

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
MESTRADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
MODALIDADE PROFISSIONAL

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES
(FMAs) EM FORMAÇÃO VEGETAL PSAMÓFILA-REPTANTE:
ECOLOGIA E MICORRIZORREMEDIAÇÃO.**

OCIMAR FERREIRA DE ANDRADE

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

2012

OCIMAR FERREIRA DE ANDRADE

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES
(FMAs) EM FORMAÇÃO VEGETAL PSAMÓFILA-REPTANTE:
ECOLOGIA E MICORRIZORREMEDIAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, na área de concentração Meio Ambiente e Materiais, linha de pesquisa Desenvolvimento e Sustentabilidade.

Orientador: Professor *DSc.* Victor Barbosa Saraiva
(Doutor em Ciências pela Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Cabo Frio/RJ
2012

A553i Andrade, Ocimar Ferreira de.

Identificação de fungos micorrízicos arbusculares (fmas) em formação vegetal psamófila-reptante: ecologia e micorrizorremediação / Ocimar Ferreira de Andrade. – Cabo Frio: [s.n.], 2012.

xv, 80 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Fluminense / IF Fluminense -Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental.

1. Biorremediação. 2. FMA's. 3. Micorriza. 4. Hidrocarboneto. 5. Petróleo. I. IF Fluminense. II. Título.

CDD 589.2

Dissertação intitulada *Identificação de Fungos Micorrizicos Arbusculares (FMAs) em Formação Vegetal Psamófila-Reptante: Ecologia e Micorriorremediação*, elaborada por Ocimar Ferreira de Andrade e apresentada publicamente perante a Banca Examinadora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, na área de concentração Meio Ambiente e Materiais, linha de pesquisa Desenvolvimento e Sustentabilidade do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.

Aprovada em _____.

Banca Examinadora:

Victor Barbosa Saraiva, Doutor em Ciências (Biofísica)/ Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense

Luis Felipe Umbelino dos Santos, Doutorado em Ecologia pela UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense

Orivaldo Jose Saggin Junior, Doutor em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas) pela Universidade Federal de Lavras - Embrapa Agrobiologia.

AGRADECIMENTOS

Embora eu seja infinitamente grato a Deus por tudo que tem me proporcionado em uma vida de superações e vitórias, com Ele não necessito usar muitas palavras, pois em meu coração onde habita tudo que sinto, penso, sou e faço, Ele conhece. Com pessoas eu não sou muito bom em agradecimentos, porque a elas, não obstante a imensa gratidão que tenho por suas vidas, eu preciso dedicar muitas palavras para expressá-los, e o espaço é muito pequeno para isso.

No entanto, não poderia deixar de mencionar algumas pessoas que atribuo também a vitória até aqui alcançada. Na Bíblia, o rei Salomão declara a importância de um amigo, de estreitarmos relacionamentos e cultivarmos amizades e nunca estarmos sozinhos numa caminhada árdua: "...pois se caírem, um levantará o seu companheiro; mas ai do que estiver só, pois, caindo, não haverá outro que o levante...um cordão de três dobras não se arrebenta facilmente. (Eclesiastes 4:10-12).

À minha esposa e meus filhos sou grato pela paciência e longanimidade. À minha mãe Albertina, por seu carinho e fé no que o filho se propôs a conquistar com a ajuda de Deus. Aos meus irmãos sanguíneos por participarem da minha trajetória de vida. Aos meus queridos amigos familiares eu expresse minha profunda gratidão pela paciência e cooperação, pelas palavras de ânimo e alegria a cada etapa vencida. Meus amigos-irmãos, Nanda e Everaldo (o Vevé), Ivone e Joclemy (o Jô) e Léo e Cristina, todos sempre com palavras de força e oração animando-me e abençoando-me. Minha vitória é a vossa vitória. Sobre quantos eu poderia descrever cada contribuição com a minha vida e luta: Leonardo e Raissa, Paulo Cardoso e Beth, Elisa e Jeferson, Mônica e Odilon, meus colegas professores do C.E. Miguel Couto, da E. M. Darcy Ribeiro e do IFF-Cabo Frio; meus companheiros do curso de pós-graduação em Ensino de Ciências da Natureza (IFF)...falta-me espaço, não no coração, mas nas linhas que não poderei aqui escrever.

Meus companheiros de turma do mestrado são daqueles que a gente não se esquece facilmente. Cada um, com sua personalidade peculiar, ensinou-me, cativou-me: Fernanda, Gisely, Luizão, Patrícia, Paulo, Mário (o Beto), Carlos, Cassius, Magno, todos, companheiros de luta admiráveis. Os colegas de Campos, Ramon, Daniel, Carlos, Rogério, Davi e o Fred de Cabo Frio, relacionamentos rápidos, porém marcantes, assim como foram marcantes todos os contatos com nossos professores do mestrado: José Augusto, Jader, Marcos, Maria Inês, Dalila, Roberta, Paulo, Manildo, importantes contribuições na minha formação e no meu crescimento profissional.

Agradecimentos especiais faço às Fernanda e Gisely (ou Gisely e Fernanda) que chegaram de mansinho, conquistaram um pedaço enorme do meu coração com suas brincadeiras, amizade e afeto. A Nanda, uma amiga inteligente e batalhadora, pequena por fora enorme por dentro e um coração imenso; A Gi, um talento enorme para a pesquisa científica, maior ainda para a solidariedade e companheirismo. Sinto-me honrado por estar ao lado delas em momentos de grandes lutas e alegrias. A outra dobra da valorosa corda desse grupo de amigos é o Roberto, possuidor de um silêncio mineiro e com inteligência sagaz, capaz de, numa só sugestão, me fazer dar um salto enorme nos textos de minhas pesquisas. Obrigado companheiros de viagem, de mestrado, de vida. Como poderei esquecer vocês?

Aos meus companheiros de laboratório, alunos dedicados e imprescindíveis na busca dos resultados: Marianne, Murilo, Celso, Janaína, Larissa, Alex e nas coletas de campo: Maurílio.

À Prof.^a Dr.^a Maria Helena Campos Baeta Neves e à fotógrafa Bruna Pozzebon, pesquisadoras do IEAPM, pela atenção, disponibilidade e comentários que muito contribuíram com a qualidade das imagens microscópicas deste estudo.

Ao professor Ricardo Luis Louro Berbara, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e seus orientandos, Sael Sanches, Nemilson Bastos, Camila Nobre e Mariana Gonzales, pela inestimável cooperação.

Aos professores Flávio Dias e Manildo Macião, batalhadores na busca da qualidade na pesquisa experimental e presenças marcantes no LEMAN e inspiração pedagógica.

Deixei para o final o agradecimento ao meu orientador Victor Barbosa, o Vitão, que foi quem deu a primeira dica do que eu poderia fazer no mestrado quando eu pensava que Engenharia Ambiental não era a “minha praia”. Aí está pequeno-grande professor, cheguei até aqui por culpa sua, e com a ajuda de Deus. Juntos, tenho certeza que ainda desbravaremos essa tão pouco conhecida área da micorrizorremediação na restinga.

Peço as bênçãos dos céus para todos vocês, não havendo qualquer glória para mim, mas toda seja Àquele que nos fez unidos num só propósito: andarmos juntos um caminho de amor, de fé e de esperança em busca do conhecimento.

Agradeço ao IF Fluminense, agora minha casa, que desde a especialização deu-me uma oportunidade que a escola pública de qualidade deve oferecer a todo estudante brasileiro.

“O Senhor Deus me deu uma língua erudita para que eu saiba dizer ao seu tempo uma boa palavra ao que está cansado. Ele desperta-me todas as manhãs, me desperta o ouvido para que eu ouça, como aqueles que aprendem. ”

(Isaías 50:4)

*A Jesus, o eterno amigo, meus familiares e amigos-irmãos.
Dedico.*

RESUMO

Este trabalho apresenta uma investigação sobre a ecologia e o potencial rizorremediador dos Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) na Restinga de Massambaba, Arraial do Cabo, RJ. A presença bem sucedida da formação vegetal psamófila-reptante, importante para a fixação de dunas e manutenção ecológica do ambiente estressado e solo distrófico de restinga, indica que as espécies endêmicas ali encontradas são capazes de realizarem simbiose com microorganismos que auxiliam o seu estabelecimento e desenvolvimento. Como vegetais pioneiros, situando-se logo após a linha da maré, as plantas halófitas-psamófilas, entre elas a *Remirea marítima*, apresentam em suas rizosferas uma microbiota simbiote de vital importância para a sua sobrevivência nesse ambiente inóspito. A busca de possíveis soluções para mitigação de impactos causados por hidrocarbonetos do petróleo em ecossistemas costeiros, os quais têm ocorrido devido a acidentes e vazamentos no transporte de derivados do petróleo e água de produção por tubulações subterrâneas que atravessam tais ambientes, nortearam os esforços empreendidos neste estudo. São apresentados aqui dois artigos científicos: (i) uma ampla revisão de publicações sobre caracterização e classificação das micorrizas, como também estudos atuais sobre o potencial de endomicorrizas na rizorremediação de solos poluídos por hidrocarbonetos e metais pesados; (ii) identificação de esporos e outras estruturas fúngicas no solo da área de estudo e nas raízes de *R. marítima*; a realização de bioensaio que buscou avaliar o potencial rizorremediador de FMAs autóctones na presença de tolueno e inoculação com propágulos de FMAs, utilizando, para isso, sementes de *Brachiaria decumbens*, vegetal-teste amplamente relatado como simbiote de fungos micorrízicos e utilizado em experimentos de biorremediação. Foi utilizada a metodologia de extração e separação de esporos por peneiramento úmido; coloração de raízes e avaliação de colonização radicular por FMAs; identificação de estruturas fúngicas em lupa e microscópio de epifluorescência; germinação e crescimento vegetal em câmara de incubação (tipo BOD com fotoperíodo) por 30 dias. Não obstante à ausência de pesquisas similares em solo de restinga, os dados obtidos apontam para o desenvolvimento de técnicas de micorrizoremediação para mitigação de impactos causados por hidrocarbonetos, como também para manutenção de uma excepcional riqueza florística e considerável endemismo num ambiente que vem sendo negligenciado pelas práticas econômicas atuais.

Palavras – chave: Biorremediação. FMAs. Micorriza. Restinga. Hidrocarboneto.

ABSTRACT

This paper presents an investigation on the ecology and rizhoremediator potential of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) in Massambaba Restinga in Arraial do Cabo, RJ. The successful presence of the creeping psammophyte vegetation, important for the fixation of sand dunes and ecological changes of the environment and stressed dystrophic soil of sandbanks, indicates that the endemic species found there are able to realize symbiosis with microorganism that help your establishment and development. As a pioneer plant, standing just after the tide line, the “halófitas-psamófilas”, including the *Remirea maritima*, a feature in their rhizosphere microbial symbiont of vital importance to their survival in this inhospitable environment. The search for possible solutions to mitigate impacts of petroleum hydrocarbons in coastal ecosystems, which have occurred due to accidents and leaks in the transport of oil and water production by underground pipes that traverse these environments, guided efforts to this study. Presented here two papers: (i) an extensive review of publications on characterization and classification of mycorrhizae, and current studies on the potential endomycorrhizae in bioremediation of soils polluted by hydrocarbons and heavy metals; (ii) identification of spores and other fungal structures in the soil of the study area and roots of *R. maritima*; conducting bioassay that sought to evaluate the potential rizorremediador indigenous AMF in the presence of toluene and inoculation with mycorrhizal seedlings, using for this, *Brachiaria decumbens* seeds, plant-test widely reported as symbiotic mycorrhizal fungi and used in experiments bioremediation. Methodology was used for extraction and separation of spores by wet sieving; staining of roots and root colonization assessment, identification of fungal structures in magnifying glass and microscope epifluorescence; germination and plant growth chamber incubation (BOD photoperiod) for 30 days. Due to the absence of similar searches in the soil of sandbanks, the data showed the development of techniques micorrioremediation to mitigate impacts caused by pollutants, but also in maintaining an exceptional richness and considerable endemism in an environment that has been neglected for practical current economic.

Key - words: Sand dunes; hydrocarbon; bioremediation; AMF; mycorrhizae.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

FIGURA 1

Esquema ilustrativo da infecção de raiz absorvente por micorriza arbuscular onde se destaca a ampliação da área de absorção do P pelas hifas extrarradiculares. Fonte: Esquema gentilmente cedido por Berbara e colaboradores (2006).....08

FIGURA 2

Diagrama de classificação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Inclui sinónimas. Fontes: Modificado de Schüßler e Walker (2010); Oehl *et al* (2011)..... 13

FIGURA 3

Imagens de colonização dimórfica de FMAs. A- Colonização micorrízica tipo *Arum* onde as hifas se desenvolvem intercelularmente com aspecto linear; B- Colonização micorrízica tipo *Paris*, onde as hifas grossas se enovelam intracelularmente formando “coils”. Fonte: Imagens autorizada por Berbara e colaboradores (2006)..... 14

FIGURA 4

Ciclo de vida dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) - adaptado de RIVAS (2006). Fotografias: Bruna Pozzebon, 2012..... 15

FIGURA 5

Isoietas de precipitação na porção leste do estado do Rio de Janeiro onde está situado o Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio (ARAÚJO *et al.*, 2009). A Restinga de Massambaba (retângulo em destaque) está inserida numa área onde a taxa de precipitação anual é de aproximadamente 800 mm ou menos por ano (BOHER *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2009). Fonte: Serviço Geológico do Brasil – (CPRM, 2012) - Adaptado.....27

FIGURA 6

Mapa apresentando a distribuição fitogeográfica de *Remirea marítima* elaborado pela *Discover Life* (PICKERING,2012). 28

Artigo 2

FIGURA 1

Localização da Área de estudo na Restinga de Massambaba- RJ. Fontes: CPRM-Serviço Geológico do Brasil (2012) e Google earth - adaptadas. Latitude: 22° 56' S; Longitude: 42° 11' O..... 49

FIGURA 2

Duna fixa na formação psamófila-reptante da Restinga de Massambaba no bairro Figueira em Arraial do Cabo- RJ – local de coleta das amostras (Foto do autor)50

FIGURA 3

A: Comparação entre umidade relativa do ar (%), temperatura máxima (°C), e temperatura mínima (°C); B – Comparação entre precipitação mensal (mm) e umidade relativa do ar (%); médias

observadas na estação convencional A606, localizada no município de Arraial do Cabo- RJ, entre os dias 01 de setembro de 2011 a 27 de julho de 2012, período no qual ocorreram as cinco coletas de solo e plantas na área de estudo. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), 2012. (*) Época de amostragem.51

FIGURA 4

Diagrama de metodologia de amostragem de solo na formação vegetal-psamófila reptante da Restinga de Massambaba, em Arraial do Cabo, RJ. Note-se que em cada sítio foi formada uma triplicata de amostras compostas, totalizando 5 repetições de amostragem do solo.....53

FIGURA 5

Espécies vegetais endêmicas de restinga consorciadas presentes na Restinga de Massambaba (ARAÚJO,2009) na região mais próxima à praia (formação vegetal psamófila-reptante): 1- *Remirea marítima*; 2- *Ipomoea pes-caprae*, 3- *Panicum racemosum*; 4- *Blutaparon portulacoides* (fotos do autor)..... 54

FIGURA 6

Agregação de solo em rizosfera de *Remirea marítima* presente na área de estudo (fotos do autor).....55

FIGURA 7

Exemplares de *Remirea marítima* coletada na área de estudo. Inflorescência do vegetal e raízes micorrizadas de onde foram extraídos fragmentos para preparação do inóculo para o bioensaio.....56

FIGURA 8

Delineamento e execução do experimento de avaliação da germinação e crescimento de *B.decumbens* na presença de tolueno e FMAs autóctones em solo da Restinga de Massambaba – RJ. (i-p) - Observou-se um baixo crescimento no 24º dia de cultivo antes do estresse hídrico (setas). (l-n) - Exposição de duplicatas de cada tratamento escolhidos que apresentavam melhor desenvolvimento das plântulas no 24º dia de cultivo..... 62

FIGURA 9

Tubo para centrífuga (seta) com 30 ml de água para minimização da evaporação promovida pela ventilação forçada no interior da B.O.D.....63

FIGURA 10

Glomerosporos extraídos do solo da formação vegetal psamófila-reptante na restinga de Massambaba, A. do Cabo - RJ em coletas realizadas entre outubro de 2011 a maio de 2012. Fotos: Bruna Pozzebon.....65

FIGURA 11

(A-J) Estruturas fúngicas radiculares em raízes de *Remirea marítima* Aublet coletadas na restinga de Massambaba- Arraial do Cabo – RJ. APR- Apressórios de hifas cenocíticas na raiz (A). MIC- Micélio de FMAs (B). Seta branca - Esporocarpo em meio ao micélio aderido à raiz (B). HFM – Hifas cenocíticas de FMAs extrarradiculares (C,D). HFM-IR – Hifas de FMAs intrarradiculares (E,H,I). VES- Vesículas intercelulares (E,F,G,H). DSE – Hifa septada extrarradicular de *Dark Septate Endophytes* (D). DSE-MI – Microescleródio de DSE intrarradicular (J). ES – Esporo em rizosfera de *Remirea*. Barras indicam 20 mm. EC –Esporocarpo (M).....66

FIGURA 12

Teste de germinação de sementes de *B. decumbens* submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio 1% (SI2, SI3 e CI4) e embebição por 24 horas (SI2 e CI4) semeadas em Neossolo Quartzarênico distrófico. A- Massa seca B - altura foliar; C - Comprimento da raiz principal; D -

Percentual médio de germinação de sementes; ns= diferenças estatísticas “não significantes”; letras iguais no topo das barras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 68

FIGURA 13

Percentuais de germinação de sementes de *B. decumbens* em 30 dias de cultivo na presença de FMAs e tolueno.....71

FIGURA 14

(A) Percentual médio de sobrevivência de *B. decumbens* após 25 dias de cultivo na presença de FMAs e na presença de tolueno antes do estresse hídrico de 5 dias (B) Percentual médio de sobrevivência de *B. decumbens* após 30 dias de cultivo na presença de FMAs e tolueno após estresse hídrico de 5 dias. Letras iguais no topo das barras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....72

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1

Quantificação de glomerosporos na formação vegetal psamófila-reptante na Restinga de Massambaba, Arraial do Cabo- RJ.64

Tabela 2

Características de *B.decumbens* sobreviventes na presença de propágulos de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs), presença ou ausência de duas concentrações de hidrocarbonetos do petróleo (tolueno)¹ por 30 dias após estresse hídrico..... 70

Quadro 1

Tratamentos das sementes de *B. decumbens* para quebra de dormência em teste de germinação.....58

Quadro 2

Grupos experimentais do bioensaio de germinação e crescimento de *B. decumbens* (V) inoculadas ou não com FMAs (E ou M) na ausência ou presença de duas doses de tolueno (H₁ e H₂); n=5.60

SUMÁRIO

iv	AGRADECIMENTOS	
viii	RESUMO	
ix	ABSTRACT	
x	LISTA DE FIGURAS	
xiii	LISTA DE TABELAS E QUADROS	
1	INTRODUÇÃO	1
2	ARTIGO 1	3
	FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs): ECOLOGIA E POTENCIAL PARA MICORRIZORREMEDIAÇÃO EM SOLO DE RESTINGA.	
2.1	Resumo	3
2.2	Abstract	4
2.3	Introdução	5
2.4	Fungos Micorrízicos	6
2.4.1	Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs)	7
2.4.2	“ <i>Dark Septate Endophytes</i> ” –DSE (Fungos endófitos)	10
2.4.3	Diversidade de FMAs e de estruturas fúngicas	11
2.4.4	Ciclo de vida e forma de infecção dos FMAs	15
2.5	Biorremediação: conceitos e tipos	16
2.5.1	Fitorremediação de solos poluídos	17
2.5.2	Micorrizorremediação	22
2.6	As restingas e a formação psamófila-reptante	24
2.6.1	Fitorremediação de solos poluídos	28
2.6.2	Nutrientes em solo de restinga e eficiência micorrízica sob estresse abiótico	29
2.7	Conclusão	32
2.8	Referências Bibliográficas	33
3	ARTIGO 2	40
	POTENCIAL DE FMAS AUTÓCTONES DE PSAMÓFILAS-REPTANTES PARA RIZORREMEDIAÇÃO DE SOLO DE RESTINGA CONTAMINADO COM HIDROCARBONETO DO PETRÓLEO.	
3.1	Resumo	40

3.2 Abstract.....	42
3.3 Introdução.....	44
3.4 FMAs e a rizorremediação de solos poluídos.....	46
4 Materiais e Métodos.	
4.1 Local de coleta de amostras.....	49
4.2. Metodologia de amostragem do solo e plantas para estudo.....	52
4.3 Bioensaio de crescimento de <i>Brachiaria decumbens</i> na presença de tolueno.....	58
5 Resultados e Discussão – Parte I	
5.1 Seleção, quantificação e identificação de FMAs da Restinga de Massambaba.....	64
5.2 Identificação e quantificação de estruturas micorrízicas em raízes de <i>R. marítima</i> .	66
5.3 - Resultados e Discussão – Parte II.....	67
5.3.1 Avaliação da quebra de dormência do crescimento de sementes <i>B. decumbens</i> em Neossolo Quartzarênico.....	67
5.3.2 Avaliação da tolerância de <i>B. decumbens</i> em Neossolo Quartzarênico inoculados com FMAs e contaminado com tolueno.....	69
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
6.1 Contribuições e Perspectivas.....	74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda de energia pela sociedade moderna vem refletindo o descuido e a negligência com que essa mesma sociedade utiliza os recursos naturais. Longe de serem ilimitados, na disponibilidade e na geração de impactos ambientais e à saúde dos seres vivos, tais recursos utilizados geram resíduos que trazem preocupações cada vez maiores com os problemas relacionados a locais contaminados por esses descartes (VIDALI, 2001). Em processos industriais, o uso dos derivados de petróleo assume proporções que refletem a busca desenfreada pelo consumo na sociedade atual. A utilização e manipulação desses derivados geram resíduos e efluentes altamente contaminantes e poluidores para diversos sistemas, e sua reutilização, transporte e eliminação ou disposição em locais adequados acarretam investimentos elevados, o que tem contribuído para gerar procedimentos inadequados de descarte que culminam em danos, às vezes irreversíveis, ao meio ambiente, “tanto ao solo como aos recursos hídricos subjacentes” (MOREIRA e DOURADO, 2005).

Com o intuito de eliminar resíduos industriais descartados, tecnologias diversas de remediação da contaminação do solo foram pesquisadas e utilizadas, tais como a lavagem de solo, solidificação/estabilização, a biorremediação e a incineração em fornos de alta temperatura. A incineração é uma opção de remediação de solo em crescimento no Brasil buscando substituir a tecnologia hegemônica no país: os aterros, para onde cerca de 80% dos resíduos industriais são destinados devido aos altos custos das demais tecnologias (FURTADO, 2010). Já em uso há algum tempo, técnicas tradicionais de biorremediação de solos, como o “landfarming”, por não obterem resultados satisfatórios na eliminação completa dos resíduos tóxicos (CASTRO *et al*, 2005; PAULA, SOARES e SIQUEIRA, 2006), também tendem a ser superadas por tecnologias que propõe destruir tais resíduos definitivamente. Métodos tradicionais de eliminação de poluentes, como a incineração, podem ser muito eficazes na redução dos níveis de uma série de contaminantes, possuindo, no entanto, várias desvantagens, principalmente pela sua complexidade tecnológica, o custo para aplicação em escala pequena, e a falta de aceitação pública (VIDALLI, 2001). O aumento da exposição aos resíduos contaminantes, tanto por trabalhadores como por residentes próximos ao local de incineração, aumentam a rejeição popular a métodos de remediação como esse (VIDALLI, 2001).

A indústria do petróleo e gás natural gera poluentes desde as etapas de exploração até a distribuição dos produtos comercializáveis (SILVA, 2009). Hidrocarbonetos leves compostos de fase líquida não aquosas (*light non-aqueous phase liquids* -LNAPLs) - estes

representados usualmente por benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) e outros hidrocarbonetos derivados do petróleo mais leves que a água – compõem grande parte dos contaminantes de solo e água subterrâneas, principalmente em países industrializados e em desenvolvimento – provenientes de vazamentos de solventes e combustíveis orgânicos (SOUZA; PERES; MOARES, 2010).

Estudos com micro-organismos degradadores, entre eles os fungos, refletem o interesse de pesquisadores para melhoramento de solos agricultáveis e biorremediação desde meados do século XX (JACQUES *et al.*, 2007). Já em 1990, em conferência internacional sobre micorrizas realizada na Índia, entre diversos trabalhos sobre o assunto, foram apresentadas técnicas de isolamento de esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) em solos de regiões áridas e semiáridas (GOKULDAS; BAGYARAJ; PRASAD, 1990), que afirmaram também que o “estresse de FMAs”, causado por diversos fatores ambientais, entre eles a pouca disponibilidade de água no solo das regiões estudadas, aumentou o número de esporos e propágulos desses fungos. Este fato foi confirmado por estudos recentes que descreveram os mecanismos de adaptação das estruturas arbusculares dos fungos micorrízicos em solo distrófico e adverso (SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002).

O ambiente de restinga, caracterizado por “solos arenosos, pobres em argilas e matéria orgânica, além de baixa capacidade de reter água e nutriente” (BRAGA, 2008), torna-se propício ao desenvolvimento de micro-organismos identificados na literatura científica como rizorremediadores. As atividades simbióticas de micorrizas e plantas adaptadas a condições extremas de água e nutrientes, como as que ocorrem em dunas de restinga, foram estudadas por Cordazzo e Stürmer (2007), Koske (1988), Silva (2010) e Alarcón e Cuenca (2010). Quanto às atividades rizorremediadoras por FMAs em solos poluídos, Bento (2008), Khan (2006), Paula, Soares e Siqueira (2006), Nakatani *et al.* (2008), Nogueira (2007), Souza *et al.* (2005) apresentaram resultados positivos para degradação de hidrocarbonetos do petróleo em solos contaminados. Pode-se então inferir que as restingas se apresentam como ambientes favoráveis ao estudo da rizorremediação.

Este estudo teve como objetivo: a) Identificar estruturas infectivas de endomicorrizas (FMAs) no solo da formação vegetal psamófila-reptante na restinga de Massambaba, Arraial do Cabo- RJ e estruturas arbusculares em raízes de *Remirea maritima*, vegetal endêmico de restinga abundante na área de estudo; b) identificar a influência do hidrocarboneto do petróleo (tolueno) e da inoculação com propágulos de FMAs na germinação e crescimento de *Brachiaria decumbens*, vegetal-teste bastante utilizado em experimentos de rizorremediação e comprovadamente simbiote com micorrizas arbusculares.

2 ARTIGO 1

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs): ECOLOGIA E POTENCIAL PARA MICORRIZORREMEDIAÇÃO EM SOLO DE RESTINGA.

2.1 Resumo

Realizou-se uma revisão de diversas técnicas de biorremediação de solos contaminados por poluentes orgânicos e inorgânicos provenientes de atividades antrópicas, desenvolvidas ao longo da última década. Impactos em solos causados por hidrocarbonetos de petróleo têm se tornado um problema ambiental global devido ao crescente consumo de derivados do petróleo. As fontes contaminantes relacionadas à exploração, à produção, ao armazenamento, ao transporte, à distribuição e à destinação final de petróleo e seus derivados trazem riscos que ameaçam ambientes litorâneos frágeis, pouco estudados, e que necessitam de atenção da comunidade científica. Pretendeu-se, aqui, destacar a aplicação de biotecnologia utilizando Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) em solos impactados por hidrocarbonetos de petróleo. Os estudos aqui apresentados relatam resultados positivos para o estudo da degradação de diversos poluentes, como os metais pesados e BTEX, por via metabólica de vegetais associados às endomicorrizas. Foram abordados também os critérios taxonômicos das micorrizas arbusculares, os quais passaram por mudanças nos últimos anos, como a inserção dos FMAs no recente filo Glomeromycota e algumas famílias na nova ordem Diversisporales. Entre as principais técnicas de biorremediação, destacam-se a bioaumentação e a bioestimulação – que se distinguem da fitorremediação (que utiliza vegetais que degradam poluentes) – técnicas que potencializam a degradação de contaminantes pela utilização consorciada com micro-organismos, autóctone ou não, no ambiente contaminado. A utilização de FMAs em rizadorremediação de solos é incluída em técnicas de fitoestimulação, neste caso, classificada como micorrizorremediação.

Palavras-chave: FMAs, micorrizas, fitorremediação, fitoestimulação, petróleo.

2.2 Abstract

We conducted a review of various techniques of bioremediation of soils contaminated with organic and inorganic pollutants from anthropogenic activities, developed over the last decade. Impacts on soils caused by petroleum hydrocarbons have become a global environmental problem due to increasing consumption of oil. The sources of contamination related to the exploration, production, storage, transport, distribution and disposal of petroleum and its products carry risks that threaten fragile coastal environments, poorly studied, and in need of attention from the scientific community. It was intended here to highlight the application of biotechnology using Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) in soils impacted by petroleum hydrocarbons. The studies presented here report positive results for the degradation of various pollutants such as heavy metals and BTEX, metabolic pathway associated with vegetable endomycorrhizal. We also discussed the taxonomic criteria of mycorrhizae, which have undergone changes in recent years, as the recent AMF inclusion of the phylum Glomeromycota and some families in the new order Diversisporales. Among the main techniques of bioremediation stands out the bioaugmentation and biostimulation - distinguished of phytoremediation (using plants to degrade pollutants) - that boost the degradation of contaminants by using consortium of microorganisms, indigenous or not, the contaminated environment. The use of AMF in rhizoremediation soil is included in phytostimulation techniques, in this case, classified as micorrhizorremediation.

Keywords: AMF, arbuscular, phytoremediation, phytostimulation, oil.

2.3 Introdução

Impactos ambientais em ecossistemas diversos, causados por resíduos industriais, inclusive em faixas litorâneas onde se situam as restingas, têm se tornado motivo de grande preocupação em muitos países. Também as indústrias do setor de exploração de petróleo passaram a empreender esforços para aprimoramento dos “processos de extração, beneficiamento, refino e distribuição” (PAULA; SOARES; SIQUEIRA, 2006). Tais esforços têm o objetivo de dispor adequadamente os descartes poluentes produzidos em seus processos de produção.

Na busca de soluções para eliminação completa dos resíduos tóxicos de descartes industriais, a biorremediação vem se apresentando como técnica que traz pouco risco à saúde humana e ao ambiente, mostrando ser relativamente barata (mesmo em pequena escala), possibilitando a destruição de vários contaminantes através da “atividade biológica natural”, eliminando-os completamente ou transformando-os em substâncias inócuas (VIDALLI, 2001; CASTRO et al, 2005; PAULA, SOARES & SIQUEIRA, 2006). Unindo a aceitação pública com a possibilidade de, na maioria das vezes, ser realizada *in situ*, a biorremediação torna-se uma opção cada vez mais estudada e ampliada. Técnicas desse tipo, Silva (2009) denomina de “*Green Technologies*”, o que denota a sua credibilidade num contexto do que seja “ecologicamente correto”. Nesse cenário é que os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) se apresentam como objeto de pesquisa na área de biorremediação de solos.

Verifica-se o potencial de biorremediação de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) associados a raízes de plantas adaptadas a solos distróficos e adversos na literatura consultada. Porém, quando se trata de ambiente de restinga, a abordagem se restringe apenas à identificação da associação de FMAs e sua importância para o desenvolvimento às espécies vegetais desses ecossistemas (KOSKE, 1988; ALARCÓN e CUENCA, 2005; CORDAZZO, C. V.; STÜRMER, 2007; BRAGA, 2008; RODRIGUES, 2008; OLIVEIRA, 2009; SILVA, 2010). Assim, fazem-se necessários estudos que avaliem o potencial de micorrizorremediação por FMAs em solo de restinga.

Relacionar a ação metabólica dos FMAs à degradação de substâncias químicas poluidoras tem sido objetivo de importantes pesquisas recentes. Esses micro-organismos são considerados recursos microbiológicos para remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo, entre outras aplicações (CABELLO 2006; PAULA, SOARES e

SIQUEIRA,2006). O conhecimento diverso sobre o uso dessa tecnologia exige integração multidisciplinar para que o estudo de seu potencial biorremediador seja ampliado.

2.4 Fungos Micorrízicos

A associação simbiótica entre alguns tipos de fungos do solo e raízes da maioria de vegetais superiores é chamada de micorriza (BRUNDRETT, 1991). Segundo Souza (2006), o termo foi proposto pela primeira vez em 1885 pelo botânico alemão Albert Bernard Frank. Seu significado provém do grego “*mico*” (fungo) e “*riza*” (raízes). Mesmo conhecida 50 anos antes do botânico Frank, esta associação era considerada como parasítica pelos estudiosos da época em que ele especulou sobre a possível influência fúngica na nutrição e crescimento das plantas, afirmando que as raízes não eram injuriadas ou atacadas pelo fungos, e estes eram incapazes de causarem qualquer disfunção nos vegetais associados.

Em estudos de biorremediação, destacam-se as pesquisas com micorrizas arbusculares (MAs) por serem encontradas em inúmeros ambientes e espécies vegetais. Souza (2005) menciona que os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) possuem três formas de infecção das raízes: esporos, fragmentos de raízes micorrizadas e fragmentos de micélio (hifas extrarradicais), denominados de propágulos, propágulos infectivos ou propágulos fúngicos (SOUZA *et al*, 2003; SILVA; SIQUEIRA; SOARES, 2006; BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006; BARTZ *et al*, 2008). Algumas espécies de FMAs utilizam todas as formas de propágulo (p.e. espécies das famílias Glomeraceae e Acaulosporaceae), porém Gigasporaceae tem nos esporos sua melhor fonte de inoculação, sendo esta a melhor forma de sobrevivência da espécie. Logo, nem todas as espécies de FMAs inoculam raízes da mesma forma, além de que o sucesso da simbiose depende de fatores, tais como, espécies envolvidas, tipos de substratos e número de propágulos (SOUZA, 2005; BARTZ *et al*, 2008).

Segundo Berbara e colaboradores (2006), são quatro as principais estruturas de promoção da simbiose micorrízica dos FMAs (arbúsculos, vesícula, hifas intrarradiculares e hifas extrarradiculares), e delas, as mais estudadas são as hifas fúngicas intrarradiculares, devido à maior facilidade de observação e análise, e aos mecanismos de transferência de nutrientes para a planta micorrizada. No entanto, são as hifas extrarradiculares que estimulam o aumento da produtividade do solo, agindo em harmonia com todas as funções químicas e biológicas ali presentes, e, por isso, estão diretamente relacionadas com a qualidade do solo (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006).

Acerca do desenvolvimento do estudo e das aplicações das micorrizas arbusculares em diversos setores do desenvolvimento econômico, Souza e colaboradores (2006) declararam:

Esses estudos foram confirmados pelas técnicas da ciência moderna e se constituiu nas bases da micorrizalogia, que se espalhou pelo mundo inteiro e representa, hoje, um importante ramo interdisciplinar das Ciências Biológicas, com enormes possibilidades para a exploração comercial, visando aumentar a produção de madeira, fibras e alimentos e, ainda, reduzir os custos financeiros e o impacto dos sistemas modernos de produção sobre o meio ambiente (p.613).

2.4.1 Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs)

As micorrizas formadas pelos Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs), são o tipo de simbiose radicular mais comum, encontradas em cerca 80% das plantas vasculares (SMITH e READ, 1997). Os FMAs são encontrados numa grande variação de plantas em ecossistemas diversos no Brasil, e até 35 espécies deles podem ser encontradas em dunas costeiras (SIQUEIRA; LAMBAIS e STÜRMER, 2002).

O ciclo de vida dos FMAs, por serem obrigatoriamente simbiotróficos, é completado somente mediante associação a uma raiz hospedeira, e esta lhe fornece nutrientes (principalmente hidrocarbonetos) necessários ao seu desenvolvimento e reprodução (SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002; BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006). Brundrett e colaboradores (1996) esclareceram que três componentes principais estão envolvidos na associação de micorrizas arbusculares com plantas simbiontes: as características do solo, o tipo de fungo e a planta com características ideais para a simbiose. Estabelecida tais condições desenvolve-se a infecção por hifas originadas nos esporos dos FMAs que são atraídos por exsudados da raiz da planta, estabelecendo-se aí a micorriza (vesículas, arbúsculos e hifas internas e externas). A simbiose promove a absorção de nutrientes, principalmente o fósforo, além da zona dos pelos radiculares onde ocorre depleção de Pinorgânico (Pi), conforme Berbara e colaboradores (2006) esquematizaram (figura 1).

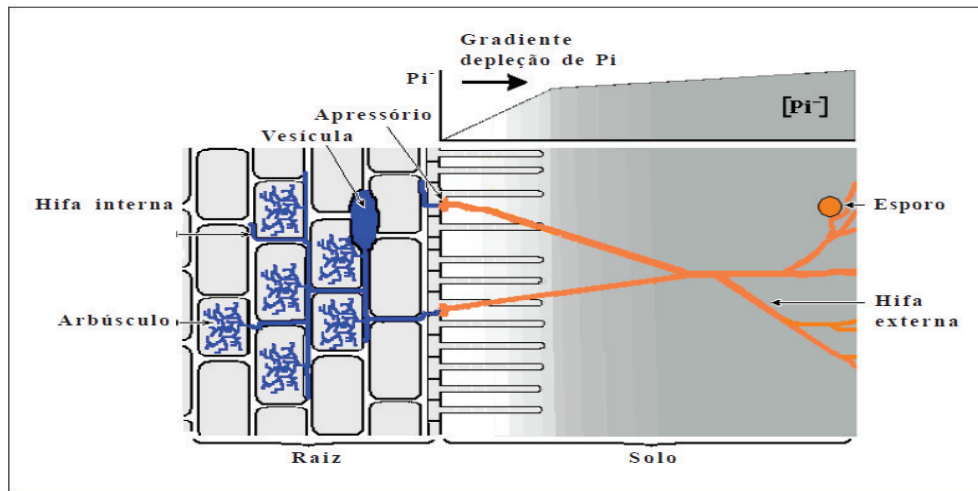


Figura 1- Esquema ilustrativo da infecção de raiz absorvente por micorriza arbuscular onde se destaca a ampliação da área de absorção do P pelas hifas extra-radiculares. Fonte: Esquema gentilmente cedido por Berbara e colaboradores (2006).

Segundo Berbara e colaboradores (2006), que detalharam os processos metabólicos envolvendo a transferência de nitrogênio e fósforo para as raízes pelos fungos micorrízicos e do carbono do vegetal para os fungos, a simbiose se estabelece pelo benefício mútuo (planta-fungo) que ocorre devido à presença das hifas inter e extrarradiculares. Estas se diferenciam em uma estrutura presente nas células do córtex radicular similar a um haustório, excessivamente ramificado, os arbuscúlos, onde ocorre a troca bidirecional de nutrientes entre os simbiossitos. É nessa estrutura que a planta fornece ao fungo compostos orgânicos fixados via fotossíntese, e recebe do fungo elementos minerais extraídos do solo (principalmente fósforo e nitrogênio). A maior eficiência das hifas extrarradiculares em absorver nutrientes do solo se deve a serem estruturas extremamente longas e finas, indo além da zona de depleção de nutriente em torno das raízes e aumentando a superfície de contato com o solo.

Descrevendo a sinalização molecular e a transdução de sinais na formação de MAs, Kiriachek *et al.* (2009) observa que nas interações planta-micro-organismo a percepção mútua ocorre antes do contato físico propriamente entre eles, envolvendo não apenas moléculas do exsudado de origem vegetal, mas também sinais moleculares de origem fúngica. Embora os mecanismos de comunicação fungo-planta sejam pouco estudados devido à dificuldade de cultivo de FMAs na ausência de plantas hospedeiras, sabe-se que o início da germinação dos esporos no solo não necessita de um sinal vegetal, já que os esporos podem germinar em água. Compostos voláteis (p.e. CO_2) exsudados pelas raízes podem estimular a germinação desses esporos, o que denota uma sensibilidade dos FMAs aos compostos presentes na rizosfera vegetal. A busca de isolar o “fator de ramificação das hifas” (“*Branching Factor*”,

BF), num esforço de identificação dos mecanismos envolvidos na germinação e infecção pelos FMAs, constatou a presença de uma proteína codificada pelo gene MtENOD11¹. Quanto aos compostos ativos no processo de comunicação entre os simbioses, observou-se que plantas nutricionalmente deficientes em P apresentaram concentração maior desses compostos do que aquelas bem nutridas com P (KIRIACHEK *et al*, 2009).

A inibição da colonização de raízes mediante a alta concentração de Pi (fósforo inorgânico) no solo, o papel regulador de fitohormônios (auxinas e citocininas) encontrados em maior concentração nas rizosferas de plantas colonizadas e o fato da formação de apressórios de FMAs ocorrerem somente na presença de tecidos da raiz, não sendo observado em superfícies sintéticas, denotando um reconhecimento específico por células de raízes de plantas simbioses, indicam o envolvimento de importantes mecanismos sinalizadores e estimulantes de MAs que necessitam ser melhores esclarecidos (NUNES *et al*, 2008; KIRIACHEK *et al*, 2009; RAMOS *et al*, 2011).

Siqueira e colaboradores (2002) abordaram a formação de arbúsculos, destacando que eles promovem a “integração morfofisiológica, bioquímica e funcional” e o estabelecimento do processo mutualista, o que resulta no “micotrofismo”, que é a absorção de nutrientes pela planta através do fungo.

Quanto à reprodução dos FMAs, Berbara e colaboradores (2006) salientaram que não existem evidências comprovadas que indiquem que esse fungos se reproduzam sexualmente. Sugerem, então, maiores estudos para elucidação dos mecanismos de evolução dos mesmos, assim como sua forma de manter a diversidade genética. A multiplicação de FMAs de forma puramente assexuada estaria descartada por ser esta um obstáculo à evolução da espécie, e à consequente adaptação ao longo do tempo, devido ao acúmulo de mutações deletérias decorrentes da falta de variabilidade genética (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006).

Há dois tipos de crescimento no ciclo de vida dos FMAs: o crescimento assimbiótico, que é a germinação de propágulos no solo (esporos, hifas e micélio) na ausência de raízes e, na presença destas, realizam o crescimento simbiótico, que é a colonização do córtex radicular garantindo a produção de novos propágulos (DURAZZINI, 2009).

¹ MtENOD11 é um gene que codifica uma proteína rica em hidroxiprolina, componente da matriz extracelular, cuja expressão é induzida durante o desenvolvimento de MAs. Mesmo que essa molécula não tenha sido ainda identificada, nem a sua essencialidade para o estabelecimento das MAs demonstrada, tal indução de expressão gênica é evidência direta da troca de sinais entre plantas e FMAs. (KIRIACHEK *et al*, 2009).

Tem-se em conta que a rizosfera de uma planta micorrizada torna-a possuidora de maior tolerância a ambientes distróficos devido a uma nutrição mineral mais equilibrada promovida pelos FMAs (CABELLO, 2006; KHAN, 2006). Por isso, há o interesse científico em identificar e quantificar seu potencial de biodegradação de poluentes orgânicos como os hidrocarbonetos do petróleo.

Cabello (2006) afirmou que, teoricamente, os FMAs compensariam a redução do crescimento de raízes de plantas simbiontes em solos poluídos, já que, tal crescimento, torna-se reduzido em plantas não micorrizadas devido à toxicidade dos poluentes. Relatou, ainda, a presença no solo de diversas fontes de propágulos de algumas espécies de fungos bem adaptadas a ambientes adversos, como esporos, hifas e fragmento de raízes com estruturas arbusculares, possibilitando maior potencial biótico para iniciação de novas colônias.

Entre as ações desenvolvidas pelas micorrizas arbusculares destaca-se a ação “biocontroladora” que ameniza o estresse causado por fatores diversos como metais pesados e poluentes orgânicos (SIQUEIRA; LAMBAIS e STÜRMER, 2002). É esta característica que pode tornar os FMAs eficazes como coadjuvante na mitigação de impactos causados por possíveis derramamentos de petróleo e seus derivados em solos de restinga.

2.4.2 “*Dark Septate Endophytes*” –DSE

As hifas hialinas dos FMAs são cenocíticas, ou seja, não são septadas (quando septada indica envelhecimento do micélio) (BERBARA, SOUZA e FONSECA, 2006; SOUZA, 2005). No entanto, a investigação de raízes em busca de infecção de MAs pode apresentar hifas septadas em meio ao micélio cenocítico dos FMAs, e que podem não ser hifas envelhecidas destes fungos. Estudos em vegetação de ambientes semiáridos têm relatado a presença de outro tipo de endomicorriza, cujas hifas são septadas e de coloração mais escuras. Os especialistas têm denominado estes fungos de “*Dark Septate Endophytes*” (DSE) ou fungos endofíticos septados escuros (DSEF) (PEREIRA, 2011) e os incluem no grupo dos Deuteromicetos (conidiais ou fungos imperfeitos) (JUMPPONEN e TRAPPE, 1998). Embora seu papel ecológico ainda seja pouco conhecido, estudos prévios têm relatado uma “colonização” de DSE e FMAs em raízes de plantas hospedeiras (JUMPPONEN e TRAPPE, 1998; GARCIA, MENDOZA e POMAR, 2012), porém os DSE também têm sido relatados em espécies de plantas não-micorrízicas (REININGER; GRÜNIG e SIEBER, 2012). Embora os FMAs sejam cosmopolitas, os DSEs são particularmente encontrados em ambientes estressados (GARCIA, MENDOZA e POMAR, 2012; KNAPP; PINTYE e KOVÁCS, 2012).

Reininger e colaboradores (2012) destacaram que espécies de DSE não podem ser diferenciadas com base na morfologia, mas por meio de marcadores moleculares genéticos da população.

Knapp e colaboradores (2012), investigando a colonização de plantas nativas e invasoras em áreas arenosas semiáridas nas estepes húngaras, concluíram que 14 grupos de DSE ali encontrados e identificados dominam 60% da colonização, e que são similares aos anteriormente relatados em pastagens áridas da América do Norte, confirmando a hipótese de que tais grupos fúngicos compartilham ambientes semiáridos em uma escala global.

Santos *et al.* (2010) ao considerar como “associação positiva” a simbiose entre DSE e vegetais, mencionaram que a metodologia para preparação de raízes para observação de FMAs também permite a observação de infecções por DSE, sugerindo ser apropriada a avaliação de ambas as infecções (DSE e FMAs). Entretanto, diferentemente dos FMAs, por não serem biotrófico obrigatório os DSEs apresentam facilidade de crescimento em laboratório devido ao seu desenvolvimento em meio de cultura independentemente da presença de raízes (PEREIRA, 2011).

2.4.3 Diversidade de FMAs e de estruturas fúngicas.

Muitos pesquisadores realizaram pesquisas taxonômicas para classificação de FMAs. Gerdemann e Trappe, em 1974, foram os primeiros a proporem uma classificação em separado para os fungos formadores de micorrizas arbusculares (BERBARA; SOUZA e FONSECA, 2006). A discussão em torno de critérios metodológicos e parâmetros de classificação e nomenclatura ainda ocupam parte da literatura consultada.

Os primeiros estudos incluíam os FMAs no filo Zygomycota baseados apenas na morfologia dos mesmos. Porém estudos posteriores por análise filogenética das sequências de DNA da subunidade menor do gene ribossomal (SSUrDNA) (SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, 2001, 2010) afastavam os FMAs daquele grupo e sugeriram a formação de um grupo monofilético (grupo de espécies derivadas de um ancestral comum). Desta forma foi criado o filo **Glomeromycota** no qual estão incluídos todos os FMAs (SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, 2001).

Goto e Maia (2006) alertaram para as inúmeras terminologias que cada pesquisador aplica à identificação dos esporos de FMAs segundo critérios próprios. Apontaram que as estruturas propagativas têm sido descritas com nomes diferentes. Esse estudo aponta que cada um dos filios de fungos tem um nome apropriado para seus esporos: **ascósporos** de

Ascomycota, **basidiósporos** de Basidiomycota, **zygósporos** de Zygomycota. É com tais fundamentos que propõe um novo nome para os esporos do Filo Glomeromycota: **glomerósporos** (GOTO; MAIA, 2006).

Berbara e colaboradores (2006) apresentaram três gêneros como abrangentes da maioria das espécies de FMAs: *Glomus*, *Acaulospora* e *Scutellospora*, respectivamente com 104, 33 e 32 espécies das 197 descritas. Esses autores fazem uma ampla revisão taxonômica sobre o desenvolvimento da classificação dos FMAs e suas diversas mudanças, ampliando a divisão dos FMAs.

A classificação geral apresentada por Silva (2008) foi detalhada anteriormente por Berbara e colaboradores (2006) os quais apontaram a recente criação da ordem Diversisporales para incluir quatro famílias: Diversisporaceae (gênero *Diversispora*, com 3 espécies descritas); a Gigasporaceae (gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora*, onde são descritas 7 e 32 espécies respectivamente); a Pacisporaceae (gênero *Pacispora*, com 7 espécies descritas) e a Acaulosporaceae (gêneros *Acaulospora* e *Entrophospora* com 33 e 5 espécies descritas respectivamente). Além dessas, ali são descritas as demais ordens anteriormente aceitas e suas respectivas famílias e gêneros correspondentes: Glomerales, família Glomeraceae (gênero *Glomus* com 104 espécies); Archaeosporales, famílias Archaeosporaceae (gênero *Archaeospora*, com 3 espécies) e Geosiphonaceae (gênero *Geosiphon*, com 1 espécie) e, finalmente, a ordem Paraglomerales, família Paraglomeraceae (gênero *Paraglomus*, com 2 espécies). Esta relação totaliza 4 ordens, 8 famílias, 10 gêneros e 197 espécies descritas e classificadas, além de análise filogenética de sequência SSU rDNA, com base em resultados “morfológicos, citológicos e moleculares” (WALKER *et al.*, 2004 *apud* BERBARA *et al.*, 2006). Deve-se, no entanto, atentar com cuidado para a “análise filogenética baseada em um só gene [observando-se que] a evolução de genes nem sempre segue o processo de especiação” (BERBARA, SOUZA e FONSECA, 2006). No caso de FMAs, é possível e desejada a análise de outros genes conforme apresentado nos estudos específicos. Com base em estudos recentes pode-se elaborar o diagrama apresentado na figura 2.

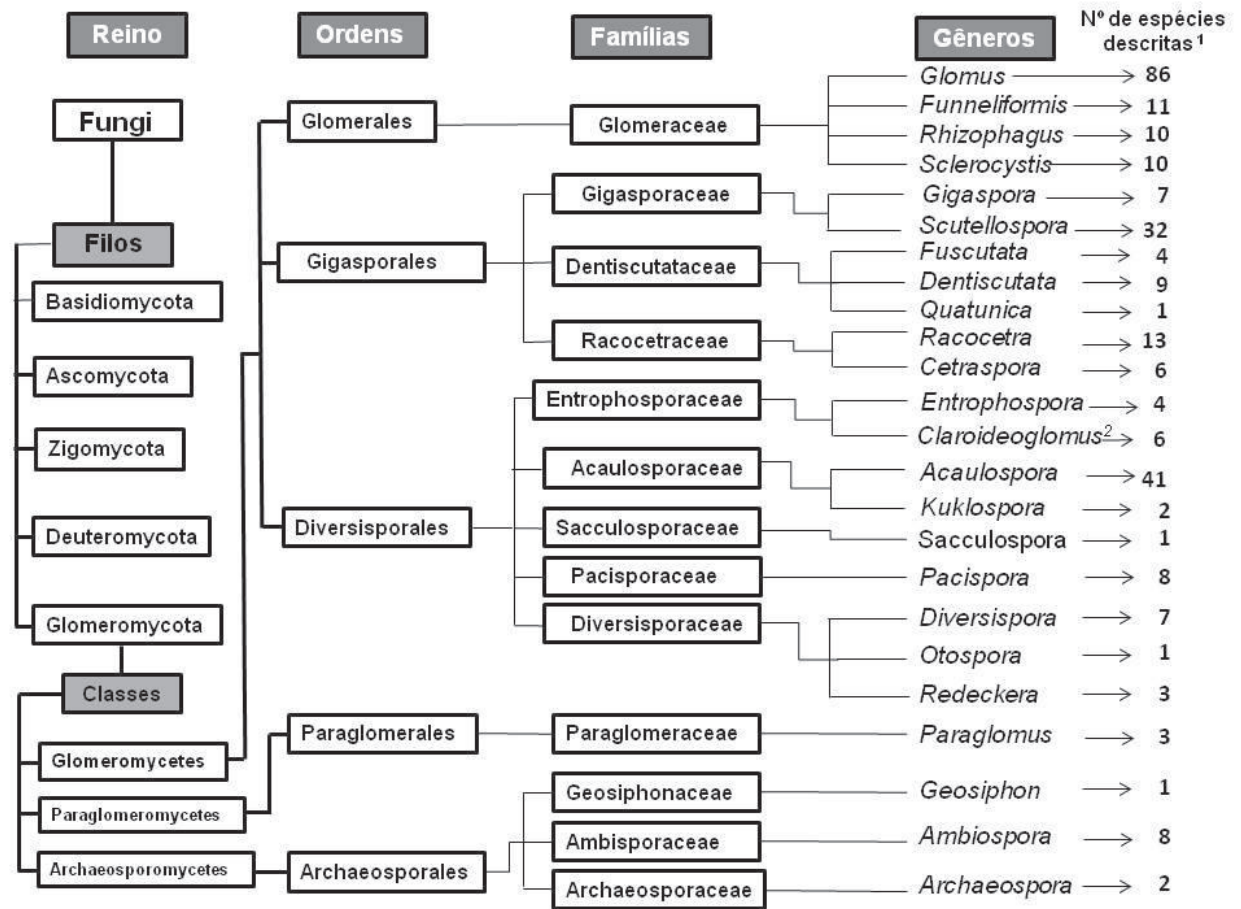


Figura 2 - Diagrama de classificação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). ⁽¹⁾Inclui sinônimos². Fontes: Modificado de Schüßler e Walker (2010); Oehl *et al* (2011).

Estudo recente de revisão das novas descobertas taxonômicas, baseado em estudos que realizaram análises moleculares sistematizando os diversos grupos de FMAs filogeneticamente, ampliou o número de classes (3), ordens (5), famílias (13), gêneros (31) e espécies (282) do filo Glomeromycota (SCHÜßLER; WALKER, 2010; OEHL *et al.*, 2011), denotando os constantes esforços que a comunidade científica mundial realiza para se chegar a um consenso na classificação dos FMAs.

Diferentes tipos de colonização radicular podem ser encontrados nas micorrizas arbusculares, os quais têm funções similares. As colonizações se distinguem morfológicamente em dois tipos: a Paris e a Arum (figura 3). Estes termos advêm do fato de o primeiro tipo ter sido reconhecido há cerca de 100 anos na espécie vegetal *Paris quadrifolia*,

² Oehl *et al* (2011) descrevem ainda 6 gêneros, cada um contendo 1 espécie descrita, além dos relacionados no diagrama acima : Glomeraceae: *Simiglomus*, *Septoglomus* e *Albahypha*; Archaeosporaceae: *Intraspora*; Entrophosporaceae: *Viscospora*; Diversisporaceae: *Tricispora*. 2- Schüßler e Walker (2010) descrevem o gênero *Claroideoglomus* na família Claroideoglomeraceae e ordem Glomales; no diagrama acima, este gênero segue a classificação sugerida por Oehl (2011) que o insere na família Entrophosporaceae, ordem Diversisporales.

e o segundo em *Arum maculatum* (Dickson, 2004). Na colonização do tipo *Arum*, as hifas crescem intercelularmente, de maneira linear e longitudinal ao longo do espaço cortical, formando estruturas finas e muito ramificadas nas células – os arbúsculos. No tipo *Paris*, hifas grossas enovelam-se intracelularmente, desenvolvendo hifas enroladas ou “coils” (BERBARA, SOUZA e FONSECA, 2006). O mesmo fungo pode formar os diferentes tipos de colonização dependendo da anatomia das raízes de diferentes plantas hospedeiras (BRUNDRETT, 1996).

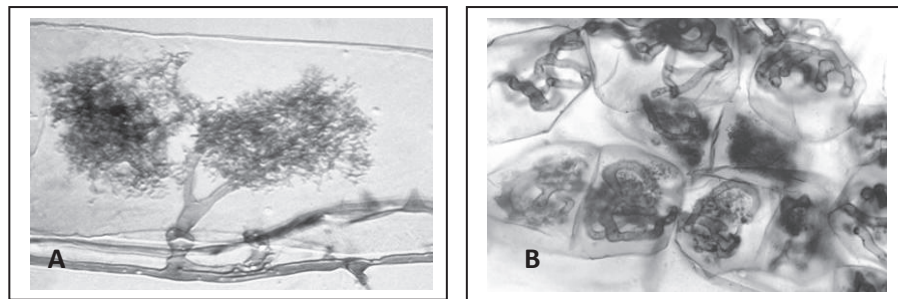


Figura 3. Imagens de colonização dimórfica de FMAs. A- Colonização micorrízica tipo *Arum* onde as hifas se desenvolvem intercelularmente com aspecto linear; B- Colonização micorrízica tipo *Paris*, onde as hifas grossas se enovelam intracelularmente formando “coils”. Fonte: Imagens autorizada por Berbara e colaboradores (2006).

Khade (2008) estudando morfotaxonomia de *Glomus rubiforme* e *Glomus pachycaulis*, espécies esporocárpicas de FMAs, através da análise de seus “clamidósporos”, respectivamente amarelos e marrons, detalhou as características taxonômicas de cada uma dessas espécies por seus esporocarpos.

Segundo Goto e Maia (2005), a maioria de FMAs esporocárpicos (termo que inclui espécies com esporos em grupos e espécies com estruturas mais complexas) não tem sua distribuição bem conhecida. Esse estudo afirma que entre as espécies esporocárpicas apenas duas pertencem ao gênero *Acaulospora*, enquanto todas as outras estão incluídas no gênero *Glomus*. Cinco espécies de *Glomus* presentes na Mata Atlântica e em áreas cultivadas no nordeste brasileiro foram identificadas por esses autores.

Goto, Costa e Maia (2009) alertaram para o cuidado que se deve ter nas observações para identificação de espécies de FMAs, como cor e tamanho de esporos, já que estes variam por fatores intrínsecos ou ambientais. Por isso, indivíduos de uma mesma espécie coletados em locais diferentes podem apresentar variação na cor e tamanho de seus esporos. Justifica-se então que não se deve utilizar essas características, exclusivamente, para classificação das espécies encontradas em determinado sítio.

Observa-se, pois, a importância de cuidados na investigação e classificação de fungos em pesquisas que pretendam encontrar, selecionar e classificar FMAs, devido à grande variedade e semelhança de aspectos taxonômicos de suas espécies.

2.4.4 Ciclo de vida e forma de infecção dos FMAs

Segundo Rivas (2006), o ciclo de vida dos FMAs passa por três etapas: pré-infecção, colonização e desenvolvimento micelial. O esquema na figura 4 apresenta resumidamente os processos envolvidos nessas fases.



Figura 4 - Ciclo de vida dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) - adaptado de RIVAS (2006). Fotografias: Bruna Pozzebon, 2012.

Todas as estruturas infectivas dos FMAs, denominadas "propágulos" (esporos, hifas, arbúsculos, vesículas ou mesmo fragmento de raízes micorrizadas) são capazes de iniciar uma colonização em uma raiz de planta simbiote (MAIA; SILVEIRA; CAVALCANTE, 2005; BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006; SAGGIN JUNIOR; SILVA, 2002, RODRIGUES, 2008).

Quanto aos processos metabólicos dos FMAs para adaptarem-se a ambientes estressados, Miransari (2011) destaca a presença de elevado número de vacúolo nas vesículas produzidas pelos fungos entre as células corticais infectadas de plantas presentes em solos sob estresse salino. Tais vacúolos nessas condições apresentam maior armazenamento de íons de sal, tais como cloreto de sódio, o mesmo ocorrendo com íons metálicos em solos poluídos com metais pesados. Essa adaptação fúngica pode atenuar os efeitos desfavoráveis sobre o crescimento das plantas. Sob tais condições, os FMAs podem alterar a fisiologia da planta de forma tal que permite a planta hospedeira suportar o estresse (MIRANSARI, 2011). Saggin Junior (2002) enfatiza a importância agrícola e ecológica de tais modificações, não obstante o desconhecimento de seus mecanismos fisiológicos exatos, já que podem elevar a tolerância da planta ao estresse hídrico em ambientes secos.

2.5 Biorremediação: conceitos e tipos

Vidali (2001), em sua revisão geral sobre tecnologias utilizada em remediação de solo contaminado, principalmente a biorremediação, detalhou os diversos tipos utilizados *in situ* e *ex situ* (remediação do solo realizada, respectivamente, no ambiente e fora do local de contaminação), caracterizando a biorremediação como a remoção de contaminantes do ambiente por micro-organismos devido ao metabolismo que possuem e possibilitam a remoção ou acumulação dos mesmos em estruturas celulares específicas. Exemplo de tal adaptação é o fato de ser observada nas vesículas de FMAs oriundos de ambientes halófilos ou poluídos a presença de um elevado número de vacúolos armazenando íons de sódio e cloreto, ou metais traços, podendo atenuar com isto “os efeitos desfavoráveis do estresse sobre o crescimento das plantas” (MIRANSARI, 2011).

Bento (2008) ressaltou que reações químicas combinadas com processos de engenharia criam condições máximas para que os micro-organismos envolvidos na biorremediação (principalmente bactérias e fungos) promovam a transformação dos contaminantes orgânicos do solo. Em seu estudo relacionou as principais “substâncias alvos” da fitorremediação, uma das técnicas utilizadas na remediação de solos contaminados. Na fitorremediação incluem-se metais traços (Pb, Zn, Cu, Ni, Hg, Se), hidrocarbonetos derivados de petróleo (BTEX) e resíduos orgânicos industriais (PCPs, PAHs), entre outros, como substâncias alvos (BENTO, 2008). O trabalho de Bento (2008) abordou a interação entre dois tipos de simbiose rizosférica: FMAs e rizóbios isolados de áreas contaminadas na Refinaria Duque de Caxias (REDUC) em solo com cinco níveis de contaminação por petróleo (0, 10, 30, 50 e 70 g.kg⁻¹). Este

é um campo interessante de estudo, pois amplia o potencial de biorremediação dos solos contaminados por hidrocarbonetos.

Silva (2009) fez uma ampla revisão sobre os diferentes processos biorremediadores de hidrocarbonetos, detalhando-os: A **bioestimulação** refere-se à técnica de melhoria dos fatores ambientais, destacando-se o pH, o teor de umidade, a temperatura, o aumento de nutrientes (fontes de carbono orgânico, fósforo, nitrogênio, etc.) e de aceptores finais de elétrons estimulando a fitorremediação por micro-organismos presentes nas rizosferas. A **bioaumentação** refere-se ao aceleração e o aumento da eficiência de degradação do poluente pela inserção de micro-organismos que promovam a quebra dos hidrocarbonetos, porém não originários do ambiente onde ocorre a contaminação, e que vão agir concomitantemente com os microrganismos autóctones. Silva (2009) ainda destaca que a eficiência do processo de bioaumentação já foi comprovada em experimentos com sedimento arenoso, onde o resultado identificou que a fração pesada do óleo contaminante foi reduzida em 31% após a consorciação de micro-organismos exógenos.

Jacques (2007), recomendando a biorremediação de solos poluídos com hidrocarbonetos de petróleo, relata resultados conflitantes de estudos que testam a bioestimulação com N e P no solo contaminado. Em seu estudo destaca que a bioaumentação reduziu a degradação de HPAS.

Biopilhas, compostagem, biorreatores e incineração são variantes de técnicas de remediação de solo *ex situ* (CASTRO et al, 2005; SILVA, 2009). Usualmente, o campo utilizado na *landfarming* situa-se próximo ao local de produção dos resíduos, podendo por isso ser considerado uma técnica *in situ*.

2.5.1 Fitorremediação de solos poluídos

Diversas plantas apresentam propriedades favoráveis à fitorremediação, tais como crescimento rápido, alta produção de biomassa, competitivas, vigor e tolerância à poluição, e por isso podem ser usadas em ações de despoluição de solos (LAMEGO e VIDAL, 2007).

Inúmeras pesquisas foram realizadas com fitorremediação na última década. Tecnologias promissoras têm sido aplicadas em várias escalas para o tratamento de poluentes moderadamente hidrofóbicos, tais como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) (BARAC *et al.*, 2004) e também metais pesados, agrotóxicos, explosivos, solventes clorados e resíduos tóxicos de indústria (ANSELMO e JONES, 2005).

Segundo Lamego e Vidal (2007), são cinco os tipos de fitorremediação citados na literatura que relacionam processos fisiológicos de plantas a micro-organismos simbiotes, os quais podem ser empregados, dependendo da natureza química ou da propriedade do poluente (BENTO, 2008):

- Fitoestabilização : Uso de plantas específicas para estabilização dos poluentes no solo, prevenindo perdas por erosão ou lixiviação (LAMEGO e VIDAL, 2007).
- Fitodegradação : Aqui, as atividades enzimáticas das plantas degradam poluentes orgânicos diretamente ou indiretamente com a participação de enzimas de micro-organismos simbiotes. Herbicidas, trinitrotolueno e tricloroetileno (TCE) são degradados em processos enzimáticos que envolvem glutatona e citocromo P-450 monooxigenase, mineralizando completamente os poluentes a compostos inorgânicos (dióxido de carbono, água e minerais) ou a intermediários estáveis armazenados na própria planta. Embora a fitodegradação seja geralmente atribuída à planta, a presença de micro-organismos endofíticos são importantes para esse processo ocorrer (BARAC *et al.*, 2004; LAMEGO e VIDAL, 2007).
- Fitovolatilização: Nesse processo, ocorrem a absorção pelas raízes e a incorporação dos poluentes no tecido da planta, convertidos em formas não tóxicas e volatilizados na atmosfera (LAMEGO e VIDAL, 2007).
- Fitoextração : Espécies vegetais que promovem a extração de poluentes do solo fazendo-os acumularem-se em seus tecido são chamadas de hiperacumuladoras, caracterizando esse tipo de fitorremediação(LAMEGO e VIDAL, 2007; BENTO, 2008).
- Fitoestimulação : É a estimulação da degradação de poluentes orgânicos por micro-organismos simbiotes (como as micorrizas) presentes na rizosfera de plantas, estimulados pelos exudados do vegetal como fonte de carbono. Esse processo é utilizado em limpeza de ambientes contaminados por compostos orgânicos hidrofóbicos (como o petróleo e seus derivados), os quais não podem ser absorvidos pelas plantas. As micorrizas presentes na rizosfera participam no processo de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo e, conseqüentemente no crescimento da planta, favorecendo a dissipação dos poluentes (KAIMI *et al.*, 2006; BENTO, 2008). Na fitoestimulação pode-se incluir a rizorremediação e a micorrizorremediação por abrangerem relação simbiótica em rizosfera de vegetais fitorremediadores.

Além dessas técnicas, Bento (2008) acrescentou mais duas outras em sua revisão:

- Rizofiltração : Técnica que utiliza espécies vegetais aquáticas que possuem potencial de remoção de contaminantes em meio aquoso, com o objetivo de reduzir a concentração de

nitrogênio, fósforo e outros poluentes. O melhoramento da qualidade de águas residuais tem sido o principal objetivo desta técnica.

- A fitominação é aplicada em remediação de solo com presença de baixa concentração de metais (menores que 1%), tanto por contaminantes (fitorremediação), como por metais de interesse econômico (fitoextração).

Carneiro, Siqueira e Moreira (2002) estudando processos em fitoextração de metais pesados com diversas espécies vegetais, constataram que *Pffafia* sp é hiperacumuladora de cádmio (Cd) e zinco (Zn). Das 31 espécies vegetais analisadas nesse estudo de fitorremediação de cádmio e zinco, além de *Pffafia* sp, apenas 6 espécies (embora menos tolerantes) foram consideradas promissoras para revegetação de áreas contaminadas com esses metais pesados: *T. repens*, *E. mexicana*, *C. dactylon*, *Cyperus* sp, *A. strigosa* e *C. ciliares*. As espécies *Sidas glaziovii*, *Bidens pilosa*, *Rhynchelytrum repens*, *Cenchrus echinatus* e *Nicandra physaloides* foram consideradas extremamente sensíveis à contaminação do solo por Zn e Cd, não sendo indicadas para ações de fitorremediação de solos poluídos por esses metais.

Diversos estudos relatam a utilização de *Brachiaria* em experimentos de rizorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos do petróleo e metais pesados, inclusive em associação com FMAs (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002; SILVA; SIQUEIRA; SOARES, 2006; NAKATANI et al., 2008; CEOLA, 2010). Abordando o caráter facultativo que algumas plantas apresentam em relação à simbiose com FMAs, destacando a dependência delas da associação com esses fungos em solo distrófico, principalmente pela baixa disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi) e insuficiência de absorção deste nutriente por tais vegetais, Berbara e colaboradores (2006) citaram como exemplo a *Brachiaria decumbens*.

Santos e colaboradores (2007) também estudaram *Brachiaria decumbens* em fitoestabilização de Zn e Cd e observaram que esta espécie apresentou tolerância a esses metais presentes no resíduo industrial após tratamento de contenção química com silicato de cálcio e lodo de biodigestor de cervejaria. Apresentaram então esta técnica como um tipo de bioestimulação à fitorremediação destes metais.

Em revisão sobre os processos de fitorremediação Lamego e Vidal (2007) relataram *Pennisetum purpureum* (capim-elefante), *Brachiaria decumbens* (capim-braquiária) e *Pennisetum graucum* (milheto forrageiro) como fitorremediadores de cromo.

Tang e colaboradores (2010) utilizaram *Lolium multiflorum* L. (Azevém) para degradação de óleo diesel. Os autores citam ainda outros estudos com vegetais comumente

usados em pesquisa sobre remediação de solo contaminado por petróleo: *Sorghum bicolor* (sorgo), *Linum usitatissimum* (linhaça), *Panicum* sp., *Eleusine indica* (L.) Gaerth (capim-de-galinha), *Festuca arundinacea* (Festuca, Tall Fescue) e *Phaseolus coccineus*, além de outros vegetais serem ali citados como potenciais fitorremediadores, como os centeio, milho, alfafa e arroz.

Paula, Soares e Siqueira (2007) estudaram a fitorremediação de antraceno e creosoto pela presença do FMA *Glomus etunicatum* em rizosfera de *Pueraria phaseoloides*. Muitos outros estudos relatam resultados positivos da fitorremediação de poluentes inorgânicos e orgânicos (CASTRO et al, 2005; KAIMI et al., 2006; SILVA; SIQUEIRA; SOARES, 2006; JACQUES et al, 2007; LAMEGO; VIDAL, 2007; SANTOS, 2007; TANG et al, 2010; KATHI ; KHAN, 2011; RIVAS, 2012;). No entanto, Lamego e Vidal (2007) observaram que poucas pesquisas têm sido conduzidas sobre as relações entre o crescimento radicular das plantas, a atividade microbiana e a degradação de contaminantes realizados por micorrizas. Não obstante, estes pesquisadores afirmaram que, geralmente, tanto o crescimento vegetal simbiote e a dissipação de hidrocarbonetos de petróleo é favorecida pela presença de micorrizas.

Estudos sobre biorremediação de solos relataram diluições experimentais com diversas doses de derivados do petróleo: Jacques (2005) adicionou 500mg de antraceno - um HPA (Hidrocarboneto policíclico aromático) - por quilo de solo. O que corresponde a 0,10g (116 µl ou **0,05%**) de poluente em 200g de substrato-teste. Jacques (2007) relata experimento de biorremediação com utilização de 1.017mg por Kg⁻¹ de solo de uma mistura de 16 HPAs, correspondendo a 203 mg (235 µl ou **0,01%**) em 200g de substrato. TANG (2002) relata uma concentração **6,19%** de petróleo no solo contaminado estudado, equivalente a 12,38g (14,30 ml) de poluente em 200g de solo. Ôtênio (2005) trabalhando com biodegradação de BTX (Benzeno, tolueno e xileno) em meio líquido por *Pseudomonas putida* utiliza as concentrações de 50mg .L⁻¹ e 33,33 mg.L⁻¹ correspondentes a concentração de **0,05%** e **0,03%** de tolueno no substrato respectivamente. Ogbo (2008) utiliza cinco diferentes níveis de contaminação preparadas com água destilada. Aproximadamente **1, 2, 3, 4, e 5%** foram preparados adicionando 0,8, 1,62, 2,43, 3,24 e 4,05 ml de combustível para motores diesel em 10 ml de água destilada, respectivamente. A água contaminada foi utilizada para umedecer papel de filtro nas placas de Petri. Jacques (2005) adicionou 500mg de antraceno - um HPA (Hidrocarboneto policíclico aromático) - por quilo de solo. O que corresponde a 0,10g (116 µl ou **0,05%**) de poluente em 200g de substrato-teste. Jacques (2007) relata experimento de

biorremediação com utilização de 1.017mg por Kg⁻¹ de solo de uma mistura de 16 HPAs, correspondendo a 203 mg (235 µl ou **0,01%**) em 200g de substrato. TANG (2002) relata uma concentração **6,19%** de petróleo no solo contaminado estudado, equivalente a 12,38g (14,30 ml) de poluente em 200g de solo. Ôtênio (2005) trabalhando com biodegradação de BTX (Benzeno, tolueno e xileno) em meio líquido por *Pseudomonas putida* utiliza as concentrações de 50mg .L⁻¹ e 33,33 mg.L⁻¹ correspondentes a concentração de **0,05%** e **0,03%** de tolueno no substrato respectivamente. Ogbo (2008) utiliza cinco diferentes níveis de contaminação preparadas com água destilada. Aproximadamente **1, 2, 3, 4, e 5%** foram preparados adicionando 0,8, 1,62, 2,43, 3,24 e 4,05 ml de combustível para motores diesel em 10 ml de água destilada, respectivamente. A água contaminada foi utilizada para umedecer papel de filtro nas placas de Petri. Jacques (2005) adicionou 500mg de antraceno - um HPA (Hidrocarboneto policíclico aromático) - por quilo de solo. O que corresponde a 0,10g (116 µl ou **0,05%**) de poluente em 200g de substrato-teste. Jacques (2007) relata experimento de biorremediação com utilização de 1.017mg por Kg⁻¹ de solo de uma mistura de 16 HPAs, correspondendo a 203 mg (235 µl ou **0,01%**) em 200g de substrato. TANG (2002) relata uma concentração **6,19%** de petróleo no solo contaminado estudado, equivalente a 12,38g (14,30 ml) de poluente em 200g de solo. Ôtênio (2005) trabalhando com biodegradação de BTX (Benzeno, tolueno e xileno) em meio líquido por *Pseudomonas putida* utiliza as concentrações de 50mg .L⁻¹ e 33,33 mg.L⁻¹ correspondentes a concentração de **0,05%** e **0,03%** de tolueno no substrato respectivamente. Ogbo (2008) utiliza cinco diferentes níveis de contaminação preparadas com água destilada. Aproximadamente **1, 2, 3, 4, e 5%** foram preparados adicionando 0,8, 1,62, 2,43, 3,24 e 4,05 ml de combustível para motores diesel em 10 ml de água destilada, respectivamente. A água contaminada foi utilizada para umedecer papel de filtro nas placas de Petri. Jacques (2005) adicionou 500mg de antraceno - um HPA (Hidrocarboneto policíclico aromático) - por quilo de solo. O que corresponde a 0,10g (116 µl ou **0,05%**) de poluente em 200g de substrato-teste. Jacques (2007) relata experimento de biorremediação com utilização de 1.017mg por Kg⁻¹ de solo de uma mistura de 16 HPAs, correspondendo a 203 mg (235 µl ou **0,01%**) em 200g de substrato. TANG (2002) relata uma concentração **6,19%** de petróleo no solo contaminado estudado, equivalente a 12,38g (14,30 ml) de poluente em 200g de solo. Ôtênio (2005) trabalhando com biodegradação de BTX (Benzeno, tolueno e xileno) em meio líquido por *Pseudomonas putida* utiliza as concentrações de 50mg .L⁻¹ e 33,33 mg.L⁻¹ correspondentes a concentração de **0,05%** e **0,03%** de tolueno no substrato respectivamente. Ogbo (2008) utiliza cinco diferentes níveis

de contaminação preparadas com água destilada. Aproximadamente **1, 2, 3, 4, e 5%** foram preparados adicionando 0,8, 1,62, 2,43, 3,24 e 4,05 ml de combustível para motores diesel em 10 ml de água destilada, respectivamente. A água contaminada foi utilizada para umedecer papel de filtro nas placas de Petri.

2.5.2 Micorrizorremediação

A característica cosmopolita dos FMAs é comumente apresentada nos estudos sobre estes fungos. Tal característica possibilita estudá-los em diversos ambientes e avaliá-los em inúmeras biotecnologias aplicadas ao solo, inclusive naquelas que visam eliminar resíduos tóxicos em ambientes contaminados, como por exemplo, agrotóxicos, metais pesados e hidrocarbonetos do petróleo. As técnicas de biorremediação com micorrizas podem ser aplicadas tanto *ex situ* como *in situ* (CASTRO et al, 2005; NAKATANI, 2008; BENTO, 2008; SILVA, 2009).

A técnica de se utilizar fungos micorrízicos para biorremediação de solo contaminado por atividade antropogênicas foi também denominada de “*Mycorrhizoremediation*” por Khan (2006), que relatou a importância do estudo das raízes de plantas e a diversidade da microbiota do solo e sua associação com bactérias, fungos e microfauna em seu papel na remediação biológica de solos contaminados. Destacou, ainda, a universalidade da presença de FMAs nas rizosferas de plantas e as qualidades desses fungos como biofertilizantes e biodegradadores em solos poluídos, sugerindo que mais estudos que esclareçam tais mecanismos sejam realizados.

A associação micorrízica se torna mais importante ainda em ambientes degradados e solos empobrecidos de minerais (DURAZZINI, 2009) como é o caso dos solos arenosos distróficos encontrados em restingas, sendo que estas são extremamente vulneráveis aos acidentes com exploração e transporte de petróleo e seus derivados que têm se intensificado mediante o aumento da pressão antrópica sobre seus ecossistemas.

Gogosz e colaboradores (2010) realizaram estudo de germinação e desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa* (gabioba) em solo contaminado por derramamento de petróleo de uma refinaria em Araucária-PR em 2000, assim como o desenvolvimento da mesma espécie em solo proveniente do local do derramamento biorremediado por 5 anos, e concluiu que a biorremediação amenizou o efeito do contaminante no desenvolvimento da plântula em 30 e 60 dias de experimento. O estudo abrangeu uma revisão sobre os impactos na germinação e desenvolvimento de diversas espécies vegetais causados por contaminações

por petroderivados, apontando para a importância da biorremediação de ambientes poluídos com estes compostos.

Cabello (2006), Paula, Siqueira e Soares (2006) e Bento (2008), em estudos sobre FMAs e suas potencialidades para degradação de hidrocarbonetos do petróleo, realizaram a separação de esporos desses fungos, identificando-os e classificando-os, apresentando resultados positivos quanto a sua capacidade de biorremediação. A redução de absorção de contaminantes do solo pela planta micorrizada se dá pela capacidade de adsorção das substâncias tóxicas pelas paredes das hifas dos FMAs devido aos polissacarídeos extracelulares aí produzidos, o que aumenta a tolerância dessas plantas a esse tipo de ambiente (NOGUEIRA, 2007).

Sobre o mecanismo utilizado pelos FMAs para degradação de substâncias tóxicas em solos poluídos e da contribuição na agregação do solo, Khan (2006) relatou a importância das proteínas relacionadas com as glomalinas para esses processos ocorrerem. Destacando a importância dos exsudados de fungos simbiotes no processo de agregação de solos dunares de restinga, Rodrigues (2008) relata as valiosas ações ecológicas dos FMAs para o meio ambiente, entre elas o favorecimento da estabilização dos solos promovida pela ação física do micélio fúngico e pela ação da glomalina. Berbara e colaboradores (2006) apresentaram dois prováveis fatores para agregação e estabilidade dos solos: um físico, pelas hifas extraradiculares envolvendo e enovelando partículas minerais e orgânicas do solo, e outro quelante, graças à ação das glomalinas.

Paula, Soares e Siqueira, (2006) e Nakatani e colaboradores (2008), analisando a atividade de FMAs em solo de “*landfarming*”, relataram que há maior capacidade de estimulação da degradação de hidrocarbonetos de petróleo no solo com plantas micorrizadas acelerando o processo de biorremediação.

Silva (2009), descrevendo as diversas técnicas disponíveis hoje para remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo, destacou que as “*Tecnologias Verdes*”, onde os processos biológicos estão inseridos, têm maior aceitação pública do que os métodos físico e químicos de remediação, visto que apresentam baixo custo, possibilidade de aplicação para tratamento *in situ* e eficiência elevada para a biodegradação de diversos contaminantes.

Baseado em diversos estudos sobre remediação de solos por FMAs, Nogueira (2007) afirmou que, embora os mecanismos de tolerância a ambientes poluídos com metais não tenham ainda sido elucidados, sabe-se que isolados provenientes de sítios contaminados são mais resistentes quando expostos à mesma situação de presença de metais. A variação de tolerância aos contaminantes, que pode ocorrer conforme a origem dos FMAs pré-expostos ou

não aos agentes tóxicos, sugere que testes comparativos com espécies de fungos cultivados em vasos contaminados e não-contaminados com hidrocarbonetos devam ser realizados. A análise dos estudos citados acima apresenta as micorrizas, principalmente as MAs, com potencial de depuração do ambiente contaminado, promovendo o restabelecimento da biota do solo e melhor recuperação das espécies vegetais simbiotes. Paula, Siqueira e Soares (2007), estudando a fitorremediação de antraceno e creosoto em solo de *landfarming* por *Brachiaria brizantha* e *Pueraria phaseoloides*, concluíram que esta última é indicada para biorremediação de áreas impactadas por hidrocarbonetos do petróleo. Tal resultado relacionou-se à presença do FMA *Glomus etunicatum* em suas raízes enquanto que *Brachiaria brizantha* (sensível à presença de HAPs) não foi encontrada colonizada por FMAs.

Cabello (2006) discute os efeitos de hidrocarbonetos do petróleo sobre a colonização micorrízica, comparando o potencial de colonização entre propágulos encontrados em solo poluído e não poluído em experimentos realizados na Argentina e Alemanha. Seus resultados indicaram maior presença de arbúsculos nas raízes que foram colonizadas por propágulos em solo não poluído. No entanto, verificou também um alto potencial de colonização dos FMAs em solo poluído por hidrocarbonetos, constatando maior presença de vesículas nos vegetais estressados pelo poluente, não obstante observar uma menor presença de esporos nesse tipo de solo. Ou seja, a presença de arbúsculos nas raízes diminuiu à medida que o estresse causado pelo poluente aumenta, enquanto que o contrário se observou em relação à presença de vesículas. Cabello (2006) ainda sugere a busca de mais informação sobre FMAs em solos poluídos por hidrocarbonetos, tais como limites de tolerância, os efeitos da adição de nutrientes, as espécies eficientes na promoção do crescimento e sobrevivência vegetal, e a avaliação do papel de vários tipos de propágulos desses solos.

2.6 As restingas e a formação psamófila-reptante

O termo restingas tem sido utilizado para designar ecossistemas costeiros que se desenvolveram sobre depósitos litorâneos arenosos costeiros quaternários originados pelos movimentos de transgressão e regressão marinhos e pela deposição de sedimentos de origem fluvial. Fitogeograficamente, denomina-se o conjunto de comunidades vegetais, distribuídas em mosaico, associado a esses depósitos arenosos costeiros quaternários e aos ambientes rochosos litorâneos. (ASSUMPCÃO e NASCIMENTO, 2000; SANTOS; SYLVESTRE; ARAUJO, 2004; ARAUJO et al., 2009; BOHRER, 2009; BRASIL, 2009).

Segundo Assumpção e Nascimento (2000), o ambiente geológico recente das formações de restingas, caracterizado por suas diferenças geomórficas, pedológicas e climáticas, foi colonizado por espécies vegetais provenientes de outros ecossistemas (Mata Atlântica, Tabuleiros e Caatinga) com variações fenotípicas devido às condições diferentes do seu ambiente original.

Nessas faixas litorâneas, ao longo da costa brasileira, são encontradas diversas formações vegetais nas quais se encontram, bem adaptadas, plantas de fisionomias herbáceas salinas, entre elas, a formação “praial-graminóide”- nomenclatura adotada por Assumpção e Nascimento (2000), entre muitas outras nomenclaturas existentes e revisadas por Thomaz e Monteiro (1992) e Silva (1999).

Thomaz e Monteiro (1992) relata uma formação vegetal na zona de marés, a qual denomina de “formação halófila”. Esse autor ainda discute as características das duas formações situadas dentro e no limite da zona de marés, observando a dificuldade em separar as duas comunidades ali presentes: a halófila e a psamófila-reptante onde tanto em uma quanto em outra se pode encontrar indivíduos com características psamófitas (plantas reptantes) e halofíticas (com adaptações para ambiente salgado) e que apresentam relações ecológicas estreitas. Por isso o autor se refere a elas como uma única formação vegetal : “formação halófila-psamófila”.

Kuster (2010), que denomina de “formação halófila-psamófila reptante” toda a região dunar que limita as marés, discute as características “eutróficas” daquele solo pela presença marcante de sódio originado pelo *spray* marinho (salsugem), não obstante o solo seja caracterizado como “pobre” ou “distrófico” devido à deficiência dos demais nutrientes.

Boher (2009) e Araújo e colaboradores (2009), que mapearam detalhadamente as formações vegetais do Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio-RJ, onde está inserida a Restinga de Massambaba, utilizaram nomenclaturas diferentes para todas as formações próximas à praia, designando-as simplesmente de “formação psamófila-reptante”, nomenclatura ora adotada neste estudo. Ocorre uma baixa densidade populacional de vegetais na zona varrida pelas marés, ocasionado por eventos cíclicos de marés de tempestades que reduzem drasticamente a biomassa e a densidade das populações naquela área (SEELIGER, 1988).

As restingas do Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio no Rio de Janeiro, Brasil, são possuidoras de uma riqueza exuberante, e a Restinga de Massambaba tem sua importância apresentada por Araújo et al (2009) e Bohrer et al (2009) com alta diversidade vegetal sobre planície areno-argilosa e seriamente ameaçada por atividades antrópicas degradadoras.

Características especiais promovem nesse ecossistema costeiro do Rio de Janeiro um clima peculiar do litoral do sudeste, abrigo espécies vegetais endêmicas às restingas e mais de 14 espécies que somente ocorrem em restingas e na mata atlântica do Estado (ARAÚJO *et al.*, 2009).

As rizosferas de formações vegetais em dunas litorâneas apresentam espécies de fungos, que numa relação mutualística - as micorrizas - possibilitam que tais plantas sobrevivam em um ambiente tão adverso em suas características físico-químicas e climáticas (SILVA *et al.*, 2010; CORDAZZO & STÜRMER, 2007).

As características ambientais da restinga de Massambaba fazem dela importante biótopo para a biodiversidade local (PETROBRÁS, 2008), características essas fortemente influenciadas pelo clima peculiar da região (figura 5). Segundo Boher (2009), suas condições climáticas são resultantes da interação de diversos fatores, entre eles está o efeito provocado pela ressurgência, caracterizada pelo deslocamento da massa oceânica superficial aquecida pelos ventos e a migração vertical de águas frias de subsuperfície, o que inibe a formação de cumulus. Juntamente com a inexpressiva existência de chuvas causadas pelo relevo (“menor controle orográfico”) devido ao afastamento do topo da Serra do Mar em direção ao litoral, o resultado é a diminuição da taxa de precipitação nessa faixa litorânea (BOHER, 2009), o que lhe imprime aspectos fitossociológicos diferenciados do seu entorno, apresentando vegetação “enquadradas na definição de florestas secas”, característica do semiárido nordestino (ANDRADE, 2005). Tais condições, as quais estão associadas à sua história geomorfológica e ao clima semiárido, originaram na Restinga de Massambaba uma diversidade florística numerosa que necessita ser conservada (ARAÚJO *et al.*, 2009).

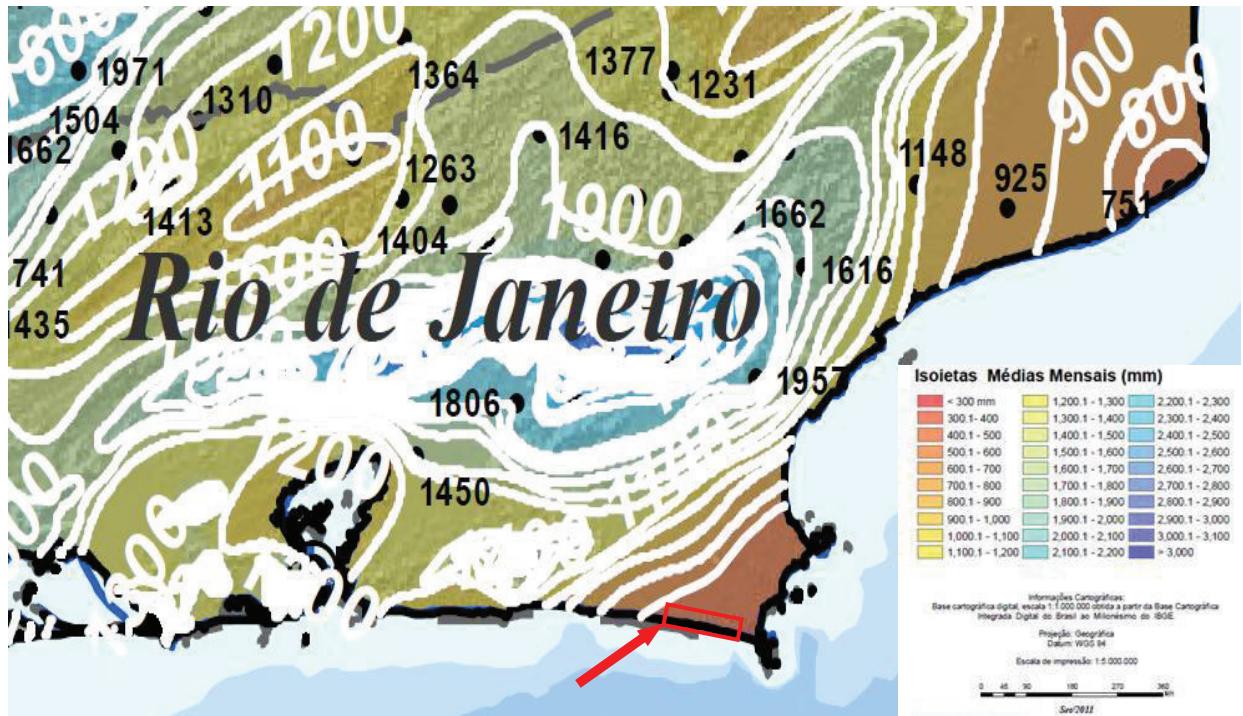


Figura 5- Isoietas de precipitação na porção leste do estado do Rio de Janeiro onde está situado o Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio (ARAÚJO *et al.*, 2009). A Restinga de Massambaba (seta e retângulo em destaque) está inserida numa área onde a taxa de precipitação anual é de aproximadamente 800 mm ou menos por ano (BOHER *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2009). Fonte: Serviço Geológico do Brasil – (CPRM, 2012) - Adaptado.

Quanto à diversidade vegetal que caracterizam o ecossistema de restinga, Araújo e colaboradores (2009) apresentaram dez tipos de formação vegetal na Restinga de Massambaba. São catalogadas e classificadas 664 espécies vegetais distribuídas em 118 famílias de angiospermas e pteridófitas. São também identificadas espécies halófitas e psamófitas ocupando uma extensa faixa próxima à praia em todo o seu cordão arenoso (PETROBRÁS, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2009; THOMAZ, L. D.; MONTEIRO, 1992).

Como característica seletiva para este ambientes alguns vegetais apresentam estômatos apenas na face abaxial das folhas (hipoestomáticas), característica presente em *R. maritima* relatada por BOEGER (2006). Segundo Alves *et al.* (2009) o Brasil possui quinze gêneros de Cyperaceae, e cinco desses são monoespecíficos, entre eles a *Remirea maritima*. Ou seja, em qualquer ambiente de restinga no Brasil esta é a única espécie encontrada de *Remirea*. Isso se confirma no levantamento fitossociológico na Restinga de Massambaba realizado por Araujo *et al.* (2009) onde a única espécie do gênero listada é a *Remirea maritima* Aubl, o que também se confirma na “Lista de Espécies da Flora do Brasil” (ALVES *et al.*, 2012). Alves *et al.* (2009) acrescentam que as Cyperaceas são potenciais bioindicadores de ecossistemas saudáveis.

A *Remirea marítima* possui distribuição fitogeográfica desde o sul da América do Norte até a Austrália, já identificada por diversos especialistas em todo o mundo (PICKERING,2012) (figura 6).

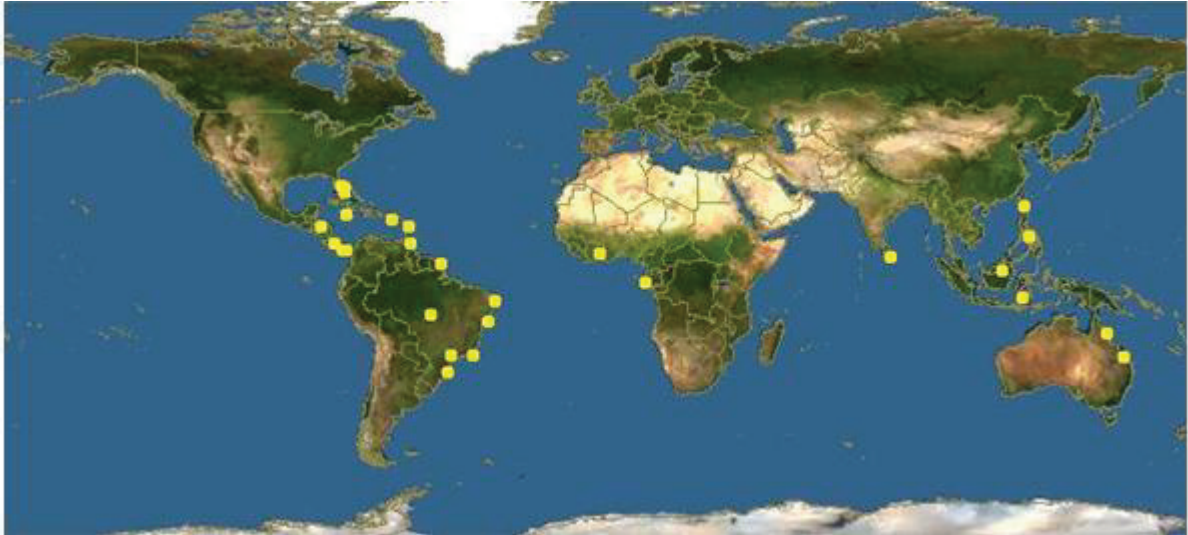


Figura 6 – Mapa³ apresentando a distribuição fitogeográfica de *Remirea marítima* elaborado pela Discover Life (PICKERING,2012).

2.6.1 Presença de FMAs em zonas costeiras

Koske (1988) investigou a presença de FMAs em rizosferas de plantas de dunas no Havaí e encontrou algum nível de colonização em todas as plantas estudadas, entre elas, *Batis maritima*, *Cocos nucifera*, *Ipomoea brasiliensis*, *Pennisetum setaceum*, *Prosopis pallida*, *Scaevola taccada*, e *Sporobolus* sp. O gênero *Glomus* foi o mais frequente das espécies encontradas, e, ao contrário dos demais, esteve presente em todos os sítios estudados. Também foi relatada alta taxa de frequência do gênero *Sclerocystis* em rizosferas de *Scaevola*, *Cocos*, *Pennisetum*, *Ipomoea* e *Batis*, e do gênero *Scutellospora* em rizosferas de *Scaevola*, *Ipomoea*, *Pennisetum*, *Cocos*, and *Sporobolus*.

Cordazzo e Stürmer (2007) avalizaram a ocorrência de FMAs em dunas costeiras no Sul do Brasil em gramíneas da espécie *Panicum racemosum* e constataram a presença de 10 espécies de FMAs em dunas incipiente, dunas frontais e dunas fixadas. Dois gêneros, dos

³ O mapa de distribuição fitossociológica de *Remirea marítima*, apresentado virtualmente no site Discover Life (PICKERING,2012), possui forma interativa, no qual se pode acessar os registros de arquivos e de exsicatas de herbários internacionais, tais como Global Biodiversity Information Facility, Missouri Botanical Garden database e Plants Database, United States Department of Agriculture database. Disponível em: < http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map > e < <http://eol.org/pages/29459/media>>. Acesso em: 20 de maio 2012

quatro encontrados, foram dominantes: *Scutelospora* predominou nas três áreas estudadas, enquanto que *Glomus* na rizosfera de *Panicum* em dunas fixas. Ao comparar com outros estudos que avaliaram plantas adaptadas a dunas costeiras, esses autores constataram o baixo percentual (<1%) de colonização em *Panicum* na área estudada.

Rodrigues (2008), avaliando o efeito da inoculação de FMAs associada à adubação nitrogenada em *Clusia fluminensis* presente na Restinga da Marambaia, RJ, destacou a importâncias desses fungos para a reabilitação de áreas tropicais onde predominam solos de baixa fertilidade, sendo essenciais para o sucesso da revegetação.

Braga (2008), desenvolvendo estudo com a espécie de palmeira *Allagoptera arenaria* na Restinga de Marambaia- RJ avaliou a associação de FMAs e bactérias fixadoras de nitrogênio na rizosfera daquele vegetal e encontrou uma alta taxa de colonização em todas as áreas avaliadas. Destacaram-se ali os gêneros de maior frequência: *Glomus*, *Acaulospora* e *Gigaspora*.

Oliveira (2009), em estudo em área de restinga no litoral do Estado da Paraíba, caracterizou comunidades de FMAs presentes em área de dunas revegetadas avaliando sua influência no desenvolvimento das espécies vegetais nativas *Tabebuia roseo-alba* e *Tocoyena selloana*. Seu estudo avaliou a produção de proteínas do solo relacionadas à glomalina (PSRG), densidade e diversidade de esporos presentes nas rizosferas dos vegetais estudados relatou a presença de colonização micorrízica em *Tabebuia*, com frequência de 80%, e em *Tocoyena* a frequência foi de 60%.

Silva (2010), buscando determinar a situação de comunidades de FMAs em áreas de dunas impactadas por mineração e revegetadas, realizou comparação dessas áreas com outras áreas de restinga: mata de restinga arbórea preservada, restinga praiana e dunas revegetadas. Esse autor relatou a maior ocorrência de glomerosporos e maior número de propágulo infectivos em mata de restinga arbórea preservada e em área de duna revegetada.

Em todos os estudos que investigaram rizosferas de plantas em zonas costeiras, destacou-se a importância dos FMAs para adaptação e crescimento dessas plantas em sistemas dunares.

2.6.2 Nutrientes em solo de restinga e eficiência micorrízica sob estresse abiótico

Souza (2007) abordou a questão da ciclagem de nutrientes em ambiente de restinga. O estudo destacou a importância da interação entre as comunidades vegetais e a biota do solo, observando que a perturbação dessas interações põe em risco o funcionamento equilibrado

dos mesmos, podendo levar a prejuízos sócio-econômico-ambientais, inclusive à extinção de espécies. Perturbações ambientais podem ser detectadas quando são observadas alterações na biota do solo devido ao aumento da fauna do solo ou de intervenções na cobertura vegetal, podendo gerar a ruptura da sustentabilidade a médio e longo prazo (SOUZA, 2007).

O solo na restinga não é a principal fonte de nutrientes, o que fica por conta do *spray* marinho que é a maresia presente na atmosfera (SOUZA, 2007). A salsugem trazida pelos ventos marinhos é responsável pelo maior aporte de P nas formações vegetais imediatamente após a praia (BOHRER et al, 2009; LOURENÇO JUNIOR; CUZZUO, 2009; RODRIGUES, 2008). Lourenço Junior e Cuzzuo (2009) identificou maior concentração de P na formação psamófila-reptante do que na formação *Palmae*. O mar também é fonte de adição de nutrientes em restingas através do lençol freático, porém, este também pode funcionar como dreno de nutrientes, pois, devido às características arenosas do solo, os nutrientes não ficam retidos. Reside aí a importância imprescindível de mecanismos capazes de reter ou retardar a saída de matéria orgânica existente (SOUZA, 2007), principalmente dos micro-organismos ali envolvidos. A inter-relação existente entre esses organismos dependentes do solo (fauna edáfica, bactérias e fungos) é que permite a decomposição estrutural e química dos tecidos complexos de plantas, restos de animais e também do micélio fúngico das micorrizas na rizosfera, fontes importantes de carbono e nutrientes nesse processo ecológico de ciclagem da matéria orgânica (HOFFMANN et al, 2009; BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006).

O estabelecimento de simbiose micorrízica tem no gradiente de P no solo um dos fatores limitantes, pois este nutriente em maiores concentrações influencia a exsudação de fitohormônios que sinalizam contrariamente à micorrização do vegetal (KIRIACHEK, 2009). As características físico-químicas do solo de restinga apresentam ainda outro fator limitante proporcionado pelo estresse salino: a presença de sódio (Na) bastante expressiva conforme apresentada por estudos que realizaram análise físico-química de solos litorâneos. Logo, estruturas micorrízicas que atuam na redução do impacto de estresse e na manutenção nutricional do vegetal, são de grande importância para a sobrevivência no ecossistema de restinga.

Estudos que analisaram os valores de bases trocáveis, K, Ca e Mg, entre os macronutrientes e Cu, Mn e B entre os micronutrientes, além de apresentarem altos índices de Na (LOURENÇO JUNIOR; CUZZUO, 2009; SOUZA, 2007; PEREIRA et al, 2005; GOMES et al, 2007; FRAGA; PEREIRA; SOUZA, 2010), são importantes para a compreensão dos processos ecológicos envolvidos na manutenção da fauna edáfica em ecossistemas semiáridos.

Lourenço Junior e Cuzzuo (2009) detectaram gradiente decrescente de concentração de nutrientes com a profundidade do solo. Nos primeiros 10 cm da formação psamófila-reptante na restinga do Parque Estadual Paulo César Vinha, Guarapari- ES, onde a concentração foi maior para todos os nutrientes naquela formação vegetal do que nos demais níveis, encontraram maiores teores de Fe (17,3 mg.kg⁻¹) e Zn (53,8 mg.kg⁻¹). Os teores de P e Na foram de 24,6 e 104 mg.kg⁻¹, respectivamente, nesta mesma profundidade. Os demais nutrientes quantificados na análise foram: K: 20,3; Ca:760,0; Mg: 87,0 mg.kg⁻¹.

Fraga e colaboradores (2010) quantificaram teores de Ca (3,27cmol.kg⁻¹)⁴ ; Mg (1,62cmol.kg⁻¹), K (29,67 mg.kg⁻¹), P (3,16 mg.kg⁻¹), Na (0,14 cmol.kg⁻¹) na restinga de Marambaia-RJ. A parte superior (10 cm de profundidade) do perfil do solo também apresentou maiores valores para estes nutrientes do que as inferiores.

Scivittaro e Pillon (2007) apresentando interpretação dos teores de fósforo (P) no solo, de acordo com o teor de argila em sua composição, descreveram como “muito baixo” o teor desse nutriente em menor ou igual concentração de 7mg.dm³ em amostra de solo com 20% de argila (classe 4) e “muito alto” para teor maior ou igual a 42 mg.dm³ de solo da mesma classe. Cabe saber que, segundo Souza e Lobato (2012), o teor máximo de argila encontrado em solo de restinga (Neossolo Quartzarênico) é de até 15%. Logo, de acordo com os estudos aqui citados, ambientes de restinga podem apresentar teores de P menores do que o classificado como “muito baixo”. Tais condições estressantes são propícias ao estabelecimento das micorrizas arbusculares, o que, como aqui discutido, está diretamente relacionado aos mecanismos simbióticos planta-fungo.

Em observações cito-histoquímicas de FMAs foi encontrada presença de enzima fosfatase alcalina em arbúsculos e hifas intra-radiculares. Tal atividade enzimática tem sido aceita como um bom índice do efeito da associação micorrízica no crescimento da planta hospedeira (MATOS; SILVA; LIMA, 1999). Em estudo de Matos e colaboradores (1999), que fizeram importante revisão sobre o papel de P nas micorrizas arbusculares, afirma-se que o fato de espécies diferentes de FMAs possuírem variação no potencial de absorção de P, tendo como base o C usado por unidade de P transportado pela hifa, torna-se uma ferramenta de avaliação da eficiência da simbiose micorrízica como um método importante para seleção de fungos mais eficientes nesse processo e consequente aplicação biotecnológica. Essa eficiência se traduz pela habilidade do fungo de aumentar a fotossíntese e o crescimento do

⁴ Um Centimolc de carga, ou cmolc, é igual a 10 mg de hidrogênio. A fórmula para cálculo é: cmolc g/dm³ = peso atômico do elemento químico em g / valência /100 (LOPES; GUILHERME,1992). Por exemplo, 1 cmolc de Na = 22,99 / 1 / 100 = 0,230 g de Na ou 230 mg de Na.

hospedeiro, através de um melhor fornecimento de nutrientes, principalmente P. (MATOS; SILVA; LIMA, 1999).

2.7 Conclusão

Nesta revisão obteve-se uma ampla abordagem da ecologia das micorrizas e de diversas tecnologias de biorremediação onde elas são aplicadas. Os conhecimentos sobre FMAs e seu potencial para micorrizorremediação (fitoestimulação por micro-organismos em rizosfera de espécies fitorremediadoras) de solos contaminados por poluentes orgânicos e inorgânicos foi evidenciado. As muitas pesquisas realizadas com estas técnicas não se refletem em solos distróficos de restinga, onde a literatura, na maior parte, trata apenas de identificar as espécies de fungos micorrízicos e seu potencial de estimulação de crescimento de plantas desse ecossistema, não relacionando os FMAs ali encontrados à remediação destes solos contaminados por poluentes.

A micorrizorremediação apresenta promissora oportunidade de desenvolvimento de uma tecnologia para possível solução para alguns problemas ambientais brasileiros. No entanto, se fazem necessários maiores estudos que forneçam dados qualitativos e quantitativos para seu desenvolvimento. A micorrizorremediação de solos poluídos parece ser o processo indicado para solos de restinga, tendo em vista as condições extremas que vivem ali a flora endêmica, principalmente pelo estresse hídrico e a salinidade constante. Não obstante tais condições serem adversas para as espécies de fungos e bactérias simbiotes de vegetais, são ambientes ideais para o desenvolvimento de comunidades micorrízicas específicas de FMAs que promovem o crescimento e adaptação das plantas colonizadas aos sistemas dunares.

2.8 Referências Bibliográficas

- ANDREAZZA, R. *et al.* Ocorrência de associação micorrízica em seis essências florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, julho-setembro, vol.18, nº 03. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. Brasil, 2008. pp. 343-351.
- ANSELMO, A. L. F. ; JONES C. M Fitorremediação de Solos Contaminados – O Estado da Arte. **XXV Encontro Nac. de Eng. de Produção** – Porto Alegre, RS, 2005.
- ALARCÓN, C. ; CUENCA, G. Arbuscular mycorrhizas in coastal sand dunes of the Paraguaná Peninsula, Venezuela. *Mycorrhiza*: 16:1– 9, 2005. Disponível em < <http://www.springerlink.com/content/m5kp73181-7086636/> > Acesso em 14 de out de 2010.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 865p.
- ARAÚJO, D. S. D. *et al.* Área De Proteção Ambiental De Massambaba, Rio De Janeiro: Caracterização Fitofisionômica e Florística - **Rodriguésia** 60 (1): 067-096. 2009.
- BARTZ, M. L. C. *et al.* Comparação entre as técnicas de amostragem direta em campo e cultura-armadilha para mensuração da diversidade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares. **Hoehnea** 35(1): 159-164, 2 tab., 2008.
- BARAC, T. *et al.* Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**, London, v.22, n.5, p.583-588, 2004.
- BENTO, R.A. **Simbioses Radiculares e a Fitorremediação de Solo Contaminado por Resíduos Oleosos de Refinaria de Petróleo** . 2008. Disponível em < <http://www.if.ufrj.br/inst/monografia/2007II/Ricardo%20Aparecido%20Bento.pdf> > acesso em 03 de jun 2010.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A; FONSECA, H. M. A. C. Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito Além da Nutrição. In **Nutrição Mineral das Plantas**. SBCS, Viçosa, 2006: 53 -85, (ed. FERNANDES, M.S.). 432p.
- BOHRER, C. B. A. *et al.* Mapeamento Da Vegetação E Do Uso Do Solo No Centro De Diversidade Vegetal De Cabo Frio, Rio De Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 60 (1): 001-023. 2009.
- BRAGA, T. V. S. **Associações com fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio em *Allagoptera arenaria* (Gomes) O. Kuntze na restinga de Marambaia, R.J.** 2008. 33 f. Monografia, programa de graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 417/2009. Dispõe sobre parâmetros básicos para definição de vegetação primária e dos estágios sucessionais secundários da vegetação de Restinga na Mata Atlântica e dá outras

providências. **Diário Oficial da União (DOU)** 224, 24/11/2009, p.72. Brasília. 2009. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=617> >.

BRUNDRETT, M. Mycorrhizas in natural ecosystems. **Adv. Ecol. Res.** 21, 171–313.1991. Disponível em < <http://pt.scribd.com/doc/51667302/Mycorrhizas-in-Natural-Ecosystems>> Acessado em 01 jun 2011.

BRUNDRETT M. *et al.* **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture.** ACIAR Monograph 32. 37. 1996. ISBN 186320 181 5. Disponível em < <http://aciarc.gov.au/publication/MN032>>. Acesso em 20 de out 2010.

CABELLO, M. N. Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) - **FEMS Microbiology Ecology** - Volume 22 Issue 3, Pages 233 – 236 - Published Online: 17 Jan 2006. Disponível em < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00375.x/full>> Acesso em 20 de out 2010.

CANHO , P. V; VAZOLLER, F.R. **Coleção Biodiversidade do Estado de São Paulo: Síntese e Recomendações.** V.1, cap 10, p. 115-118. São Paulo, SP, 1999.

CASTRO, R. A. *et al* . Otimização do Sistema de Landfarming da RPBC – Refinaria Presidente Bernardes. **Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás.** 2005. Disponível em <http://pessoal.utfpr.edu.br/marlenesoares/arquivos/Landfarming.pdf> > acesso em 14 de out de 2010.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesq. agropec. bras.** [online]. 2002, vol.37, n.11, pp. 1629-1638. ISSN 0100-204X.

CORDAZZO ,C. V.; STÜRMER, S. L. . Ocorrência De Fungos Micorrízicos Arbusculares Em *Panicum Racemosum* (P. Beauv.) Spreng (Poaceae) Em Dunas Costeiras Do Extremo Sul Do Brasil. *Atlântica (Rio Grande)*, Vol. 29, No 1. 2007.

DURAZZINI, A. M. S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos sob diferentes cultivos. **Revista Agrogeoambiental.** Inconfidentes- Minas Gerais, ano 1, n. 1, p. 1-7, jan/abr 2009.

FURTADO, M. Tratamento de resíduos. **Revista Química e Derivados.** Edição nº 495 - Março de 2010. Disponível em < <http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd495/incinerador/incinerador01.html>>. Acesso em 05 de jul 2010.

GARCÍA, I.; MENDOZA, R.; POMAR,M. C. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes under contrasting grazing modes in the Magellanic steppe of Tierra del Fuego. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 155. 2012. p. 194– 201.

GOKULDAS P.; BAGYARAJ , D. J. ; PRASAD, T. G. Mycorrhizal reproduction as influenced by moisture stress. In: BUSHAN L. J.; CHAND, H. (Ed.). **Proceedings Of The National Conference On Mycorrhiza.** Department Of Plant Pathology Haryana Agricultural University at Haryana Agricultural University, Hisar- India .1990. 213 p. (On-line).

- GOGOSZ, A.M. *et al.* Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. **Braz. J. Biol.**, 2010, vol. 70, no. 4, p. 977-986
- GOTO, B. T.; MAIA, L. C. Sporocarpic species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), with a new report from Brazil. **Acta bot. bras.**: 19(3): 633-637. 2005
- GOTO, B. T.; COSTA, C. M.C.; MAIA, L. C. *Glomus halonatum* Rose & Trappe (Glomeromycota) in South America: comments on the morphological characteristics of the species. **Acta bot. bras.** 23(4): 1167-1170. 2009.
- INVAM. **International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi**. Disponível em < [http:// invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/classification.htm](http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/classification.htm).> Acessado em: 14 out 2010.
- JUMPPONEN A, TRAPPE J.M. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root colonizing fungi. *New Phytologist* 140: 295–310.
- JACQUES, R.J.S. *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.37,n.4,p.1192-1201, jul-ago, 2007. ISSN0103-8478.
- KAIMI, E. *et al.* Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.55, n.1-2, p.110-119, 2006.
- KATHI, S.; KHAN, A. B. Phytoremediation approaches to PAH contaminated soil. **Indian Journal of Science and Technology**. Vol. 4 No. 1, 2011. ISSN: 0974- 6846.
- KHADE, S. W. Morpho-taxonomy of synonyms: *Glomus rubiforme* and *Glomus pachycaulis* (Glomeromycota). Department of Botany, Goa University, Taleigao Plateau, GOA-403206, India. **Anales de Biología** 30: 55-59, 2008. Disponível em < http://www.um.es/analesdebiologia/numeros/30/PDF/30_06.pdf> acesso em 3 jul. 2011.
- KHAN, Abdul G., Mycorrhizoremediation—an enhanced form of phytoremediation - **Journal of Zhejiang University Science B** Volume 7, Number 7, 503-514, DOI: 10.1631 - 2006. ISSN 1862-1783 (Online)
- KIRIACHEK, S. G. *et al.* Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **R. Bras. Ci. Solo**, 33:1-16, 2009.
- KNAPP ,D.G., PINTYE, A., KOVÁCS, G. M.. The Dark Side Is Not Fastidious – Dark Septate Endophytic Fungi of Native and Invasive Plants of Semiarid Sandy Areas. **PLoS ONE**. February 2012 . Volume 7 , Issue 2 , e32570.
- KOSKE, R. E. - Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae of Some Hawaiian Dune Plants. **Pacific Science**, vol. 42, nos. 3-4. University of Hawaii Press. 1988.
- LAMEGO, F. P.; VIDAL,R. A. Fitorremediação: Plantas como agentes de despoluição? **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 17, p. 9-18, jan./dez. 2007

LEAL, P. L. **Fungos micorrízicos arbusculares isolados em culturas armadilhas de solos sob diferentes sistemas de uso na Amazônia**. Dissertação (Mestrado). Lavras : UFLA, 67 p. 2005. Disponível em < www.cipedia.com/web/FileDownload.aspx?IDFile=154755 > Acesso em 03 jul de 2011.

MIRANSARI ,M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2011. 89:917–930. DOI 10.1007/s00253-010-3004-6.

MOREIRA , C. A.; Dourado J. C. Análise de contaminantes de fase líquida não aquosa (NAPLs) Por aplicação do Método Eletromagnético Indutivo (EM). **Revista Brasileira de Geofísica** . 2005, 23 (3): pp. 213-220. ISSN 0102-261X.

NAKATANI, A. S. *et al* - Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de “landfarming” de resíduos petroquímicos - **R. Bras. Ci. Solo**, 32:1501-1512, 2008.

NOGUEIRA ,M. A. Micorrizas Arbusculares e Metais Pesados. In : SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. dos S. (Eds). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, p.218-238. 2007.: il. ISBN: 978-85-85564-14-8 (Publicação online)

NUNES, J. L. da S.; SOUZA, P. V. D. de; MARODIN, G. A. B. and FACHINELLO, J. C. Incremento no desenvolvimento do porta-enxerto de pessegueiro "Aldrighi" por fungos micorrízicos arbusculares autóctones. *Ciênc. agrotec.* [online]. 2008, vol.32, n.6, pp. 1787-1793. ISSN 1413-7054.

OEHL, F. *et al*. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. **International Mycological Association** - Fungus · volume 2 · no 2: 191–199. 2011. Doi:10.5598/ima fungus. 2011.02.02.10

OLIVEIRA, J. R. G. de. O papel da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) autóctones no desenvolvimento de espécies vegetais nativas em área de dunas de restinga revegetadas no litoral do Estado da Paraíba. **Revista Brasil. Bot.**, V.32, n.4, p.663-670, out.-dez. 2009.

PAULA, A. M. ; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J.O.- Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de *landfarming* de resíduos petroquímicos - **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v.10, n.2, p.448–455, 2006.

_____. Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*- **R. Bras. Ci. Solo**, 31:805-811, 2007.

PEREIRA, G. M. D. Ocorrência de fungos endofíticos "*dark septate*" em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.3, p.331-334, mar. 2011.

RAMOS, A. C. *et al*. An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. **Braz. J. Plant Physiol.** [online]. 2011, vol.23, n.1, pp. 79-89. ISSN 1677-0420. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S167704202011000100010&script=sci_abstract&tlng=pt > Acessado em 07 de ago 2012.

REININGER, V.; GRÜNIG, C. R.; SIEBER, T. N. Host species and strain combination determine growth reduction of spruce and birch seedlings colonized by root-associated dark septate endophytes. *Environmental Microbiology*. 2012. 14(4), 1064–1076 doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02686.

RIVAS, P. E. C. **Influencia de la cobertura vegetal sobre la diversidad y estructura de las comunidades de hongos micorrizicos y sus efectos em la estabilización de suelos degradados**. Tese (Doutorado) . C.S.I.C. da Universidade de Granada. 2006. Disponível em < <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1008/1/16154952.pdf> > acesso em 12 de mar. de 2012.

RODRIGUES, G. R. G. **Análise do crescimento de espécies vegetais utilizadas na restauração de áreas de restinga: resposta da adição de fungos micorrizicos arbusculares e nitrogênio**. 2008. 56p Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Departamento de Ciências Ambientais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

SANTOS, F. S. *et al.* Chemical amendment and phytostabilization of an industrial residue contaminated with Zn and Cd. **Sci. Agric.**, v.64, n.5, p.506-512, Piracicaba, 2007.

SANTOS; E. A. *et al.* Ocorrência de fungos micorrizicos em plantas daninhas. In: **Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 27.**, 2010, Ribeirão Preto – SP, pp. 677-682.

SANTOS, M. G.; SYLVESTRE, L. da S. ; ARAUJO, D. S.D. de. **Análise florística das pteridófitas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil**. *Acta Bot. Bras.* [online]. 2004, vol.18, n.2, pp. 271-280. ISSN 0102-3306.

SANTOS, V. L. da S. **Fungos Micorrizicos Arbusculares em ecossistema de Mata Seca no Norte de Minas Gerais**. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycol. Res.** 105 (12) : 1413±1421 (December 2001). # The British Mycological Society DOI: 10.1017/S0953756201005196

SCHÜBLER, A.; WALKER C. **The Glomeromycota – a species list with new families and new genera**. *in* libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. 2010. Disponível em < http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/Schuessler&Walker2010_Glomeromycota.pdf > e < <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/> > Acesso em jul de 2012.

SILVA, D. K. A. *et al.* Atividade de fungos micorrizicos arbusculares em dunas litorâneas impactadas por mineração. **XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas** (Centro de Convenções do SESC , 2010 , Guarapari – ES, Brasil).

SILVA, E. M. **Condição micorrizica em espécies de *Passiflora* e efeito da simbiose na promoção do crescimento**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2008. Disponível em < www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB2284.pdf > acesso em 3 jul. 2011.

SILVA, L. J. **Processo de Landfarming para Tratamento de Resíduos Oleosos**. PROGRAMA EQ-ANP Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural Processo. UFRJ. 2009. Disponível em: < <http://www.eq.ufrj.br/prh13/download/?prh13-processo-de-landfarming-tratamento-residuos-oleosos.pdf>> (Dissertação de Mestrado). Acesso em: 06 de jun.2010.

SILVA, S. da; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.12, p.1749-1757, dez. 2006

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, Márcio R.; STÜRMER, Sidney L. - Fungos Micorrízicos Arbusculares- **Rev. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 25- março/abril 2002 – PP 18-21.

SMITH, S. E.; READ D. J. Mycorrhizal Symbiosis. **Academic Press**. London: 1997. 605 p

SOUZA, E. F. de; PERES M. R.; MORAES S. B. de. Avaliação do desempenho de surfactantes para a solubilização de fases líquidas não aquosas em meio aquoso. **Quím. Nova**, Vol. 33, No. 3, 532-538, 2010

SOUZA, F.A. de. **Biology, ecology and evolution of the family Gigasporaceae, arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota)**. 2005, 157 p. Tese (Doutorado) - Netherlands Institute of Ecology, Leiden University, Netherlands. Disponível em < <https://openaccess.leidenuniv.nl/bitstream/handle/1887/3400/Part%201.pdf?sequence=10>> Acesso em : 15 de jun. 2012.

SOUZA, R. G. *et al.* Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em área de caatinga, na Região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, V.26, n.1, p.49-60, mar. 2003.

SOUZA, R. C. de. **Caracterização da biota do solo da restinga de Marambaia, RJ, e estabelecimento de simbiose micorrízica em *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

SOUZA, V. C. de *et al.* Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.10, n.3, p.612–618, 2006. Campina Grande, PB, DEAg/UFCG.

TRUFEM, S. F. B. Diversidade no Reino Fungi: Zigomycota. 35-42 pp. In: Joly, C. A & Bicudo, C. E. M.;orgs Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brazil: Síntese do Conhecimento ao Final do século XX, 1 Microorganismos & Vírus; Canhos, V. P. C. & Vazoller, R. F. – São Paulo, FAPESP, 1999.

TANG, J. *et al.* Bioremediation of Petroleum Polluted Soil by Combination of Ryegrass with Effective Microorganisms. **Journal of Environmental Technology and Engineering** , 2010, 3(2):80-86.

VAZ, M.J. **Biodegradação ex-situ e avaliação da atividade biológica de solos contaminados por hidrocarbonetos**. 2010, 102 p. Mestrado (Dissertação). Universidade de Santa Cruz do Sul- UNISC-RS. Disponível em Portal Domínio Público. Acesso em 3 ago 2010

VIDALLI, M. Bioremediation: An overview. **Pure Applied Chemistry**. v. 73, pp. 1163–1172. 2001. Disponível em < <http://www.iupac.org/publications/pac/pdf/2001/pdf/7307x1163.pdf>> acesso em 14 de out de 2010.

3 ARTIGO 2

POTENCIAL DE FMAS AUTÓCTONES DE PSAMÓFILAS-REPTANTES PARA MICORRIZORREMEDIAÇÃO DE SOLO DE RESTINGA CONTAMINADO COM HIDROCARBONETO DO PETRÓLEO.

3.1 Resumo

Um problema crescente que ameaça a existência e a sustentabilidade dos ecossistemas de restinga é a sua contaminação por hidrocarboneto derivados do petróleo, principalmente pelos derramamentos decorrentes de falha no transporte de tais produtos, vazamento em tubulações subterrâneas que cortam aqueles ambientes, e postos de combustíveis em funcionamento em suas proximidades. Não obstante ser identificadas diversas espécies de FMAs em comunidades de solos halófilos de restinga pode-se inferir seu potencial biorremediador por estudos realizados em outros tipos de solo, mas que relatam os mesmos gêneros de fungos como participantes dos processos micorrizorremediadores de solos poluídos. No presente estudo desenvolveu-se metodologia para avaliação do potencial micorrizorremediador dos FMAs em um Neossolo Quartzarênico distrófico presente em formação vegetal psamófila-reptante de restinga. Utilizando-se o tolueno (hidrocarboneto integrante da classe BTEX) nas concentrações de 0 ; 0,77 e 23,5 ml kg⁻¹ solo (0,153 ml e 4,7 ml por vaso de 240 mm³), realizou-se bioensaios de micorrizorremediação. A planta-teste foi *Brachiaria decumbens* cultivada por quatro semanas sob os diversos tratamentos e inoculação com propágulos de FMAs. O delineamento experimental foi desenvolvido na presença ou ausência de propágulos de FMAs: esporos (E) e fragmentos de raízes de *Remirea maritima* micorrizados (M) combinados com duas doses de poluente: 153µl de tolueno (H₁), 4,7ml de tolueno (H₂) e duas testemunhas não contaminadas: uma não inoculada com FMAs (V) e outra inoculada com esporos (VE), em grupos experimentais com 5 repetições. Buscando testar o impacto da contaminação na planta-teste e sobre as características do solo original, não foi realizado qualquer tipo de bioestimulação (fertilização ou outras adições). Glomerosporos de FMAs foram extraídos por decantação e peneiramento úmido de amostras de Neossolo Quartzarênico distrófico coletado na restinga de Arraial do Cabo, RJ, e o seu isolamento foi realizado em placa canaletada com auxílio de lupa estereoscópica. A identificação dos esporos foi feita através de comparação com as descrições disponíveis no sítio da Coleção

Internacional de Cultura de FMAs (INVAM) e em literatura com descrição original das espécies. O bioensaio foi realizado em câmara B.O.D. com fotoperíodo, para avaliar os efeitos de tolueno na germinação, no crescimento e na colonização micorrízica de *B. decumbens* durante 30 dias. Todos os tratamentos foram submetidos a estresse hídrico (ausência de regas) nos cinco últimos dias. O delineamento experimental foi desenvolvido na presença ou ausência de propágulos de FMAs: esporos (E) e fragmentos de raízes de *Remirea maritima* micorrizados (M) combinados com duas doses de poluente: 153µl de tolueno (H₁), 4,7ml de tolueno (H₂) e duas testemunhas não contaminadas: uma não inoculada com FMAs (V) e outra inoculada com esporos (VE), em grupos experimentais com 5 repetições. Utilizando metodologia de extração e isolamento dos glomerosporos nas amostras do solo, foi observada a presença dos seguintes gêneros: *Acaulospora*, *Gigaspora* e *Glomus*, já relatados como presentes em experimentos de biorremediação ou em áreas degradadas, e as espécies *Dentiscutata cerradensis* e *Fuscutata heterogama*. O crescimento de *B. decumbens* na presença dos FMAs autóctones da restinga e de tolueno demonstrou que o inóculo e o contaminante não interferiram na germinação da planta, constatando-se, em média, 62,8% de viabilidade das sementes. Após o estresse hídrico, foi observado que os maiores percentuais de sobrevivência do vegetal foram encontrados nos tratamentos inoculados com propágulos de FMAs e com maior concentração de tolueno: VMH₂ (68,5%), VEH₂ (70,1%), indicando uma provável proteção radicular pelo fungo contra os efeitos adversos do solo e do potencial de toxicidade do tolueno. O tratamento controle (V) obteve o menor percentual de sobrevivência (26,5%), indicando os efeitos distróficos do solo sobre o vegetal, e, conseqüentemente, a capacidade que o fungo tem de contribuir positivamente na relação simbiótica nos tratamentos inoculados. Nesta situação, os maiores percentuais de sobrevivência do vegetal sob maior concentração de poluente também sugerem um estímulo abiótico pelo hidrocarboneto nos tratamentos inoculados com FMAs (VMH₂ e VEH₂) quando comparados com os demais que receberam menor concentração de tolueno: VH₁ (28,7%), VMH₁ (32,1%) e VEH₁ (42,6%) de sobreviventes. Fica evidenciada a resposta diferenciada das micorrizas em situação de estresse hídrico e sob contaminação com hidrocarboneto nas concentrações estudadas. Infere-se que o poluente pode ter sido utilizado como fonte de energia pelos fungos e bactérias, potencializando o efeito dos FMAs. A investigação ainda buscou identificar os FMAs presentes na rizosfera de *Remirea maritima*, espécie vegetal endêmica de restinga e abundante na área de coleta neste estudo. As estruturas intracelulares (hifas, vesículas e arbúsculos) foram encontradas com alta frequência e os gêneros aí identificados foram *Acaulospora* e *Glomus*.

3.2 Abstract

A growing problem that threatens the existence and sustainability of ecosystems sandbank is its contamination by petroleum hydrocarbons, primarily by spills arising from failure to transport such products, leaks in underground pipes that cut those environments, and gas stations in operation in its vicinity. Despite being identified in several species of AMF soil communities halophytes sandbank can infer bioremediation potential by studies in other types of soil, but they report the same genera of fungi as participants mycorrhizoremediation processes of polluted soil. In the present study developed a methodology for assessing the rhizoremediation potential AMF in a sandy loam type of vegetation present in creeping-psamophyte sandbank. Using toluene (hydrocarbon class member BTEX) at concentrations of 0, 0.77 and 23.5 ml kg⁻¹ soil (153 µl and 4.7 ml per pot) was held mycorrhizoremediation bioassays. The test plant was cultivated *Brachiaria decumbens* for four weeks under the various treatments and inoculation with AMF propagules. The experiment was carried out in the presence or absence of AMF propagules: spores (E) and root fragments of *Remirea maritima* mycorrhizal (M) combined with two doses of pollutant: 153µl of toluene (H1), 4.7 ml of toluene (H2) and uncontaminated two witnesses: one not inoculated with AMF (V) and one inoculated with spores (VE) in experimental groups with 5 replicates. Seeking to test the impact of contamination on the test plant and the characteristics of the original soil, had not been done any of bioestimulation (fertilization or other additions). AMF spores were extracted by wet sieving and decanting of quartz sand samples collected in the dunes Arraial do Cabo, RJ, and its isolation was performed in canaletada plate with the aid of a stereo microscope. The identification of spores was made by comparison with descriptions are available at the website of the International Culture Collection of VAM (INVAM) and literature describing the original species. The bioassay was performed in chamber B.O.D. photoperiod, to evaluate the effects of toluene on germination, growth and mycorrhizal colonization in *B. decumbens* for 30 days. All treatments were subjected to water stress (no irrigation) in the last five days. The experiment was carried out in the presence or absence of AMF propagules: spores (E) and fragments of mycorrhizal roots *Remirea maritima* (M) combined with two doses of pollutant: 153µl of toluene (H₁) 4.7 ml toluene (H₂) and two control uncontaminated: a not inoculated with mycorrhizal fungi (V) and one inoculated with spores (VE) in experimental groups with 5 replicates. Using the methodology of extraction and isolation of glomerospores in soil samples, we observed the presence of the following genres: *Acaulospora*, *Gigaspora* and *Glomus*, already reported as present in bioremediation experiments or degraded areas, and

the species *Dentiscutata cerradensis* and *Fuscutata heterogama*. The growth of *B. decumbens* in the presence of AMF native of sandbanks and toluene showed that the inoculum and the contaminant did not interfere in the germination of the plant, confirming 62.8% of seed viability. After the water stress was observed that the highest percentages of survival of the plant were found in treatments inoculated with AMF propagules and greater concentration of toluene: VMH₂ (68.5%), VEH₂ (70.1%), indicating a probable fungus root protection against the adverse effects of soil and potential toxicity of toluene. The control treatment (V) had the lowest survival percentage (26.5%), indicating the effects dystrophic soil on the plant, and therefore the ability of the fungus has to contribute positively in the symbiotic relationship in the inoculated treatments. In this situation, the highest percentages of survival of the plant at higher pollutant concentration also suggest a stimulus by abiotic hydrocarbon in treatments inoculated with AMF (VMH₂ and VEH₂) when compared with others who received lower concentration of toluene: VH1 (28.7%), VMH₁ (32.1%) and VEH₁ (42.6%) of survivors. The results showed a differential response of mycorrhizae in a situation of water stress and hydrocarbon contamination under the concentrations studied. It is inferred that the pollutant may have been used as energy source by bacteria and fungi, increasing the effect of the AMF. The research also sought to identify the AMF present in the rhizosphere of *Remirea maritima* salt marsh plant species endemic and abundant collection area in this study. The intracellular structures (hyphae, vesicles and arbuscules) were found with high frequency and genders there were identified *Acaulospora* and *Glomus*.

3.3 Introdução

A presença cosmopolita dos Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) colonizando 80 a 97% das espécies vegetais (BERBARA, SOUZA e FONSECA, 2006; NOGUEIRA, 2007) proporciona interesse da comunidade científica por tais micro-organismos nos estudos com biorremediação de solos poluídos, principalmente por metais pesados e hidrocarbonetos do petróleo (NOGUEIRA, 2001; VIDALLI, 2001; CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002; SOUZA et al., 2005; CABELLO, 2006; PAULA; SOARES; SIQUEIRA, 2006, 2007; BENTO, 2008; NAKATANI et al., 2008; TANG, 2010).

As restingas, ecossistemas costeiros que se desenvolveram sobre depósitos litorâneos arenosos quaternários, originados pelos movimentos de transgressão e regressão marinhos e pela deposição de sedimentos de origem fluvial, possuem comunidades vegetais de fisionomias herbáceas salinas bem adaptadas às condições distróficas do solo, onde a entrada de nutrientes ocorre principalmente através do *spray* marinho. (ASSUMPCÃO e NASCIMENTO, 2000; SANTOS; SYLVESTRE; ARAUJO, 2004; ARAUJO et al., 2009; BOHRER, 2009; BRASIL, 2009). Como um dos ecossistemas litorâneos mais degradados, principalmente pela pressão imobiliária (ARAÚJO, 2009; BOHRER *et al* 2009), se fazem necessárias pesquisas que venham caracterizar e quantificar a microbiota do solo e suas implicações ecológicas nesses ambientes ainda pouco estudados.

Segundo Brundrett (1991), os FMAs são comuns na grande maioria de ecossistemas terrestres, entre eles, as florestas tropicais e dunas costeiras. Alguns estudos confirmaram a presença desses fungos em solos dunares em associação com plantas de restingas (KOSKE, 1988; ALARCÓN; CUENCA, 2005; CORDAZZO; STRUMER, 2007; OLIVEIRA, 2009; BRAGA, 2008; RODRIGUES, 2008; OLIVEIRA, 2009; SILVA, 2010), no entanto, não foram encontrados estudos que avaliassem a associação dos FMAs com vegetais de restinga na presença de poluentes.

Sobre o crescimento de vazamentos de hidrocarbonetos para o ambiente, em dezembro de 2011 a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) publicou um texto explicativo sobre “áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo”. Segundo esse

relatório, em 2002 foram identificados 255 áreas contaminadas; ao final de 2005 já eram 1.596 áreas e em 2011 foram registradas 4.131 áreas. O relatório ainda aponta como maior responsável por esses vazamentos os postos de reabastecimento, os quais totalizaram 3.217 pontos (78% do total) de contaminação. Os demais responsáveis pela contaminação das áreas cadastradas são indústrias (14%); outros comercios (4%); resíduos urbanos (3%) e acidentes/agricultura/fontes desconhecidas (1%) (CETESB, 2011). Os principais grupos de contaminantes ali relatados foram: combustíveis líquidos (em 2.637 pontos), solventes aromáticos (2.587), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs (1.605), metais (543) e solventes halogenados (272).

O tolueno ou metilbenzeno (fórmula: $C_6H_5CH_3$; peso molecular = 92,15; $D = 0.87 \text{ g/cm}^3$), um solvente lipossolúvel, é um hidrocarboneto aromático, incolor e de odor característico. Sabe-se que o tolueno é um depressor do sistema nervoso central (SNC), mas seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido (FOSTER et al, 1994). O tolueno deriva compostos químicos como cresol, benzeno e fenol. Tem diversas aplicações na indústria como na fabricação de creolina, solventes de tintas, adesivos (cola de sapateiro), nylon, corantes, perfumes, desinfetantes, explosivos (TNT), inseticidas, detergente, resinas, medicamentos e embalagens de alimentos (CAMPOS, 2004; FOSTER, 1994). Sua principal participação na poluição ambiental se dá por sua presença em combustíveis automotivos como um dos componentes do BTEX (Benzeno, Tolueno, Etil-benzeno e Xileno), compostos voláteis participantes da composição da gasolina. Por sua toxicidade tem despertado importante preocupação ambiental (SILVA, 2009, OLIVEIRA; ARBILLA; SILVA, 2007). Estudos realizados em postos de combustíveis na cidade do Rio de Janeiro apontam para uma concentração desses compostos na atmosfera dos postos numa taxa 158 vezes maior que a encontrada no restante da cidade (OLIVEIRA; ARBILLA; SILVA, 2007). A volatilidade dessas substâncias e a presença marcante de ventos nas regiões litorâneas podem transferir esses poluentes para ambientes naturais, como as restingas, contaminando fauna, flora e solo de forma preocupante.

As restingas também podem sofrer impactos diretos por petroderivados por serem atravessadas por oleodutos e gasodutos, além de tubulações de transporte de resíduos de área de refinamento de petróleo (água de produção), tubulações estas sujeitas a falhas e consequentes vazamentos, como os que ocorriam frequentemente na Restinga de Jurubatiba, em Cabiúnas, Macaé-RJ, até serem desativados (FERREIRA; MORAES; SANTOS, 2005).

Neste cenário destacam-se pesquisas que visam minimizar os impactos de atividades antrópicas em ecossistemas naturais sem introdução de espécies exóticas que, ao longo do

tempo, possam trazer resultados indesejados (RODRIGUES, 2008; BOURSCHEID; REIS, 2010; FERREIRA, 2004).

Estudos de identificação e caracterização de espécies e ecologia do solo de ambientes litorâneo empreendidos nas duas últimas décadas (THOMAZ; MONTEIRO, 1992; KOSKE, 1988; ASSUMPÇÃO; NASCIMENTO, 2000; ANDRADE, 2005; CORDEIRO, 2005; FERREIRA; MORAES; SANTOS, 2005; BOEGER, 2006; CORDAZZO; STÜRMER, 2007; BRAGA, 2008; RODRIGUES, 2008; ARAUJO *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2009; BOHRER, 2009; OLIVEIRA, 2009; KUSTER, 2010) trazem perspectiva de uma crescente sensibilização da importância de conservação das restingas. Nessa trajetória de crescimento do interesse pela investigação da biodiversidade do solo da restinga estão os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) (ALARCÓN; CUENCA, 2005; SILVA, 2010). Em dunas costeiras, onde são encontradas formações vegetais de restinga, são relatadas 35 espécies de FMAs pertencentes ao filo Glomeromycota (SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002).

Unir o conhecimento adquirido sobre ecologia dos FMAs e a biorremediação de solos contaminados em ambientes de restinga, particularmente por hidrocarbonetos do petróleo, pode ser um passo a ser dado para o aperfeiçoamento da biotecnologia de remediação desenvolvida até o momento.

3.4 FMAs e a micorrizorremediação de solos degradados por poluentes

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são amplamente estudados quanto ao seu potencial biorremediador em solos contaminados com poluentes, tais como metais pesados e hidrocarbonetos do petróleo, provavelmente devido a melhora na nutrição vegetal e às propriedades agregadoras e estabilizadoras de solos que eles proporcionam (SOUZA, 2005; BERBARA, SOUZA e FONSECA, 2006; KHAN, 2006). A capacidade de biorremediação que esses fungos possuem varia de acordo com a interação solo-planta-fungo, onde as condições abióticas locais e a genética dos simbioses influenciam a dinâmica das relações envolvidas na microbiota rizosférica associada (SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002; BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006).

Quanto à seleção que os FMAs sofrem em solos poluídos com hidrocarbonetos, Paula (2007) destacou que indivíduos extraídos de solos que já haviam sofrido contaminação por derivados do petróleo foram mais eficazes no processo de biorremediação do que aqueles das mesmas espécies extraídos de solos não contaminados quando expostos aos testes de contaminação *ex situ*. Tal adaptação também pode ser apontada pelos resultados obtidos por

Cabello (2006) onde as raízes dos vegetais em solos poluídos por hidrocarbonetos apresentaram maior percentual de vesículas do que as de solos não poluídos.

Paula (2007) avaliou os efeitos de antraceno (concentrações de 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 g kg⁻¹ solo) e creosoto (concentrações de 0; 0,5; 1; 2 e 3 g kg⁻¹ solo) no crescimento e na colonização micorrízica de *Brachiaria brizantha* e *Pueraria phaseoloides* por *Glomus etunicatum*, e relata que tais contaminantes exerceram ação inibitória sobre o a simbiose micorrízica em até 90% após seis semanas de cultivo.

Bento (2008), em experimento conduzido em casa de vegetação por 90 dias, testou fitorremediação de solo contaminado artificialmente por petróleo bruto (com cinco níveis de contaminação: 0,10, 30, 50, e 70 g.kg⁻¹) por sete espécies de leguminosas arbóreas (25 sementes por espécie) inoculadas com cinco espécies de FMAs: *Gigaspora margarita*, *Entrophospora contigua*, *Scutellospora calospora*, *Scutellospora heterogama* e *Glomus clarum* consorciado com um coquetel de quinze isolados rizóbios, encontrando percentuais de remoção de mais de 50% de TPH (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) no nível de 0,10 de contaminação, em todas as espécies vegetais testadas.

Nakatani e colaboradores (2008) estudando atividade rizosférica da comunidade bacteriana e FMAs em plantas de sistema de landfarming de resíduos petroquímicos relatou densidade elevada de esporulação micorrízica (entre 900 a 4.800 esporos por 50cm³), observando a maior esporulação em *Brachiaria decumbens*. Quatro espécies de FMAs foram ali encontradas: *Glomus intraradices*, *Acaulospora morrowiae*, *Paraglomus occultum* e *Archaeospora trappe*. Estas três últimas espécies ainda não haviam sido relatadas em área contaminada por hidrocarbonetos do petróleo (NAKATANI *et al.*, 2008).

Cabral e colaboradores (2010) relataram a cinética e a capacidade de retenção de metais (Cu, Zn, Cd e Pb) por micélios de FMAs cultivados em vasos com *Brachiaria decumbens*. Estes autores concluíram que *Glomus clarum* e *Gigaspora gigantea* foram os mais eficazes na retenção de Cu e Zn, sugerindo o uso promissor destes fungos na técnica de biorremediação de solos poluídos.

Ceola (2010), estudando a colonização micorrízica em área de mineração de carvão no Sul de Santa Catarina revegetada com *B. decumbens*, sugere o estabelecimento de programa de inoculação de FMAs (preferencialmente *Glomus clarum*) como estratégia de revegetação de áreas mineradas a serem recuperadas.

Silva e colaboradores (2006) avaliando ação biorremediadora de 14 isolados de FMAs, concluíram que as espécies *Acaulospora spinosa*, *Acaulospora morrowiae* e *Gigaspora gigantea*, foram eficientes remediar solo artificialmente contaminado com metais (Cu, Zn,

Pb e Cd) e cultivado com *B. decumbens*. De acordo com a espécie de FMAs, variou a capacidade de extração dos poluentes do solo pela planta em até 63% dos teores iniciais de contaminação e acumulação de até 1000% de Cu nas raízes do vegetal, e ainda esta capacidade de bioacumulação se relacionou à presença de glomalina produzida pelos FMAs. Essa glicoproteína, descoberta em 1996 pela cientista americana Sara F. Wright, além de sua implicação na biorremediação de solos contaminados, promove também a agregação das partículas do solo viabilizando o desenvolvimento da estrutura do solo (WRIGHT e UPADHYAYA, 1998; BERBARA ; SOUZA; FONSECA 2006; DINIZ, 2011).

Estudos em solos poluídos que se propuseram a avaliar os efeitos fitorremediadores de plantas em simbiose com FMAs autóctones, relataram efeitos positivos na utilização de esporos isolados de cultura monoxênica e monospórica (a partir de um único esporo) ou micélios dos mesmos, originados de comunidades de fungos nativos (KHAN, 2006; NOGUEIRA, 2007; BENTO, 2010; CABRAL,2010).

Flores-Aylyas (2003) sugeriu a aplicação de substâncias estimulantes da micorrização, o que pode favorecer a colonização de novas plantas a partir de propágulos presentes no solo. Tal possibilidade aponta para a necessidade de pesquisas em ambientes naturais impactados por hidrocarbonetos do petróleo em que seja possível a estimulação da micorrização por inoculação de FMAs autóctones.

No presente trabalho foram avaliados diversos tratamentos, inoculados ou não com FMAs, para quebra de dormência de sementes de *B. decumbens* semeadas em amostras de Neossolo Quartzarênico presente na formação vegetal psamófila-reptante de restinga; foram testados os efeitos da inoculação de FMAs autóctones sobre o crescimento de *Brachiaria decumbens* e a sua colonização micorrízica em solos de restinga contaminado por tolueno em condições controladas. O trabalho também teve o objetivo de identificar estruturas micorrízicas nas rizosferas e raízes de *Remirea marítima* e levantar os FMAs dominantes presentes na formação vegetal psamófila-reptante de restinga.

Buscando testar a tolerância das micorrizas arbusculares à contaminação com hidrocarboneto e as possíveis variações de resultados dependentes apenas do nível de simbiose fungo-planta, foram realizados cultivos em vasos sem a aplicação de bioestimulação (acréscimo artificial de nutrientes ao substrato) ao solo autoclavado para os testes de micorrizorremediação.

Previamente, foram realizados testes de quebra de dormência das sementes de *B. decumbens*, nos quais foram obtidos os percentuais de germinação das mesmas e percentuais de crescimento da planta em Neossolo Quartzarênico distrófico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local da coleta de amostras

A área de estudo está situada na Restinga de Massambaba, no bairro Figueira- Arraial do Cabo - RJ, situada aproximadamente a $22^{\circ}56'S$; $42^{\circ}11'W$ no litoral do Rio de Janeiro (figura 1) e tem em seu entorno salinas e residências, estando sujeita a contínua influência de ações antrópicas. Porém, devido a estar inserida numa área de preservação ambiental (RIO DE JANEIRO, 2009) conserva ainda características marcantes do ecossistema de restinga como dunas e formação vegetal herbáceas, arbóreas e halófilas-reptantes (THOMAZ, L. D.; MONTEIRO, 1992; BOHRER *et al* 2009).

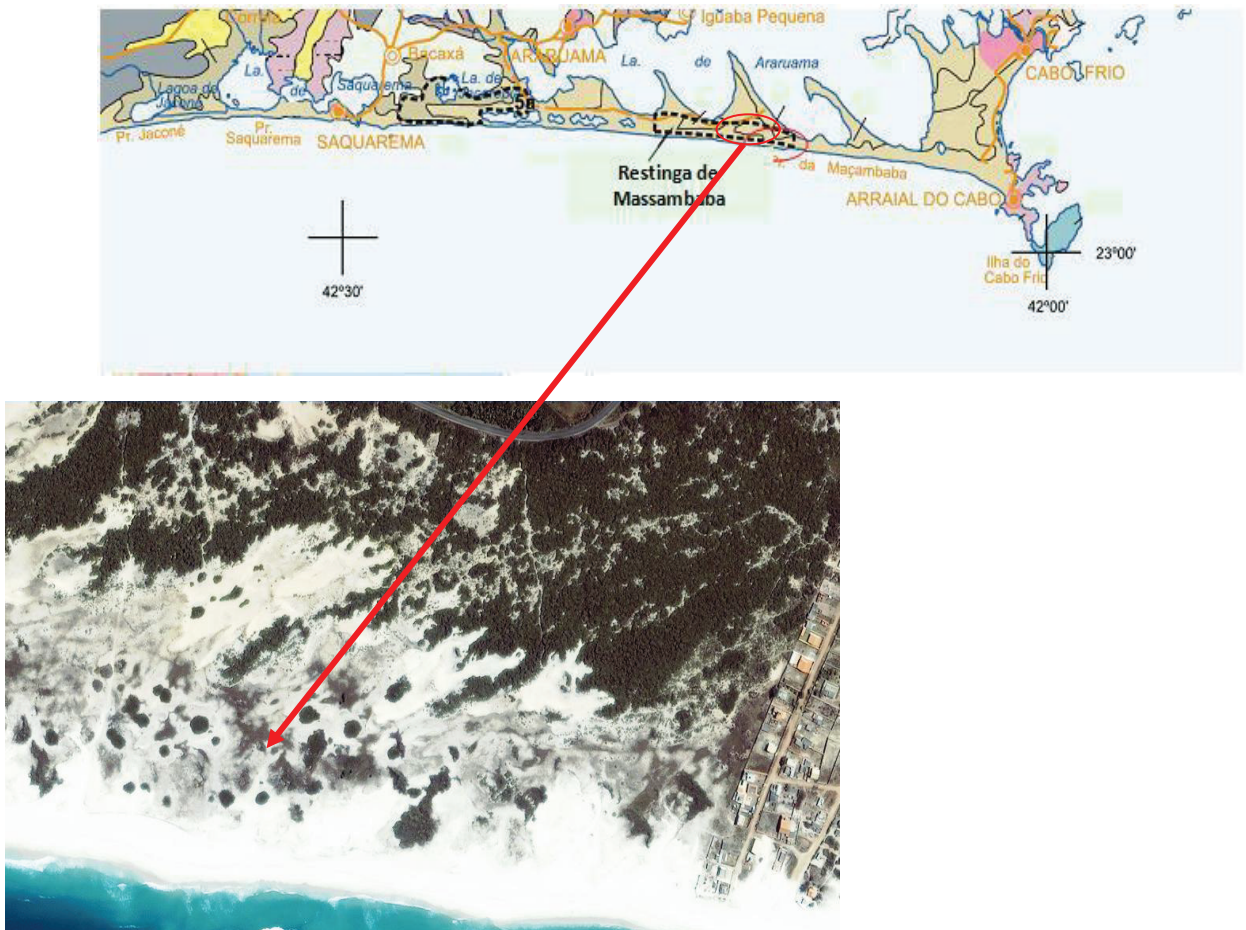


Figura 1. Localização da Área de estudo na Restinga de Massambaba- RJ. Fontes: CPRM-Serviço Geológico do Brasil (2012) e IF Fluminense-Macaé, RJ - adaptadas. Latitude: $22^{\circ} 56' S$; Longitude: $42^{\circ} 11' O$.

Optou-se pela realização de coletas que abrangessem ambas as formações vegetais pós-praia (halófila e psamófila-reptante), com critério de coleta de solo e exemplares de

plantas que estivessem presentes em ambas as formações dentro do sítio previamente estabelecido (Figura 2)



Figura 2. Duna fixa na formação psamófila-reptante da Restinga de Massambaba no bairro Figueira em Arraial do Cabo- RJ – local de coleta das amostras (Foto do autor).

O clima da região é marcado por duas estações bem definidas: úmida (chuvosa) no verão e seca no inverno, com duração de aproximadamente 5 meses, é classificado como BSh, uma variação do clima semiárido quente de Köppen (ARAUJO, 2009; BOHRER, 2009; KOTTEK *et al*, 2006). Nas figuras 3A e 3B estão apresentadas a precipitação mensal e as médias mensais de umidade relativa do ar e de temperatura, ocorridas na região no período de coletas.

As coletas foram realizadas em cinco campanhas entre os meses de outubro de 2011 e maio de 2012: uma em 03/10 (fim do período seco) e duas em 12/12/2011 e 30/01/2012 (período chuvoso) e duas em 19/3 e 21/05/2012 (início da estiagem com chuvas esporádicas).

Com os dados climatológicos obtidos pela Estação Meteorológica Automática A606, do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) em Arraial do Cabo, para a latitude 22,9761°S e Longitude 42,0213°W, observou-se, no período que abrangeu setembro/2011 a julho/2012, que a precipitação mensal variou de 0,20 a 256 mm mensais (média mensal de 97,18 mm) com um total de 1.166,10 mm no período; a umidade relativa do ar média foi de 74,76 % e a temperatura variou entre 20 e 36°C, com uma média mensal de 23°C aproximadamente .

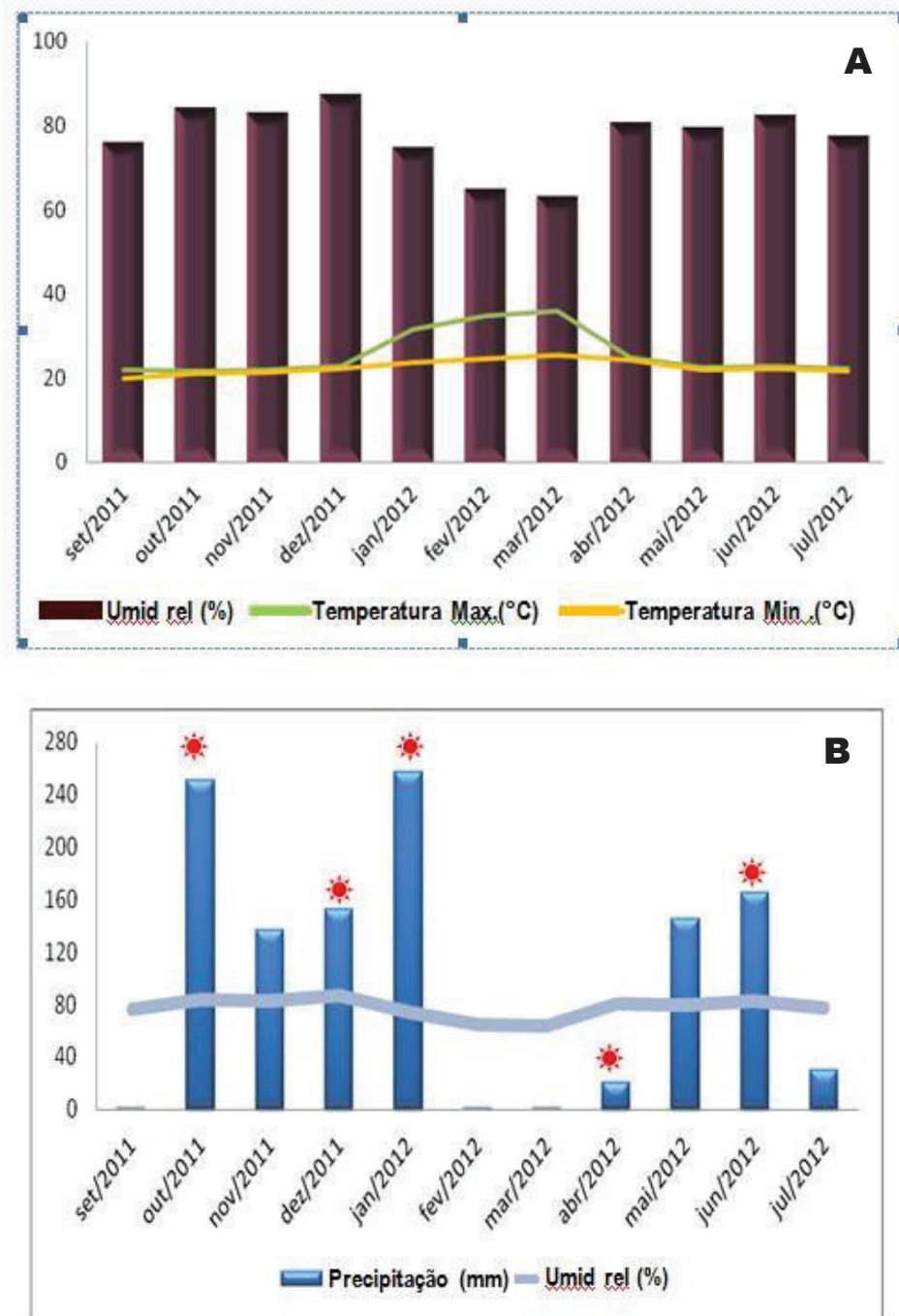


Figura 3– A: Comparação entre umidade relativa do ar (%), temperatura máxima (°C), e temperatura mínima (°C); **B –** Comparação entre precipitação mensal (mm) e umidade relativa do ar (%); médias observadas na estação convencional A606, localizada no município de Arraial do Cabo-RJ, entre os dias 01 de setembro de 2011 a 27 de julho de 2012, período no qual ocorreram as cinco coletas de solo e plantas na área de estudo. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), 2012. (☀) Época de amostragem.

Entre as espécies ali relacionadas encontra-se a *Remirea marítima* - aqui abordada como objeto de estudo na simbiose com micorrizas arbusculares autóctones – espécie vegetal que, juntamente com a *Ipomoea pes-caprae*, *Panicum racemosum* e *Blutaparon portulacóide*.

Na formação psamófila-reptante foi encontrada uma consorciação desses quatro tipos vegetais que tem seus rizomas entrelaçados subterraneamente criando uma “rede fixadora” das dunas, não obstante já haver relatos de averiguação da importância de exsudados vegetais e da microbiota rizosférica para tal agregação do solo (BERBARA et al. 2006; KUSTER, 2010).

4.2 Metodologia de amostragem do solo e plantas para estudo

As coletas foram realizadas conforme descrito abaixo:

- a) Ao longo de 2,4 km de praia, a partir do limite leste da restinga de Massambaba, no bairro Figueira, e entre 25 e 50 m da linha de maré alta, foram delimitados cinco sítios (1 a 5), formando retângulos paralelos ao mar de aproximadamente 40m comprimento por 15m de largura, com intervalo entre os sítios variando 150m aproximadamente.
- b) Em cada dia de campanha de amostragem designou-se um sítio diferente para realização das coletas. Dividiu-se cada sítio em três parcelas e em cada parcela foram coletadas dez subamostras que, juntas, formaram uma triplicata de amostra composta por sítio (aproximadamente 2kg de solo por amostra composta) (SOUZA e GUERRA 1998; SILVA, 2009). Cada amostra composta recebeu a seguinte designação: Sítio 1 em 03/10/11: P1,P2,P3; Sítio 2 em 12/12/11-P4,P5,P6; Sítio 3 em 30/01/12- P7,P8,P9; Sítio 4 em 19/03/12 –P10,P11,P12; Sítio 5 em 21/05/12- P13, P14, P15 (Figura 4).
- c) Em cada um dos pontos foram coletadas diversas amostras de rizosferas da comunidade da formação psamófila-reptante juntamente com exemplares de *Remirea maritima*. Os pontos de coleta foram realizados em zigue-zague, entre as partes mais baixas e mais altas das dunas frontais. A profundidade variou entre 20 a 50 cm dependendo do soterramento dos rizomas das plantas sob a areia solta.
- d) Devido ao fato de haver um consórcio de quatro espécies dominantes de plantas na formação psamófila-reptante da área de estudo (Figura 5), a coleta de solo e extração de esporos autóctones envolveu as rizosferas também dessas plantas. No entanto, neste trabalho, a identificação de estruturas fúngicas nas raízes foi realizada somente em *Remirea maritima*. Parte da amostra de raízes de *R. maritima* coletadas na área de estudo foram utilizadas para identificação de estruturas de micorrizas arbusculares e outras estruturas intra e intercelulares.



Figura 4– Diagrama de metodologia de amostragem de solo na formação vegetal-psamófila reptante da Restinga de Massambaba, em Arraial do Cabo, RJ. Note-se que em cada sítio foi formada uma triplicata de amostras compostas, totalizando 5 repetições de amostragem do solo.

- e) Todas as amostras foram transportadas para o laboratório, depois de embaladas individualmente em sacos plásticos, marcadas com códigos de sua localização, para posterior separação e identificação das comunidades de FMAs presentes nas rizosferas e raízes coletadas. Aproximadamente 3 kg de solo foram extraídos em cada sítio da área de estudo. Não foi realizado qualquer procedimento para correção do solo, visando testar suas características distróficas mediante contaminação no crescimento vegetal.
- f) Anteriormente ao procedimento de extração de esporos, foi realizada a homogeneização e quarteamento dos 3 kg de substrato, a fim de se obter uma amostra significativa (SILVA, 2009), dos quais foram separados 400g para posterior extração de esporos por peneiramento úmido. As sobras de cada amostra de solo foram separadas para testes de crescimento e inoculação de FMAs sob contaminação e não contaminação com tolueno e FMAs (micorrizorremediação). Estes formaram o substrato para os oito tratamentos do bioensaio (13,2 kg), após secos, peneirados (1 mm) e autoclavado em 3 ciclos de 121°C, por 2 horas cada, em dias consecutivos, a fim de eliminar propágulos viáveis de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) indígenas.
- g) Das amostras compostas coletadas em três dos sítios acima (Sítio 1, 3 e 4), foram também separados outros 400g de solo de 6 pontos de coletas: Sítio 1- P1 e P2; Sítio 3 – P7 e P8; e Sítio 4 – P10 e P11. Destes, foram separadas, após quarteamento de cada amostras, 3 subamostras de 50 ml (triplicata) para extração dos esporos pelo método de peneiramento úmido e centrifugação com sacarose, totalizando 18 subamostras analisadas para quantificação do número de esporos presentes. O isolamento dos

esporos, após a extração, foi realizado em placa canaletada e vidro de relógio com o auxílio de alfinetes entomológicos e lupa estereoscópica (40x de aumento), sendo posteriormente contados.



Figura 5 - Espécies vegetais endêmicas de restinga consorciadas presentes na Restinga de Massambaba (ARAÚJO,2009) na região mais próxima à praia (formação vegetal psamófila-reptante): 1- *Remirea marítima*; 2- *Ipomoea pes-caprae*, 3- *Panicum racemosum*; 4- *Blutaparon portulacoides* (fotos do autor).

A *Remirea marítima* é uma planta endêmica de restinga da família das Cyperaceae, cuja classificação é a seguinte: Reino: Plantae; Subreino: Tracheophyta (plantas vasculares); Superdivisão: Spermatophyta (fanerógamas ou plantas com sementes); Divisão: Magnoliophyta (planta de flor); Classe: Liliopsida (monocotiledôneas); Subclasse: Commelinidae; Ordem Cyperales; Família: Cyperaceae; Gênero: *Remirea* Aubl.-Beachstar; Espécie: *Remirea marítima* Aubl.- Beachstar (ZECCA, 2008; USDA, NRCS, 2012).

Na comunidade florística da área de estudo observou-se uma propagação expressiva de *R. marítima* na zona móvel das dunas frontais (aprox. 50 metros da praia), onde o vento promove o movimento constante de areia, marcando assim a delimitação entre a formação vegetal e a zona de marés. Nessa zona halófito, com exceção das quatro espécies aqui citadas, foi rara a presença de outros vegetais.

Ao expor as raízes de *Remirea* constatou-se que sua rizosfera era abundante, apresentando agregação de solo o que sugere maior presença de fatores de agregação

importantes, como exsudados do vegetal e micélio de fungos além de outros micro-organismos. Assim, esta planta foi escolhida para realização de experimentos de remediação, servindo como inoculante de propágulos de FMAs através de raízes colonizadas de *Remirea marítima* (Figura 6).

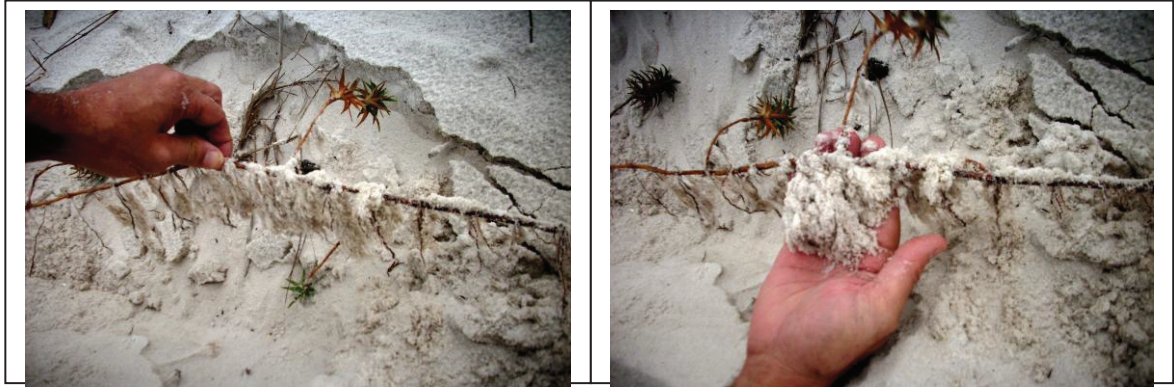


Figura 6 – Agregação de solo em rizosfera de *Remirea marítima* presente na área de estudo (fotos do autor).

Exemplares de *R. marítima* coletados (figura 7) na área de estudo foram comparados com pranchas disponíveis em sites de herbários publicadas na internet (PICKERING,2012; ROYAL BOTANIC GARDEN EDINBURGH, 2012), onde se pode comparar inflorescência, anatomia de raízes e rizomas característicos. Além disso, observam-se as mesmas características anatômicas foliares descritas por Boeger e Gluzezak (2006): área foliar pequena e coriáceas com baixo grau de suculência, verticalmente orientadas e com folhas hipoestomáticas, ou seja, com estômatos presentes apenas na face abaxial da folha.

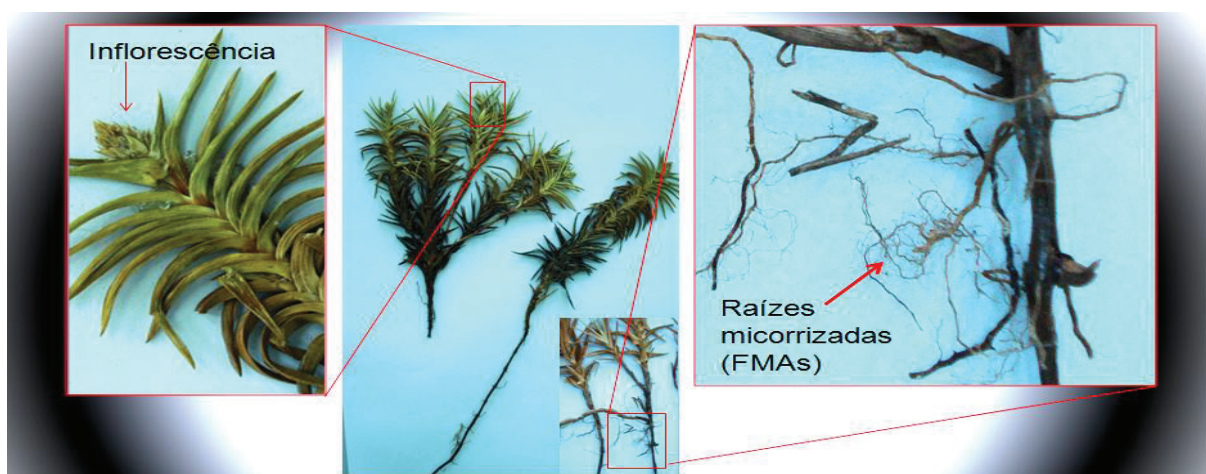


Figura 7 – Exemplares de *Remirea marítima* coletada na área de estudo. Inflorescência do vegetal e raízes micorrizadas de onde foram extraídos fragmentos para preparação do inóculo para o bioensaio.

Os glomerosporos foram comparados com chaves taxonômicas amplamente difundida por órgãos especializados e publicações de pesquisadores especialistas em taxonomia de FMAs, como Schüßler e Walker (2001, 2010), Siqueira, Lambais e Stürmer (2002); Goto, Costa e Maia (2009); Berbara e colaboradores (2006); Silva (2008) e Khade (2008); e no website da INVAM (International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi), estando ainda em fase de classificação para posterior publicação.

Utilizando metodologia de coloração de raízes e visualização de colonização micorrízica (UFLA, 2010; SOUZA; GUERRA, 1998), as raízes armazenadas em álcool 50% foram cortadas em fragmentos de 1 a 1,5 cm de comprimento depois, em backer de 50 ml, submetidas ao clareamento em solução de KOH 10% por 60 minutos a uma temperatura de 90 °C em banho Maria. As raízes de *R. maritima* são bastantes escuras, porém bem finas. Por isso, alguns testes de acidificação foram realizados. Bons resultados foram obtidos imergindo-as em solução de ácido clorídrico 1% por 3 minutos e não acidificando as raízes mais finas. As raízes que continuavam escuras foram submetidas ainda a uma solução de peróxido de hidrogênio alcalino (0.5% NH₄OH e 0.5% v/v de H₂O₂ em água). As raízes claras, depois de lavadas, foram colocadas em backer de 50 ml com solução de azul de trypan 0,05% durante 60 minutos a 90°C em banho Maria. As raízes mais claras e finas não foram deixadas corando no banho Maria após clareamento, mas deixadas em placa de petri imersa na solução azul de trypan em temperatura ambiente por 48 horas, obtendo-se também bom resultado.

A presença de estruturas fúngicas de FMAs nas raízes avaliadas e os esporos do solo rizosférico foram observados em microscópio de epifluorescência Olympus BX51 acoplado a uma câmera fotográfica Olympus DP72 no Laboratório de Microscopia do Grupo de Biologia do Instituto de Estudos do Mar Alte. Paulo Moreira (IEAPM), Arraial do Cabo – RJ, equipamentos utilizados para obtenção das imagens.

Nos bioensaios de micorrizorremediação a decisão de se utilizar *Brachiaria decumbens* como vegetal-teste, mediante presença de poluente, baseou-se em pesquisas sobre a utilização desta última em estudos de biorremediação de solos poluídos e de inúmeros relatos sobre sua capacidade de se associar a FMAs. Não foram encontrados, porém, relatos com plantas halófilas-psamófilas neste tipo de experimento.

Procedeu-se, então, os testes preliminares de germinação e crescimento de *Brachiaria decumbens* em solo coletado na área de estudo, peneirado e autoclavado em 3 ciclos de 2 horas/121°C/ 1 atm em dias consecutivos. As sementes de *Brachiaria decumbens* foram obtidas no Instituto de Agronomia - Departamento de solos da UFRRJ. Os resultados foram

submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05\%$) utilizando-se o programa de estatística GraphPad Prism (versão 5.00 -2007).

Antes do ensaio que avaliou o potencial micorrizorremediador dos FMAs, foi realizado teste de germinação das sementes de *B. decumbens* em substrato originado de solo de restinga, sem bioestimulação (acréscimo de nutrientes), onde as sementes foram submetidas a 4 tratamentos em triplicata (Quadro 1): um controle onde as sementes foram semeadas *in natura* sem inoculação de propágulos de FMAs (SI1); desinfestação com hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos (SI3); embebição por 24 horas em água destilada autoclavada (SI2 e CI4) para quebra de dormência. As sementes dos tratamentos 2 e 4 foram também submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio a 1% por três minutos (SILVA, 2007 – adaptado). Posteriormente, as sementes tratadas foram semeadas no substrato extraído da área de estudo. O tratamento CI4 foi inoculado com propágulos de FMAs (esporos e fragmentos de raízes micorrizadas) também extraídos diretamente do solo coletado objetivando a observação de influência destes na germinação das sementes e crescimento vegetal. O teste foi realizado em condições controladas em câmara de incubação (tipo BOD) com fotoperíodo de 24h e temperatura permanente de 25°C no Laboratório de Ecotoxologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM) do – IF Fluminense- Campus Cabo Frio.

Os vasos foram delineados sequencialmente em ordem numérica (1 a 12) correspondendo cada número à respectiva triplicata por tratamento:

Quadro 1 – Tratamentos das sementes de *B. decumbens* para quebra de dormência em teste de germinação.

Código	Replicata	Tratamento da semente
SI1	1(a) , 2(b) e 3(c)	<i>In natura</i> (controle)
SI2	4(a), 5(b) e 6(c)	Embebidas e desinfestadas
SI3	7(a),8(b) e 9(c)	Desinfestadas
CI4	10(a), 11(b) e 12(c)	Embebidas, desinfestada e com propágulos de FMAs

O experimento foi desenvolvido da seguinte forma: em cada vaso de 240 cm³ foram semeadas 9 sementes em 3 covas por vaso num total de 27 sementes por tratamento. Ao todo foram testadas 108 sementes (22,5% do total a ser utilizado no experimento de micorrizorremediação posterior). O objetivo principal deste teste foi obter a forma de tratamento das sementes mais adequada à quebra da dormência e o crescimento inicial do

vegetal no solo distrófico, estabelecendo assim o percentual de sementes que germinariam neste tipo de solo e o desenvolvimento da plântula em 40 dias, obtendo-se parâmetros de semeadura e crescimento do vegetal para o bioensaio de rizorremediação.

A germinação foi monitorada em uma base diária durante o período de 40 dias, no qual foram obtidos os dados para o cálculo de percentagem (%) (GORGOSZ, 2010) , como também as quantificações médias da biomassa e altura foliares e comprimento de raízes principais em cada tratamento. As regas ocorreram com o emprego de 20-30 ml de água, em média, a cada dois dias, ou de acordo com a necessidade da plântula mediante observação visual da umidade superficial do substrato. Após 40 dias de cultivo, os comprimentos das folhas e das raízes principais foram mensurados com a utilização de paquímetro, enquanto que, para determinar a biomassa, as plantas foram desidratadas em estufa de secagem (80°C por 1h e meia) e pesadas em balança digital (precisão de 0,0001). Os dados foram organizados em tabelas e analisados no programa estatísticos GraphPad Prism, versão 5.0.

4.3 Bioensaio de crescimento de *Brachiaria decumbens* na presença de tolueno

Empregou-se uma amostra composta de Neossolo Quartzarênico distrófico (EMBRAPA, 2009; BOHRER,2009; ARAUJO et al., 2009) coletado na Restinga de Massambaba, Figueira, A. do Cabo, RJ. O material do solo inicialmente foi conservado em refrigerador a 4°C para posterior aplicação dos tratamentos.

O estudo foi composto por um bioensaio realizado em câmara climatizadora - tipo B.O.D com fotoperíodo de 12h, marca Nova Ética, modelo: 411/FPD155 - para avaliar os efeitos do tolueno no crescimento e na colonização micorrízica de *B. decumbens* durante o período de quatro semanas entre 15de junho e 15 de julho de 2012.

Não foram encontrados estudos que testassem hidrocarbonetos em solo de restinga para obter doses equivalentes que pudessem servir como parâmetros para este estudo. Assim os cálculos para determinação das dosagens levaram em conta a densidade do produto e as quantidades de substrato utilizadas em estudos similares.

Dimensionando o experimento para a incubadora a ser utilizada, decidiu-se que seriam utilizados 40 vasos com capacidade para 240 ml, preenchidos com aproximadamente 60% do seu volume para minimizar a contaminação vaso a vaso. Após preparação e separação do substrato (peneiramento e autoclavagem) utilizou-se 200g do mesmo para receber a inoculação de FMAs e ou o poluente, denominado aqui de “solo-teste”. No fundo de cada vaso foram adicionados 80g de substrato e acima o solo-teste, e sobre este foram aplicados

50g do mesmo substrato, com o objetivo de minimizar a volatilização do tolueno durante o experimento.

Neste estudo as concentrações de 4,7 ml e 0,153µl de tolueno foram misturadas a 10 ml de água (Ogbo, 2008) para serem adicionadas a cada 200g (120 ml) de substrato-teste e homogeneizados com espátula. Imediatamente a cada homogeneização de um vaso, inseriu-se o volume de 50 g (30 ml) de substrato seco acima do substrato-teste.

Quanto à inoculação do substrato com FMAs, neste estudo foram utilizados fragmentos de raízes micorrizadas de *Remirea maritima* visando comparar os resultados desses tratamentos com o inoculado apenas com glomerosporos.

O delineamento experimental foi desenvolvido na presença ou ausência de esporos (E), fragmentos de raízes micorrizadas de *Remirea marítima* (M), 153µl de tolueno (T1), 4,7ml de tolueno (T2) em grupos experimentais totalizando oito tratamentos, com cinco repetições (Quadro 2).

O bioensaio foi desenvolvido de acordo com os seguintes tratamentos experimentais:

Quadro 2 – Tratamentos experimentais do bioensaio de germinação e crescimento de *B. decumbens* (V) inoculadas ou não com FMAs (E ou M) na ausência ou presença de duas doses de tolueno (H₁ e H₂); n=5.

Código	FMAs	Tolueno (em 200g de solo)
V	-	-
VH ₁	-	153 µl
VH ₂	-	4,7 ml
VMH ₁	X	153 µl
VMH ₂	X	4,7 ml
VE	X	-
VEH ₁	X	153 µl
VEH ₂	X	4,7 ml

As respectivas doses de tolueno (H₁ e H₂) foram diluídas em 200g de solo para cada vaso.

Para a inoculação do substrato foram empregados glomerosporos de FMAs extraídos de 50 ml, em triplicata, das amostras de solo da área de estudo pela técnica de decantação e peneiramento úmido e centrifugação com água (GERDEMANN & NICOLSON 1963; SOUZA e GUERRA, 1998-adaptados). Em tratamentos específicos (VHM1 e VHM2) foram utilizados como inóculo de FMAs fragmentos de raízes micorrizadas de *Remirea marítima*

coletadas nas campanhas de coleta e conservadas a 4°C em sacos plásticos contendo parte do solo coletado para manutenção da viabilidade das hifas (UFLA,2010). No peneiramento úmido foi utilizado um conjunto de peneiras com malhas de 420 e 53 µm, seguido de centrifugação em água a 3000 rpm por três minutos e em solução de sacarose a 50% a 2000 rpm durante dois minutos (GERDEMANN & NICOLSON, 1963). Os esporos foram submetidos à separação por tipos morfológicos (tamanho, cor, brilho, forma, transparência e ornamentação). A técnica de peneiramento úmido e centrifugação com água e sacarose foi adaptada às condições peculiares do solo estudado, já que glomerosporos maiores foram observados no sobrenadante antes da primeira centrifugação (com água). A adaptação necessária foi realizar a separação dos esporos sobrenadantes anteriormente à primeira centrifugação, só após isso, foi realizada a segunda centrifugação com sacarose 50%. O isolamento dos esporos, após a extração, foi feito em placa canaletada e vidro de relógio com o auxílio de alfinetes entomológicos e lupa estereoscópica (40x). Os esporos separados foram reservado em uma diluição com água destilada autoclavada e conservados, por breve período, sob refrigeração de 4°C para posterior inoculação nos tratamentos (BARTZ *et al*, 2008).

Na literatura consultada, não foi encontrada padronização sobre o número de esporos a serem utilizados em suspensão-inóculo, havendo resultados positivos para quantidade menores que vinte esporos a centenas deles suspensos em água. Na metodologia aplicada por INVAM (2010) na produção de “vasos-armadilhas” e obtenção de cultura monospórica, sugere-se que a quantidade de esporos a ser aplicada diretamente nas raízes dependerá da espécie do FMA. Neste experimento, no momento da semeadura das sementes de *B. decumbens* já tratadas de acordo com o teste de germinação aqui apresentado, em cada cova (6 covas por vaso em cinco repetições) foram aplicadas doses de 300 µl do inóculo de glomerosporos (com 4 esporos em média), extraídos de uma suspensão de 27 ml com 360 esporos aproximadamente, agitada constantemente para manter a homogeneização durante o processo de inoculação. Ou seja, nos três tratamentos inoculados (VE, VEH₁ e VEH₂) a fração do substrato inoculada em cada vaso - contendo 200g (120 ml) de substrato-teste, com ou sem poluente- recebeu aproximadamente 24 esporos. A suspensão-inóculo foi pipetadas utilizando-se micropipetas com descartador de ponteira PipetPlus 100-1000ul (PX 1000).

Em seguida, os tratamentos permaneceram em condições controladas em câmara de incubação com fotoperíodo de 12h (dia e noite) e temperatura permanente de 25°C no Laboratório de Ecotoxologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM) do – IFFluminense-Campus Cabo Frio (figura 8 a-p).

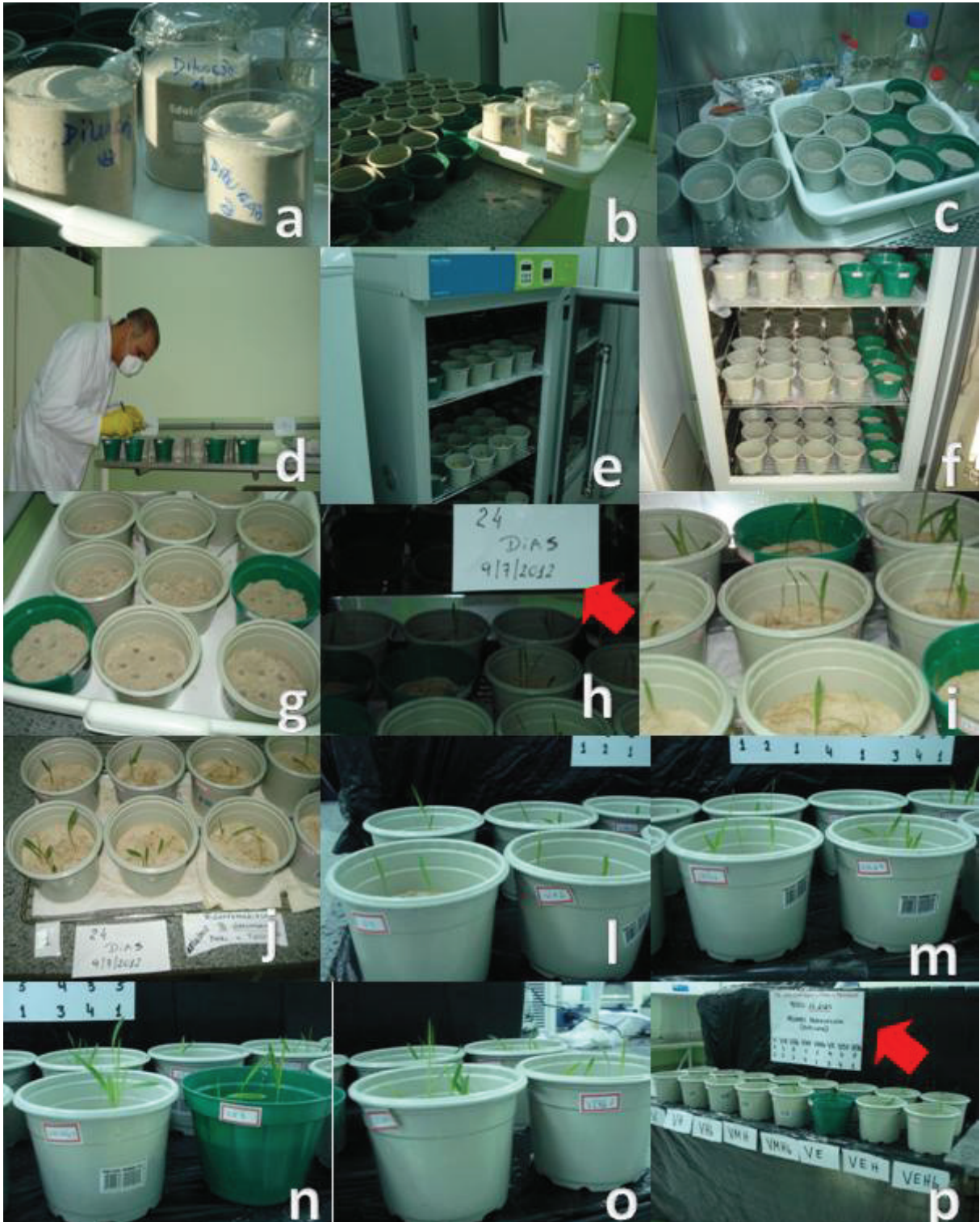


Figura 8 (a-g) - Delineamento e execução do experimento de avaliação da germinação e crescimento de *B.decumbens* na presença de tolueno e FMAs autóctones em solo da Restinga de Massambaba – RJ. **(i-p)** - Observou-se um baixo crescimento no 24º dia de cultivo antes do estresse hídrico (setas). **(l-n)** - Exposição de duplicatas de cada tratamento escolhidos que apresentavam melhor desenvolvimento das plântulas no 24º dia de cultivo.

A incubadora foi adaptada para o experimento deixando-se apenas três prateleiras para execução do experimento com espaços intercalados verticalmente para acomodar os quarenta vasos e manter uma altura entre prateleiras que não prejudicasse a rega diária e o rodízio dos vasos, o qual foi realizado a cada 4 dias tanto horizontal como verticalmente (invertendo-se as posições das prateleiras). Buscando diminuir a influência da ventilação forçada sobre a umidade interna da câmara e do substrato, efeitos estudados por Gaspar-Oliveira et al (2007) que manteve bandejas com água no germinador, decidiu-se afixar 6 tubos para centrifuga de 50ml, com 40 ml de água destilada (sem reabastecimento por todo o período em que transcorreu o experimento), posicionados dois em cada lateral das três prateleiras da incubadora (B.O.D) (figura 9).



Figura 9 - Tubo para centrifuga (seta) com 30 ml de água para minimização da evaporação promovida pela ventilação forçada no interior da B.O.D.

A germinação foi monitorada em uma base diária. A partir do 18º dia não se observou mais qualquer germinação até o final do experimento, no qual foram obtidos os dados para o cálculo de percentagem de germinação (%G). As quantificações da biomassa, altura foliar e comprimento de raízes principais foram realizadas ao final do experimento. As medidas de comprimento foliar foram realizadas na folha primária (plúmula) de cada plântula. Não foi quantificada a biomassa das raízes devido à fragilidade das mesmas não suportar o procedimento de extração dos grãos de areia aderidos fortemente a elas.

As regas diárias ocorreram com o emprego de 20-40 ml de água, ou de acordo com a necessidade da plântula mediante observação visual da umidade superficial do substrato e o crescimento vegetal. Após 30 dias de cultivo, os comprimentos das folhas e das raízes principais foram mensurados com a utilização de paquímetro, enquanto que, para determinar a

biomassa foliar, as plantas foram desidratadas em estufa de secagem (80°C por 1h e meia) e pesadas em balança digital (precisão de 0,0001).

No 25º dia após a semeadura foi aplicado a todos os tratamentos um estresse hídrico deixando-se de fazer as regas periódicas, objetivando avaliar a sobrevivência das plântulas nessas condições.

Para a análise da germinação foi calculada a porcentagem de germinação (GASPAR-OLIVEIRA, 2007) em cada tratamento. Os dados foram organizados em tabelas e os resultados submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste de Tukey com $p < 0,05$, no programa estatísticos GraphPad Prism, versão 5.0.

5 Resultados e Discussão – Parte I

5.1 Seleção, quantificação e identificação de FMAs da Restinga de Massambaba

A quantificação de glomerosporos das coletas realizadas em 6 pontos da área de estudo está apresentada na tabela 1:

Tabela 1 – Quantificação de glomerosporos na formação vegetal psamófila-reptante na Restinga de Massambaba, Arraial do Cabo- RJ.

	P1	P2	P7	P8	P10	P11
Média*	17±4,0	22±12,2	47±23,3	31±17,1	12±4,2	8±2,1
Total	52	43	142	94	37	23

* As médias foram obtidas por contagem em triplicata (50 ml) de cada ponto de coleta. As datas em que as coletas foram realizadas foram: 03/10/11(P1 e P2);30/01/12 (P7,P8); 19/03/12 (P10 e P11). A análise estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) apresentou diferença significativa apenas nas amostras entre P7 e P11.

Observou-se diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,5$) entre as amostras do dia 30/01/2012 (P3) e 19/03/2012 (P6). Nota-se a diferença de pluviosidade em cada um dos períodos: P3 ocorreu em período chuvoso (408,40 mm no bimestre dez-jan) e P6 com ausência de chuvas (0,70 mm no bimestre fev-mar). SILVE, 2011 afirmou que o número de esporos é um atributo bastante variável, já que a esporulação é dependente de diversos fatores. Alguns desses influem diretamente nos valores obtidos, tais como: forma de coleta, tamanho da amostra e a técnica de quantificação adotada.

Obteve-se uma média de 22 esporos em 50ml (aproximadamente 28 esporos/100 g) de solo. Foram separados, no total, 395 glomerosporos dos quais foram montadas as lâminas para identificação.

Foram realizadas também a identificação de estruturas infectivas (hifas intrarradiculares, arbúsculos, vesículas) nas raízes de *R. marítima* coletadas. Foram encontradas

Na área de estudo foi possível confirmar, por características morfológicas, a presença dos gêneros *Acaulospora* sp (figura 10 e); *Gigaspora* sp (figura 10 f) , *Glomus* sp (figura 10 a-c); já relatados como presentes em experimentos de biorremediação ou em áreas degradadas, e a espécie *Fuscutata heterogama* (figura 10d).

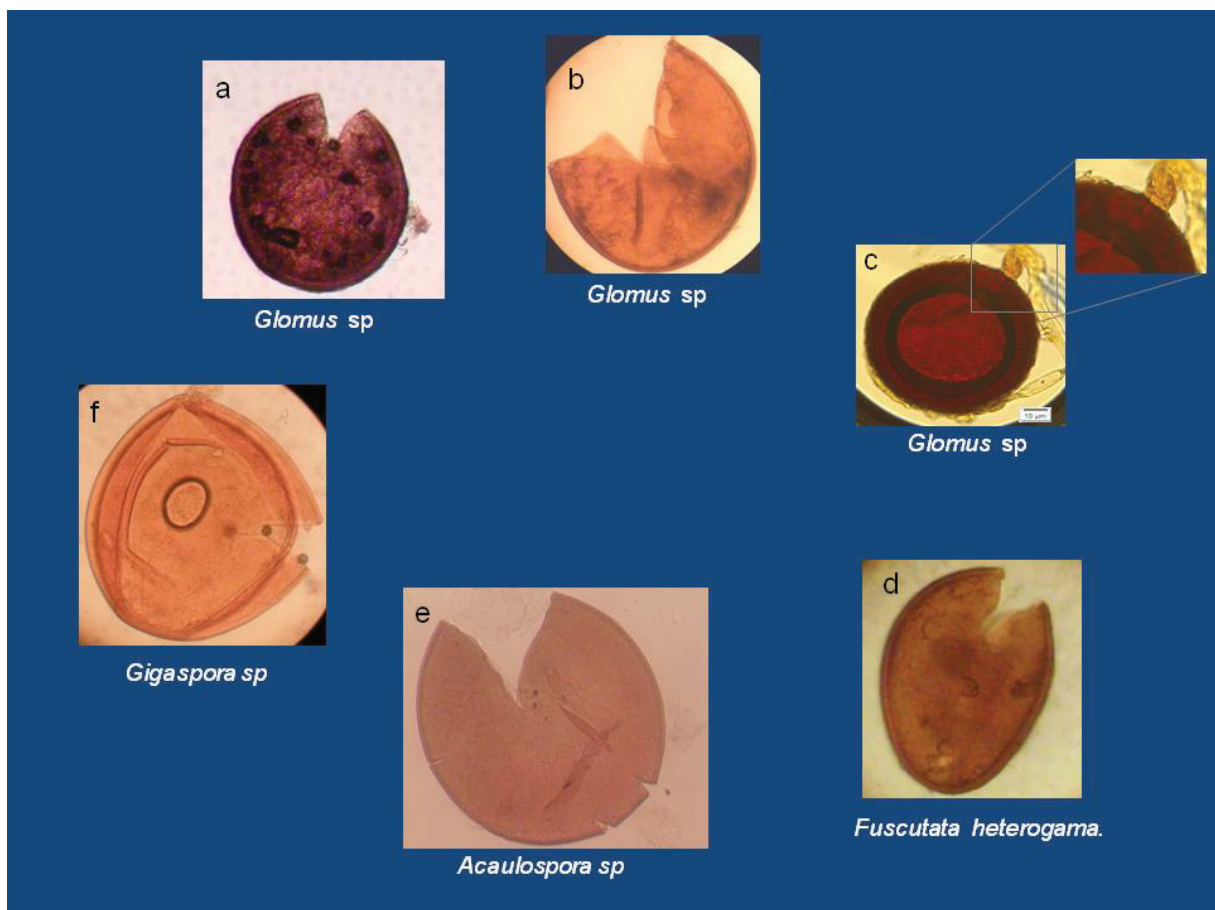


Figura 10 – Glomerosporos extraídos do solo da formação vegetal psamófila-reptante na restinga de Massambaba, A. do Cabo - RJ em coletas realizadas entre outubro de 2011 a maio de 2012. Fotos: Bruna Pozzebon.

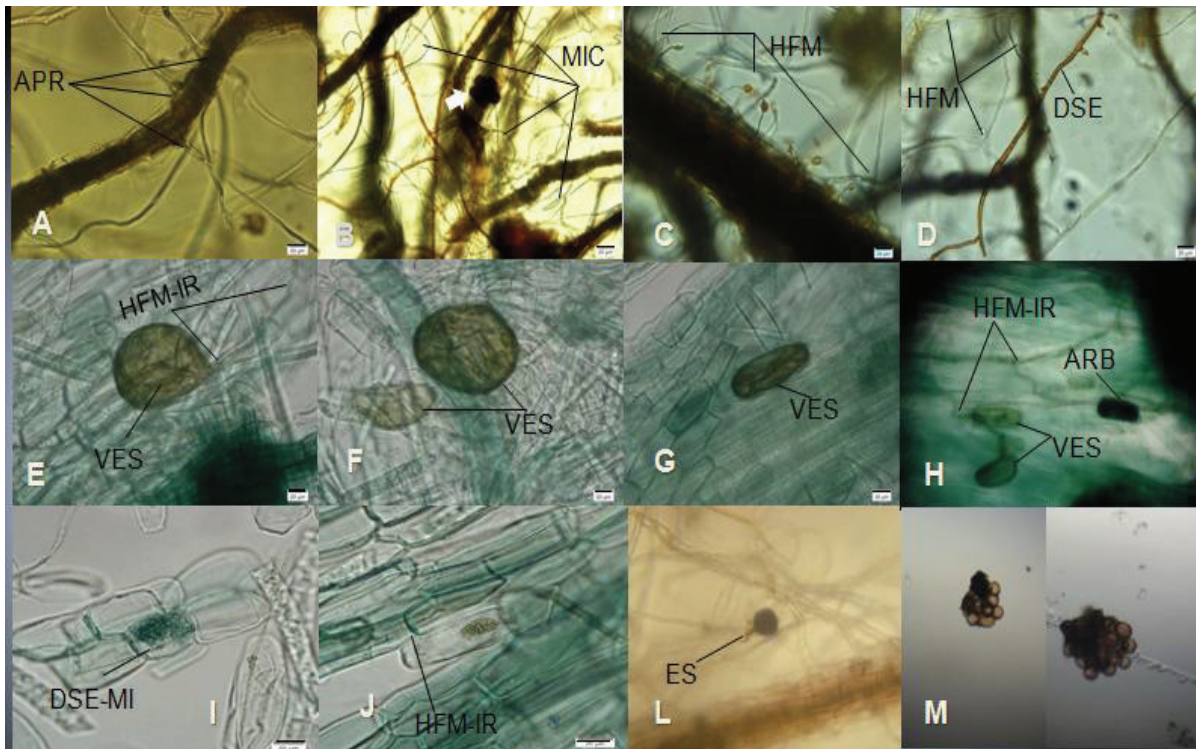
Soares et al. (2009) discutiram resultados de estudos que apresentaram influência em tratamentos com FMAs em crescimento de mudas de vegetais, observando variações em resultados dependendo da espécie de FMAs utilizada na inoculação. Em estudos com

abacaxizeiro a inoculação resultou em maior crescimento das mudas quando comparadas com as não micorrizadas. No entanto, tal estudo observou que, também em abacaxizeiro, a utilização de *Glomus etunicatum* não promoveu o crescimento das mudas, mesmo com índice de colonização de 70%.

5.2 Identificação de estruturas micorrízicas em raízes de *R. maritima*

A ocorrência de FMAs no solo da formação psamófila-reptante pôde ser constatada por meio da observação de micélio extrarradicular e estruturas intrarradiculares das amostras de *R. maritima* (figura 11).

Na figura 11D foi observada a presença de hifas septadas escuras colonizando raízes de *R. maritima*, podendo ser comparadas às “*Dark Septate Endophytes*”, encontradas em ambientes estressados (GARCIA;MENDOZA;POMAR, 2012; KNAPP; PINTYE; KOVÁCS, 2012), o que pode confirmar a hipótese de Knapp e colaboradores (2012) que tais grupos fúngicos compartilham ambientes semiáridos em uma escala global.



Imagens: Bruna Pozzebon

Figura 11 - (A-J) Estruturas fúngicas radiculares em raízes de *Remirea maritima* Aublet coletadas na restinga de Massambaba- Arraial do Cabo – RJ. APR- Apressórios de hifas cenocíticas na raiz (A). MIC- Micélio de FMAs (B). Seta branca - Esporocarpio em meio ao micélio aderido à raiz (B). HFM – Hifas cenocíticas de FMAs extrarradiculares (C,D). HFM-IR – Hifas de FMAs intrarradiculares (E,H,I). VES- Vesículas intercelulares (E,F,G,H). DSE – Hifa septada extrarradicular de *Dark Septate Endophytes* (D). DSE-MI – Microescleródio de DSE intrarradicular (I). ES – Esporo em rizosfera de *Remírea*. Barras indicam 20 mm. EC –Esporocarpio (M).

Estruturas fúngicas, hifas intra e extrarradiculares, esporos, esporocarpos, arbúsculos, vesículas nas raízes e na rizosfera de *R. maritima* confirmam que este vegetal é simbiote de FMAs (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006; BRAGA, 2008; SAGGIN JÚNIOR, 2002; SANTOS, 2010; SCHÜBLER; WALKER 2010; INVAM, 2010) e, por isso sua utilização em experimentação com solo contaminado por hidrocarbonetos é perfeitamente viável, podendo gerar resultados positivos para micorriorremediação (KHAN, 2006; LAMEGO; VIDAL, 2007).

Cordeiro (2005) e Boeger (2006) destacaram características estruturais de plantas halófitas-psamófilas, entre elas a *Remirea marítima*, que possibilitam sua adaptação a ambientes distróficos litorâneos, como as restingas. Algumas características desta zonação, composição florística e adaptações estruturais vegetais são atribuídas à presença de fatores como a concentração de nutrientes no solo, profundidade do lençol freático, deposição de salsugem e posição topográfica.

Relacionando características bioacumuladoras de fitorremediação e o relato de plantas halófitas possuem “células acumuladoras de NaCl” (MARTINS; MACHADO;ALVES, 2008) e também à capacidade de acumular íons cloreto e sódio que as vesículas de FMAs em raízes de plantas sob ambiente salino possuem (MIRANSARI, 2011) pode-se inferir a capacidade micorriorremediadora que essas plantas podem possuir quando associadas a FMAs. São questões como esta que, para indicações de biorremediação de solos de restinga impactados por poluentes oriundos de ações antrópicas, demandam pesquisas multidisciplinares, tais como bioquímica, moleculares e fisiológicas (KHAN, 2006) e apontam para a necessidade de identificação de espécies autóctones a serem utilizadas em tais técnicas biotecnológicas.

5.3 - Resultados e Discussão – Parte II

5.3.1 Avaliação da quebra de dormência do crescimento de sementes de *B. decumbens* em Neossolo Quartzarênico

Na figura 12 apresentados os resultados para o teste de quebra de dormência das sementes de *B. decumbens*, no qual os quatro tratamentos a que foram submetidas são comparados. Os tratamentos SI₂ e CI obtiveram maior crescimento de raízes, demonstrando que a melhor quebra da dormência e o desenvolvimento das raízes se apresentaram melhor quando as sementes passaram por embebição e desinfestação. Os resultados para percentual

de germinação, produção de massa seca e crescimento foliar não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$, $n=3$).

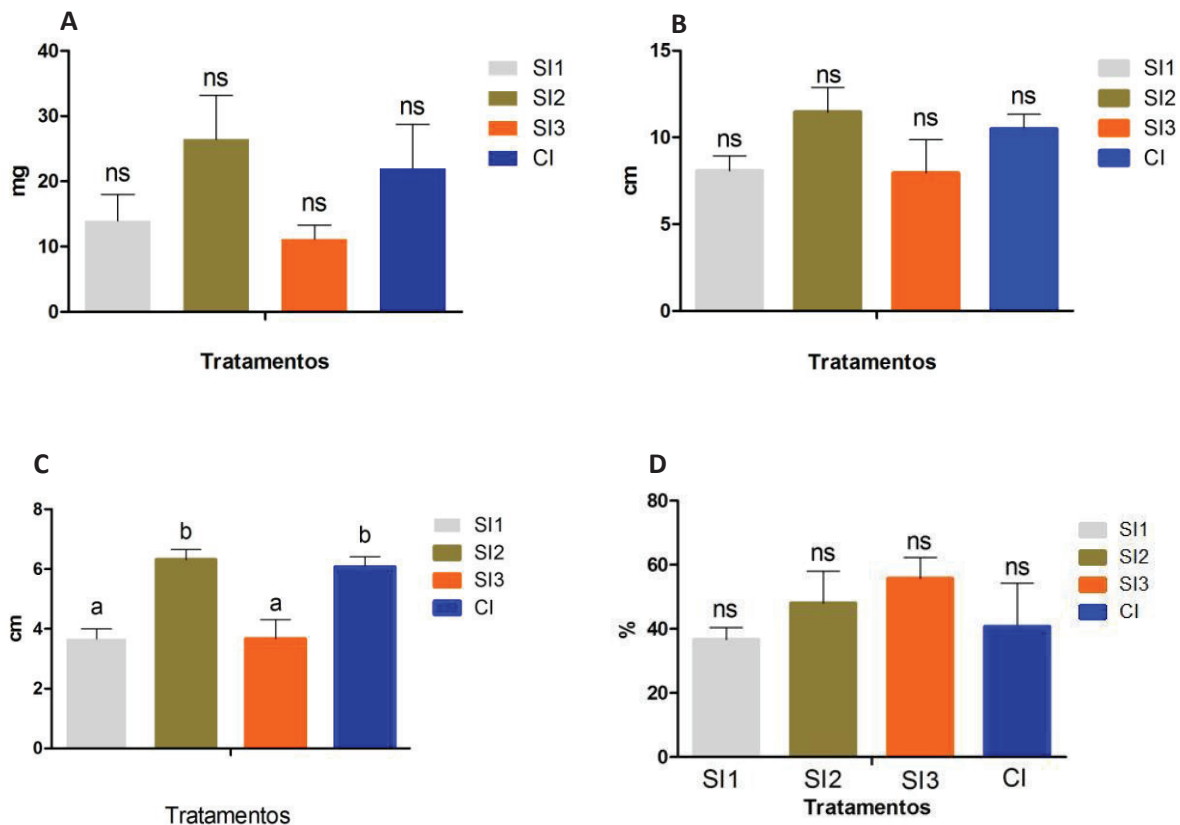


Figura 12 – Teste de germinação de sementes de *B. decumbens* submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio 1% (SI2, SI3 e CI4) e embebição em água destilada por 24 horas (SI2 e CI4) semeadas em Neossolo Quartzarênico distrófico. **A**- Massa seca **B** - altura foliar; **C** - Comprimento da raiz principal; **D** - Percentual médio de germinação de sementes; ns= diferenças estatísticas “não significantes”; letras iguais no topo das barras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Constatou-se que não houve ausência de germinação em nenhum dos tratamentos e interferência significativa dos FMAs no crescimento do vegetal, mantendo-se em $45 \pm 8, 21\%$ o percentual médio de sementes germinadas.

Lima (2008), ao avaliar a micorrização de raízes de manjeriço e trevo por *Glomus clarum*, relata a ação negativa que os momentos iniciais da simbiose vegetal – fungo pode sofrer, uma vez que os FMAs drenam cerca de 5 a 20% do fotossintato líquido total produzido pelo hospedeiro para sua formação e manutenção, e, por isso, considera tal processo simbiótico um dreno para o hospedeiro nos momentos iniciais de sua formação e inicialmente não benéfico para os vegetais (LIMA, 2004 apud LIMA 2008).

Necessário se faz a realização de estudos que desenvolvam experimentos de germinação e crescimento de plantas em solo de áreas dunares por período maior de

observação, objetivando constatar essa ação não benéfica inicial dos FMAs no processo simbiótico e seus possíveis benefícios no desenvolvimento da planta hospedeira após as primeiras semanas da inoculação.

Embora o bioensaio tenha apresentado resultados satisfatórios e parâmetros para o bioensaio de micorrizorremediação posterior, observaram-se baixos valores para crescimento foliar, números de folhas e massa seca do vegetal-teste. Boeger e Gluzezak (2006) comenta que menores áreas foliares refletem uma estratégia para evitar a perda de água por transpiração quando o vegetal se encontra em condições de temperaturas elevadas e sob intensa luz solar ou mesmo como resposta à baixa fertilidade do solo. Esse autor apresenta também interferência no metabolismo vegetal promovida pela alta salinidade no solo que pode reduzir a taxa de crescimento, resultando em plantas com menor tamanho e número de folhas, além da redução da área foliar. Tanto a salinidade quanto a baixa fertilidade são características do solo de restinga utilizado no experimento. Foi observado na formação psamófila-reptante da área de coleta, uma comunidade vegetal pouco abundante e crescimento foliar reduzido, corroborando tais respostas apresentadas por Boeger e Gluzezak (2006). Isso pode explicar os baixos valores resultantes do experimento.

5.3.2 Avaliação da tolerância de *B. decumbens* em Neossolo Quartzarênico inoculados com FMAs e contaminado com tolueno.

Na tabela 2 são observadas as distribuições de totais e médias obtidas da *B. decumbens* submetida ao teste com tolueno e FMAs. Nota-se que a germinação das sementes manteve-se numa média de 31 indivíduos, ou seja, $51 \pm 6,2\%$ do total semeado germinaram, média próxima à obtida no teste de germinação ($45 \pm 14,4\%$) onde não foi utilizado hidrocarboneto. Infere-se que não houve influência do hidrocarboneto e dos FMAs na germinação da *B. decumbens*. Quanto ao número de sobreviventes observou-se que os tratamentos inoculados com FMAs e com dose mais concentrada de tolueno (VMH₂ e VEH₂) obtiveram maior número de indivíduos (17) resistentes ao estresse, o que pode ser consequência de influência de FMAs na sobrevivência do vegetal. Observou-se também que esse mesmos tratamentos obtiveram maior massa foliar total (Mft) – 34,8mg (VMH₂) e 29,5 mg (VEH₂) respectivamente - porém as médias de produção de massa foliar (Mf) obtidas em cada tratamento não foram estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ocorrendo o mesmo para comprimento da raiz (Cr) e altura foliar (Af).

Tabela 2 - Características de *B.decumbens* sobreviventes na presença de propágulos de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs), presença ou ausência de duas concentrações de hidrocarbonetos do petróleo (tolueno)¹ por 30 dias após estresse hídrico.

Características	V	VH ₁	VH ₂	VMH ₁	VMH ₂	VE	VEH ₁	VEH ₂
Total de germinação	28	30	31	31	25	32	38	30
Mf _t (mg)	9,1	11,3	23,7	11,3	34,8	13,7	23,4	29,5
Mf (mg)	3,0ns ±1,7	3,8ns ±2,3	4,7ns ±2,4	2,3ns ±0,4	7,0ns ±4,3	3,4ns ±1,8	7,8ns ±4,2	5,9ns±3,3
Cr (cm)	3,5ns ±2,0	3,8ns ±1,0	4,1ns ±1,4	3,5 ns ±1,04	3,4 ns±1,0	4,3 ns±1,4	3,2 ns±0,6	3,0 ns±1,5
Af (cm)	6,2 ns±0,2	4,9 ns±1,1	5,4ns±0,7	5,1 ns±0,5	5,5 ns±1,4	5,9 ns±1,2	7,7 ns±1,7	5,3 ns±0,7

¹- V: vegetal na ausência de hidrocarboneto (tolueno); VH₁: vegetal na presença de menor concentração de tolueno em substrato (153 ml.200g⁻¹solo) VH₂: vegetal na presença de maior concentração de tolueno em substrato (4,7ml. 200g⁻¹ solo); VE: Vegetal na presença de esporos de FMAs; VEH₁: Vegetal na presença de esporos de FMAs e dose de menor concentração de tolueno em substrato (153ml.200g⁻¹solo); VEH₂: Vegetal na presença de esporos de FMAs e maior concentração de tolueno em substrato (4,7ml. 200g⁻¹ solo); VMH₁: vegetal na presença de fragmentos de raízes micorrizadas de *Remirea marítima* e dose de menor concentração de tolueno em substrato (153ml.200g⁻¹ solo); VMH₂: vegetal na presença de fragmentos de raízes micorrizadas de *Remirea marítima* e dose de maior concentração de tolueno em substrato (4,7ml.200g⁻¹ solo).2- Mf, Af e Cr : médias de massa seca foliar, altura foliar e comprimento da raiz respectivamente com desvio padrão. Mft: massa seca foliar total por tratamento após estresse hídrico; 3-Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p< 0,05, n=5)

Na figura 13 são observados os percentuais de germinação e de sobrevivência do vegetal-teste. Esses percentuais foram calculados levando-se em consideração o percentual de cada vaso, obtendo-se a partir daí a média que cada tratamento apresentava. Nota-se que não houve influência significativa do hidrocarboneto e de FMAs no percentual de sementes germinadas. Embora haja relatos de que os hidrocarbonetos do petróleo inibam a germinação de sementes, segundo Inckot (2008), bioensaios podem obter resultados diferentes de acordo com a espécie, a concentração e o tipo de óleo.

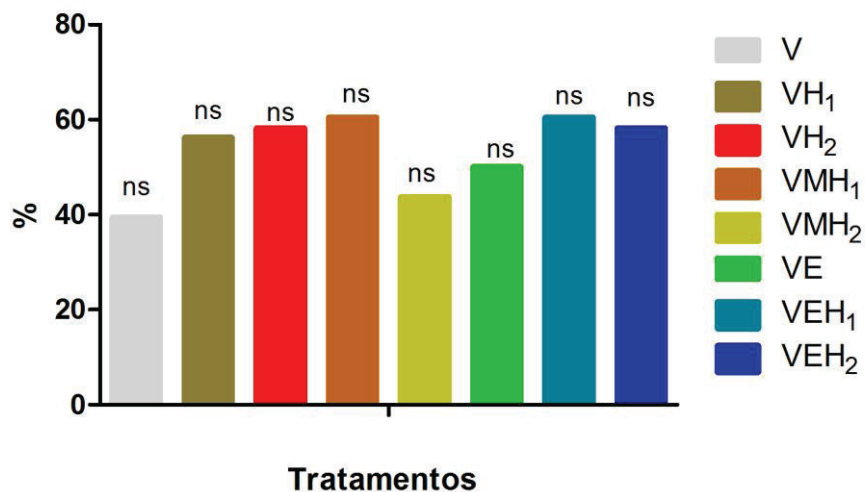
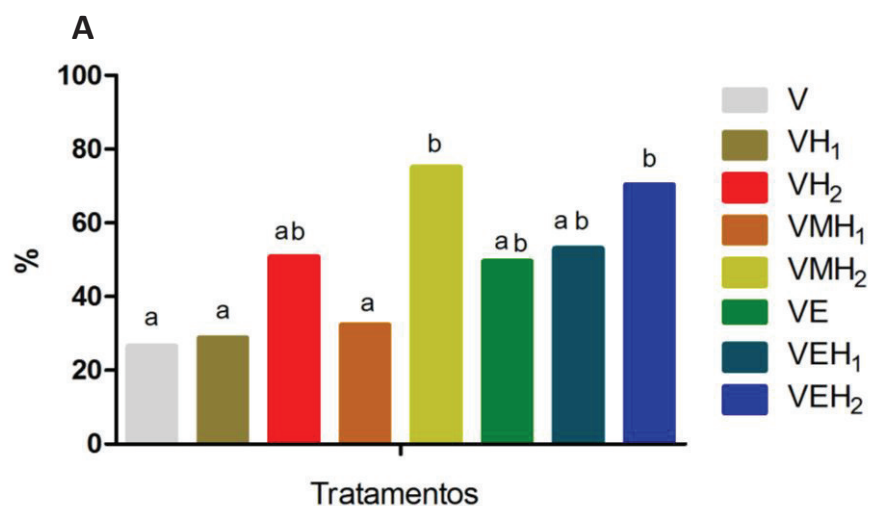


Figura 13- Percentuais de germinação de sementes de *B. decumbens* em 30 dias de cultivo na presença FMAs e tolueno.

Os resultados mais expressivos em relação à influência dos FMAs na sobrevivência das plantas submetida a estresse hídrico na presença do contaminante estão apresentados nas figuras 14A e 14B. Observou-se que o tratamento que foi inoculado com fragmentos de raízes micorrizadas de *R. maritima* e com maior dosagem de tolueno, VMH₂, apresentou o maior percentual médio ($89,6 \pm 12,5$) de sobrevivência após o estresse aplicado. O tratamento que recebeu esporos e maior dosagem de tolueno, VEH₁, também apresentou alto percentual médio de sobrevivência ($81,7 \pm 22,1$), denotando uma aparente influência do fungo no crescimento do vegetal na presença de tolueno. Entretanto, VEH₂ não apresentou diferença estatística significativa quando comparado com VH₂ ($41 \pm 11,2\%$) que recebeu dosagem maior do poluente, mas nenhum propágulo de FMAs.



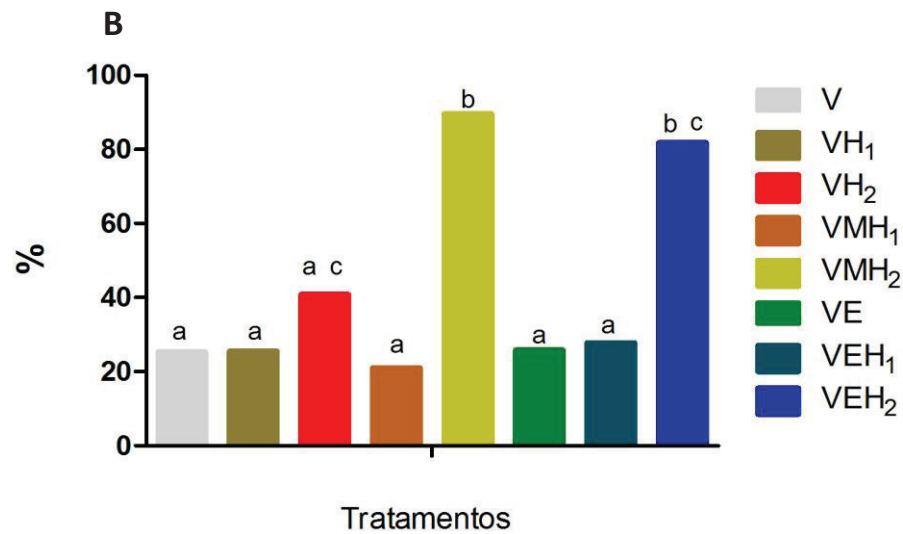


Figura 14- (A) Percentual médio de sobrevivência de *B. decumbens* após 25 dias de cultivo na presença FMAs e na presença de tolueno e antes do estresse hídrico de 5 dias (B) Percentual médio de sobrevivência de *B. decumbens* após 30 dias de cultivo na presença FMAs e tolueno, após estresse hídrico de 5 dias. Letras iguais no topo das barras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Um melhor desempenho do vegetal submetido à concentração maior de tolueno sem inoculação sugere um estudo mais aprofundado para obtenção de dados que venham esclarecer se tal desempenho deve-se ou não ao potencial fitorremediador da *B. decumbens*, que na ausência de FMAs pode utilizar um dos caminhos metabólicos da fitorremediação aqui já discutido.

Os tratamentos que apresentaram menor percentual de plântulas sobreviventes ao estresse abiótico de seca artificialmente produzido - cessação de regas - foram os que não receberam inoculação com FMAs (V, VE, VH₁ e VH₂) ou inoculados que receberam dose de tolueno em menor concentração (VMH₁ e VEH₁). A influência direta do tolueno nessa sobrevivência do vegetal ainda não pode ser explicada nesse experimento, já que em baixa concentração do poluente não se apresentou diferença significativa de sobrevivência vegetal em relação ao controle. Aqui não se optou por realizar desinfestação dos esporos nem dos fragmentos de raízes de *R. maritima* utilizados no inóculo, no entanto Soares (2009) cita mecanismos metabólicos associados a bactérias promotoras do crescimento de plantas” simbiotes de FMAs que podem melhorar o desempenho da planta sob condições de estresse e aumentar o rendimento. Tais mecanismos simbióticos podem estar envolvidos na utilização do hidrocarboneto pelo fungo como fonte de carbono, refletindo em maior crescimento micelial e maior influência na sobrevivência da planta. Soares (2009) testando inoculação de FMAs associados ou não a bactérias promotoras de crescimento em plântula micropropagada

de abacaxizeiro, relata que não houve crescimento significativo na presença de FMAs esterilizados com hipoclorito de sódio e estreptomicina. Tal sinergia bactéria-fungo também é abordada por Azcón-Aguilar e Barea (1997) observando que a mesma promove o desenvolvimento e a sanidade do vegetal melhorando sua adaptação à medida que reduz o estresse.

Observou-se ainda que o tratamento controle (V), não obstante o seu percentual de germinação ($46,7 \pm 17,3$) ter se mantido estatisticamente similar ao da média do experimento ($51,0 \pm 6,2\%$), obteve o menor percentual total de sobrevivência ($26,5 \pm 12,5\%$) após o estresse hídrico, o que pode refletir os efeitos distróficos do solo sobre o vegetal, e, conseqüentemente, a dificuldade do vegetal resistir a estresse abiótico na ausência de micorrizas.

Quanto à análise de variância não ter revelado efeito significativo no percentual de germinação das sementes, Gorgosz (2010) também não encontrou diferenças estatísticas significativas no percentual de germinação de *Campomanesia xanthocarpa* O. BERG (Myrtaceae) em teste com solo contaminado por petróleo concluído em 35 dias. Entretanto, esse autor destacou a importância de pesquisas que avaliaram a ação inibitória do efeito tóxico do petróleo sobre a germinação de sementes de diversas espécies vegetais, destacando que a germinação de sementes pode ser inibida pelo efeito tóxico do petróleo ou por condições desfavoráveis do solo.

Paula (2007), pesquisando os efeitos de antraceno e creosoto em *Brachiaria* e *Pueraria* na colonização de *Glomus*, destaca que os efeitos tóxicos de poluentes orgânicos também podem ocorrer sobre FMAs, inibindo a colonização micorrízica. Aos 30 dias observou-se crescimento nas plantas inoculadas com esporos de FMAs e tolueno.

A baixa disponibilidade de nutrientes, característica do solo de restinga, pode ter interferido na manutenção do desenvolvimento das plântulas sendo necessários testes que insiram doses nutricionais, embora tal procedimento não venha representar as características naturais do solo encontrado em zona psamófila-reptante da restinga.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram identificados esporos do gênero *Glomus* na área de estudo, constatando a presença de Fungos Micorrízicos Arbusculares na formação vegetal Psamófila-Reptante da Restinga de Massambaba, em Arraial do Cabo-RJ. Foram identificadas estruturas micorrízicas arbusculares (esporos, hifas extra e intrarradiculares, vesículas,

arbúsculos e esporocarpos) em raízes de *Remirea maritima* (família Cyperaceae) coletadas na área de estudo. Segundo Souza (2006) a família Cyperaceae não apresenta colonização por micorrizas, então de acordo com os resultados do presente estudo pode-se indicar a identificação da colonização de *Remirea maritima* por micorrizas (FMAs).

Também na identificação da colonização de *R. maritima* por FMAs, foi observada a presença de hifas septadas escuras, podendo ser comparadas aos *Dark Septate Endophytes*”, características de ambientes estressados, o que pode confirmar a hipótese de que tais grupos fúngicos compartilham ambientes semiáridos em uma escala global, sugerindo a importância de estudos sobre DSE na co-colonização em raízes de plantas hospedeiras de FMAs.

Em bioensaio de micorrizorremediação de solo de restinga contaminado com hidrocarboneto do petróleo (tolueno) a presença de propágulos de FMAs de *R. maritima* promoveu maior tolerância ao poluente e ao estresse hídrico em *B. decumbens*, cujo percentual médio de sobrevivência para os tratamentos com maior concentração de tolueno, inoculados com fragmentos de raízes micorrizadas de *R. maritima* provenientes da área de estudo, foi de 89,6 %. Este resultado indica a importância desse vegetal, e sua associação com FMAs, em processos de biorremediação de solos contaminados com hidrocarboneto do petróleo.

6.1 Contribuições e Perspectivas

Diante da possibilidade do Centro de Diversidade de Cabo Frio, onde se insere a Restinga de Massambaba, sofrer impactos com derivados do petróleo devido à expansão regional e o crescimento populacional, o qual tem entre outras demandas, o aumento da utilização de combustíveis, este trabalho apontou a necessidade de estudos que caracterizem, quantifiquem e testem impactos do aumento da utilização e possíveis derramamentos de petroderivados em solo de restingas. A identificação de FMAs associados aos vegetais de restinga aliada ao entendimento da dinâmica desses micro-organismos na presença de poluentes como hidrocarbonetos do petróleo podem gerar biotecnologia para a descontaminação de diversos ecossistemas mundiais.

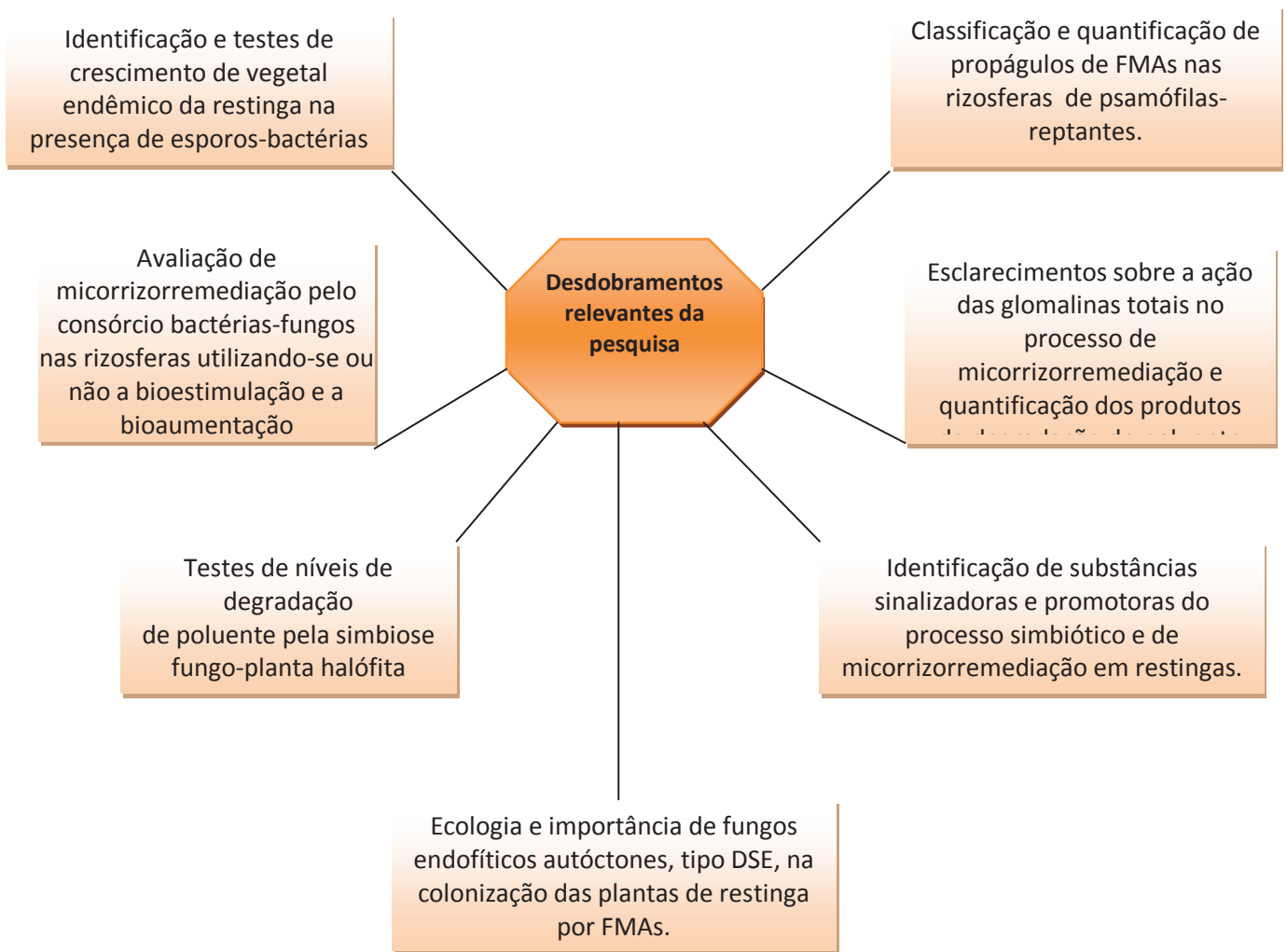
Os vazamentos ocorridos na Restinga de Jurubatiba por consequência da tubulação com água de produção que a atravessava, advinda da Refinaria Cabiúnas (FERREIRA; MORAES; SANTOS, 2005) podem ter sido interrompidos com a desativação da tubulação, porém que providências foram tomadas para biorremediação do solo, ainda não foram publicadas. Sugere-se aqui um aprofundamento das pesquisas com micorrizorremediação de

hidrocarbonetos em restingas para que programas de despoluição do solo desses ambientes possam ser implantados tão logo se identifique acidentes como aquele.

Não se sabe ainda a amplitude do impacto na biota local e nem na microbiota do solo na região de Massambaba devido ao crescimento urbano em direção à mata de restinga. Possivelmente, o lençol freático (bastante aflorado) tem sido contaminado por efluentes em fossas e sumidouros nas residências e comércios em franca expansão imobiliária. Qual a alteração na microbiota rizosférica dos vegetais da restinga que pode ser causada pelo possível aumento de coliformes fecais e de matéria orgânica no lençol freático local? Que consequências o aumento artificial de nutrientes, incrementados pela contaminação do lençol freático devido ao aumento populacional na região, poderá causar aos mecanismos simbiotes dos vegetais e dos FMAs ali presentes? Bairros em franco crescimento, como Monte Alto e Figueira, foram erguidos sobre a restinga de Massambaba, de tal forma que em muitos quintais das casas ali construídas ainda se pode observar exemplares deste ambiente (como cactos, a *Allagoptera arenaria* – o guriri, e a *Eugênia angustifolia* - a pitangueira), como também nos terrenos, que ainda não foram pavimentados, o solo arenoso e branco pode ser encontrado por traz de muros e cercas demarcadoras de propriedades privadas. Com o crescimento da demanda, postos de abastecimentos de combustíveis poderão ser construídos nesses bairros e as consequências poluidoras de suas instalações já foram esclarecidas neste estudo.

Questionamentos e impactos como estes demandam maiores pesquisas multidisciplinares que buscarão responder as consequências de alterações ecossistêmicas e seus impactos na biota do solo decorrentes das crescentes atividades antrópicas na região.

A pesquisa aqui apresentada necessita ser continuada para que respostas à sociedade não sejam iniciadas apenas quando os efeitos negativos de tais alterações estiverem sendo observados por ela. Alguns desses desdobramentos, quanto ao estudo do solo e ambiente rizosférico das plantas de restinga, são aqui sugeridos:



7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S. F. de. Identificação da vegetação xerófila na região de Cabo frio–RJ, com auxílio de geoprocessamento. **Anais do XI Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada** – FFLCH – USP- São Paulo 2005.

ALARCÓN, C. ; CUENCA, G. Arbuscular mycorrhizas in coastal sand dunes of the Paraguaná Peninsula, Venezuela. **Mycorrhiza**: 16:1– 9, 2005. Disponível em < <http://www.springerlink.com/content/m5kp73181-7086636/> > Acesso em 14 de out de 2010.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York: **John Wiley & Sons**, Inc. 865p.

ALVES, M. et al. Diversity of Cyperaceae in Brazil. **Rodriguésia** 60 (4): 771-782. 2009.

_____. Cyperaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2012 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB017222>).

ARAÚJO, D. S. D. *et al.* Área De Proteção Ambiental De Massambaba, Rio De Janeiro: Caracterização Fitofisionômica e Florística - **Rodriguésia** 60 (1): 067-096. 2009.

ASSUMPÇÃO, J.; NASCIMENTO, M. T. Estrutura e Composição Florística De Quatro Formações Vegetais de Restinga No Complexo Lagunar Grussaí/Iquipari, São João Da Barra, Rj, Brasil. **Acta bot. bras.** 14(3): 301-315. 2000.

AZCÓN-AGUILAR, R. C.; BAREA, I. M. Applying mycorrhiza biotechnology to orticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, p.1-24, 1997.

BARTZ, M.L.C. *et al.* Comparação entre as técnicas de amostragem direta em campo e cultura-armadilha para mensuração da diversidade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares. **Hoehnea** 35(1): 159-164, 2 tab., 2008.

BENTO, R.A. **Simbioses Radiculares e a Fitorremediação de Solo Contaminado por Resíduos Oleosos de Refinaria de Petróleo** . 2008. Disponível em < <http://www.if.ufrj.br/inst/monografia/2007II/Ricardo%20Aparecido%20Bento.pdf> > acesso em 03 de jun 2010.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A; FONSECA, H. M. A. C. Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito Além da Nutrição. In **Nutrição Mineral das Plantas**. SBCE, Viçosa, 2006: 53 -85, (ed. FERNANDES, M.S.). 432p.

BOEGER, M.R.T.; GLUZEZAK, R.M. Adaptações estruturais de sete espécies de plantas para as condições ambientais da área de dunas de Santa Catarina. **IHERINGIA, Sér. Bot.**, Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 73-82, jan./dez. 2006.

BOHRER, C. B. A. *et al.* Mapeamento Da Vegetação E Do Uso Do Solo No Centro De Diversidade Vegetal De Cabo Frio, Rio De Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 60 (1): 001-023. 2009.

BOURSCHEID, K. ; REIS, A. Dinâmica da invasão de *Pinus elliottii* Engelm. em restinga sob processo de restauração ambiental no Parque Florestal do Rio Vermelho, Florianópolis, SC **Revista Biotemas**, 23 (2), junho de 2010.

BRAGA, T. V. S. **Associações com fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio em *Allagoptera arenaria* (Gomes) O. Kuntze na restinga de Marambaia, R.J.** 2008. 33 f. Monografia, programa de graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

BRUNDRETT, M. Mycorrhizas in natural ecosystems. **Adv. Ecol. Res.** 21, 171–313.1991. Disponível em < <http://pt.scribd.com/doc/51667302/Mycorrhizas-in-Natural-Ecosystems> > Acessado em 01 jun 2011.

BRUNDRETT, M. *et al.* **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. ACIAR Monograph 32. 37. 1996. ISBN 186320 181 5. Disponível em < <http://aciarc.gov.au/publication/MN032> >. Acesso em 20 de out 2010.

CABELLO, M. N. Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) - **FEMS Microbiology Ecology** - Volume 22 Issue 3, Pages 233 – 236 - Published Online: 17 Jan 2006.

CABRAL, L. *et al.* Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrízicos arbusculares. **Química Nova**, Vol. 33, No. 1, 25-29, 2010

CAMPOS, S. de . Tóxicos/Intoxicações - Tolueno-Propriedades e Características. 2004. Disponível em < <http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/12098> > acesso em 01 de set 2012.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesq. agropec. bras.** [online]. 2002, vol.37, n.11, pp. 1629-1638. ISSN 0100-204X.

CEOLA, G. **Fungos micorrízicos arbusculares na recuperação de áreas mineradas no Município de Lauro Müller, Sul de Santa Catarina.** 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. SC, 2010

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO **Texto explicativo: Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo.** Diretoria de Controle e Licenciamento Ambiental. São Paulo. 11p., Dez 2011.

CORDAZZO ,C. V.; STÜRMER, S. L. . Ocorrência De Fungos Micorrízicos Arbusculares Em *Panicum Racemosum* (P. Beauv.) Spreng (Poaceae) Em Dunas Costeiras Do Extremo Sul Do Brasil. **Atlântica** (Rio Grande), Vol. 29, No 1. 2007.

CORDEIRO, S. Z. Composição e distribuição da vegetação herbácea em três áreas com fisionomias distintas na Praia do Perú, Cabo Frio, RJ, Brasil. **Acta bot. bras.** 19(4): 679-693. 2005.

COSTA, H. A. O. **Fungos micorrízicos arbusculares em sempre-viva pé-de-ouro (*Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland).** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- UFVJM. Diamantina – MG. 2008. Disponível em < <http://acervo.ufvjm.edu.br:8080/jspui/handle/1/93> > Acesso em 22 de set. de 2011.

CPRM - Serviço Geológico do Brasil. **Projeto Atlas Pluviométrico do Brasil.** Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais. Disponível em: < http://www.cprm.gov.br/publique/media/Isoietas_Totais_Anuais_1977_2006_2011.pdf >. Acesso em ago de 2012.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: **Embrapa Produção da Informação**; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412p.

FERREIRA, M. I. P.; MORAES, G. P.; SANTOS, N. M. Valoração econômica dos impactos ambientais de dutos em unidades de conservação. Trabalho publicado nos Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Salvador, 2005.

FERREIRA, M.das G. R. Potencialidades de utilização da *Casuarina equisetifolia* em reflorestamentos. **Embrapa Rondônia**. 13 p. Documentos / Embrapa Rondonia, ISSN 0103-9865 ; 88, 2004.

FLORES-AYLAS, W.W. Efeito de *Glomus etunicatum* e fósforo no crescimento inicial de espécies arbóreas em semeadura direta. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 257-266, fev. 2003.

FORSTER, L. M. K; et al. Toxicologia DO tolueno: Aspectos relacionados ao Abuso. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v 28, n.2, abril 1994. Disponível a partir do <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101994000200011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 02 de setembro 2012. [http:// dx.doi.org/10.1590/S0034-89101994000200011](http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101994000200011).

FRAGA, M. E.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, F. A. de. Micobiota do Solo de uma Área de Duna na Restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, RJ. **Floresta e Ambiente** 2010 jan./jun.; 17(1):30-36 doi 10.4322/floram.2011.007. ISSN 2179-8087

GASPAR-OLIVEIRA, C. M. et al. Manutenção da umidade do substrato durante o teste de germinação de *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 3, p.46-53, 2007

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, p. 235-244, 1963.

GOGOSZ, A.M. *et al.* Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. **Braz. J. Biol.**, 2010, vol. 70, no. 4, p. 977-986

GOMES, F. H. *et al.* Solos sob vegetação de restinga na Ilha do Cardoso (SP): I - Caracterização e classificação. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** [online]. 2007, vol.31, n.6 [cited 2012-08-31], pp. 1563-1580 . Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832007000600033&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0100-0683

GOTO, B. T.; COSTA, C. M.C.; MAIA, L. C. *Glomus halonatum* Rose & Trappe (Glomeromycota) in South America: comments on the morphological characteristics of the species. **Acta bot. bras.** 23(4): 1167-1170. 2009.

HOFFMANN, R. B. *et al.* Diversidade da mesofauna edáfica como bioindicadora para o manejo do solo em areia, Paraíba, Brasil. **Caatinga (Mossoró, Brasil)**, v.22, n3, p 121-125, julho/setembro 2009. www.ufersa.edu.br/caatinga.

INCKOT, R. C. et al. Anatomia das plântulas de mimosa pilulifera (leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. **Rodriguésia** 59 (3), pp. 513-524. 2008.

INVAM. **International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi**. Disponível em < [http:// invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/classification.htm](http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/classification.htm)> Acessado em: 14 out 2010.

JACQUES, R. J. S. *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, julho-agosto. Ano 2007 - vol.37, nº 004. UFSM. Santa Maria – Brasil. Pp.1192-1201.

KHADE, S. W. Morpho-taxonomy of synonyms: *Glomus rubiforme* and *Glomus pachycaulis* (Glomeromycota). Department of Botany, Goa University, Taleigao Plateau, GOA-403206, India. **Anales de Biología** 30: 55-59, 2008. Disponível em < http://www.um.es/analesdebiologia/numeros/30/PDF/30_06.pdf> acesso em 3 jul. 2011.

KHAN, Abdul G., Mycorrhizoremediation—an enhanced form of phytoremediation - **Journal of Zhejiang University Science B** Volume 7, Number 7, 503-514, DOI: 10.1631 - 2006. ISSN 1862-1783 (Online)

KIRIACHEK, S. G. *et al.* Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **R. Bras. Ci. Solo**, 33:1-16, 2009.

KOSKE, R. E. - Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae of Some Hawaiian Dune Plants. **Pacific Science**, vol. 42, nos. 3-4. University of Hawaii Press. 1988.

KOTTEK, M *et al.* World Map of the Köppen-Geiger climate classification Updated **Meteorologische Zeitschrift**, Vol. 15, No. 3, 259-263. 2006. DOI: 10.1127/0941-2948/2006/0130.

KUSTER, V. C. **Anatomia e Aspectos Ecológicos de Espécies Vegetais Ocorrentes na Restinga do Parque Estadual Paulo César Vinha (ES)**. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa (UFV). 2010.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Fitorremediação: Plantas como agentes de despoluição? **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 17, p. 9-18, jan./dez. 2007

LOURENÇO JUNIOR, J. ; CUZZUO, G. R. F. Caracterização de solos de duas formações de restinga e sua influência na constituição química foliar de *Passiflora mucronata* Lam. (Passifloraceae) e *Canavalia rosea* (Sw.) DC. (Fabaceae). **Acta bot. bras.** 23(1): 239-246. 2009.

MAIA, L.C.; SILVEIRA, N.S.S.; CAVALCANTE, U.M.T. Interação entre Fungos Micorrizicos Arbusculares e Patógenos Radiculares. In: MICHEREFF, S.J.; DOMINGOS, E.G.T.A.; MENEZES, M. (Eds) **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife : UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.398 p.

MARTINS, S.; MACHADO,S. R. ;ALVES, M. Anatomia e ultra-estrutura foliar de *Cyperus maritimus* Poir. (Cyperaceae): estratégias adaptativas ao ambiente de dunas litorâneas. **Acta bot. bras.** 22(2): 493-503. 2008.

MATOS, R. M. B.; SILVA, E. M. R. da; LIMA, E. Fungos micorrízicos e nutrição de plantas. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, dez. 1999 36p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 98). ISSN 0104-6187.

MIRANSARI ,M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2011. 89:917–930. DOI 10.1007/s00253-010-3004-6.

NAKATANI ,A. S. *et al* - Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de “landfarming” de resíduos petroquímicos - R. **Bras. Ci. Solo**, 32:1501-1512, 2008.

NOGUEIRA, M.A. **Interações entre micorriza arbuscular, rizobactérias, fósforo e silício na manifestação da toxidez de manganês em soja.** Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo - USP. Piracicaba-SP. 2001. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-06052002-153538/pt-br.php> >. Acesso em: 23 mai. 2012.

NOGUEIRA ,M. A. Micorrizas Arbusculares e Metais Pesados. *In* : SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. dos S. (Eds). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental.** Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 312 p.: il. ISBN: 978-85-85564-14-8 (Publicação online)

NOVAIS,C.B.de; SOUZA F.A.de ; SIQUEIRA, J.O. Caracterização fenotípica e molecular de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em banco de germoplasma. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.8, p.806-896, ago. 2010

OLIVEIRA, J. R. G. de. O papel da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) autóctones no desenvolvimento de espécies vegetais nativas em área de dunas de restinga revegetadas no litoral do Estado da Paraíba. **Revista Brasil. Bot.**, V.32, n.4, p.663-670, out.-dez. 2009.

OLIVEIRA, K.M.P.G. de; ARBILLA, G. ; SILVA, L.S.V. Monitoramento de BTEX em um Posto de Combustíveis na Cidade de Niterói. XI Encontro da SBQ-Rio de Janeiro Universidade Federal Fluminense, out 2007.

OTÊNIO, M. H. Biodegradação de benzeno, tolueno e xileno Pela *Pseudomonas putida* CCM1 852. **Braz. J. Microbiol.** vol.36, no.3 São Paulo July. / set. 2005.

PARQUE Estadual Costa do Sol recebe vistoria em Arraial do Cabo. **Ressurgência**, Rio de Janeiro, 02 de janeiro, 2012. Disponível em <<http://ressurgencia.com.br/site/home/45-materias/923-parque-estadual-costa-do-sol-recebe-vistoria-em-arraial-do-cabo>> Acesso em: 25 agosto 2012.

PAULA, A. M. ; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J.O.- Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de landfarming de resíduos petroquímicos - R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental, v.10, n.2, p.448–455, 2006.

_____. Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*- R. Bras. Ci. Solo, 31:805-811, 2007.

PEREIRA, G. M. D. et al. Ocorrência de fungos endofíticos "dark septate" em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia. **Pesq. agropec. bras.** [online]. 2011, vol.46, n.3, pp. 331-334. ISSN 0100-204X.

PETROBRÁS - Teste de Longa Duração TLD na Área do Poço 1-RJS-504, Concessão de Espadarte, Bacia de Campos. Processo nº 02022.003178/2006 – **Diagnóstico ambiental-Meio Biótico** – Relatório BR PANGO 1/08 –Re v.00 06/2008.

PICKERING, J. **Discover Life**. Odum School of Ecology, University of Georgia 538 Biological Sciences Building, Athens, GA 30602-2602. [ca. 2012]. Disponível em <[http://www.discoverlife.org/who/ CV/Pickering,_John.html](http://www.discoverlife.org/who/CV/Pickering_John.html)>. Acesso em: 20 mai. 2012.

RIO DE JANEIRO (estado). **Decreto nº 41.820 de 16 de abril de 2009 aprova o plano de manejo da Área de Proteção Ambiental de Massambaba - APA de Massambaba, localizada nos municípios de saquarema, Araruama e Arraial do cabo, criada pelo Decreto nº 9.529-c, de 15/12/86**. Rio de Janeiro. 2009

RODRIGUES, G. R. G. **Análise do crescimento de espécies vegetais utilizadas na restauração de áreas de restinga: resposta da adição de fungos micorrízicos arbusculares e nitrogênio**. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Departamento de Ciências Ambientais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

ROYAL BOTANIC GARDEN EDINBURGH. *Remirea maritima* Aubl. (Cyperaceae). Image of herbarium specimen held at Royal Botanic Garden Edinburgh (E). Specimen barcode number E00179435. Specimen collected from: India. Collected by: Wight, Robert #1854. **Herbarium Specimen Image**.2012. Disponível em < http://eol.org/data_objects/16117360 > acesso em 23 de ago 2012.

SAGGIN JÚNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. : Micorriza Arbuscular - Papel, funcionamento e aplicação da simbiose.. In: Adriana Maria de Aquino; Renato Linhares de Assis. (Org.). **Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável**. 1ed.Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, v. 1, p. 101-149.

SANTOS, F. S. et al. Chemical amendment and phytostabilization of an industrial residue contaminated with Zn and Cd. **Sci. Agric.**, v.64, n.5, p.506-512, Piracicaba, 2007.

SANTOS, V. L. da S. **Fungos Micorrízicos Arbusculares em ecossistema de Mata Seca no Norte de Minas Gerais**. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycol. Res.** 105 (12) : 1413±1421 (December 2001). # The British Mycological Society DOI: 10.1017/S0953756201005196

SCHÜBLER, A.; WALKER C. **The Glomeromycota – a species list with new families and new genera**. in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. 2010. Disponível em < http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/Schuessler&Walker2010_Glomeromycota.pdf > Acesso em jul de 2012.

SEELIGER, U. et al **Coastal Fore-dune Flora**.1997. Subtropical Convergence Enviroments. Spring-Verlag 1997, p. 99-102.

SCIVITTARO, W. B.; PILLON C. N. Sistema de Produção da Mamona - Correção do solo e adubação. **Embrapa Clima Temperado - Sistemas de Produção**, n. 11. ISSN 1806-9207 - Versão Eletrônica .Novembro/2007.

SILVA, C. M. *et al.* Production of phenol-oxidases and peroxidases by fungi isolated from irrigated rice. **Braz. J. Microbiol.** [online]. 2003, vol.34, suppl.1, pp. 53-55. ISSN 1517-8382.

SILVA, D. K. A. *et al.* Atividade de fungos micorrízicos arbusculares em dunas litorâneas impactadas por mineração. **XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas** (Centro de Convenções do SESC , 2010 , Guarapari – ES, Brasil).

SILVA, E. M. **Condição micorrízica em espécies de *Passiflora* e efeito da simbiose na promoção do crescimento.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2008. Disponível em < www.cpsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB2284.pdf > Acesso em: 3 jul. 2011.

SILVA, L. J. **Processo de Landfarming para Tratamento de Resíduos Oleosos.** PROGRAMA EQ-ANP Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural Processo. UFRJ. 2009. Disponível em: < <http://www.eq.ufrj.br/prh13/download/?prh13-processo-de-landfarming-tratamento-residuos-oleosos.pdf> > (Dissertação de Mestrado). Acesso em: 06 jun.2010.

SILVA, S. M. Diagnóstico das Restingas no Brasil. In: Fundação BIO RIO, **Workshop Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade na Zona Costeira e Marinha.** Porto Seguro, Anais Eletrônicos. 1999. Disponível em < http://www.anp.gov.br/brasil-rounds/round7/round7/guias_r7/PERFURACAO_R7/refere/Restingas.pdf > Acesso em: 3 jul. 2011.

SILVA, S. da; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.12, p.1749-1757, dez. 2006

SILVE, E. M. **Ocorrência e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em um ecossistema cafeeiro submetido a diferentes métodos de controle de plantas daninhas.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá. 1. Itajubá (MG) : [s.n.], 2011. 78 p.:

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, Márcio R.; STÜRMER, Sidney L. - Fungos Micorrízicos Arbusculares- **Rev. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 25- março/abril 2002 – pp.18-21.

SIQUEIRA, J. O *et al.* Influência do substrato de formação e da micorriza no crescimento de mudas de cafeeiro transplantadas. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v. 30, n.12. p.1417-145, dez 1995.

SOARES, S.A.G. *et al.* Efeito de bactérias na germinação de fungos Micorrízicos arbusculares e co-inoculação em mudas de abacaxizeiro. **Caatinga (Mossoró,Brasil)**, v.22, n.2, p.31-38, abril/junho de 2009.

SOUZA, D. M. G. de; LOBATO, E. Areia quartzosa/Neossolo quartzarênico. Agência de Informação Embrapa – Bioma Cerrado. 2005. Disponível em < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_2_10112005101955.html > Acesso em 31 de ago 2012.

SOUZA, C. S. *et al.* Isolamento e Seleção de Microrganismos Degradadores de Derivados de Petróleo. **Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP**. 2005. Disponível em < http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0444_05.pdf > Acesso em: 25 mar 2010.

SOUZA, F. A. de; GUERRA, J.G.M. Emprego de Técnicas do Número mais Provável (NMP) no Estudo de populações de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs). **Seropédica: Embrapa. Agrobiologia** – 1998. 34p. (Embrapa-CNPAB.Circular Técnica nº 2 – ISSN 1516-0653).

SOUZA, R. C. de. **Caracterização da biota do solo da restinga de Marambaia, RJ, e estabelecimento de simbiose micorrízica em *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

SOUZA, V. C. de *et al.* Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.10, n.3, p.612–618, 2006. Campina Grande, PB, DEAg/UFCEG.

TANG, J. *et al.* Bioremediation of Petroleum Polluted Soil by Combination of Ryegrass with Effective Microorganisms. **Journal of Environmental Technology and Engineering** , 2010, 3(2):80-86.

THOMAZ, L. D.; MONTEIRO R. Uma Revisão da Comunidade Halófila-Pasamófila do litoral brasileiro. Bol. Mus. Biol. Mello Leitão (N.Ser.) 1:103-114, agosto 1992.

UFLA. **Coleção de Fungos Micorrízicos da Faculdade Federal de Lavras**. Disponível em < http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fungos_micorrizicos_arbusculares.html > Acesso em: 05 jun. 2010.

USDA, NRCS. 2012. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 10 June 2012). **National Plant Data Team**, Greensboro, NC 27401-4901 USA.

VIDALLI, M. Bioremediation: An overview. **Pure Applied Chemistry**. v. 73, pp. 1163–1172. 2001. Disponível em < <http://www.iupac.org/publications/pac/pdf/2001/pdf/7307x1163.pdf>> Acesso em: 14 out. 2010.

ZECCA, A. G. D. Material de Apoio para as Aulas Teóricas da Disciplina de Botânica Agrícola. Universidade Federal de Santa Maria Centro de Educação Superior Norte do Rio Grande do Sul - Departamento de Agronomia. **Frederico Westphalen**, RS, Brasil. Agosto de 2008.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil** 198:97-107.