolerance. **Applied Soil Ecology**, v. 99, p. 78–88, 2016.

- DOMÍNGUEZ, J. et al. Vermicomposting grape marc yields high quality organic biofertiliser and bioactive polyphenols. **Waste Management & Research**, v. 32, n. 12, p. 1235-1240. 2014.
- DUDAI, N. et al. Agronomic and economic evaluation of Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L.) as means for phytoremediation of diesel polluted soils in Israel. **Journal of environmental management**, v. 211, p. 247-255, 2018.
- DU, Y. L. et al. Interactive effects between earthworms and maize plants on the accumulation and toxicity of soil cadmium. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 72, p. 193-202. 2014.
- DUARTE, A. P. et al. Changes in the forms of lead and manganese in soils by passage through the gut of the tropical endogeic earthworm (*Pontoscolex corethrurus*). **European Journal of Soil Biology**. v. 53. p. 32-39. 2012.
- DUARTE, S. T.; DIAZ, L. C. Novas áreas de expansão do capital vinícola no rio grande do sul: redes e dinâmicas locais. **Anais do Seminário de Estudos Urbanos e Regionais**. 2015.
- ECHKARDT, D. P. et al. Bioconversão do esterco bovino como alternativa para a disponibilização de nitrogênio, fósforo e potássio no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, No prelo. 2018.
- EIRAS, P. P.; COELHO, F. C. Adubação verde na cultura do milho. **Programa Rio Rural. Manual Técnico**. 14 p. 2010.
- EMBRAPA (2015). Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação. **Cientistas ajudam Campanha Gaúcha a obter selo de procedência para vinhos**. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-integracao-lavoura-pecuaria-floresta-ilpf/>. Acesso em: 10 de junho de 2016.
- EISENHAUER, N. et al. Impacts of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) on plant performance are not interrelated. **Soil Biology & Biochemistry**, v. p. 561–567. 2009.
- FATIMA, R.A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 346, p. 256-273, 2005.
- FERREIRA, T. et al. População de *Pherethima hawayana* sob diferentes tipos de manejo do solo. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 6. 2013.
- FERREIRA, P.A.A. et al.. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. **Applied Soil Ecology**, v. 91, p. 37–47. 2015.
- FERREIRA, P. A. et al. Soil amendment as a strategy for the growth of young vines when replanting vineyards in soils with high copper content. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 126, p. 152-162. 2018.

FEKIAKOVA, Z., S. CORNU, AND S. PICHAT. Tracing contamination sources in soils with Cu and Zn isotopic ratios. **Science of The Total Environment**, v. 517, p. 96-105. 2015.

FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M. J. et al. Vermicomposts and/or Arbuscular Mycorrhizal Fungal Inoculation in Relation to Metal Availability and Biochemical Quality of a Soil Contaminated with Heavy Metals. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, p. 2707–2718. 2012.

FILHO, C. A. C.; TOEBE, M.; BURIN, C.; FICK, A. L.; ALVES, B. M.; FACCO, G. Tamanho de amostra para a estimação da média do comprimento, diâmetro e massa de sementes de feijão de porco e mucuna cinza. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, 2012.

FILHO, M. P.; REICHERT, J.; SCHUMACHER, G. H. **A pecuária no Rio Grande do 250 sul: A origem, a evolução recente dos rebanhos e a produção de leite**. In: ENCONTRO DE 251 ECONOMIA GAÚCHA, 6. Porto Alegre. Artigos: Pontifícia Universidade Católica do Rio 252 Grande do Sul PUCRS. 2012.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 92, p.696-717, 1994.

GARDEZI, A. K. et al. **Beans (*phaseolus vulgaris* l.) growth affected by irrigation from two sources of water mapped with gps, organic matter, and associated with *Glomus intrarradices***. In Geoscience and Remote Sensing Symposium (IGARSS), IEEE International, p. 137-140. 2014.

GIROTTTO, E. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas cultivadas em solos com acúmulo de cobre e zinco**. 2010. 151 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

GIROTTTO, E. et al. Copper availability assessment of Cu-contaminated vineyard soils using black oat cultivation and chemical extractants. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, n.12, p. 9051-9063. 2014.

GIROTTTO, E. et al. Biochemical changes in black oat (*Avena strigosa* schreb) cultivated in vineyard soils contaminated with copper, **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 103, p.199-207. 2016.

GONZÁLEZ-ALCARAZ, M. N.; VAN GESTEL, C. A. M.; Metal/metalloid (As, Cd and Zn) bioaccumulation in the earthworm *Eisenia andrei* under different scenarios of climate change. **Environmental Pollution**, v. 215, p. 178-186. 2016.

GONZÁLEZ-MENDOZA, D. et al. Copper stress on photosynthesis of black mangle (*Avicennia germinans*). **Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 665-670. 2013.

GOSWAMI, S.; DAS, S. Copper phytoremediation potential of *Calandula officinalis* L. and the role of antioxidant enzymes in metal tolerance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 211–218. 2016.

- HABIBA, U. et al. EDTA enhanced plant growth, antioxidant defense system, and phytoextraction of copper by *Brassica napus* L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 2, p. 1534-1544. 2015.
- HAN, C. et al. Bioavailability and accumulation of cadmium and zinc by *Sedum plumbizincicola* after liming of an agricultural soil subjected to acid mine drainage. **Communications, Soil Science and Plant Analysis**, v. 44, n. 6, p.1097-1105, 2013.
- HASSAN, S. E.; HIJRI, M.; ST-ARNAUD, M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grow on cadmium contaminated soil. **New Biotechnology**, v. 30, p. 780-787, 2013.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística **Pesquisa da Pecuária Municipal**. 2018.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE de pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Estatística da Produção Agrícola. 2018.
- IBRAVIN - Instituto Brasileiro do Vinho. **Cadastro vinícola e comercialização de vinhos - Empresas do Rio Grande do sul** – Brasil. 2018.
- INOCENCIO, J. P. **Evaluación de la adición de vermicomposta y hongos micorrícicos en el crecimiento de plántulas de limón**. Tese (Ciência de Produção Agrícola e Sustentável). Instituto Politécnico Nacional, Jiquilpan, Michocán, México, Dezembro. 2013.
- IORDACHE, M.; BORZA, I. The bioremediation potential of earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae) in a soil polluted with heavy metals. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 10. p. 1183-1186. 2012.
- JADIA, C.D.; FULEKAR, M. Phytoremediation: the application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. **Environmental engineering and management journal** v. 5, p. 547-558. 2008.
- KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 2011.
- KARAMI, N.; CLEMENTEB, R.; MORENO-JIMÉNEZC, E. et al. Efficiency of green waste compost and biochar soil amendments for reducing lead and copper mobility and uptake to ryegrass. **Journal of Hazardous Materials**, v.191, p. 41–48, 2011.
- KAUR, P., et al. Role of earthworms in phytoremediation of cadmium (Cd) by modulating the antioxidative potential of *Brassica juncea* L. **Applied Soil Ecology**, v. 124, p. 306-316, 2017a.
- KAUR, P. et al. Effect of earthworms on growth, photosynthetic efficiency and metal uptake in *Brassica juncea* L. plants grown in cadmium-polluted soils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 15, p. 13452-13465. 2017b.

KELLER, C. et al. Effect of silicon on wheat seedlings (*Triticum turgidum* L.) grown in hydroponics and exposed to 0 to 30 μ M Cu. **Planta**, v. 241, p. 847–860. 2015.

KLAUBERG-FILHO, O. et al. **Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados**. In: VIDAL-

TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 85-144. 2005.

LAPERCHE, V. et al. Effect of appatite amendmets on plant uptake of lead from contaminated soil. **Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 1540-1552, 1997.

LANGE, B. et al. Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. **New Phytologist**, v. 21, n. 2, p. 537-551. 2017.

LEVEQUE, T. et al. Earthworm bioturbation influences the phytoavailability of metals released by particles in cultivated soils. **Environmental Pollution**, v. 191, p. 199-206. 2014.

LEBRUN, Manhattan et al. Assisted phytostabilization of a multicontaminated mine technosol using biochar amendment: Early stage evaluation of biochar feedstock and particle size effects on As and Pb accumulation of two Salicaceae species (*Salix viminalis* and *Populus euramericana*). **Chemosphere**, v. 194, p. 316-326, 2018.

LI, Y. Improvement of the phytoremediation efficiency of *Neyraudia reynaudiana* for lead-zinc mine-contaminated soil under the interactive effect of earthworms and EDTA. **Scientific reports**, v. 8, n.6417, p.1-10, 2018.

LIU, X.; HU, C.; ZHANG, S. Effects of earthworm activity on fertility and heavy metal bioavailability in sewage sludge. **Environment international**, v. 31, n. 6, p. 874-879. 2005.

LIN, C.; CHANG, H.; HUANG, H. Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.963-968, 2005.

LIANG, S. X. et al. Feasibility of Pb phytoextraction using nano-materials assisted ryegrass: Results of a one-year field-scale experiment. **Journal of environmental management**, v.190, p. 170-175. 2017.

LÓPEZ-PERIAGO, J.E. et al. Copper retention kinetics in acid soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 72, p. 63–72. 2008.

LU, YF; LU, M. Remediation of PAH-contaminated soil by the combination of tall fescue, arbuscular mycorrhizal fungus and epigeic earthworms. **Journal of Hazardous Materials**. v. 285, p. 535–541. 2015.

- LU, YF; LU, M. Remediation of PAH-contaminated soil by the combination of tall fescue, arbuscular mycorrhizal fungus and epigeic earthworms. **Journal of Hazardous Materials**. V. 285, p. 535–541. 2015.
- MANI, D.; KUMAR, C.; PATEL, N. K. Integrated micro-biochemical approach for phytoremediation of cadmium and lead contaminated soils using *Gladiolus grandiflorus* L cut flower. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 124, p. 435-446. 2016.
- MARTINS, S. C. **Adsorção e dessorção de cobre em solos sob aplicação de lodo de esgoto e calda bordalesa**. 2005. 99 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Universidade de São Paulo. 2005.
- MARQUES, A. P. G. C. Remediation of heavy metal contaminated soils: phytoremediation as a potentially promising clean-up technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.39, p.622-64, 2009.
- MARQUES, D. M., et al. Copper Toxicity on Photosynthetic Responses and Root Morphology of *Hymenaea courbaril* L.(Caesalpinioideae). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 138, p. 1-14, 2018.
- MARTÍNEZ-CORDEIRO, H. **De la uva a la uva: Vermicompostaje de bagazo y aplicación del vermicompost al viñedo**. Tese. (Doutorado em Biologia e Ecologia Animal) Universidade de Vido. Vigo, Espanha. 2016.
- McBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. New York, Oxford University Press. 406p. 1994.
- MC LAREN, R. G.; CRAWFORD, D. V. studies on soil copper, i. the fractionation of copper in soils. **journal of soil science**, v. 24, n. 2, 1973.
- MEIER, S. et al. Interactive effect between Cu-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and biotreated agrowaste residue to improve the nutritional status of *Oenothera picensis* growing in Cu-polluted soils. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 178, p. 126–135. 2015.
- MELO, G.W. et al. Uso de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Videiras Jovens como Estratégia para Amenizar a Toxidez de Cobre. **Comunicado Técnico 176**, Embrapa, 2015.
- MITHÖFER, A.; SCHULZE, B.; BOLAND, W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. **FEBS Letters**, v. 566, n. 1-3, p.1-5, 2004.
- MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 15, n. 4, p. 523-530. 2006.
- MIOTTO, A. **Cobre em solos arenosos sob vinhedos e resposta bioquímica-fisiológica de videiras em produção**. Tese. 96f. Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

- MIOTTO, A. et al. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. **Plant and Soil**, v. 374, p. 593-610. 2014.
- MIOTTO A. et al. Copper accumulation and availability in sandy, acid, vineyard soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. v. 48, p. 1167–1183. 2017.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v.7, n.9, p.405-410, 2002.
- MOREIRA, F. S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, Lavras, MG, Brasil, 2006.
- NANDA, R.; AGRAWAL, V. Elucidation of zinc and copper induced oxidative stress, DNA damage and activation of defence system during seed germination in *Cassia angustifolia* Vahl. **Environmental and Experimental Botany**, v. 125, p. 31–41. 2016.
- NASCIMENTO, C. W. A.; ACCIOLY, A. M. A.; BIONDI, C. M. do et al. Fitoextração de metais pesados em solos contaminados: avanços e perspectivas. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 6, p. 461-4495, 2009.
- PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Revisions in Plant Biology**, v. 56, p.15-39. 2005.
- PÉREZ-ESTEBAN, J. et al. Soluble organic carbon and pH of organic amendments affect metal mobility and chemical speciation in mine soils. **Chemosphere** , v.103 , p. 164–171. 2014.
- PORTO, M. A. F.; DE QUEIROZ AMBRÓSIO, M. M.; DE FREITAS, F. C. L.; CARVALHO NASCIMENTO, S. R.; DA CRUZ, B. L. S.; GUIMARÃES, L. M. S. Feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) no controle da podridão radicular do meloeiro causada por associação de patógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 4, p. 327-332. 2018.
- QIN, G. et al. Toxicity mechanism of heavy metal copper to plants: a review. **Journal of Southern Agriculture**, v. 49, n. 3, 469-475. 2018.
- RADÜNZ, A. L. et al. Necessidades térmicas de videiras na região da Campanha do Rio Grande do Sul – Brasil. **Ciência Rural**, v.45, n.4, p.626-632. 2015.
- REPETTO, O. et al. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 555-567, 2003.
- RESENDE, M. L.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130. 2003.
- RIBEIRO FILHO M.R. et al. Inorganic Materials as Ameliorants for Soil Remediation of Metal Toxicity to Wild Mustard (*Sinapis arvensis* L.). **International Journal of Phytoremediation**, v.13, p.498–512, 2011.

- RIZWAN, M. et al. Cadmium phytoremediation potential of *Brassica* crop species: a review. **Science of the Total Environment**, v. 631, p. 1175-1191. 2018.
- ROSA, D. J. et al. **Photosynthesis and growth of young “Niágara Branca” vines (*Vitis labrusca* L.) cultivated in soil with high levels of copper and liming.** In *BIO Web of Conferences* (Vol. 3, p. 01005). EDP Sciences. 2014.
- ROSENQVIST, E.; VAN KOOTEN, O. **Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature.** In: DEELL J.R.; TOIVONEN, P.M.A. (eds.). *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Norwell, Massachusetts, USA: Kluwer Academic Publishers, p. 30-77, 2003.
- RUSCITTI, M.; ARANGO, M.; BELTRANO, J. Improvement of copper stress tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**. v. 29, p. 37-49. 2017.
- SALT, D. E.; SMITH, R. B.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 643-668, 1998.
- SANTANA, N. A. et al. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost on copper phytoremediation in a sandy soil. **Applied Soil Ecology**. v. 96, p.172–182. 2015.
- SANTIAGO-MARTÍN, A. et al. Impact of vineyard abandonment and natural recolonization on metal content and availability in Mediterranean soils. **Science of The Total Environment**, v. 551, p. 57-65. 2016.
- SANTIBÁÑEZ, C.; VERDUGO, C.; GINOCCHIO, R. Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: Implications for metal uptake and productivity of *Lolium perenne*. **Science of Total Environment**, v. 395, v.1, p. 1-10, 2008.
- SANTOS, J. B.; DE OLIVEIRA PROCÓPIO, S.; PIRES, F. R.; DA SILVA, A. A.; DOS SANTOS, E. A. Fitorremediação de solo contaminado com trifloxysulfuron-sodium por diferentes densidades populacionais de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L). DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 444-449. 2006.
- SILVA, S.; SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados pela *Brachiaria decumbens* Stapf. em solo multicontaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p.1749-1757. 2006.
- SILVA, F. N.; ANJOS, F. S.; SILVEIRA, D. F. Resignificação identitária: o caso da vitivinicultura na região da Campanha Gaúcha, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Theomai / Theomai Journal**, v. 38. 2018.
- SILVA, M.; DE ANDRADE, S. A. L.; DE-CAMPOS, A. B. Phytoremediation Potential of Jack Bean Plant for Multi-Element Contaminated Soils From Ribeira Valley, Brazil. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 46, n. 6, p. 1-11. 2018.

SILVA LÓPEZ, R. E. *Canavalia ensiformis* (L.) DC (Fabaceae). **Revista Fitos Eletrônica**, v. 7, n. 3. 2013.

SILVA, M. et al. Phytoremediation potential of jack bean plant for multi-element contaminated soils from ribeira Valley, Brazil. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 46, n.6, p. 1-11. 2018.

SINGH, J.; KAUR, A. Vermicompost as a strong buffer and natural adsorbent for reducing transition metals, BOD, COD from industrial effluent. **Ecological Engineering**, v. 74, p. 13-19, 2015.

SIZMUR, T. et al. Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.) on As, Cu, Pb and Zn mobility and speciation in contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 742-748. 2011.

SIQUEIRA, J.O., SOARES, C.R.F.S., SILVA, C.A. **Matéria orgânica em solos de áreas degradadas**. In: Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo. 2^a ed. Porto Alegre: Metrópole, p. 495-524. 2008.

SHUTCHA, M. N. et al. Three years of phytostabilisation experiment of bare acidic soil extremely contaminated by copper smelting using plant biodiversity of metal-rich soils in tropical Africa (Katanga, DR Congo). **Ecological Engineering**, v. 82, p. 81-90. 2015.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: Genesis, composition, reactions**. 2. Ed. New York: John Wiley, 496p. 1994.

SOUZA FILHO, A. P. S. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). **Planta Daninha**, v.20, n.3, p.357-364, 2002.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5^o edição. Porto Alegre, RS. Artmed. 2013.

TIECHER, T. L. et al. Effects of zinc addition to a copper-contaminated vineyard soil on sorption of Zn by soil and plant physiological responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 109-119. 2016.

THOUNAOJAM, T. C. PANDA, P.; MAZUMDAR, P.; KUMAR, D.; SHARMA, G. D.; SAHOO, L.; SANJIB, P. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 33-39. 2012.

TULOD, A. M. et al. Growth performance and phytoremediation potential of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre, *Samanea saman* (Jacq.) Merr. and *Vitex parviflora* Juss. in copper-

contaminated soil amended with zeolite and VAM. **Asia Life Sciences**, v. 21, n. 2, p. 499-522, 2012.

VAZ, F. N. C. et al. The relationship between copper, iron, and selenium levels and Alzheimer disease. **Biological trace element research**, v. 181, n. 2, p. 1-7. 2017.

VENDRUSCULO, D. **Seleção de plantas para fitorremediação de solo contaminado com cobre**. 2013. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2013.

WONG, M. W. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. **Chemosphere**, v. 50, p. 775-780, 2003.

WURST, S.; GEBHARDT, K.; MATTHIAS C. Rillig independent effects of arbuscular mycorrhiza and earthworms on plant diversity and newcomer plant establishment. **Journal of Vegetation Science**. n. 22, p. 1021–1030. 2011.

XIANG, D.; LI, H. Nutrient uptake in mycorrhizal plants – role of earthworms, *Acta Agriculturae Scandinavica*, **Section B — Soil e Plant Science**, v. 64, n. 5, p. 434-441. 2014.

YANG, J., ZHAO, C., XING, M., LIN, Y. Enhancement stabilization of heavy metals (Zn, Pb, Cr and Cu) during vermifiltration of liquid-state sludge. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 649–655. 2013.

YRUELA I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.2, p.145-156 2005.