

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

**EFEITOS DA DEPOSIÇÃO DE NITROGÊNIO EM COMUNIDADES DE
ECTOMICORRIZAS EM FLORESTAS DE FAGUS NA SUÍÇA**

Comparação entre metodologias

Giovanna Morales Peres

Prof(a).Dr(a). Vânia Silvia Rosolen

Rio Claro (SP)

2018

GIOVANNA MORALES PERES

**EFEITOS DA DEPOSIÇÃO DE NITROGÊNIO EM
COMUNIDADES DE ECTOMICORRIZAS EM
FLORESTAS DE FAGUS NA SUÍÇA**
Comparação entre metodologias

*Trabalho de Formatura apresentado ao
Instituto de Geociências e Ciências Exatas -
Câmpus de Rio Claro, da Universidade
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
para obtenção do grau de Engenheiro
Ambiental.*

Rio Claro – SP

2018

P437e

Peres, Giovanna Morales

EFEITOS DA DEPOSIÇÃO DE NITROGÊNIO EM
CO-MUNIDADES DE ECTOMICORRIZAS EM
FLORES-TAS DE FAGUS NA SUÍÇA : Comparação
entre metodologias / Giovanna Morales Peres. -- Rio
Claro, 2018

38 p. : il., tabs., fotos, mapas + 1 CD-ROM

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado -
Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio
Claro

Orientadora: Vânia Silvia Rosolen

GIOVANNA MORALES PERES

**EFEITOS DA DEPOSIÇÃO DE NITROGÊNIO EM
COMUNIDADES DE ECTOMICORRIZAS EM
FLORESTAS DE FAGUS NA SUÍÇA**

Comparação entre metodologias

*Trabalho de Formatura apresentado ao
Instituto de Geociências e Ciências Exatas -
Câmpus de Rio Claro, da Universidade
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
para obtenção do grau de Engenheiro
Ambiental.*

Comissão Examinadora

_____ (orientador)

Rio Claro, _____ de _____ de _____.

Assinatura do(a) aluno(a)

assinatura do(a) orientador(a)

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo meu coração aos meus pais, Luís e Rosangela, pelo amor incondicional e dedicação inesgotável. Meu caminhar livre, feliz e seguro só é possível pela existência de vocês, que tanto me apoiaram nessa jornada. Cada conquista é e sempre será dedicada a vocês.

Agradeço minha irmã, pelos inúmeros esforços em sempre estar ao meu lado, me proporcionando uma vida tranquila e cheia de aprendizado. Sem o seu apoio e caronas infinitas tenho a sensação de que não teria trilhado esse caminho até aqui.

Agradeço ao meu amor, pela vida alegre e cheia de risadas. Pelo companheirismo que dá a mão e vai junto, que dá carinho e bronca, daqueles que incentiva a felicidade, e se faz presente no cotidiano. Agradeço a nossa família, o aprendizado diário com a Malena e sua doçura, que tanto me ensina a ouvir a intuição e olhar para as coisas simples da vida.

Agradeço as famílias Morales e Peres, por essa sensação de nunca estar sozinho, são muito queridos e especiais.

Agradeço a república Cabeças, a graduação não teria sido a mesma sem o compartilhar tão gostoso com vocês. Em especial, agradeço a She-ra e a Globs, por mostrar o caminho sem volta do autoconhecimento e amor próprio, da força feminina e do desejo de ser livre. A Xepa, por estar sempre ao meu lado, mostrando que a amizade deve ser cultivada e regada com muito amor e que junto se vai mais longe. As maravilhosas Rena e Lambida por mostrarem a diversidade, e como isso é lindo demais. A Sula e Kika, por serem companheiras sem restrição, sábias e atentas ao ouvir. A Bia por mostrar a maturidade. As mais novas, obrigada pela sensação da renovação e as mais velhas pelo poder de mudança. Cada uma, com sua singularidade, me mostra um mundo novo.

Agradeço as vacas ariscas por lembrarem da ancestralidade feminina, do apoio e segurança que uma rede tão especial pode trazer. Ensinaamentos, cantorias, fogueiras que fizeram meus olhos brilharem de tanta emoção. Que sigamos sempre juntas.

Agradeço também a Cigana, amiga querida que me mostra a delicadeza e o esforço sem limites. Aos amigos da Milharal e Pança, pelas festas, comidas e filminhos juntos.

Agradeço do meu coração a Janice e ao Mani, por serem exatamente aquilo que eu precisava em um momento de muita confusão.

Agradeço a professora Vania, por ser paciente e atenta, e por sempre dar suporte para minhas realizações acadêmicas.

Agradeço ao instituto que me recebeu na Suíça e me deu a possibilidade de trabalho e aprendizado. Em especial agradeço a Lucienne que sempre me orientou e ajudou.

Por fim agradeço a UNESP e toda a bagagem que me proporcionou.

RESUMO

Atividades antrópicas vêm intensificando a deposição de nitrogênio (N) na atmosfera, principalmente através da agricultura e de processos industriais. Esta deposição resulta em um excesso de N nos ecossistemas florestais, que afeta a saúde dos fungos do grupo das ectomicorrizas (ECM). A maioria das árvores em zonas temperadas dependem desta interação para absorção de nutrientes, prejudicando por consequência a saúde dos indivíduos arbóreos. Esta pesquisa faz parte de um programa de monitoramento florestal na Suíça, que analisa estes efeitos em ambientes naturais de faixas europeias, em um gradiente de deposição que varia entre 19,1 a 32,4 kg N ha⁻¹ a⁻¹. Objetiva identificar qual metodologia, entre as analisadas, apresentam maior confiabilidade estatística e espera-se encontrar correlação negativa com a deposição de nitrogênio e, além disso, estabelece um padrão metodológico para a quantificação de micélio ectomicorrízico em sacos de malha. Foram estudados três métodos: classes de colonização visível, frequência em buracos na malha e análise quantitativa da biomassa. A validação do melhor método foi feita após análise qualitativa e quantitativa, onde a classe de colonização visível e a análise quantitativa da biomassa do fungo apresentaram-se como uma excelente combinação de métodos, sendo de simples e rápido processamento possibilitando, ainda, análises posteriores mais complexas.

ABSTRACT

Anthropic activities have been intensifying the nitrogen deposition (N) in atmosphere, mainly through agriculture and industrial processes. This deposition is driving forests ecosystems to an excess of N, what affects health of ectomycorrhizal fungi (EMF). Most of the trees in temperate zones depends of this interaction for nutrient uptake, thus harming the health of tree individuals. This research is part of a forest monitoring program in Switzerland that analyzes these effects in beech forests in a gradient of nitrogen deposition ranging from 16 to 33 kg N ha⁻¹ a⁻¹. Objective to identify which methodology, among the ones analyzed, the one that presents higher statistical reliability and it is expected to find negative correlation with the N deposition. Moreover, establishes a methodological standard for the quantification of ectomycorrhizal mycelium in mesh bags. Three methods were studied: visual estimation by colonization classes, frequency in mesh holes and quantitative biomass analysis. The validation of the best method was made after qualitative and statistical analysis, as a result, the visual estimation and biomass of mycelium were presented as an excellent combination of methods, being simple and fast processed, what enables further more complex analyzes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Área de estudo	19
4.2 Produção dos sacos de malha	20
4.3 Incubação	21
4.4 Coleta e armazenamento	21
4.5 Quantificação de micélio	22
4.5.1 Classes de colonização visível	22
4.5.2 Frequência em buracos na malha	23
4.5.3 Biomassa	24
4.6 Análise estatística	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio desempenha um papel fundamental no crescimento e funcionamento de uma planta (Erisman et al., 2013), estando presente em aminoácidos que compõe proteínas utilizadas em todas as reações enzimáticas e é necessário para que o processo de fotossíntese ocorra (Uchida, 2000). Apesar de o nitrogênio ser o gás mais abundante na Terra, as plantas não podem fazer uso direto deste elemento quando se apresenta em sua forma não-reativa N_2 . A forma reativa do nitrogênio representa uma pequena fração do que é encontrado naturalmente na atmosfera (NADP, 2016).

Algumas décadas atrás, o nitrogênio apresentava-se como o nutriente de maior fator limitante em ecossistemas naturais e seminaturais (Bobbink e Hetteling, 2010), de acordo com Rennenberg e Gessler (1999). Como consequência disto, os processos microbiológicos nos solos florestais, os processos metabólicos em árvores e o funcionamento dos ecossistemas florestais estão adaptados a escassez de N ao invés de N em excesso. No entanto, após a Segunda Guerra Mundial, o uso de fertilizantes artificiais, processos industriais e as emissões de óxidos de nitrogênio (NO_x) provenientes de veículos a motor aumentaram acentuadamente a concentração de N nestes ambientes (Person, 2000), elevando as concentrações de nitrogênio a níveis críticos, tornando-se então um problema ambiental.

Estudos de expressiva magnitude experimental tentam explicar tal efeito. Entretanto quando se tem uma abordagem ecossistêmica é preciso observar e analisar diferentes compartimentos que levam a uma ação global no ecossistema florestal, sendo difícil compreender a relação específica entre o aumento da disponibilidade de N e o declínio das tendências de crescimento e nutrientes nas árvores. Portanto, os componentes do ciclo de nutrientes e sua sensibilidade ao aumento dos níveis de N precisam ser investigados.

A totalidade dos efeitos ao ambiente ainda não está clara, entretanto é possível perceber indícios de que as comunidades de micorrizas presentes nos solos florestais estão sendo alteradas, principalmente o grupo das Ectomicorrizas (Wallander e Nylund, 1992). A simbiose ectomicorrízica entre árvores e fungos é vital para a absorção de água e nutrientes pelas plantas. A maioria das espécies arbóreas de regiões temperadas se associaram a esses fungos para superar suas limitações nutricionais, sendo as florestas de Faia um exemplo desta interação.

As florestas de Faias (*Fagus sylvatica*) são representadas por árvores florestais de folhas largas, muito importantes e difundidas na Europa Central e Oriental. São conhecidas por formar

abundantes simbioses ectomicorrízica com grande diversidade de espécies de fungos (Buée et al., 2009) e são consideradas altamente dependentes desta interação para absorção de nutrientes (Druebert et al., 2009).

Os fungos micorrízicos constituem um sumidouro considerável de carbono na maioria dos ecossistemas. Este carbono é usado para construir extensas redes miceliais no solo, assim como para a atividade metabólica relacionada à absorção de nutrientes (Smith e Read, 2008). Recentemente, vários métodos foram desenvolvidos para quantificar a produção e a quantidade de biomassa de micélios externos de fungos micorrízicos em campo. De acordo com Wallander et al. (2013), esses métodos incluem mini-rizotrons, crescimento em sacos de malha, e medições indiretas de classificação com base na exploração de tipos de fungos ectomicorrízicos.

Embora várias técnicas estejam disponíveis, todas elas têm limitações que precisam ser levadas em consideração. As evidências até agora indicam que os fungos micorrízicos são componentes-chave da biomassa microbiana em muitos ecossistemas, destacando a necessidade de estender a aplicação dos métodos atuais, permitindo compreender os ciclos biogeoquímicos detalhadamente e visualizar como eles estão sendo afetados pelas atividades antrópicas poluidoras, impactando assim diversos ambientes. O presente trabalho analisa a quantidade de biomassa de micélio externo dos fungos ectomicorrízicos, em um tempo estabelecido, com a utilização do método de crescimento em sacos de malha, e tem como objetivo a seleção do método de quantificação mais confiável estatisticamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O nitrogênio raramente ocorre em minerais presentes no solo e, portanto, não é resultado do processo de intemperismo como outros nutrientes. A maior parte do nitrogênio foi incorporada naturalmente nos ecossistemas por fixação biológica e outra pequena porção por descargas elétricas (Högberg et al., 2000). Atualmente, as formas mais expressivas de fixação do nutriente se dão pela fixação biológica e industrial (Gomes et al., 2000). A Figura 1, apresenta os principais elementos envolvidos nos processos de ciclagem do Nitrogênio.

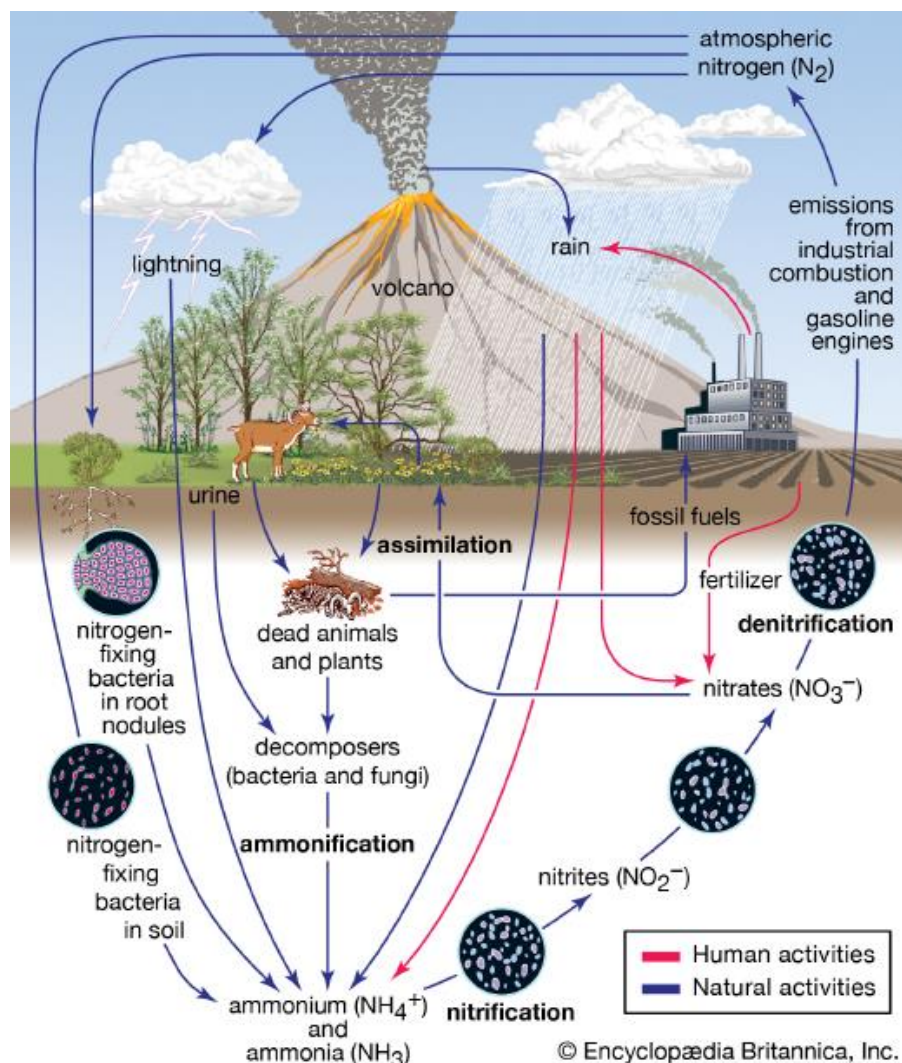


Figura 1. Ciclo do Nitrogênio. Fonte: Encyclopædia Britannica Online (2018)

A fixação biológica ocorre naturalmente por meio de organismos de vida livre, associados às plantas ou simbiontes, que convertem, por meio de processos enzimáticos, o N_2

em diferentes moléculas que podem ser absorvidas por plantas (Vieira, 2017). Assim como a fixação biológica, a fixação atmosférica também é um processo natural, onde a energia liberada por relâmpagos é capaz de quebrar a ligação tripla do nitrogênio, sendo possível a formação de óxidos de nitrogênio (NO_x). Entretanto a quantidade de raios é superior a uma ordem de grandeza menor do que quaisquer estimativas de fixação biológica, sendo pouco discutido em estudos (Fowler et al., 2013).

No início do século XX, uma preocupante escassez de nitrogênio reativo se instalara devido à demanda por alimentos para população crescente e também para explosivos a base de nitrogênio, muito utilizados na I Guerra Mundial (Galloway, 2008). A solução veio em 1908 com o processo Haber-Bosch, que conseguiu suprir a demanda de nitrogênio da época, dobrando as taxas de fixação do mesmo (Sutton et al, 2011). A esse processo se dá o nome de fixação industrial, que tem como principal fim a produção de fertilizantes para agricultura, e tem como produto a amônia NH_3 . A amônia é produzida através da combinação do N atmosférico, obtido através da destilação fracionada do ar liquefeito, com o H proveniente do gás natural do petróleo (Gomes et al, 2000). A descoberta tornou possível, hoje, a existência de metade da população mundial, entretanto trouxe inúmeras consequências a qualidade de vida e ao meio ambiente (Galloway, 2008).

Outro modo pelo qual a atividade do homem adiciona N ao planeta é através da queima de combustíveis fósseis, gerando involuntariamente NO_x , através da oxidação do N_2 ou da presença de N fóssil orgânico no combustível reagindo a altas temperaturas (Erisman, 2011). A maior parte desta contribuição mundial é oriunda de processos industriais, queima de combustível fóssil para transporte e produção de energia, assim como ocorre na Suíça (Figura 2).

Regulações públicas a respeito da deposição de poluentes atmosféricos tem resultado em uma diminuição de N no final do século 20. Apesar disso, as emissões de N em algumas partes da Europa Central ainda podem atingir $50\text{-}100 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$, com menores valores para florestas elevadas (Bahr, 2013). Estes valores ultrapassam os valores de cargas críticas para florestas de faia discutidos abaixo, e por consequência se tornam um problema ambiental.

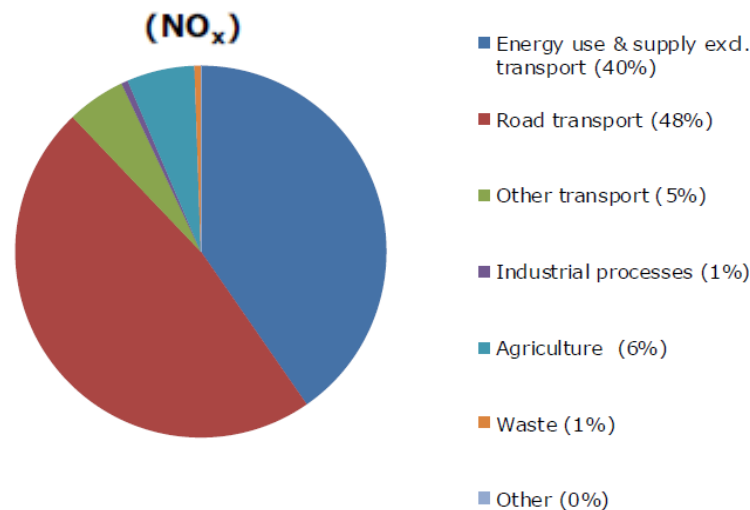


Figura 2. Contribuição de NO_x por fonte emissora na Suíça. Fonte: European Environment Agency, 2014.

Os demais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio foram apontados por Erisman (2011) e se encontram sumarizados logo a baixo.

- **NITRIFICAÇÃO.** Processo em que ocorre a oxidação da amônia em oxiânions. A oxidação inicial forma nitrito, $2 \text{NH}_3 + \text{e}^- + 3 \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2^- + 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}^+$, e é realizado por bactérias como as Nitrosomonas. Já o próximo passo, tem como resultado a oxidação do nitrito á nitrato, $2 \text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_3^-$, e é realizado por gênero Nitrobacter.
- **DESNITRIFICAÇÃO.** O nitrogênio volta a sua forma não reativa pela atividade de bactérias, como Pseudomonas, capazes de usar o nitrato como um acceptor de elétrons terminal na respiração: $2 \text{NO}_3^- + 12 \text{H}^+ + 10\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$.
- **ASSIMILAÇÃO.** As plantas assimilam nitrogênio na forma de nitrato e amônio. O nitrato assimilado é primeiro reduzido a amônio, e depois combinado em formas orgânicas, geralmente via glutamato. Os animais assimilam o nitrogênio pela quebra de proteína em aminoácidos.
- **AMONIFICAÇÃO/MINERALIZAÇÃO e EXCREÇÃO.** Quando plantas e animais morrem, bactérias decompositoras produzem amônia por meio de proteínas que estes continham. Os animais, por sua vez, excretam compostos de nitrogenados em excesso em seus corpos, como amônia, ureia, alantoína e ácido úrico, que também são alvos da amonificação.

- **REAÇÃO ANAMMOX.** Processo de conversão do nitrito e amônio em gás nitrogênio puro (N_2) em mares e oceanos, fontes termais, fontes hidrotermais e muitos ecossistemas de zonas húmidas de água doce, que escapam para atmosfera. O mecanismo de reação é acionado por uma bactéria recém descoberta, chamada *Brocadia anammoxidans*.
- **VOLATILIZAÇÃO.** Transforma fertilizantes e adubos na superfície do solo em gases como NH_3 , N_2O e N_2 que também se juntam a atmosfera.
- **INTemperismo DE ROCHAS.** Processo em que o nitrogênio armazenado em rochas é liberado por processos de intemperismo através do vento, chuva e erosão.

As fontes antrópicas de deposições atmosféricas em formas combinadas de N [NH_4^+ , (NH_x); NO_3^- , NO_2^- , (NO_y)], chegam aos solos florestais por meio da deposição úmida ou deposição seca (Pan et al, 2012). Estas podem desencadear efeitos negativos nestes ambientes, indicando a carga crítica desse poluente no ecossistema (Figura 3).

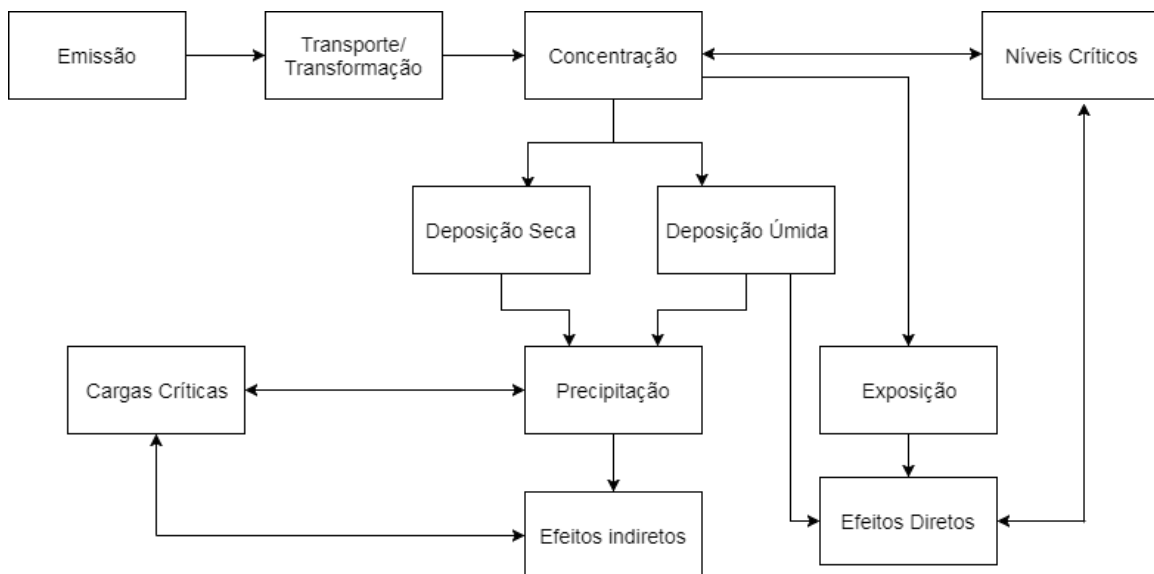


Figura 3. Cadeia de causa e efeito de um poluente atmosférico (Heiji e Schneider, 1991).

A ideia básica do conceito de carga crítica é balancear a deposição do elemento poluidor a que o ecossistema foi exposto, com a capacidade deste de amortecer a entrada, de remover o elemento do sistema ou de imobiliza-lo a longo prazo, sem que ocorram efeitos nocivos significativos em elementos sensíveis do ambiente (Rhim et al, 2016). Se trata de uma estimativa quantitativa, tipicamente expressas em termos de quilogramas por hectare por ano

(kg / ha / ano) ou deposição total (húmida + seco). Cargas críticas podem ser desenvolvidas para uma variedade de respostas do ecossistema, e quando são excedidas, os efeitos podem se estender por grandes distâncias. Por exemplo, o excesso de nitrogênio, provenientes de atividades antrópicas atingir ambientes naturais e alterar seu crescimento (NADP, 2017).

As cargas críticas de nitrogênio variam em diferentes habitats e seus efeitos podem ser observados em diferentes compartimentos do ecossistema. Para as florestas de Faia, os valores de N são de 10 -20 kg N ha⁻¹ a⁻¹ (Bobbink e Hettelingh, 2010). A gravidade dos impactos dependem de uma série de fatores como: (1) Duração e quantidade total de entradas; (2) Forma química e física da entrada de aerossóis de N; (3) Sensibilidade intrínseca da planta e das espécies animais presentes; (4) Condições abióticas, incluindo o clima; (5) Uso ou gerenciamento passado e presente de terras, e especialmente (6) Algumas características do solo: capacidade de neutralização do ácido (ANC), disponibilidade de nutrientes do solo e fatores do solo que influenciam o potencial de nitrificação, as taxas de imobilização e desnitrificação do N (Bobbink et al, 2010). Como consequência, diferentes ecossistemas apresentam alta variabilidade na sensibilidade à deposição de N atmosférico, entretanto é possível generalizar alguns tipos de impactos representados por excesso de N (Figura 4).

Uma série de eventos complexos podem ser observados quando a entrada de nitrogênio aumenta em regiões com baixo teor inicial de N, onde processos ecológicos interagem em diferentes escalas espaciais e temporais. Os impactos da deposição de N em relação às cargas críticas podem ser encontrados em diferentes partes do sistema, como nos processos que ocorrem no solo (acidificação, mineralização, nitrificação, lixiviação e decomposição da M.O). Assim como nutrição, fisiologia, fenologia, recrutamento e susceptibilidade a pragas e patógenos em árvores e também afetando a biodiversidade de macro fungos e micorrizas, líquens e algas verdes, vegetação terrestre e fauna (Bobbink and Hettelingh, 2010).

Praticamente todas as árvores em florestas temperadas do Norte vivem em simbiose com fungos ectomicorrízicos (Smith and Read, 2008). O micélio de ECM se liga às raízes finas das árvores e as envolve em uma estrutura chamada manto. Dentro do manto, as hifas fúngicas penetram no córtex e na córnea da raiz como uma rede, entre as células corticais. Do outro lado do manto, o micélio externo do fungo se estende para o solo, onde assimila nutrientes de fontes inorgânicas e orgânicas, bem como da água (Figura 5) (Bahr, 2018).

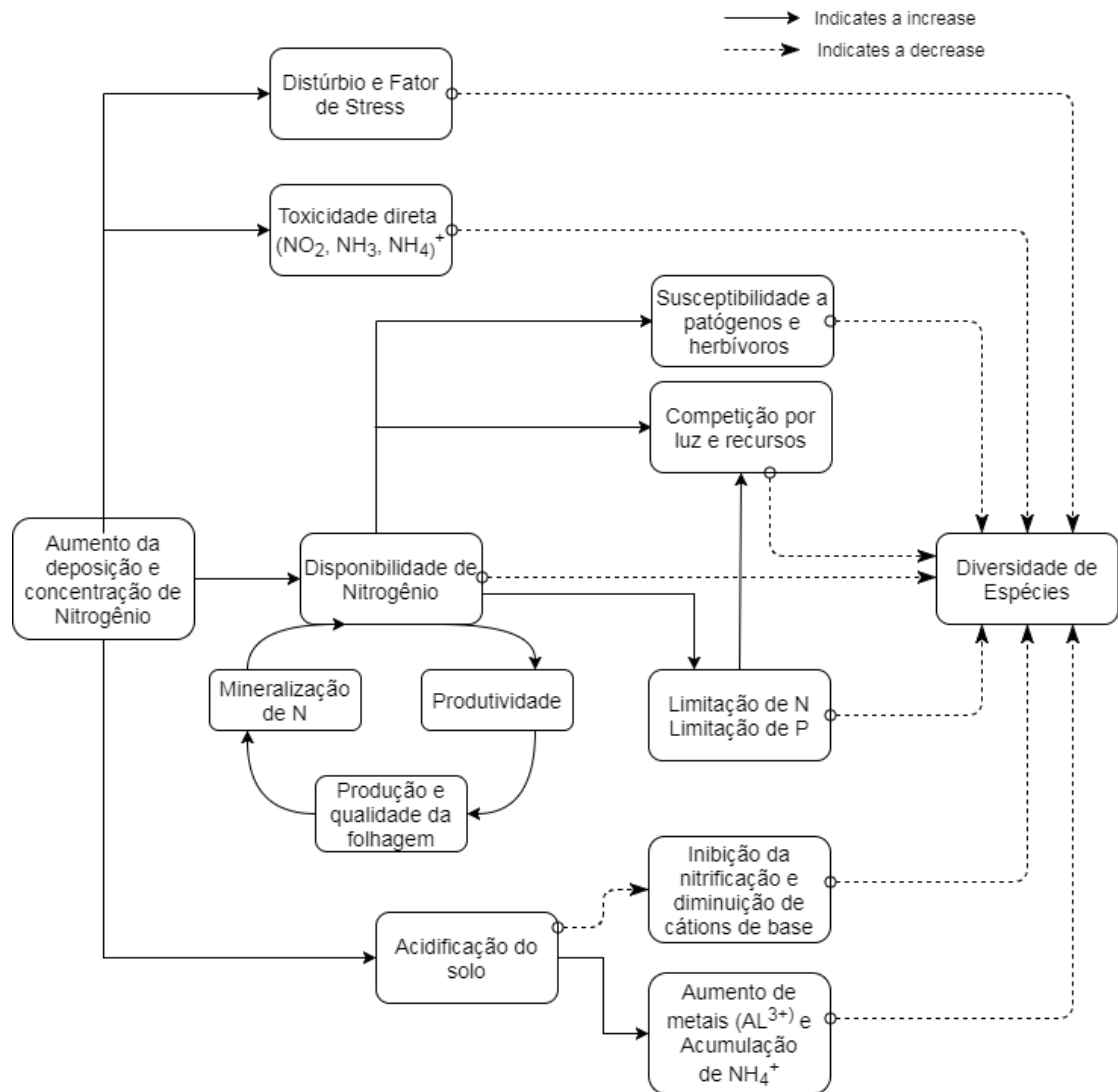


Figura 4. Esquema dos principais impactos devido ao aumento da deposição de Nitrogênio (Dise, 2011).

Os fungos ectomicorrízicos (fECM) são muito importantes para a absorção de nutrientes, uma vez que o micélio externo se estende ao solo, aumentando o volume explorado pelas raízes das árvores em até duas ordens de grandeza (Harley, 1989). As respostas relatadas para o aumento da deposição de N incluem mudanças na comunidade de ectomicorriza, diminuição da diversidade fECM, diminuição da colonização das raízes e diminuição do crescimento de micélio do solo (De Witte et al., 2017). Os efeitos nestes indivíduos ainda são incertos, pois existem algumas dificuldades em exatificar de que maneira estes são prejudicado, sendo também problemático analisar os processos microbiais do solo sem expô-lo a um

distúrbio maior, sendo ainda mais complexa devido a dependência simbiote entre os fungos com as raízes das árvores.

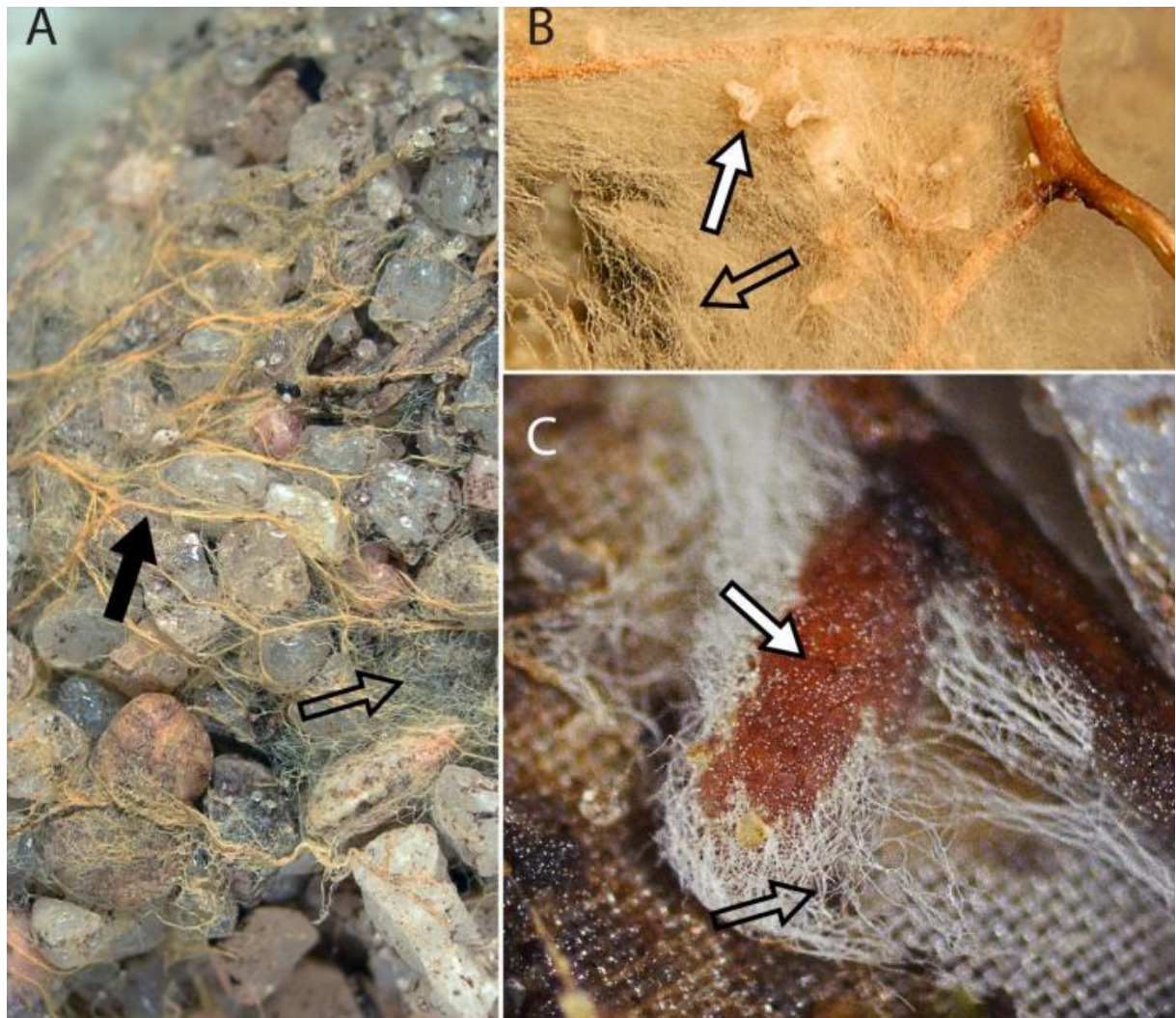


Figura 5. Micélio de fEMC colonizando raízes finas das árvores e encapsulando-as com o manto (setas brancas). Do manto, o micélio externo do fungo se estende para dentro do solo com suas finas hifas (setas transparentes) e rizomorfos (setas pretas). A figura C mostra uma raiz colonizada fora do saco de malha, sendo que o micélio penetra para dentro do saco. Na figura A, podemos observar o conteúdo de areia sendo agregada pelo micélio (Bahr, 2013).

Para compreender a extensão dos danos causados as comunidades de fEMC nos solos florestais, se faz necessário uma quantificação de sua biomassa, além de outros estudos, a fim de comparar em um gradiente de deposição uma correlação entre o poluente e a produção micelial do fungo. Um problema chave na determinação da produção de micélio micorrízico é a falta de métodos para distinguir o crescimento das hifas micorrízicas das dos fungos

saprotroficos. Como os fECM não são monofiléticos (Hibbett et al., 2000), nenhum marcador bioquímico ou baseado em DNA pode ser encontrado para quantificar apenas esse grupo a partir do complexo ambiente do solo. Portanto, vários métodos são necessários para distinguir a biomassa de micélio ECM da de outros micélios fúngicos (Wallander, 2013).

Uma maneira de selecionar o micélio de fECM é usar um substrato com baixo teor de matéria orgânica, por exemplo areia, onde fungos saprotroficos apresentam baixíssimo crescimento pois dependem da presença de matéria orgânica (Wallander et al, 2001). Este substrato é colocado no solo em sacos feitos de malha, onde apenas o micélio é capaz de penetrar, prevenindo assim a entrada de raízes (Bahr, 2013). Este método é conhecido como crescimento de micélio em sacos de malha.

Existem diferentes maneiras de se quantificar a produtividade de micélio de fECM dentro destes sacos, estas podem ser feitas através de classes de colonização visíveis, contagem de buracos nos sacos de malha, estimativa da biomassa, utilização de biomarcadores (Wallander et al, 2011), comprimento de hifas por unidade de solo, marcadores moleculares (Baldrian, 2013), teor de carbono (Wallander et al, 2001), entre outros. Embora estas técnicas estejam disponíveis, todas elas têm limitações que precisam ser levadas em consideração, para maior compreensão dos efeitos decorrentes deste processo, o presente projeto se faz importante no estabelecimento de um bom método de pesquisa que possa dar maior segurança estatística na investigação dos efeitos da deposição de nitrogênio em fungos de ectomicorrizas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Selecionar um ou mais métodos quantitativos do micélio externo de ectomicorrizas presente no solo através de crescimento em sacos de malha, selecionando aquele com maior confiabilidade estatística. Espera-se encontrar um método que tenha uma boa correlação negativa com o gradiente de deposição de nitrogênio.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar três diferentes métodos de quantificação em sacos de malha, observando suas dificuldades para então relatá-las.
- Estabelecer metodologia laboratorial, detalhando o passo-a-passo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto representa o estágio inicial de uma pesquisa que estuda os efeitos da deposição de nitrogênio na floresta de fagus na Suíça. As implicações desta deposição podem ser verificadas através dos impactos encontrados nas comunidades de fungos ectomicorrízicos, presentes no solo e nas raízes das árvores. Para se obter uma metodologia confiável de quantificação do micélio destes fungos, foram utilizados sacos de malha encubados no solo de um experimento iniciado no ano de 2013. Estes sacos foram submetidos a três metodologias de quantificação distintas: classes de colonização visível, frequência em buracos na malha e análise quantitativa da biomassa. Os resultados foram avaliados qualitativamente e quantitativamente, sendo então possível a escolha do método mais relevante ao estudo e também a elaboração e criação de um passo-a-passo metodológico.

4.1 Área de estudo

Para efeito de análise comparativa foram analisados 7 pontos de interesse (Tabela 2). Estes sítios apresentam gradiente de deposição de N variando de 19,1 a 32,4 kg N ha⁻¹ a⁻¹ (Figura 6), e são pertencentes a uma rede de observação permanentes de florestas (Braun et al., 1999). As 7 parcelas selecionadas são dominadas pela faia europeia, que compreende em média 79% da área basal.

Nome	Código	Elevação (m)	Precipitação total de chuva (mm a ⁻¹)	pH	Deposição de N (kg ha ⁻¹ a ⁻¹)
<i>Rodersdorf</i>	<i>RO</i>	440	1050.6	4.1	19.1
<i>Allschwil</i>	<i>AL</i>	350	885	4.1	21.1
<i>Breitenbach</i>	<i>BB</i>	460	995.4	5.2	21.9
<i>Pratteln</i>	<i>PR</i>	415	1116.5	4.5	23.7
<i>Habsburg</i>	<i>HA</i>	430	1089	4.2	24.7
<i>Aarwangen</i>	<i>AW</i>	470	1162.4	4.0	25.4
<i>Muri</i>	<i>MU</i>	490	1133.7	4.0	32.4

Tabela 2. Condições ambientais dos sítios analisados.

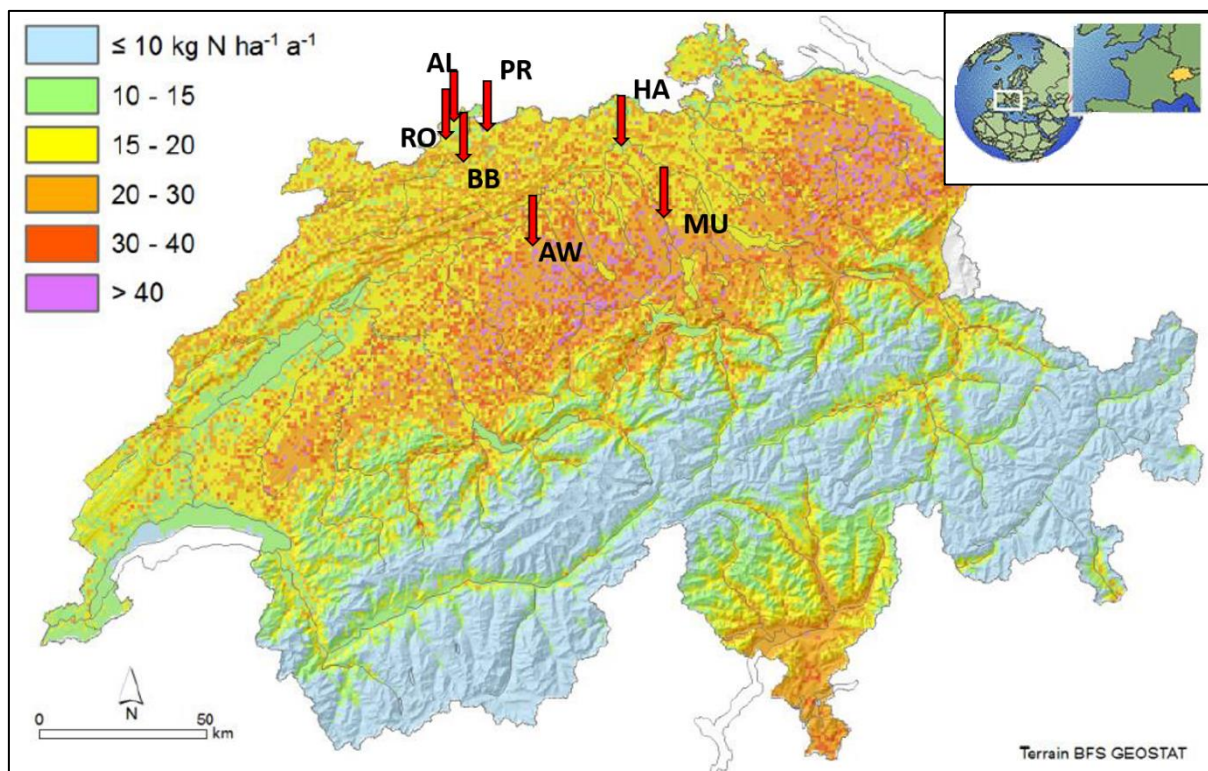


Figura 6. O mapa mostra a deposição total de nitrogênio modelada para o ano de 2015 com marcadores nos sítios analisados (<https://s.geo.admin.ch/7df5b8329f>).

4.2 Produção dos sacos de malha

Uma porção de areia de quartzo, de granulometria 0,36-2 mm, foi mergulhada e permaneceu durante uma noite em solução ácida de HCl 4 M. Na manhã seguinte o ácido foi diluído em água e então derramado em água corrente. A areia restante foi lavada com água da torneira, deixando-se a mangueira dentro do recipiente, durante aproximadamente 1 hora, e depois lavada com água desmineralizada (Demi H₂O) durante 5-10 minutos. A condutividade elétrica foi medida com Metrohm Titrande a fim de verificar se o ácido e a água da torneira haviam sido removidos, almejando um valor de condutividade menor que 10 mS/cm. Esta areia foi seca a 70 ° C e armazenada em baldes esterilizados esperando o período em que seriam incubadas no solo.

Os sacos foram produzidos a partir de malha de filtro Nitex 03-50/31 com 2cm de diâmetro e malha de 50µm. As extremidades foram soldadas juntas colocando tiras de plástico

embaixo, entre e em cima da malha (a malha de nylon não poderiam derreter), formando um cone cilíndrico de 10 cm de comprimento.

4.3 Incubação

Os sacos de malha foram preenchidos com areia e enterrados no solo, onde ficaram incubados durante 4 anos (2013-2017), em orifícios localizados na interface entre os horizontes orgânico e mineral, onde a produção de micélio de ectomicorizas é maior (Lindahl et al., 2006) (Figura 7).

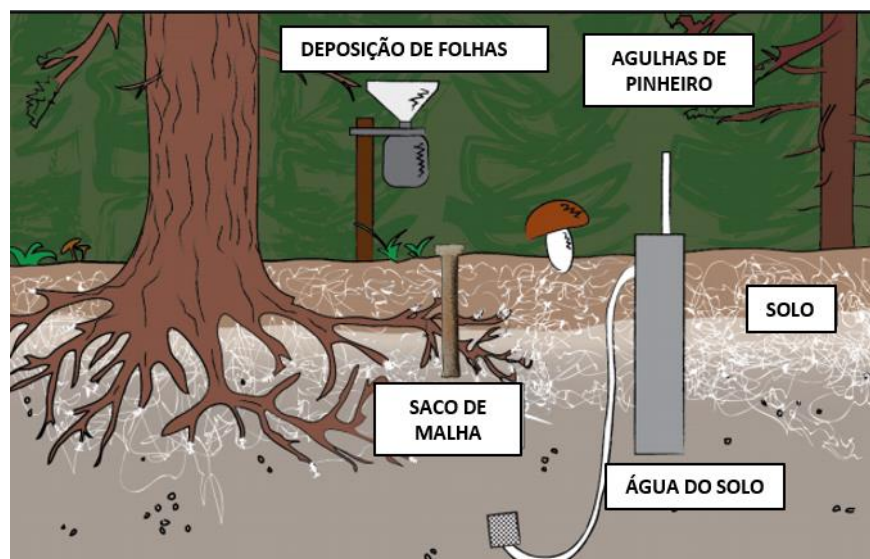


Figura 7. Visão geral da amostragem de campo (Bahr, 2013)

4.4 Coleta e armazenamento

Os sacos de malha foram coletados em saídas de campo realizadas no segundo semestre de 2017, preferencialmente durante tempo seco para que a areia não sofresse aglutinação pela umidade, mas apenas pela presença de micélio. A areia coletada durante tempo úmido foi seca ao ar em laboratório. Feito esse processo, os sacos foram armazenados em refrigeradores a 4 °C antes de serem processados.

4.5 Quantificação de micélio

4.5.1 Classes de Colonização Visível

Para se obter uma boa visualização da mistura areia + micélio, o conteúdo dos sacos foi transferido para potes transparentes, cuidadosa e lentamente, onde a areia possuía certo movimento ao ser agitada (Foto 1). Os recipientes foram colocados na posição horizontal e um movimento giratório foi aplicado, sendo então possível identificar diferentes níveis de aglutinação na areia. O nível de agregação se dava pela presença de micélio na areia, funcionando como uma espécie de “teia” que unia os grãos, sendo este acontecimento mais ou menos intenso.



Foto 1. Mistura areia + micélio sendo transferida para outro recipiente.

A quantidade visível de micélio foi estimada em 5 classes de colonização da seguinte forma:

1 = 0 – 20 % = nenhum micélio

2 = 20 – 40 % = presença de micélio escasso, algumas partículas de areia se juntam

3 = 40 – 60 % = presença de micélio e alguma agregação de partículas de areia

4 = 60 – 80 % = abundância de micélio e forte agregação de partículas de areia

5 = 80 – 100 % = todas as partículas de areia agregadas por micélio

4.5.2 Frequência em buracos na malha

Depois de abrir o saco com auxílio de uma tesoura limpa (Foto 2), foram separadas tiras da malha em três secções longitudinais ao longo do saco (2, 5 e 8 cm de profundidade) e armazenadas em saquinhos plásticos com vedação (Fotos 3 e 4).



Foto 2. Saco sendo cortado.

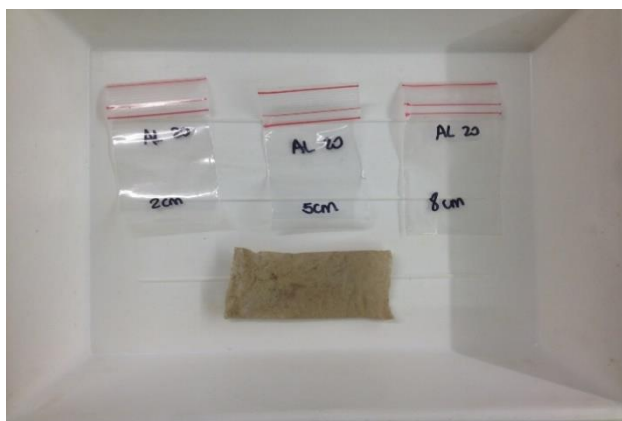


Foto 3. Saquinhos para armazenar as malhas e malha já esvaziada.



Foto 4. Recipiente com a mistura areia + micélio e saquinhos com os cortes longitudinais.

Com o auxílio de um estereomicroscópio, a presença ou ausência de hifas foi quantificada nos cortes longitudinais da malha, onde selecionou-se aleatoriamente 100 furos para cada seção do saco. A malha foi apertada entre duas lâminas de microscópio, juntamente com uma folha de grade de mm transparente (voltado para a malha para melhor resolução), na qual um quadrado de 3x3mm é destacado, sendo possível visualizar 9 quadrados inscritos neste maior (Foto 5).

Em cada um desses nove quadrados, foi contada 1 linha de 10 furos de malha (escolheu-se a 3ª linha vertical da linha da grade da mão direita de cada quadrado) e no quadrado central foi contada uma linha adicional para somar 10 furos totalizando 100 furos de malha.

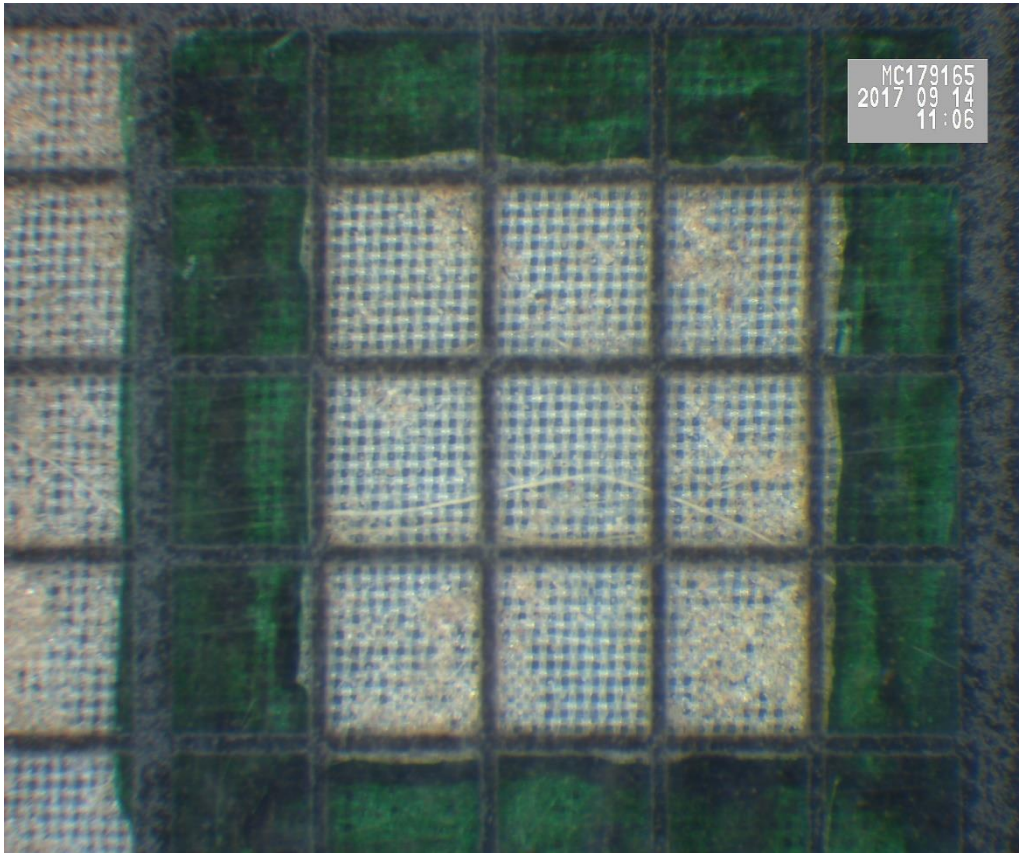


Foto 5. Malha sendo visualizada no estereomicroscópio.

Para calcular o valor de frequência (% de presença) para cada saco foi realizada a média das três seções longitudinais. Em seguida, foi calculada a média da frequência média dos sacos replicados para posterior análise.

4.5.3. Biomassa

Depois de ser feito a análise do método de classe de colonização visível as amostras foram preenchidas com água desmineralizada onde a areia ficou completamente submersa. Os tubos foram colocados no agitador HT durante pelo menos 10 minutos a fim de fazer com que o micélio flutuasse no topo da água (Foto 6).



Figura

Foto 6. Potes sendo agitados em agitador HT.

Cada amostra foi transferida para um béquer de 500 ml onde mais água desmineralizada foi adicionada e agitou-se manualmente o recipiente para que o micélio flutuasse novamente para o topo da água (Foto 7), em seguida despejou-se os teores líquidos sobre uma peneira de metal na filtração a vácuo (Foto 8). Este processo foi repetido 3 vezes.



Foto 7. Béquer com água desmineralizada e béquer com a mistura de areia + micélio + água.

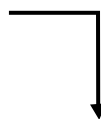


Foto 8. Sistema de filtragem a vácuo.

O micélio foi transferido da peneira para uma placa de petri com fórceps (sob o estereoscópio) e limpou-se a areia restante durante 5 minutos por amostra, para obter tratamento igualitário (Fotos 9 e 10). Secado ao forno a 60 ° C durante pelo menos 3 dias em placas de petri ou papel (7x12cm). Pesado em balança de alta precisão no laboratório. Recuperou a areia em uma balde. Amostras armazenadas em sacos de papel.



Foto 9. Estereoscópio ligado e peneira com micélio.

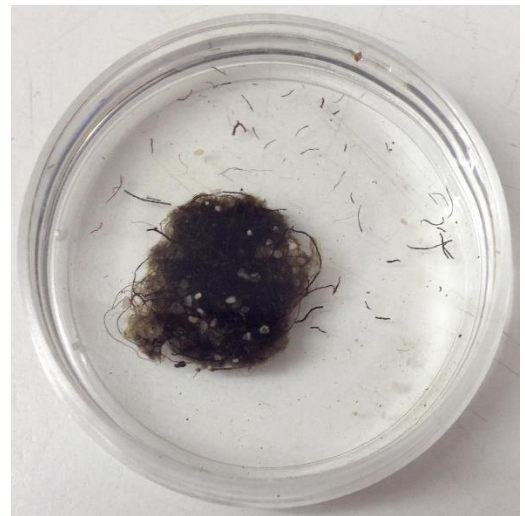


Foto 10. Micélio na placa de petri antes da remoção de areia excedente.

4.6 Análise Estatística

Os dados foram compilados e, por meio de estudos estatísticos, usando o software R (pacote VEGAN) e a ferramenta do Excel Action como ferramentas, selecionou-se uma combinação de métodos para quantificar a presença de micélio nos sacos de malha. Os testes realizados foram a matriz de correlação entre os diferentes métodos de quantificação e o gradiente de deposição de nitrogênio para cada sitio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os sete sítios, 115 amostras (11-20 amostras por local) foram visualizadas com sucesso para os métodos de classes de colonização visível, frequência em buracos na malha e biomassa (Tabela 3). Os resultados para cada sítio dos três métodos de quantificação da produção micelial em sacos de malha pode ser verificado na tabela 3.

MÉTODO	APLICAÇÃO	TEMPO	EQUIPAMENTOS	DIFICULDADES	COMPARABILIDADE
<i>Classes de colonização visível</i>	Amostra inteira, sem perda	3 Minutos	Estereoscópio	Todas as amostras devem ser estimadas da mesma maneira e pela mesma pessoa.	Comparável
<i>Frequência em buracos na malha</i>	Amostra inteira, sem perda	10 Minutos	Estereoscópio	Todas as amostras devem ser estimadas da mesma maneira e pela mesma pessoa.	Comparável
<i>Biomassa</i>	Amostra inteira, pouca perda pela limpeza	20 Minutos	Agitador HT Filtro a vácuo Forno de secagem Balança de alta precisão	Umidade desempenha um papel e a areia deve ser removida	Comparável

Tabela 3. Métodos utilizados no estudo para quantificar a produção de micélio em sacos de malha.

Os métodos foram considerados simples e baratos podendo ser realizados com um pequeno dispêndio de tempo e baixas demandas de equipamento. Todos os três métodos são baseados em uma análise de toda a amostra sem destruí-la. Isto traz a vantagem de as amostras poderem ser subsequentemente utilizadas para análises posteriores.

A classe de colonização visível é muito simples e rápida, mas não permite uma afirmação quantitativa sobre a biomassa. Um pré-requisito importante para bons valores é que todas as amostras sejam tratadas da mesma forma e avaliadas pela mesma pessoa. Este método é usado por muitos pesquisadores, de modo que as comparações com esse estudo são possíveis. Em estudos comparativos de grandes distâncias geográficas ou gradientes ambientais, este

método é prático porque as diferenças na composição de espécies têm pouco efeito sobre os resultados.

A frequência em buracos na malha é muito simples e rápida de realizar, mas permite uma declaração quantitativa mais precisa sobre a biomassa nas malhas do que a estimativa visual. Com este método, é novamente um pré-requisito importante que todas as amostras sejam tratadas da mesma forma e, se possível, avaliadas pela mesma pessoa. Este método tem sido usado regularmente no grupo de pesquisa de H. Wallander por alguns anos. No entanto, falta uma comparação com outros grupos de pesquisa e vários ecossistemas florestais. Comparado a grandes distâncias geográficas ou a gradientes ambientais, este método é adequado porque as diferenças na composição de espécies têm pouco efeito nos resultados.

A determinação do peso requer alguns equipamentos, que estão disponíveis na maioria dos laboratórios de microbiologia. Além disso, este método é muito simples e rápido de realizar. Apenas a limpeza do micélio é um pouco demorada e produz perda mínima, sendo de extrema importância que a areia presente na amostra seja removida e o micélio seja seco, pois caso não ocorram, haverá interferência significativa na estimativa da biomassa. A determinação de peso fornece a informação de biomassa quantitativa mais precisa dos sacos de malha e é mais reprodutível do que a estimativa visual e a frequência em buracos de malha. Este método também é adequado para a comparação de biomassa em grandes distâncias geográficas ou em gradientes ambientais.

Os resultados se encontram resumidos na Tabela 4, onde foi feita a média as diferentes metodologias para cada sítio.

Sítio	Deposição de Nitrogênio (kg ha ⁻¹ a ⁻¹)	Colonização Visível (classes 1-5)	Frequência em buraco de malha	Biomassa (mg)
RO	19,1	3,47	14,21	22,93
AL	21,1	2,71	7,00	11,58
BB	21,9	3,41	12,71	17,72
PR	23,7	2,65	18,75	8,51
HA	24,7	1,82	2,06	2,77
AW	25,4	1,8	0,87	3,038
MU	32,4	2,06	1,47	6,66

Tabela 4. Para cada sítio, a média dos resultados dos métodos quantitativos.

Em um estudo anterior na Floresta de Faia suíça, a colonização micelial visualmente estimada nos sacos de malha diminuiu com o aumento da deposição de nitrogênio (de Witte et al., 2017). Isso se reflete nos resultados dos nossos testes atuais (Gráfico 1), onde a colonização visualmente estimada mostra uma correlação negativa com o aumento da deposição de nitrogênio ($\rho = -0,694$, $P = 0,1-0,05$).

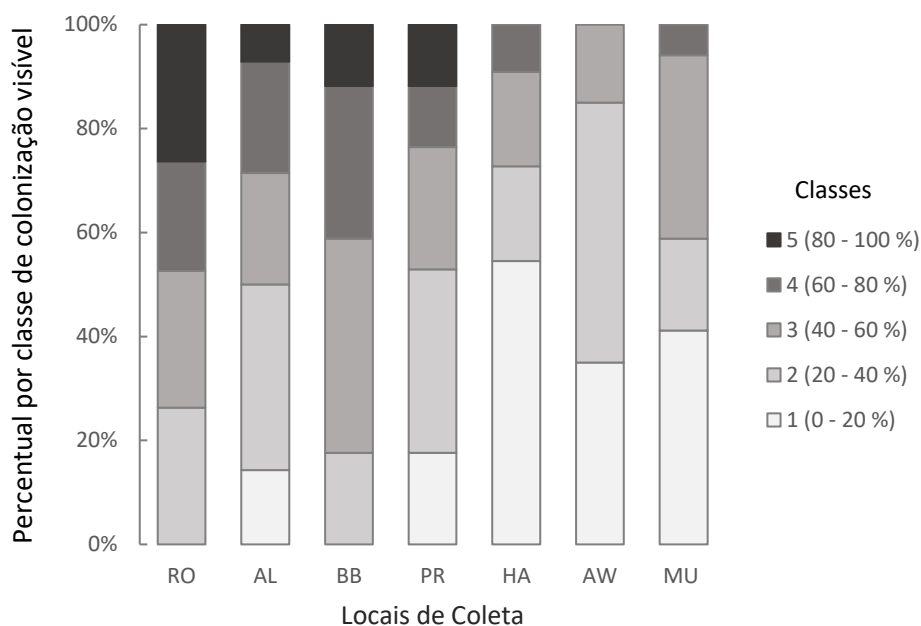


Gráfico 1. Percentagem de colonização micelial em sacos de malha nas 7 parcelas analisadas por gradiente de deposição de Nitrogênio (menor deposição à esquerda).

A quantificação visual de micélio em classes mostra que a colonização, após 4 anos de incubação, em sacos com considerável crescimento (classe 4 e 5) foi observada em sítios onde a deposição de nitrogênio varia entre 19 e 24 kg N ha⁻¹ a⁻¹, e sacos onde nenhum crescimento (classe 1) foi observado em sítios com deposição > 24 kg N ha⁻¹ a⁻¹.

Os valores médios de estimativa visual e a determinação do peso mostram uma correlação positiva altamente significativa (coeficiente de correlação ρ de Pearson = 0,967, $P < 0,001$), enquanto que a estimativa visual também está correlacionada com a colonização no tecido de malhas significativamente positivo ($\rho = 0,782$, $P < 0,05$). A colonização da malha de tecido, no entanto, não está significativamente correlacionada com o peso ($\rho = 0,659$) (Figura 8).

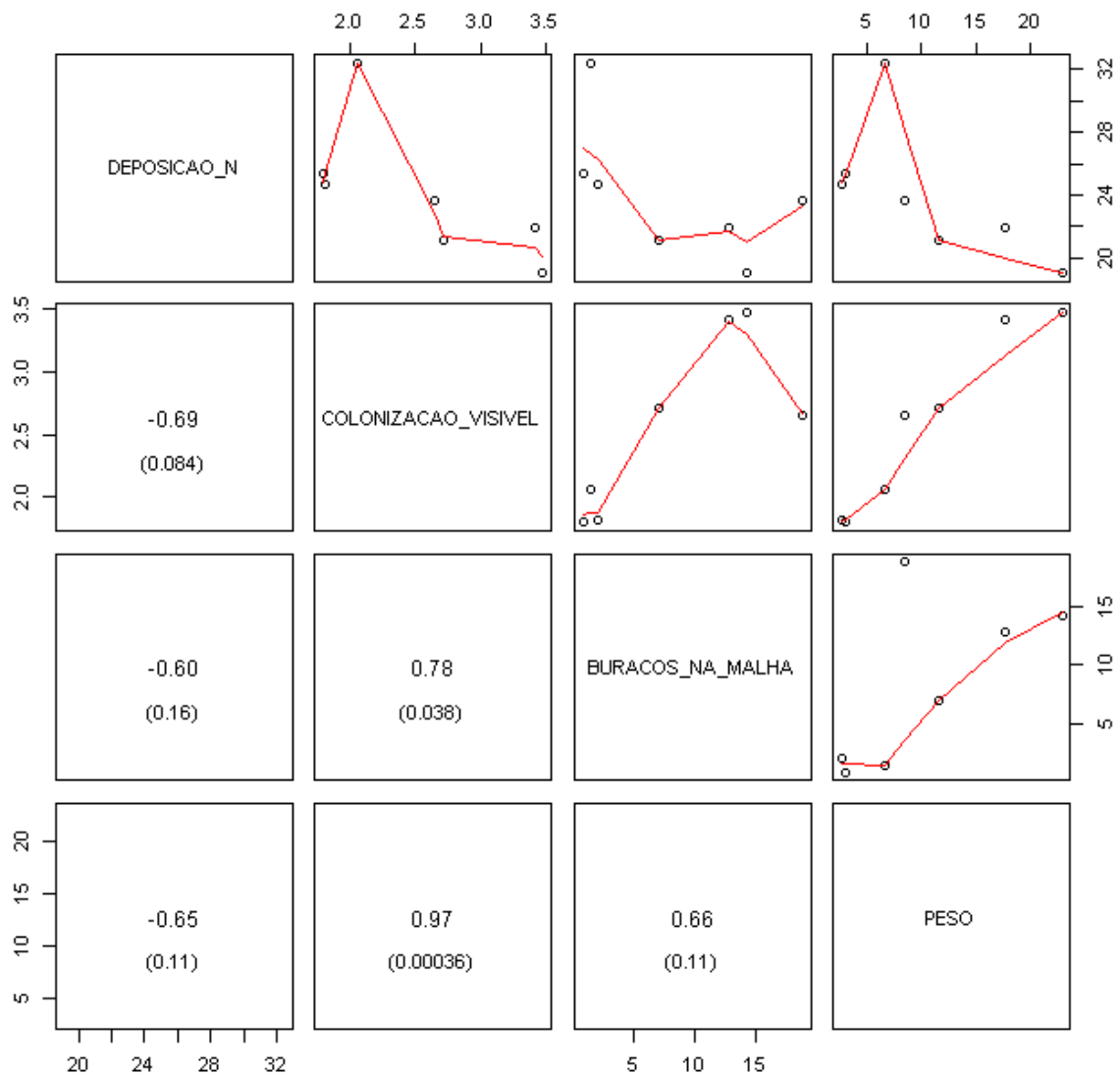


Figura 8. Matriz de correlação de Pearson com a variável ambiental deposição de N e com os três métodos de quantificação: classes de colonização visível, frequência em buracos na malha e Biomassa. Os valores dentro dos quadrados são coeficiente ρ de Pearson e p-valor, em cima e em baixo, respectivamente.

O teste mostrou que a estimativa visual e a determinação do peso produzem resultados muito semelhantes, enquanto a contagem de malhas de tecido povoadas é apenas parcialmente comparável aos outros dois métodos. Naturalmente, existem algumas limitações a essa comparabilidade, como os diferentes tempos de incubação dos sacos de tela. As razões para os desvios na contagem de malhas de tecido podem ser múltiplas. Por exemplo, o tecido é frequentemente contaminado e as hifas pouco distinguíveis são, portanto, difíceis de

reconhecer. O tecido das sacolas de malha está em contato direto com o solo durante a incubação, portanto, é provável que mais saprófitas cresçam na malha, mas não penetrem no interior das sacolas de malha.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, é recomendável para estudos futuros a quantificação do micélio utilizando a estimativa visual por classes de colonização e/ou a determinação do peso, sendo que o primeiro método apresentou os melhores valores estatísticos. Estes são métodos simples e baratos para quantificar o micélio, que permitem a análise subsequente do DNA para identificar as espécies. A contagem em tecido de malha, é um método relativamente novo, mas que se apresentou inferior aos outros dois métodos, portanto não pode ser recomendado para futuros estudos nesta forma. Se otimizada, poderá ser testada e comparada com os outros dois métodos.

A estimativa visual da produção de micélio é o método com menor esforço e parece dar resultados muito confiáveis, sendo muito gratificante que este produza resultados tão semelhantes quanto a determinação precisa do peso. Isso sugere que esse método deve ser usado em todos os estudos para permitir comparabilidade entre os estudos.

Os objetivos específicos do estudo foram alcançados, sendo possível relatar o passo-a-passo metodológico para a quantificação de micélio pelo método de sacos de malha, e descrever as dificuldades encontradas no processo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bahr, A. Ectomycorrhizal fungi: Their role in nitrogen retention and carbon sequestration in northern coniferous forests. Lund University, 2013. Disponível em: <https://lup.lub.lu.se/search/ws/files/5530350/4022947.pdf> . Data de acesso: 28 out. 2018.

Baldrian, P., Větrovský, T., Cajthaml, T., Dobiášová, P., Petránková, M., Šnajdr, J., Eichlerová, I., 2013. Estimation of fungal biomass in forest litter and soil. *Fungal Ecol.* 6, 1–11. Disponível em: doi:10.1016/j.funeco.2012.10.002. Data de acesso: 25 out. 2018.

Bobbink, R., Hettelingh, J.P., 2010. Review and revision of empirical critical loads-response relationships. Proc. an ExpertWork. Noordwijkerhout, 23–25 June 2010 (246 pages). <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/680359002.pdf>. Acesso em: 18 de nov. 2017.

Bobbink, R., Hicks, K., Galloway, J., Spranger, T., Alkemade, R., Ashmore, M., Bustamante, M., Cinnerby, S., Davidson, E., Dentener, F., Emmett, B., Erisman, J-W., Fenn, M., Gilliam, F., Nordin, A., Pardo, L., and De Vries, W. (2010). Global assessment of nitrogen deposition effects on plant terrestrial biodiversity: a synthesis. *Ecological Applications*: **20**, 30-59. Disponível em: <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1890/08-1140.1>. Data de acesso: 20 set. 2018.

Braun, S., Rihm, B., Schindler, C., Flückiger, W., 1999. Growth of mature beech in relation to ozone and nitrogen deposition: an epidemiological approach. In: Sheppard, L.J., Cape, J.N. (Eds.), *Forest Growth Responses to the Pollution Climate of the 21st Century*. Springer Netherlands, Dordrecht:pp. 357–364 http://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-1578-2_30. Acesso em: 21 set. 2018.

Bücking, H., Liepold, E., Ambilwade, P., 2012. The Role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes. *Agricultural and Biological Sciences* Pg.: 107-138. <https://www.intechopen.com/books/plant-science/the-role-of-the-mycorrhizal-symbiosis-in-nutrient-uptake-of-plants-and-the-regulatory-mechanisms-und>. Acesso em: 21 nov. 2017.

Buée, M., de Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., Jurkevitch, E., 2009. The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* 321:189–212. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-9991-3>. Acesso em: 01 de out. 2018.

Buée, M., Vairelles, D., Garbaye, J., 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus silvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15:235–245. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-004-0313-6>. Acesso em: 01 de out. 2018.

De Witte, L.C., Rosenstock, N.P., van der Linde, S., Braun, S. Nitrogen deposition changes ectomycorrhizal communities in Swiss beech forests. *Science of the Total Environment* 605–606 (2017) 1083–1096. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717315450?via%3Dihub>. Acesso em: 21 nov. 2017

DISE, N. B et al. Nitrogen as a threat to European terrestrial biodiversity. The European Nitrogen Assessment, ed. Mark A. Sutton, Clare M. Howard, Jan Willem Erisman, Gilles Billen, Albert Bleeker, Perinette Grennfelt, Hans van Grinsven and Bruna Grizzetti. Published by Cambridge University Press. © Cambridge University Press 2011, with sections © authors/European Union. Disponível em: http://www.nine-esf.org/files/ena_doc/ENA_pdfs/ENA_c20.pdf. Data de acesso: 22 out. 2018.

Druebert, C., Lang, C., Valtanen, K., Polle, A., 2009. Beech carbon productivity as driver of ectomycorrhizal abundance and diversity. *Plant Cell Environ.* 32:992–1003. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3040.2009.01983.x>. Acesso em: 01 de out. 2018.

Erisman JW, Galloway JN, Seitzinger S, Bleeker A, Dise NB, Petrescu AMR, Leach AM, de Vries W. 2013 Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Phil Trans R Soc B* 368: 2013. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/368/1621/20130116>. Acesso em: 21 nov. 2017.

Erisman, J.W; Grinsven, H. van; Grizzetti, B.; Bouraoui, F.; Powlson, D.; Sutton, M.A.; Bleeker, A.; Reis, S.. The European nitrogen problem in a global perspective. The European Nitrogen Assessment. Cambridge University Press, 2011.

European Environment Agency. Air pollution fact sheet 2014 Switzerland. 2014.

Fowler D et al. 2013 The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Phil Trans R Soc B* 368: 20130164. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>. Data de acesso: 21 de out. 2018.

Galloway J., Erisman, J.W., Sutton, M.A., Klimont, Z., Winiwarter, W. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience*, 28 sep. 2008.

GOMES, M. A. F.; SOUZA, M. D. de; BOEIRA, R. C.; TOLEDO, L. G. de. Nutrientes vegetais no meio ambiente: ciclos biogeoquímicos, fertilizantes e corretivos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 50 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 18). Disponível em: http://docsagencia.cnptia.embrapa.br/agriculturaMeioAmbiente/Gomes_nutrientes.pdf. Acesso em: 12 de set. 2018.

Harley JL. 1989. The significance of mycorrhiza. *Mycological Research* **92**: 129–139. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756289800012>. Data de acesso: 21 out. 2018.

Hibbett, D. S., Gilbert, L.B., Donoghue. M. J.. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 407, pg 506-508. 28 set. 2000 online. Macmillan Magazines Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/35035065>. Data de acesso: 28 out. 2018.

Hoffmann, L. V., Lucena, V.S, 2006. Para Entender Micorrizas Arbusculares. EMBRAPA. Campina Grande, PB. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/18310/1/DOC156.pdf>. Acesso em: 19 no. 2017.

Högberg, P., Bengtsson, G., Berggren, D., Högberg, M., Nilsson, I., Nohrstedt, H., Persson, T., Sjöberg, M. HOW ARE THE NITROGEN DYNAMICS OF FOREST SOILS AFFECTED?. Swedish Environmental Protection Agency. Pg.: 29-52. Pg.: 9-12. <http://swedishepa.se/Documents/publikationer/620-6137-2.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2017.

Lindahl, B.D., Boberg, J., Trumbore, S.E., Ihrmark, K., Hogberg, P., Finlay, R.D., Stenlid, J., 2006. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen nuptake in a boreal forest. *New Phytol.* 173:611–620. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01936.x>. Acesso em: 09 dez. 2017.

MARTINELLI L. A. Os caminhos do nitrogênio - do fertilizante ao poluente, *Informações agrônômicas*, número 118, junho de 2007. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/4671/2990>>. Acesso em: 12 de set. 2018.

NADP, 2016. Nitrogen from the atmosphere. ISWS Miscellaneous Publication 207 and NADP Brochure 2016-01. <http://nadp.sws.uiuc.edu/lib/brochures/nitrogenAtmos.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2017.

NADP. National Atmospheric Deposition Program Critical Loads of Atmospheric Deposition Science Committee, 2017. CLAD Critical Load Definitions, version 1.1. NADP Data Report 2016-01. Illinois State Water Survey, University of Illinois at Urbana-Champaign, IL.

Person, T. 2000. The Nitrogen Problem in historical perspective. Effects of Nitrogen Deposition on Forest Ecosystems. Swedish Environmental Protection Agency. <http://swedishepa.se/Documents/publikationer/620-6137-2.pdf>. Acesso em: 07 ago. 2018

Rennenberg, H., Gessler, A., 1999. Consequences of N deposition to forest ecosystems – recente results and future research needs. *Forest Growth Responses to the Pollution Climate of the 21st Century*. Pg.: 47-64. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/221988998_Climate_change_impacts_adaptive_capacity_and_vulnerability_of_European_forest_ecosystems Acesso em: 15 ago. 2018

Rihm B., Achermann B. 2016: Critical Loads of Nitrogen and their Exceedances. Swiss contribution to the effects-oriented work under the Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (UNECE). Federal Office for the Environment, Bern. Environmental studies no. 1642: 78 p.

Rodrigues, R. A. R.; de Mello, W. Z.; da Conceição, M. C. G.; de Souza, P. A.; Silva, J. J. N. Dinâmica do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas e Florestais Tropicais e seu Impacto na Mudança do Clima. *Rev. Virtual Quim.*, 2017, 9 (5), 1868-1886. Disponível em: <<http://rvq.s bq.org.br/imagebank/pdf/v9n5a07.pdf>>. Acesso em: 19 de set. 2018.

SMITH, S.E., READ, D.J.. Mycorrhizal Symbiosis. Academic press, London, 2008.

SOUZA, P. A. de; MELLO, W. Z. de. SILVA, J. J. N. da; RODRIGUES, R. de A. R.; CONCEIÇÃO, M. C. G. da. Deposições Atmosféricas Úmida, Seca e Total de Nitrogênio Inorgânico Dissolvido no Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Virtual Quim.*, 2017, 9 (5), 2052-2066. Disponível em: <http://rvq.s bq.org.br/imagebank/pdf/v9n5a19.pdf>. Acesso em: 04 de out. 2018.

Sutton M.A., Oenema O., Erisman J.W., Leip A., van Grinsven H., Winiwarter W.. **Too much of a good thing**. *Nature*, 14 Apr. 2011; 472(7342):159-61. Disponível em: doi: 10.1038/472159a. Epub 2011 Apr 10. Data de acesso: 15 set 2018.

Uchida, R. S., 2000. Essential Nutrients for Plant Growth: Nutrient Functions and Deficiency Symptoms. In: *Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture* J. A. Silva and R. Uchida, eds. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa. Pg: 31-56. <http://src.gov.jm/wp-content/uploads/2013/02/pnm3.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2018.

VIEIRA, R. F. Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas. Brasília, DF. Embrapa, 2017. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1090589/1/2017LV04.pdf>>. Acesso em: 19 de set. 2018.

Wallander, H., Ekblad, A., Godbold, D.L., Johnson, D., Bahr, A., Baldrian, P., Björk, R.G., Kieliszewska-Rokicka, B., Kjoller, R., Kraigher, H., Plassard, C., Rudawska, M., 2013. Evaluation of methods to estimate production, biomass and turnover of ectomycorrhizal mycelium in forests soils – a review. *Soil Biol. Biochem.* 57:1034–1047. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071712003409>. Acesso em: 24 de set. 2018.

Wallander, H., Göransson, H., Rosengren, U., 2004. Production, standing biomass and natural abundance of ^{15}N and ^{13}C in ectomycorrhizal mycelia collected at different soil depths in two forest types. *Oecologia* 139, 89 e 97. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00442-003-1477-z.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

Wallander, H., Nilsson, L.O., Hagerberg, D., Bååth, E., 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytol.* 151:753–760. Disponível em: <<http://portal.research.lu.se/ws/files/2873225/624336.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2018.

Wallander, H., Nilsson, L.O., Hagersberg, D., Baath, E., 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of externalmycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytol.* 151, 753–760. Disponive em: doi:10.1046/j.0028646x.2001.00199.x. Data de acesso: 20 out. 2018.

Wallander, H., Nylund, J.-E., 1992. Effects of excess nitrogen and phosphorus starvation on the extramatrical mycelium of ectomycorrhizas of *Pinus sylvestris* L. *New Phytol.* 120, 495–503. Disponível em: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01798.x>. Data de acesso: 05 out. 2018.

Y. P. Pan, Y. S. Wang, G. Q. Tang, and D. Wu. Wet and dry deposition of atmospheric nitrogen at ten sites in Northern China. *Atmos. Chem. Phys.*, 12, 6515–6535. 2012. Disponível em: www.atmos-chem-phys.net/12/6515/2012/. Data de acesso 29 out. 2018.