

**INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
FLUMINENSE**

Secretaria de Educação
Profissional e Tecnológica

Ministério
da Educação



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL - PPEA
MESTRADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL MODALIDADE PROFISSIONAL

**ECOLOGIA E POTENCIAL REMEDIADOR DO CONSÓRCIO FMA -
BACTÉRIA ISOLADO DA RIZOSFERA DE *Remirea maritima***

MARYÉLLEN DE CASTRO SOARES DOS REIS

Cabo Frio -RJ

2014

MARYÉLLEN DE CASTRO SOARES DOS REIS

**ECOLOGIA E POTENCIAL REMEDIADOR DO CONSÓRCIO FMA -
BACTÉRIA ISOLADO DA RIZOSFERA DE *Remirea maritima***

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Instituto Federal Fluminense para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, na área de concentração em Sustentabilidade Regional, linha de pesquisa Avaliação e Gestão Ambiental.

Orientador: Professor *DSc.* Victor Barbosa Saraiva.

Co- Orientador: Ocimar Ferreira de Andrade

Cabo Frio -RJ

2014

Dados de Catalogação na Publicação (CIP)

R375e Reis, Maryéllen de Castro Soares dos.
 Ecologia e potencial remediador do consórcio FMA-
Bactéria isolado da Rizosfera de *Remirea maritima*/
Maryéllen de Castro Soares dos Reis. – Macaé, RJ, 2014.
 92 f.: il. color.

 Orientador: Victor Barbosa Saraiva.
 Coorientador: Ocimar Ferreira de Andrade.

 Dissertação (mestrado). – Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Programa de
Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Macaé, RJ, 2014.
 Inclui bibliografia.

1. Ecologia vegetal. 2. Bacteriologia agrícola.
3. Massambaba, Restinga de (RJ). 4. Biorremediação. 5.
Solos - Análise. I. Saraiva, Victor Barbosa, orient. II.
Andrade, Ocimar Ferreira de, coorient. III. Título.

CDD 363.72098153 23.ed.

Dissertação intitulada “**ECOLOGIA E POTENCIAL REMEDIADOR DO CONSÓRCIO FMA - BACTÉRIA ISOLADO DA RIZOSFERA DE *Remirea maritima***”, elaborada por Maryéllen de Castro Soares dos Reis 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 **Sustentabilidade Regional**, linha de Pesquisa Avaliação e Gestão Ambiental 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, Doutor em Ecologia / Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.

Norton Heise, Doutor em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP / Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Biofísica.

Sael Sánchez Elías, Doutor em Ciências do Solo / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ. CPGA_CS,

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me oportunizou e condicionou os meus esforços, agradeço ao meu marido Maurício pelo apoio e perseverança e aos meus Mestres pelo aprimoramento intelectual, ao orientador Victor Saraiva que realmente é um condicionante em novas expectativas, detentor de boas ideias e exemplo de profissionalismo, necessárias ao conhecimento e o desenvolvimento de novo mestre. Ao amigo e co-orientador Ocimar que colaborou com todo o conhecimento prévio necessário, organizador de metodologias e ainda um articulador das linhas de trabalho. Aos meus pais Mirtes e Marcos que sempre me ensinaram o valor do estudo. Aos amigos Marianne Nunes, Janaína Teixeira, Alan Mendonça, Aline Câmara, Luis “Astolfo” Guilherme e Murillo Mascarenhas, pelo apoio técnico e as divertidas horas de descontração. Aos colegas de turma, Marcelo Tardelli, Thiago Merici, Daniela Almeida, Ilana pelo incentivo durante os árduos momentos de aula e finalmente ao IFF - Instituto Federal Fluminense, pela formação e auxílio durante o desenvolvimento do estudo.

Até aqui, nos ajudou o Senhor.

1 Samuel 7:12b

RESUMO

As demandas energéticas atuais que visam o desenvolvimento das atividades industriais, agrícolas e residenciais requerem muita atenção, pois as utilizações de fontes de combustíveis fósseis estão se tornando cada vez mais escassos e o mesmo têm causado problemas ambientais. Durante a exploração, o refino, o transporte e as operações de armazenamento do petróleo e/ou de seus derivados podem ocorrer derramamentos acidentais ocasionando a contaminação do ambiente. Tais eventos motivam, a realização de pesquisas relacionadas com a remediação de locais contaminados como a biorremediação. As restingas são ambientes de grande importância devido a sua proximidade com o mar e com características distróficas formadas pelas ações das marés, ciclos de ventos e movimentos de areia. Apresenta ainda grandes taxas de endemismo. Os interesses por estes ambientes têm aumentado, pois nela se desenvolvem as principais atrações turísticas das cidades litorâneas, e detém potencial econômico como o escoamento de produtos em portos, podendo gerar danos passíveis de contaminação provindas do mar e do solo. A restinga de Massambaba compreende grande importância ecológica estando situada em áreas protegidas abrangendo a APA de Massambaba, Reserva Extrativista Marinha, Parque Estadual Costa do Sol. Neste sentido foi feito um levantamento bibliográfico das principais publicações sobre a Restinga de Massambaba e foram feitas análises da microbiota associada à raiz de *Remirea marítima* e do solo da formação vegetal psamófila-reptante. Foram isolados e quantificados os esporos de FMA, verificado a taxa de colonização de *R. marítima* por FMAs, foram isolados as bactérias presentes no solo e nos esporos de FMAs com verificação da sensibilidade das mesmas em presença de tolueno cultivadas em meio líquido e sólido e o crescimento avaliado na presença e ausência de tolueno. De acordo com nossos resultados o solo da psamófila-reptante possui grande quantidade de FMA dos Gêneros *Glomus sp.* e *Gygaspora sp.* e as raízes de *R. marítima* encontram-se abundantemente colonizadas por FMAs (96,67%). Nossos resultados indicam um possível efeito protetor dos vegetais por FMAs quando na presença de tolueno, com uma ação que pode ocorrer sem uma efetiva participação de bactérias.

Palavras- chave: Restinga; Massambaba; biorremediação; Tolueno; FMA; Bactéria.

ABSTRACT

Now a day the development of industrial, agricultural and residential activities have increased the energy demands. These facts require close attention due to fossil fuel sources uses in high scale causing environmental problems as consequence. During the exploration, refining, transportation and oil storage or its derivates may occur accidental spills causing environmental contamination. These events motivate the research related to remediation of contaminated sites such as bioremediation. Sand banks have great rates of endemism and are also very important environments due to its proximity to the sea presenting dystrophic characteristics shaped by the action of tides, wind cycle, sand movements. The interests for these environments have risen, due to the fact that these areas develop the main tourist attractions of the coastal cities, and have economic potential as the flow of goods imports, which may cause damage as contamination on sea and soil. The sand bank known as Restinga de Massambaba comprises great ecological importance and is located in protected areas covering PAC Massambaba, Marine Extractive Reserve, State Park Costa del Sol. Regarding to these arch it was made a literature review, including the major publications on Restinga Massambaba. It was also made the analysis of the microbiota in association with *Remirea maritime* root sand psamófila reptant-plant soil training. The spores of AMF were isolated and quantified, *R. maritime* colonization rate for AMF were checked, the bacteria present in soil and mycorrhizal spores were isolated and its sensitivity to toluene was observed in the presence of toluene cultured in liquid and solid growth media and evaluated in the presence and absence of toluene. According to research results the soil psamófila-reptant presents a large amount of *Glomus sp.* and *Gygaspora sp.* and *R. maritime* roots are abundantly colonized for AMF (96.67%). The results indicate a possible protective effect of vegetables for AMF in the presence of toluene, concluding that this action may occur without an effective participation of bacteria.

Key words: Sand bank; Massambaba; bioremediation; toluene; AMF; Bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** – Divisão do perfil esquemático de restingas.
- FIGURA 2** – Perfil das zonas de vegetação estudadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.
- FIGURA 3** – Diversidade no adensamento vegetacional.
- FIGURA 4** – Perfil esquemático da restinga de Massambaba
- FIGURA 5** - Mapa do Parque Estadual da Costa do Sol evidenciando os núcleos de interesse ecológico em seus respectivos municípios..
- FIGURA 6** – Mapa da Região dos Lagos.
- FIGURA 7** – Tratamento demonstrando o percentual médio de sobrevivência de *B. decumbens*.
- FIGURA 8** – Mapa da abrangência da Restinga de Massambaba.
- FIGURA 9** – Foto da primeira área de coleta com as marcações dos pontos de extração de amostras.
- FIGURA 10** – Ocorrência e frequência de esporos encontrados no solo da psamófila-reptante.
- FIGURA 11** – Distribuição e porcentagem de colonização de FMA em raiz de *Remirea marítima*.
- FIGURA 12** – Raízes de *Remirea marítima*.
- FIGURA 13** – Colônias bacterianas isoladas dos esporos
- FIGURA 14** – Análise comparativa entre as bactérias isoladas dos esporos mediante a presença de tolueno nas diferentes concentrações.
- FIGURA 15** – Bactérias isoladas do vegetal *Remirea marítima*
- FIGURA 16** – Crescimento de UFC em meio sólido com adição de Tolueno.
- FIGURA 17** - - Curva de crescimento bacteriano em meio sólido com Tolueno.
- FIGURA 18** – Efeito do Tolueno no crescimento da bactéria 3B Filme

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Trabalhos realizados que demonstram as características Físico-Químicas do local e arredores.

TABELA 2 – Trabalhos realizados em ambiente terrestre que mencionem a Restinga de Massambaba.

TABELA 3 – Trabalhos realizados em ambiente aquático que mencionem a Restinga de Massambaba ou a RESEX Mar.

TABELA 4 – Descrição dos principais vegetais encontrados na Restinga de Massambaba da zona halófila-psamófila-reptante.

TABELA 5 - Presença de bactérias na desinfestação dos esporos.

TABELA 6 – Morfotipos encontrados na rizosfera de *Remirea maritima*.

TABELA 7 – Crescimento de colônias bacterianas em meio Ágar após 7 dias.

TABELA 8 - Média de unidades formadoras de colônias bacterianas em meio sólido.

LISTA DE ABREVIACÕES

- APA** – Área de Preservação Ambiental
- BFN** – Bactérias Fixadoras de Nitrogênio
- BTEX**- Hidrocarbonetos: Benzeno, Tolueno, Etil-benzeno e Xileno
- BOD** - Demanda bioquímica de Oxigênio
- CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
- CDVCF** – Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio
- CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente
- DL50** – Dose letal mediana
- D.O.** – Densidade ótica
- EPS** – Substância Polimérica Extracelular
- FMA**- Fungo Micorrízico arbuscular
- HA**- Hidrocarboneto aromático
- HPA** – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
- IEAPM** – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
- INEA** – Instituto Estadual do Ambiente
- LEMAN**- Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental
- LB**- Meio de cultura bacteriana_Luria-Bertani
- MA**- Micorriza arbuscular
- PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase
- PECSol** – Parque Estadual da Costa do Sol
- PGA** – Polissacarídeo d- glutamato
- QS** – Quorum Sensing
- RESEX Mar** – Reserva Extrativista Marinha
- RESEX Mar AC**- Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo
- SNUC** – Sistema Nacional de Unidades de Conservação
- UFRRJ** – Universidade Rural do Rio de Janeiro
- UMG** – Último Máximo Glacial
- ZPVS** - Zonas de Preservação da Vida Silvestre
- ZPVS- D** - Zonas de Preservação da Vida silvestre área D

LISTA DE SÍMBOLOS

° - Graus

°C- Grau Celsius

cm – Centímetros

et al. – E colaboradores

g- Gramas

H₂O₂ – Água Oxigenada

h - Hora

ha – Hectares

Kg – Quilos

Km - Quilômetros

KOH – Hidróxido de Potássio

m - Metros

ml- Mililitros

mm – Milímetros

N – Nitrogênio

n° - Número

NH₄OH – Hidróxido de amônio

nm - nanômetros

pH – escala para a grandeza físico-química potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

qsp -Quantidade Suficiente Para

rpm – rotação por minuto

S/N° - Sem número

UV – Ultra Violeta

% - por cento

v/v – Volume por volume.

μl- Microlitro

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
EPIGRAFE	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTAS DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES	x
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
1 APRESENTAÇÃO.....	13
2. ARTIGO CIENTÍFICO	
RESTINGA DE MASSAMBABA: REVISÃO SISTEMÁTICA	
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
2.1 INTRODUÇÃO	16
2.2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.2.1 Restingas	17
2.2.2 Restinga de Massambaba	19
2.3 OBJETIVOS	25
2.3.1 Objetivo Geral	25
2.3.2 Objetivos Específicos	25
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
2.6 CONCLUSÃO.....	30
2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

3. ARTIGO CIENTÍFICO

ECOLOGIA E POTENCIAL REMEDIADOR DO CONSÓRCIO FMA – BACTÉRIA ISOLADO DA RIZOSFERA DE *Remirea maritima*

RESUMO	46
ABSTRACT	47
3.1 INTRODUÇÃO	48
3.2 REVISÃO DE LITERATURA	49
3.2.1 Biorremediação	49
3.2.2 Fitorremediação	49
3.2.3 FMA	50
3.2.4 Bactérias	51
3.2.5 Bactérias formadoras de biofilme	52
3.2.6 Vegetação Psamófila-reptante - <i>Remirea maritima</i>	53
3.2.7 Hidrocarbonetos do petróleo	53
3.2.8 Tolueno	54
3.2.9 Resultados Preliminares	55
3.3 OBJETIVOS	56
3.3.1 Objetivo Geral	56
3.3.2 Objetivos Específicos	56
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	56
3.4.1 Local da coleta de amostras	56
3.4.2 Metodologia de amostragem do solo e plantas para estudo	59
3.4.3 Contagem de esporos	61
3.4.4 Colorização das Raízes	61
3.4.5 Colonização de Micorrizas	62
3.4.6 Isolamento de Bactérias dos esporos	62
3.4.7 Teste de desinfestação de esporos	62
3.4.8 Análise de densidade ótica das bactérias isoladas dos esporos	63

3.4.9 Obtenção e manutenção das bactérias da rizosfera	63
3.4.10 Coloração de Gram	63
3.4.11 Meio Agar-Agar em presença de tolueno	64
3.4.12 Meio Agar-LB em presença de tolueno	64
3.4.13 Tolerância ao tolueno em meio LB líquido	64
3.5 RESULTADOS	65
3.5.1 Contagem de esporos	65
3.5.2 Colonização de raízes de <i>Remirea maritima</i> por FMA	67
3.5.3 Bactérias Isoladas do FMA.....	69
3.5.4 Verificação dos efeitos de tolueno no crescimento de bactérias isolados de <i>Glomus</i> sp.	69
3.5.5 Desinfestação de esporos	70
3.5.6 Isolamento de bactérias da rizosfera de <i>Remirea maritima</i>	71
3.5.7 Coloração de Gram em isolados bacterianos	72
3.5.8 Meio Agar-Agar com tolueno utilizando a bactéria 3B Branca filme	73
3.5.9 Meio Agar-LB com tolueno utilizando a bactéria 3B Branca filme	74
3.5.10 Crescimento bacteriano em meio líquido na presença de tolueno	75
3.6 DISCUSSÃO	76
3.7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. APRESENTAÇÃO

O período em que vivemos é dependente de grande quantidade de energia para desenvolver as atividades industriais, agrícolas e residenciais modernas. Durante a exploração, o refino, o transporte e as operações de armazenamento do petróleo e/ou de seus derivados podem ocorrer derramamentos acidentais ocasionando a contaminação do ambiente. Tais eventos vêm motivando, a realização de pesquisas relacionadas com a remediação de locais contaminados (Revisto por ANDRADE, 2010).

A biorremediação é uma técnica em que se utiliza o cultivo de micro-organismos autóctones ou alóctones, degradadores de compostos xenobióticos, ou matéria orgânica recalcitrante, no combate da degradação do ambiente sendo o método mais eficaz e econômico, pois participam dos ciclos biogeoquímicos dos elementos na biosfera (DAS; CHANDRAN, 2001).

Segundo a revisão de Andrade (2010), muitas empresas, têm despertado o interesse pelo uso da biorremediação como opção de reabilitação de áreas contaminadas. Em países como os Estados Unidos e Canadá, a técnica bioquímica de biorremediação vem sendo amplamente utilizada no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Porém, no Brasil as técnicas de biorremediação ainda estão na base da teoria, com poucos casos práticos, embora exista grande possibilidade de expansão.

Sob a perspectiva de se utilizar plantas associadas a micro-organismos em processos de remediação de áreas contaminadas surge, além do citado anteriormente, a demanda em se aprimorar as metodologias aplicadas aos inventários vegetacionais e microbiológicos criando-se unidades conservadas de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro para a conservação dos ecossistemas e biorremediação.

2. RESTINGA DE MASSAMBABA: REVISÃO SISTEMÁTICA

RESUMO

As restingas são ambientes de grande importância e interesse científico, pois possuem características que dificultam o estabelecimento populacional na linha de sucessão devido às características distróficas formadas pelas ações das marés e ciclos de ventos que promovem movimentos de areia com a formação de dunas. Apresenta ainda grandes taxas de endemismo ao longo de sua extensão. Os interesses por estes ambientes têm aumentado, pois nela se desenvolvem as principais atrações turísticas das cidades litorâneas, aumentando cada vez mais o seu potencial econômico. A especulação imobiliária de alto valor comercial, assim como o interesse pelo escoamento de produtos em portos, pode gerar danos passíveis de contaminação provindas do mar e do solo, além das extrações irregulares de areia. Devido à proximidade com o mar as restingas foram classificadas de diversas formas, ou por deposição sedimentar, ou por características físicas, ou por distribuição florística. A restinga de Massambaba compreende grande importância ecológica estando situada em áreas protegidas abrangendo a APA de Massambaba, Reserva Extrativista Marinha, Parque Estadual Costa do Sol. Neste sentido foi feito um levantamento bibliográfico das principais publicações sobre a Restinga de Massambaba que demonstrou que foram poucos os estudos na área o que justifica o interesse e uma maior relevância para o conhecimento da área.

Palavras-chave: Restinga; Massambaba; Reserva Extrativista, APA

ABSTRACT

The dunes are of great importance and scientific interest environments because they have characteristics that hinder population establishment in the line of succession because of dystrophic features formed by the action of tides and winds cycles that promote movement of sand to the dune formation. Still has high rate of endemism along its length. The interest in these environments has increased because it develops the main tourist attractions of the coastal cities and urban occupation areas, with great economic potential. Real estate speculation of high commercial value as well as interest in the flow of goods in ports can generate damage likely stemmed from the sea and soil contamination, in addition to irregular extractions of sand. The proximity to the sea the dune was classified in several ways, either by sediment deposition, or physical characteristics, or floristic distribution. The Massambaba dune comprises ecologically important being situated in protected areas covering Massambaba APA, Marine Extractive Reserve, Costa do Sol State Park. This direction was made literature major publications on Massambaba dune which showed that there were few studies in which justifies a greater interest and relevance to the area.

Keywords: Restinga; Massambaba; Extractive Reserve, APA

2.1 INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente rico em diversidade de micro-organismos que mantêm constante interação com os vegetais presentes e principalmente na rizosfera (Revisto em ARTURSSON e colaboradores, 2006), pois nela ocorre a absorção de nutrientes pelo vegetal e as trocas de substância com os seres decompositores, transformadores e/ou assimiladores como os fungos e as bactérias. Estas associações entre os micro-organismos do solo e os vegetais presentes propiciam uma dinâmica que permite adaptações às condições ambientais (MELLONI *et al.*, 2012; NOVAIS, 2008). Os solos podem sofrer estresses gerados por ações antrópicas em áreas urbanas e atingir ambientes de interesse ecológicos pouco estudados como as restingas, que possuem características marcantes (MENESES; ARAÚJO, 1999), onde dunas frontais são colonizadas por plantas herbáceas (CORDAZZO; SEELINGER, 1988). Devido a influência do mar sobre estes ecossistemas que apresentam sedimento arenoso, configura-se aí um ambiente salino com pouca disponibilidade de matéria orgânica, alta porosidade e grande lixiviação, pois as planícies costeiras formadas pela justaposição de cordões litorâneos modelam as praias, dunas frontais, cordões litorâneos e zonas intercordões (MENESES; ARAÚJO, 1999). As restingas anteriormente já foram classificadas como "feixes de restinga" (BIGARELLA, 1954), "terraços de construção marinha" (BIGARELLA, 2001), "antigos cordões de praias", "meandros abandonados", "outras feições lineares" (RIVEREAU *et al.*, 1968) e "alinhamento de antigos cordões litorâneos" (MARTIN *et al.*, 1988). Estas áreas ainda sofrem variações do lençol freático, pois em solos arenosos há grande percolação de água gerando uma camada branca abaixo de tudo que é acumulado e lavado do solo superior (BARCELLOS *et al.*, 2011).

Magnago (2009) reforça que as áreas de restinga podem ainda ser classificadas de acordo com a deposição de sedimentos, considerando-se a proximidade do mar e rios como porção inundável e inundada, formando quatro fisionomias (floresta inundada, inundável, não inundável de transição e não inundável). O forte controle pedológico e hidrológico sobre as características fitofisionômicas das restingas se deve ao porte do vegetal segundo a sucessão ecológica estabelecida (MAGNAGO *et al.*, 2011). Na medida em que se verifica o porte do vegetal, considera-se então o seu crescimento mediante sua estrutura fixadora, raízes, que estão associadas a outros organismos. Berbara e colaboradores, (2006) indicam que 80 % das

famílias de plantas são colonizadas por espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Estes são encontrados em regiões tropicais com solo pobre e alta capacidade de adsorção de fosfatos (SIQUEIRA, 1994).

Nesse contexto faz-se necessário o estudo das características do ambiente de restinga onde ocorrem as interações entre os seres vivos, ecossistema ameaçado pela atividade antrópica oriundas do oceano e de atividades terrestres. Esta região geográfica geralmente não é entendida como um ecossistema frágil, sendo assim, faz-se necessário conhecê-la para entender a ecologia e o potencial de recuperação em caso de contaminações e a proteção deste ecossistema ameaçado.

2.2 REVISÃO DA LITERATURA

2.2.1 Restingas

A costa litorânea do Brasil possui 9200 km, dos quais grande parte são cobertos por restingas (ARAÚJO; HENRIQUES, 1984; ARAÚJO, 1992), que se originou a partir de depósitos marinhos quaternários formando solos arenosos (ARAÚJO, 1992; ARAÚJO; MACIEL 1998; SCARANO, 2002). Conforme a resolução do CONAMA 303/2002 as restingas são classificadas como depósito arenoso paralelo a linha da costa formando uma franja, de forma geralmente alongada, produzido por processos de sedimentação que se renovam constantemente formando uma areia rica em sais, sem desenvolvimento de camada orgânica, sendo então pobres em nutrientes, bastante permeáveis e relativamente secos nas camadas superficiais. Nela encontram-se diferentes comunidades que recebem influência marinha, também consideradas comunidades edáficas por dependerem mais da natureza do substrato do que do clima. A vegetação característica da zona halófila-psamófila, ou também chamada de vegetação pioneira de dunas (BARROS *et al.*, 1991; ALMEIDA; ARAÚJO, 1997) possui uma composição florística semelhante ao longo da costa brasileira e que está adaptada às condições de adversidades como os solos arenosos, a alta salinidade, a ação das ondas e dos ventos que carregam areia, e danificam as partes superiores dos vegetais (ALONSO, 1977; ARAÚJO; LACERDA, 1987; MANTOVANI 1992; THOMAZ;

MONTEIRO, 1994). A cobertura vegetal nas restingas ocorre em mosaicos, e encontra-se em praias, cordões arenosos, dunas e depressões, apresentando, de acordo com o estágio de sucessão, estrato herbáceo, arbustivos e arbóreo adaptada às condições ambientais sendo esta última classificação mais interiorizada (fig. 1).



Figura 1- Divisão do perfil esquemático de restingas. Fonte: zonacosteira.bio.ufba.br

Cada sistema de restinga tem uma singular topografia, fisionomia e flora (ARAÚJO, 2000). No entanto, a distribuição da vegetação em zonas parece ser um padrão ao longo da costa (ARAÚJO; HENRIQUES, 1984). Para tanto há de se considerar que cada zona possui limites diferenciados para as condições adversas, tais como a alta temperatura, disponibilidade de água no solo e alta salinidade (ROCHA *et al.*, 2008).

Segundo Meneses e Araújo (1999), as restingas possuem ainda características definidas pela posição da praia constituindo duas regiões. A halófila é uma área instável, pois é lavada eventualmente pelas águas do mar, e os vegetais são relevantes pela tolerância ao sal do substrato (ANDRADE, 1966). A formação psamófila-reptante pela tolerância a alta mobilidade pois fica localizada na faixa contígua atingida pelas ondas apenas nos períodos de tempestades, e sua cobertura vegetal contribui de maneira significativa para a estabilidade destas areias. Esta última forma, uma zona tampão entre o mar e as áreas interiores da planície, pois as espécies herbáceas são particularmente sensíveis às alterações do microclima e do solo, o seu pequeno porte e sistema radicular superficial são indicadores das condições ambientais (CITADINI-ZANETE *et al.*, 2001).

Araújo e Henriques (1984) ao classificar a vegetação da Restinga de Jurubatiba-RJ descreveu que a vegetação pode ser subdividida em quatro zonas diferentes: reptante halófila-psamófilos, pós-praia fechada ; arbustiva aberta de *Clusia* e Myrtaceae matagal fechado, cada um deles caracterizado de acordo com o aspecto geral da vegetação e categorizados seguindo

estes critério. No entanto COGLIATTI-CARVALHO e colaboradores (2001) esquematizou o perfil das zonas de vegetação (fig 2) segundo a proposta de Araujo *et al* (1998).

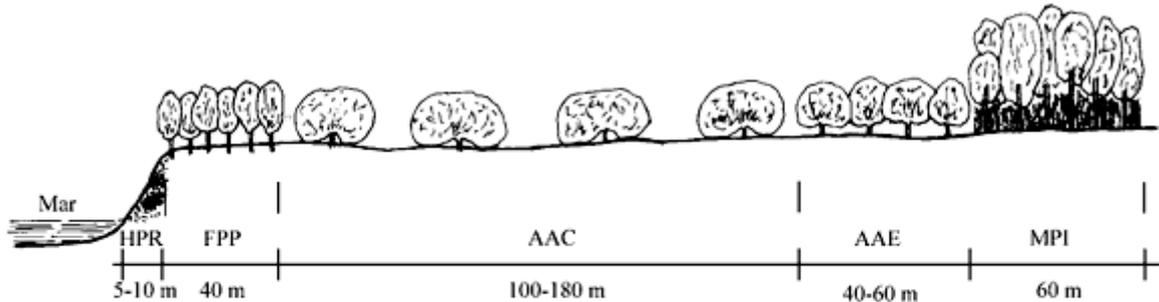


Figura 2. Perfil das zonas de vegetação estudadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. HPR = halófila e psamófila reptante; FPP = fechada de pós-praia; AAC = área aberta de *Clusia*; AAE = área aberta de Ericácea; MPI = mata periodicamente inundada.

Fonte: COGLIATTI-CARVALHO *et al.*, 2001.

O mesmo não se pode notar quando a influência dos ventos e a dinâmica das ondas são diferentes nos mais diversos ambientes litorâneos podendo alterar as características fitofisionômicas configurando pequenas variações, conforme representado na Fig 3.

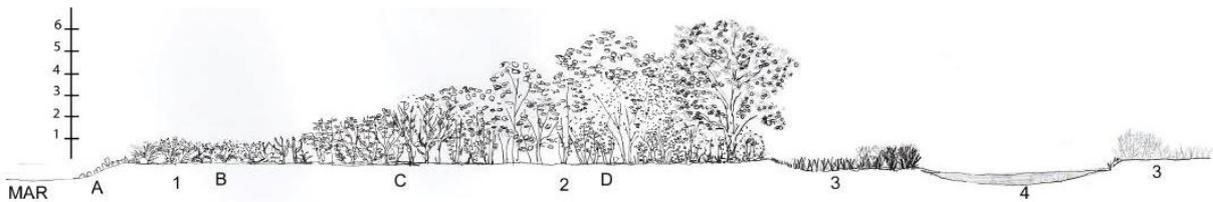


Figura 3: Diversidade do adensamento vegetacional. Fonte: <http://mangueerestinganilhado cardoso.blogspot.com.br/p/restinga.html>

2.2.2 Restinga de Massambaba

Localizada no Estado do Rio de Janeiro, a restinga de Massambaba (fig. 4) está no Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio (CDVCF), nos municípios de Saquarema, Araruama e Arraial do Cabo (22.92417° SUL; 42.22431° OESTE).

Compreende a Área de Proteção Ambiental de Massambaba (APA) criada por meio do Decreto 9.529, de 15/12/1986,

Com os objetivos de: preservar áreas remanescentes de restinga, lagoas costeiras e brejos, responsáveis pelo abrigo de inúmeras espécies de aves migratórias e habitat de espécies vegetais endêmicas; preservar inúmeros sítios arqueológicos, fundamentais para pesquisas científicas; (Decreto 9.529, de 15/12/1986)

A administração está a cargo do Instituto Estadual do Meio Ambiente INEA, com o plano de manejo instituído pelo decreto 41.820 de 16 de abril de 2009. Apresenta uma área de 7.630 ha, contendo ao todo 26 km de praias, sendo que no seu ponto mais estreito possui 700 m de largura, enquanto no seu ponto mais largo mede aproximadamente 6.000 m (INEA, 2014).

Agrupa-se a APA de Massambaba a Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, (RESEX Mar AC), criada pelo Decreto S/Nº de 03 de janeiro de 1997, ocupando uma área de 56.796 ha de lâmina de água ao longo de uma faixa de 3 milhas adjacentes à costa com objetivos de “garantir a exploração autossustentável e a conservação dos recursos naturais renováveis, tradicionalmente utilizados para a pesca artesanal, por população extrativista do município de Arraial do Cabo” (decreto s/nº de 03 de janeiro de 1997).

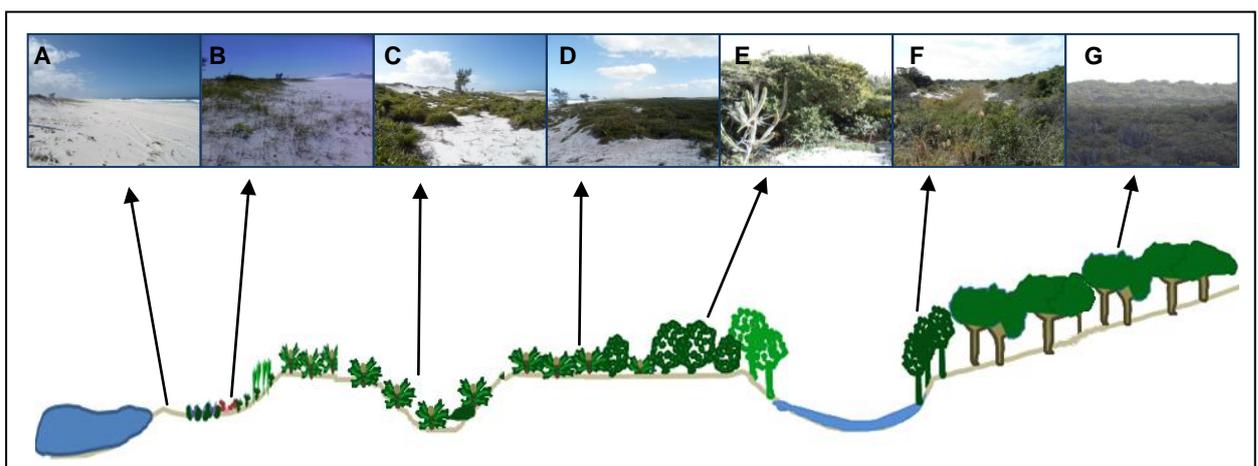


Figura 4 – Perfil esquemático da Restinga de Massambaba- Arraial do Cabo- RJ onde em (A) área halófila, (B) psamófila-reptante, (C) fácies baixa, (D) herbácea aberta inundável, (E)

arbustiva fechada pós-praia, (F) florestal inundada e inundável e (G) florestal não inundável.
fonte: elaboração própria.

Araújo e colaboradores (2009) descrevem que na restinga de Massambaba foram identificadas 10 formações vegetais para as áreas de restinga: “psamófila reptante, arbustiva fechada pós-praia, arbustiva aberta não inundável (fácies baixa), herbácea aberta inundável, arbustiva aberta não inundável (fácies alta), arbustiva aberta inundável, florestal não inundável, florestal inundada; florestal inundável, e herbácea-arbustiva salina, nos terrenos salinos”.

O Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio pertence ao bioma Mata Atlântica e conforme Araújo (1997) apresenta uma riqueza de espécies localizadas nas restingas do Rio de Janeiro com um somatório de 57% das espécies em 12% da área total. A Área de Proteção Ambiental de Massambaba, pertencente ao CDVCF, é uma área de importância ecológica (ROCHA *et al.* 2003), que em 2011 ganhou mais uma conquista, no que tange a preservação, com a criação do Parque Estadual da Costa do Sol (PECSol). O PecSol é uma Unidade de Conservação Integral (UCI), segundo a classificação do Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), com o decreto nº 42.929 de 18 de abril de 2011 perfazendo uma área total aproximada de 9.840,90 hectares, dividido em quatro setores abrangendo os municípios de Araruama, Armação de Búzios, Arraial do Cabo, Cabo Frio, Saquarema e São Pedro da Aldeia.

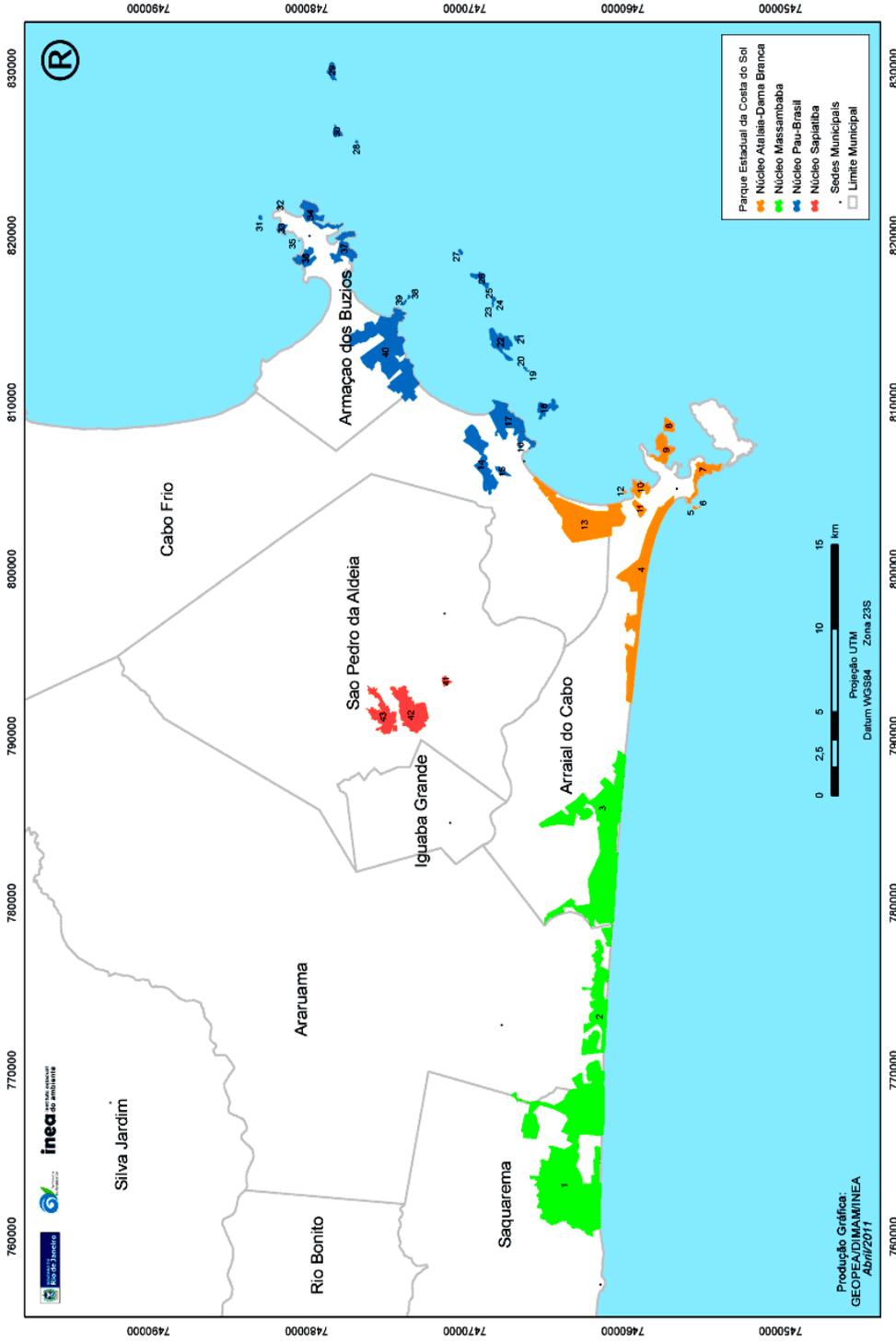


Figura 5: Mapa do Parque Estadual da Costa do Sol evidenciando os núcleos de interesse ecológico em seus respectivos municípios. Fonte: <http://www.vozdasaguas.com/wp-content/uploads/2012/04/PECSol-Mapa.png>

Estudos indicam que a formação da restinga iniciou-se durante o Pleistoceno, mais de 120.000 anos atrás durante a regressão marinha isolando os seus corpos de água e se estendeu até o Último Máximo Glacial (UMG, 17.000 anos). Com a chegada da transgressão da UMG, iniciou-se a formação das restingas (entre 7.000 e 5.000 anos atrás) formando duas linhas de cordões arenosos onde a primeira data aproximadamente 120.000 anos e a segunda de 7.000 anos, e assim se deu também as formações lagunares que ocorrem entre elas (TURCQ *et al.*, 1999). Segundo Muehe e Corrêa (1989), sistemas de restinga de dupla barreira se desenvolvem como resultado de flutuações do nível do mar, que acabam por modelar o relevo (GUERRA; CUNHA, 2001).

Essa região apresenta dois fatores importantes: uma grande área litorânea em relação ao oceano, e o fenômeno da ressurgência, que promove a subida das águas frias das correntes do fundo oceânico provinda do degelo do pólo Sul, trazendo consigo grande quantidade de nutrientes para a superfície. A presença desse fenômeno torna a região muito rica elevando dessa forma, a quantidade e a diversidade de espécies (ARAÚJO, 2000; INEA, 2014).

Os solos de restinga geralmente possuem coloração clara, rica em minerais como o quartzo, argilas silicatadas e outros, sendo facilmente coloridos por outros componentes de maior pigmentação (MATOS, 1997). Além disso, os ambientes onde as plantas ocorrem, podem apresentar baixa disponibilidade de matéria orgânica, drenagem rápida da água, luz solar direta e intensa causando superaquecimento (ANDRADE, 1966).



Figura 6: Mapa da Região dos Lagoas. (adaptado) extraído de <http://www.vozdasaguas.com/edicao/02/>

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo Geral

Sistematizar as publicações relacionadas aos ecossistemas de restinga do Estado Rio de Janeiro com ênfase na restinga de Massambaba.

2.3.2 Objetivos Específicos

- Reunir as publicações realizadas na Restinga de Massambaba que caracterizem ou cite este ambiente.
- Caracterizar as publicações referentes as características físico-químicas, Fauna, Flora e organismos encontrados no ambiente aquático inseridos na RESEX Mar.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

Foi conduzida uma pesquisa sobre artigos publicados nas bases de dados dos sites do portal Capes, Scielo, Isi Knowledge e Google acadêmico para identificar estudos relevantes publicados, dissertações de mestrado e tese de doutorado disponíveis em meio eletrônico, em qualquer período de publicação até o ano de 2014. Foram selecionados os estudos que abordavam a área ou a composição da restinga de Massambaba ou que estivessem presentes no Centro de Diversidade de Cabo Frio com relação as características físicas da restinga em questão. A revisão sistemática considerou estimativas sobre as (a) características físico-químicas do ambiente, (B) organismos vivos do ambiente terrestre (C) seres vivos do ambiente aquático. O processo de busca utilizou as seguintes palavras-chave: “Massambaba” ou, “sand dunes” ou “dunes” ou “RESEX Mar” ou “APA Massambaba” ou “restinga”, “Arraial do cabo” ou “Cabo Frio”. Foram adotados os seguintes critérios de inclusão dos estudos: (a) artigos que cite Massambaba, (b) estudos realizados na restinga de Massambaba

(c) estudos de seres vivos encontrados em Massambaba e catalogados em arquivos diversos (d) estudos de seres vivos em Arraial do Cabo na área de Massambaba (e) distribuição de seres vivos diversos presentes em Massambaba e; (f) caracterização de restingas, (g) compensação por serviços ambientais.

Os critérios adotados para a exclusão dos estudos foram: (a) aqueles que não estavam no idioma inglês, português ou francês; (b) que não citavam a área de Massambaba; (c) limitados as características urbanas; (d) versavam sobre pesca artesanal; (e) com objetivos de estudo sobre o Porto na praia dos Anjos; (f) politizavam sobre as invasões nas áreas de dunas; (g) tratavam de aspectos culturais da cidade; (h) faziam análises das cidades do Centro de Diversidade da Região de Cabo Frio indistintamente (i) abordagens histórico-econômico e/ou cultural; (j) sobre expedições ou importância da Ilha do Farol; (k) acerca da Ilha de Cabo rio e;(l) investigações turísticas.

Inicialmente, para verificar se os artigos atendiam aos critérios de inclusão, os títulos de todos os trabalhos identificados foram avaliados assim como os seus resumos. Na segunda fase, caso os resumos não estivessem claros quanto a adequação da busca, fazia-se então a leitura total do artigo. Os artigos selecionados foram organizados em tabelas (tabs 1, 2 e 3) de acordo com o ambiente em que ocorriam, tipo de estudo, autor e ano de publicação.

Para a construção do perfil esquemático da Restinga de Massambaba, foram consultadas literatura de fitofisionomia e formação geológica, e em campo foram constatas as divisões dos perfis que foram fotografadas em acordo com a sub área da Zona de Preservação da Vida Silvestre- ZPVS-D.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 132 artigos das quais 74 foram selecionados para a composição das tabelas. Foram excluídos 58 por não estarem de acordo com os itens de busca. Em análise 12 artigos especificam-se em análises físico-químico da área, 33 foram realizados em ambientes aquáticos e 29 em ambientes terrestres, dos quais apenas 10 autores restringiram-se em estudos específicos da área da restinga de Massambaba (tabs. 1, 2, e 3)

Tabela 1 – Trabalhos realizados que demonstram as características Físico-Químicas do local e arredores.

	Autor	Ano
Físico-Químico	Muehe, D	2011
	Motoki <i>et al.</i>	2011
	Motoki, <i>et al.</i>	2009
	Kiefer, <i>et al.</i>	2008
	Pereira <i>et al.</i>	2008
	Muehe, D	2006
	Silva, <i>et al.</i>	2006
	Dantas <i>et al.</i>	2001
	Bentes <i>et al.</i>	1997
	Paiva, A. M.	1993
	Tenório, M. C.	1992
	Motoki <i>et al.</i>	1988

Tabela 2 – Trabalhos realizados em ambiente terrestre que mencionem a Restinga de Massambaba.

Vegetal	Ambiente Terrestre	
	Autor	Ano
	Martins <i>et al.</i>	2012
	Aguiar <i>et al.</i>	2011
	Barros, M.J.F.	2011
	Araujo <i>et al.</i>	2009
	Rocha-Pessôa <i>et al.</i>	2008
	Barros; Costa	2008
	Fonseca-Kruel, <i>et al.</i>	2006
	Dunley B. S.	2006

	Duarte <i>et al.</i>	2005
	Vieira, R.C	2002
	Somner G. V	2001
	Braga, J.M.A	2001
	Lopes, R.C	1999
	Yano, O.	1993
	Leme, M.C.	1985
Animal	Chaves F. G	2014
	Chaves <i>et al</i>	2013
	Ariani <i>et al.</i>	2013
	Maia-Carneiro <i>et al.</i>	2013
	Chaves, Alves	2013
	Mattos <i>et al.</i>	2009
	Rocha <i>et al.</i>	2008
	Rocha <i>et al.</i>	2008
	Vecchi; Alves,	2008
	Kiefer <i>et al.</i>	2005
	Maia, V. R. C.	2005
	Coelho <i>et al.</i>	2004
	Ruta, C	1999

Tabela 3 – Trabalhos realizados em ambiente aquático que mencionem a Restinga de Massambaba ou a RESEX Mar

Ambiente Aquático		
	Autor	Ano
Micro-organismos	Jurelevicius	2014
	Magalhães, F. S.	2012
	Delfino, D.	2012
	Ramalho <i>et al.</i>	2008

	SILVA <i>et al</i>	2008
	Villaça <i>et al.</i>	2008
	SILVA <i>et al</i>	2006
	Bravin; Yoneshigue-Valentin	2002
	Coutinho <i>et al</i>	1989
Macro-organismos	Moura	2010
	Ribeiro <i>et al.</i>	2009
	Gaelzer; Zalmon	2008
	Cardoso, M.	2007
	Rocha	2005
	Lage, L. M.	2005
	Alves <i>et al</i>	2004
	Rapagn, L. C.	2004
	Floeter <i>et al.</i>	2004
	Fernandes, F.C.	2004
	Lages, B. G	2003
	Ferreira, C. E. L	2003
	Barata <i>et al.</i>	2002
	Thiengo <i>et al</i>	2002
	Barata; Fabiano	2002
	Floeter <i>et al</i>	2001
	Serejo, C. S.	1998
	Castro, <i>et al.</i>	1995
	Castro <i>et al.</i>	1993
	Muricy <i>et al.</i>	1991
	Costa; Haimovki	1990
	Ricy, G. I. M	1989
	Geise; Borobia	1988
Lacombe; Rangel	1978	

Em acordo com as publicações sobre restingas, Carvalho e Sá (2011), Aguiar *et al.*,(2011), Araújo *et al.*, (2009), Rocha-Pessôa e colaboradores (2008), Araújo e Maciel (1998) e Yano (1993) fizeram estudos florísticos em restingas fluminenses. Destes autores apenas Aguiar (2011), Araújo *et al.*, (2009), Rocha-Pessôa e colaboradores (2008) e Yano (1993) restringiram-se a restinga de Massambaba. Se considerarmos os levantamentos faunísticos, pouco foi publicado apresentando apenas Vecchi e Alves (2008) e Chaves (2013) com trabalho sobre a ave *Formicivora littoralis*, além de Rocha (2008) com distribuição de anuros em restingas e Carneiro (2012) que aborda a ecologia térmica de *Liolaemus lutzae* (Squamata, Liolaemidae). No ambiente aquático, Delfino (2012) fez estudos sobre a sedimentação de algas no Brejo do Espinho e Ruta (1999) observou a distribuição de poliquetas na área da plataforma continental as margens da restinga.

2.6. CONCLUSÃO

De acordo com os trabalhos realizados na restinga de Massambaba, observa-se que pouco tem sido publicado sobre a área compreendida neste estudo, principalmente sobre quando as buscas apontam ausência das características microbiológicas do solo, estudos faunísticos, relações entre os seres vivos, processos físico-químico e princípios da compensação por serviços ambientais, concentrando-se, porém os estudos na área marinha da RESEX Mar.

2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que apontem as características dos ecossistemas de restinga, com especial atenção aos consórcios microbianos relacionados à manutenção vegetal, estabilidade de dunas e potencial biorremediador para a mitigação de prováveis contaminações por hidrocarbonetos provenientes da atividade exploratória do petróleo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. A. Anatomia foliar de algumas plantas freqüentes nas praias arenosas do Estado de São Paulo. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 28, n. 11, p. 1297-1305, 1966.

AGUIAR, T. M; SABBA-SRUR, A. U. O; SAMICO, G. F. Potencial nutritivo e características físicas e químicas do abajeru. Pesquisa Agropecuária Tropical, v.41, n.1, p.102-109, Mar 2011.

ALMEIDA, A. L.; ARAÚJO, D. S. D. Comunidades Vegetais do Cordão Arenoso Externo da Reserva Ecológica Estadual de Jacarepiá, Saquarema, RJ. Oecologia Brasiliensis, Rio de Janeiro, v. 3, p. 47-63, 1997.

ALONSO, M. T. A. Vegetação. Pp. 91-118. In: Geografia do Brasil. Região Sudeste. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, Rio de Janeiro, 3, 1977.

ALVES, V. S., A. B. A. SOARES. Aves marinhas e aquáticas das ilhas do litoral do Estado do Rio de Janeiro. Aves marinhas insulares brasileiras: bioecologia e conservação (JO Branco, ed.). Editora da UNIVALI, Itajaí: p.83-100, 2004.

ARAÚJO, D. S. D; LACERDA, L. D. A natureza das restingas. Ciência Hoje v.6, p.42-48, 1987.

ARAÚJO, D. S. D. Vegetation types of sandy coastal plains of tropical Brazil: a first approximation. In SEELIGER, U. (ed.), Coastal plant communities of Latin America. ACADEMIC PRESS, San Diego. p.337-347, 1992.

_____- Cabo Frio Region. In DAVIES et al. (eds.), Centres of plant diversity a guide and strategy for their conservation, WWF/ IUCN, OXFORD. vol. 3, p.373-375, 1997.

_____ - Análise florística e fitogeográfica das restingas do Estado do Rio de Janeiro. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 176p. 2000.

ARAÚJO, D. S. D; SÁ C. F. C.; J. F. PEREIRA; D. S. GARCIA; M. V. FERREIRA; R. J. PAIXÃO; S. M. SCHNEIDER ; V.S. FONSECA-KRUEL. Área de Proteção Ambiental da Massambaba, Rio de Janeiro: caracterização fitofisionômica e florística. Rodriguésia v.60, n.1, p.54-84, 2009.

ARAÚJO, D. S. D; HENRIQUES, R. P. B.1984. Análise florística das restingas do Rio de Janeiro, p. 159-193. In LACERDA, LD, ARAÚJO, D. S. D, CERQUEIRA, R., ; TURCQ, B., (orgs), Restingas: origem, estrutura e processos, CEUFF. Niterói, 475 p.1993.

ARAÚJO, D. S. D; MACIEL, N. C. Restingas fluminenses: biodiversidade e preservação. Boletim FBCN v.25, p.27-51, 1998.

ARAÚJO, D. S. D; SCARANO, F. R.; SÁ, C. F. C; KURTZ, B. C.; ZALUAR, H. L. T; MONTEZUMA, R. C. M. ; OLIVEIRA, R. C. 1998. Comunidades vegetais do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. Pp. 39-62. In: F. A. Esteves (ed.). Ecologia das lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do município de Macaé. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ARIANI, C; PICKLES, R; JORDAN, W; LOBO-HAJDU, G; ROCHA, C. Mitochondrial DNA and microsatellite loci data supporting a management plan for a critically endangered lizard from Brazil. Conservation genetics: v.14, n.5 p.943 -951, 2013.

ARTURSSON, V; FINLAY, R. D; J. JANSSON, J. K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth Environmental Microbiology v.8, n.1, p. 1–10, 2006.

BARATA, P.C.R; FABIANO, F.F.C. Evidence for leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) nesting in Arraial do Cabo, State of Rio de Janeiro, and a review of occasional

leatherback nests in Brazil. Marine Turtle Newsletter v.96, p.13–16, 2002.

BARCELOS, M. E. F; RIGUETE, J. R; SILVA, L.T.P; SILVA, A. G; FERREIRA Jr, P. D. Influência do solo e do lençol freático na distribuição das formações florísticas nas areias reliquiárias do Parque Estadual Paulo César Vinha, ES, Brasil. Natureza On Line. v.3, n.9, p.134-143, 2011. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br>> acesso em 21 de jul de 2013.

BARROS, F; MELO, M. M. R. F; CHIEA, S. A. C; KIRIZAWA, M; WANDERLEY, M. G. L; JUNG- MENDAÇOU, S. L. Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso: caracterização geral da vegetação e listagem de espécies ocorrentes. São Paulo. v.1. p.84, 1991.

BARROS, M. J. F. Senegalia Raf. (Leguminosae, Mimosoideae) do Domínio Atlântico, Brasil –Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro / Escola Nacional de Botânica Tropical, 120p., 2011.

BENTES, A. M. L; Fernandez, G. B. *et al.* "Estudo da morfodinâmica de praias compreendidas entre Saquarema e Macaé, RJ." Oecologia brasiliensis. v.3, n.1, 1997.

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, p.53-85, (ed. FERNANDES, M. S.), 432p. 2006.

BIGARELLA, J. J. Nota Sobre os Depósitos Arenosos Recentes do Litoral Sul-Brasileiro v.5, Fase. 1 E 2, p.233.231, 5 FI^a, 1954.

BIGARELLA, J. J; Contribuição ao Estudo da Planície Litorânea do Estado do Paraná. Brazilian Archives Of Biology and Technology. Jubilee Volume (1946-2001), p.65-110, December, 2001.

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, Brasil. IHERINGIA, Sér.

Bot., Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 73-82, jan./dez. 2006.

BOHRER, C. B. A.. Mapeamento da vegetação e do uso do solo no centro de diversidade vegetal de Cabo Frio, Rio De Janeiro, Brasil. Rodriguésia v.1, n.60, p.001-023, 2009.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA, RESOLUÇÃO Nº 303, Dispõe sobre parâmetros, definições e limites de Áreas de Preservação Permanente. DE 20 DE MARÇO DE 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA, Decreto s/nº de 03/01/1997 criação da Reserva Extrativista Marinha do Arraial do Cabo, no Município de Arraial do Cabo, Estado do Rio de Janeiro. disponível em: <http://www.ibama.gov.br/resex/arraial/opdecret.htm> acesso em 01 junho de 2014.

BRAVIN, I. C. AND Y. YONESHIGUE-VALENTIN. Influência de fatores ambientais sobre o crescimento in vitro de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta). Revista Brasileira de Botânica v.25, p.469-474, 2002.

CASTRO, C. B., C. A. Echeverria, *et al.* Distribuição de cnidaria e echinodermata no infralitoral de costões rochosos de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. Anais da Academia Brasileira de Ciências v.65, n.4, p. 458-458, 1993.

_____. Distribuição de cnidaria e echinodermata no infralitoral de costões rochosos de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Biologia v.55, n.3, p.471-480, 1995.

CARDOSO, M. Microperfurações em Foraminíferos Bentônicos da Lagoa Pitanguinha, RJ. Anuário do Instituto de Geociências. V.30, n.1 p.233, 2007.

CARVALHO, D.A; SÁ, C. F. C. Estrutura do estrato herbáceo de uma restinga arbustiva aberta na APA de Massambaba, Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia v.2, n.62, p.367-378, 2011.

CITADINI-ZANETTE, V.; SANTOS, R.; SOBRAL, M. Levantamento florístico da vegetação arbustiva-arbórea em área ecotonal entre restinga e floresta ombrófila densa de terras baixas (Praia de Palmas, Governador Celso Ramos, Santa Catarina, Brasil). Revista Tecnologia e Ambiente, v.7, n.1, p.105-120, 2001.

CHAVES, F. G. VECCHI, M. B, LAURINDO, T. F. S; ALVES, M. A. S. Nests, Eggs, and Nestlings of the restinga antwren *Formicivora littoralis* (aves: Thamnophilidae). Anais acadêmicos Brasileiro Científico, vol.85, n.2, p547-552, june 2013.

CHAVES, F. G; ALVES, M. A. S. Gender-related diet composition and morphometry of the Restinga Antwren, *Formicivora littoralis* (Aves: Thamnophilidae). Zoologia 30: 601-606. 2013.

CHAVES, F.G. Territorialidade e ecologia reprodutiva de *Formicivora littoralis* (Thamnophilidae) na Restinga da Massambaba, RJ. PhD thesis. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2014.

COELHO, E. P., V. S. ALVES. O atobá marrom (*Sula leucogaster*) na ilha de Cabo Frio, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. Aves marinhas e insulares brasileiras: biologia e conservação. Itajaí Editora da Univali, 266p. :233-254, 2004.

COSTA, P. A. S; HAIMOVKI, M. A pesca de polvos e lulas no litoral do Rio de Janeiro. dados v.33, n.162, p.256-1.896, 1990.

CORDAZZO, C. V; SEELIGER, U. Phenological and bio-geographical aspects of coastal dune plant communities in southern Brazil. Vegetation, n.75, p.169-173, 1988.

COUTINHO, R., V. CUNHA. Projeto Recrutamento. Variação espacial das curvas de fotossíntese vs. luz nas algas bentônicas da região de Arraial do Cabo e adjacências, RJ. Insula 19: 169-178, 1989.

COGLIATTI-CARVALHO, L; FREITAS, A. F. N; ROCHA C. F. D; SLUYS, M. V. Variação na estrutura e na composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v.24, n.1, p.1-9, mar. 2001.

DANTAS, M. E; E. SHINZATO. Diagnóstico geoambiental do estado do Rio de Janeiro. CPRM, Brasília. 2001.

DELFINO, D. Sedimentology and temporal distribution of microbial mats from Brejo do Espinho, Rio de Janeiro, Brazil. Sedimentary geology ,v.263-264 p.85 -95, 2012.

DUARTE, H. M; GEßLER, A; SCARANO, F. R; FRANCO, A C; MATTOS, E. A; NAHM, M; RENNENBERG, H; RODRIGUES, P. J. F. P; ZALUAR, H. L. T; LÜTTGE, U. Ecophysiology of six selected shrub species in different plant communities at the periphery of the Atlantic Forest of SE-Brazil Flora, v.200, n.5, p.456-476, 2005.

DUNLEY, B. S. Biologia reprodutiva de *Byrsonima sericea* (Malpigiaceae), em fragmentos de diferentes tamanhos na Restinga de Massambaba, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. 2006. 52 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

ELIAS, E. P; CARVALHO, Q. C; SILVA, F. L. P; BATISTA, I. H; PEREIRA, J. O; OLIVEIRA, T. C. S; SOUZA, A. D. L. Estudo do potencial de biodegradação de petróleo por fungos isolados da macrófita aquática *Eichornia crassipes* sp. Anais Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

FERNANDES, F. C., L. C. RAPAGNÃ. Estudo da população do bivalve exótico *Isonomon* bicolor (CB Adams, 1845)(Bivalvia, Isonomonidae) na Ponta da Fortaleza em Arraial do Cabo-RJ. Água de lastro e bioinvasão. Interciência, Rio de Janeiro p.133-141, 2004.

FERREIRA, C. E. L. Non-indigenous corals at marginal sites. Coral Reefs v.22, n.4, p.498-498, 2003.

FLOETER, S. R., R. Z. P. GUIMARAES. Geographic variation in reef-fish assemblages along the Brazilian coast. Global Ecology and Biogeography v.10, n.4, p. 423-431, 2001.

FONSECA-KRUEL, V. S; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil Acta Botânica Brasileira, v.1, n.18, p.177-190, 2004.

FONSECA-KRUEL, V. S., PEIXOTO, A. L. Plantas úteis da restinga: o saber dos pescadores artesanais de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

GAELZER, L. R. AND I. R. ZALMON. Diel variation of fish community in sandy beaches of southeastern Brazil. Brazilian Journal of Oceanography v.56, n.1, p.23-39, 2008.

GEISE, L; M. BOROBIA Sobre a ocorrência de cetáceos no litoral do Estado do Rio de Janeiro, entre 1968 e 1984. Revista Brasileira de Zoologia v.4, n.4, p.341-346, 1988.

GUERRA, A. J. T; DA CUNHA, S. B. Impactos ambientais urbanos no Brasil, Bertrand Brasil. 2001.

INEA, Instituto Estadual do Ambiente. Disponível em: http://www.inea.rj.gov.br/apa/apa_massambaba.asp. Acesso em 21 de jun de 2014.

INEA, Instituto Estadual do Ambiente. Decreto 42.929/11. Criação do Parque Estadual Costa do Sol. Disponível em: http://www.inea.proderj.rj.gov.br/unidades/costadosol_decreto.pdf. Acesso em 20 de jun de 2014.

JURELEVICIUS, D. Response of the Archaeal Community to Simulated Petroleum Hydrocarbon Contamination in Marine and Hypersaline Ecosystems, Water, air and soil pollution v.225, n.2, p.1 -12, 2014.

KIEFER, M. C; VAN SLUYS, M. ; ROCHA, C. F. D. Clutch and egg size of the tropical

lizard *Tropidurus torquatus* (Tropiduridae) along its geographic range in coastal eastern Brazil.(Report) Canadian journal of zoology. v.86, n.12, p.1376, 2008.

KIEFER, M. C; VAN SLUYS, M; ROCHA, C. F. D. Body temperatures of *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae) from coastal populations: Do body temperatures vary along their geographic range? Journal of Thermal Biology, v.30, n.6, p.449-456, 2005.

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.

LACOMBE, D; RANGEL, E. F. Cirripédios de Arraial do Cabo, Cabo Frio, Instituto de Pesquisas da Marinha, Ministério da Marinha. 1978.

LAGE, L. M. Distribuição espaço-temporal da meiofauna associada a algas epilíticas em costão rochoso, com ênfase aos Nematoda livres (Arraial do Cabo. “Rio de Janeiro, Brasil), Recife, 2005.

LEME, M. C. Bromeliáceas dos municípios de Cabo Frio e Arraial do Cabo, RJ. Boletim FBCN-Rio de Janeiro v.20, n.1, n.57-67, 1985.

MAIA-CARNEIRO, T ; ROCHA, C. F. D. Influences of sex, ontogeny and body size on the thermal ecology of *Liolaemus lutzae* (Squamata, Liolaemidae) in a restinga remnant in southeastern Brazil. Journal of Thermal Biology, v.38, n.1, p.41-46, 2013.

MAIA, V. R. C. Catálogo dos Cecidomyiidae (Diptera) do estado do Rio de Janeiro. Biota Neotropica v.5, n.2, p.189-203, 2005.

MAGNAGO, L. F. S; SIMONELLI, M; MARTINS, S. V; MATOS, F. A. R; DEMUNER, V. G. Variações estruturais e característica edáficas em diferentes estádios sucessionais de floresta ciliar de tabuleiro, ES. Revista Árvore Viçosa-MG, v.35, n.3, p.445-456, 2011.

MAGNAGO, L. F. S; Gradiente vegetacional e pedológico em floresta de restinga no Espírito Santo, Brasil. Dissertação (mestrado em Botânica) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

MANTOVANI, W. A vegetação sobre a restinga em Caraguatatuba, SP. Pp. 139-144. In: Anais do 2º Congresso Nacional de Essências Nativas, São Paulo. Revista do Instituto Florestal 14. 1992.

MARTIN L.; SUGUIO K.; FLEXOR J.M.; AZEVEDO A.E.G. Mapa geológico do Quaternário costeiro dos Estados do Paraná e Santa Catarina. *Série Geol. DNPM*. Brasília, n. 28, 40 p., 2 mapas, 1988.

MARTIN, L. S. T. PEREIRA, T. S; CARVALHO, A. S. R; BARROS, C. F; ANDRADE, A. C. S. Seed germination of *Pilosocereus arrabidae* (Cactaceae) from a semiarid region of south-east Brazil. Plant Species Biology v.27, p.191–200, 2012.

MATOS, A. T. Física do Solo. Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias. UENF/CCTA., 1997.

MATTOS, J. C. F; VALE, M. M; VECCHI, M. B; ALVES, M. A. S. Abundance, distribution and conservation of the Restinga Antwren *Formicivora littoralis*. Bird Conservation International, v.19, n.4, p.392-400, 2009.

MELLONI, R; BELLEZE, G; PINTO, A. M. S; DIAS, L. B. P; SILVE, E. M; MELLONI, E. G. P; ALVARENGA, M. I. N; ALCÂNTARA, E. N. Métodos de controle de plantas daninhas e seus impactos na qualidade microbiana de solo sob cafeeiro. Revista Brasileira Ciências do Solo, v. 37, p.66-75, 2012.

MENESES, L. F. T; ARAÚJO, D. S. D. Estrutura de duas formações vegetais do cordão externo da restinga de Marambaia, RJ. Acta Botânica Brasileira. v.2, n.13, p.223-235, 1999.

MOURA, J. F; DI DARIO, PAGLIANI, B. S; LIMA, L. M; SICILIANO, S. A stranded pygmy killer whale on the coast of Rio de Janeiro State, Brazil. Marine biodiversity records v.3, 2010.

MOTOKI, A; C. A. ÁVILA Dyke-sill transitions of alkaline tabular rock bodies at Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil. Congresso Latinoamericano de Geologia. 1988.

MOTOKI, A., SICHEL, S.E., SOARES, R.S., AIRES, J.R., SAVI, D.C., PETRAKIS, G.H., MOTOKI, K.F. Vent-filling pyroclastic rocks of the Mendanha, the Itaúna, and the Cabo Frio Island, State of Rio de Janeiro, Brazil, and their formation process based of the conduit implosion model. Geociências, Rio Claro. v. 27, n. 3, p. 451-467, 2008.

MOTOKI, A., SICHEL, S.E. Hydraulic fracturing as a possible mechanism of dyke-sill transitions and horizontal discordant intrusions in trachytic tabular bodies of Arraial do Cabo, State of Rio de Janeiro, Brazil. Geofísica Internacional, Mexico City, v.47, v.1, p.13-25, 2008.

MOTOKI, A., S. E. SICHEL. Genesis of the tabular xenoliths along contact plane of the mafic dykes of Cabo Frio area, state of Rio de Janeiro, Brazil: Thermal delamination or hydraulic shear fracturing? Geociências (São Paulo) v.28, n.1, p.15-26. 2009.

MOTOKI A; VARGAS,T; IWANUCH, W; SICHEL, S. E; BALMANT, A; AIRES, J. R. Tectonic breccia of the Cabo Frio area, State of Rio de Janeiro, Brazil, intruded by Early Cretaceous mafic dyke: evidence of the Pan-African brittle tectonism? Rev. Esc. Minas v.64 n.1, Ouro Preto Jan./Mar. 2011

MUEHE, D. Erosão Costeira-Tendência ou Eventos Extremos? O Litoral entre Rio de Janeiro e Cabo Frio, Brasil. RGCI-Revista de Gestão Costeira Integrada v.11, n.2, 2011.

_____ Erosão e progradação no litoral brasileiro. – Brasília: MMA, 2006

MUEHE, D; CARVALHO, V. G. Geomorfologia, cobertura sedimentar e transporte de sedimentos na plataforma continental interna entre a Ponta de Saquarema e o Cabo Frio (RJ)

Geomorphology, sediment distribution and transpon on the inner continental shelf between Ponta de Saquarema and Cabo Frio (RJ). Brazilian Journal of Oceanography, v.41, n.1-2, p.1, 1993.

MUEHE, D; CORRÊA, C. H. T. .Dinâmica de praia e transporte de sedimentos na restinga da Maçambaba, RJ. Revista brasileira. Geociências. v.19, n.3, p.387-392, 1989.

MURICY, G; HAJDU, E; CUSTODIO, M; KLAUTAU, M; RUSSO, C; PEIXINHO, S. Sponge distribution at Arraial do Cabo, SE Brazil. Long Beach, Symposium of coastal and oceanography management, ASCE Publications, v.2, p.1183-1195, 1991.

NOVAIS, C. B. Colonização, esporulação e caracterização fenotípica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em cultura. Dissertação (mestrado em Agronomia)-Universidade federal de Lavras, UFLA. Lavras 2008.

PAIVA, A. M. Estudo das variações do nível médio do mar em Arraial do Cabo, RJ, Relatório de Pesquisa, FAPERJ-COPPE/UFRJ. 1993.

PEREIRA, J. F.; ARAUJO, D. S. D; PAIXÃO, R. J. Asclepiadaceae da Área de Proteção Ambiental de Massambaba. Pabstia. v.8, n.4, p.1-16, 1997.

PEREIRA, G. C; COUTINHO, R. *et al.* Data mining for environmental analysis and diagnostic: a case study of upwelling ecosystem of Arraial do Cabo. Brazilian Journal of Oceanography v.56, n.1, p.1-12, 2008.

RAMALHO, L. S. V; MURICY, G. et al. Taxonomy of Beania Johnston, 1840 (Bryozoa, Flustrina) from Arraial do Cabo, Rio de Janeiro state, Brazil. Arquivos do Museu Nacional v. 66, n.3-4, p.499-508, 2008.

RAPAGNÃ, L. C. Estudo da estrutura das populações dos bivalves Isognomon bicolor (CB Adams, 1845), Perna perna (Linnaeus, 1758) e Pinctada imbricata (Roding, 1798) nos costões rochosos de Arraial do cabo, RJ, Brasil, MSc Thesis, Universidade Federal Fluminense,

Brazil. (2004).

RIBEIRO, J. R. I, MOREIRA, F. F. Espécies de heterópteros dulciaquícolos (Hemiptera, Heteroptera, Gerromorpha e Nepomorpha) registradas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Arquivos do Museu Nacional v.67, n.3-4, p.303-312, 2009.

RICY, G. I. M. Sponges as pollution-biomonitoring at Arraial do Cabo, Southeastern Brazil. 1989.

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.

RIVEREAU J. C; FUCK R. A; MURATORI A; TREIN E. Ilha do Mel, folha geológica. Curitiba, Comissão da Carta Geológica do Paraná. Escala v.1, n.70.000. 1968.

ROCHA, C. F. D; HATANO, F. H; VRCIBRADIC, D; VAN SLUYYS, M. Frog species richness and β -diversity in coastal Brazilian restinga habitats. Brazilian Journal of Biology, v.1, n.68, p.101-107, 2008.

_____ Frog species richness, composition and [beta]-diversity in coastal Brazilian restinga habitats/Riqueza de espécies, composição e diversidade de anfíbios anuros em ambientes de restingas costeiras no Brasil Brazilian Journal of Biology, v.68, p.109 Feb, 2008.

ROCHA-PESSÔA, T. C; NUNES-FREITAS, A. F; COGLIATTI-CARVALHO, L; ROCHA, C. F. D. Species composition of Bromeliaceae and their distribution at the Massambaba restinga in Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian Journal of Biology, v.2, n.68 p. 251-257, 2008.

ROCHA, R. M. D; COSTA, L. V. G. Ascidians (Urochordata: Ascidiacea) from Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil. Iheringia. Série Zoologia v.95, n.1, p.57-64, 2005.

RUTA, C. Padrões de distribuição espaço-temporal dos anelídeos poliquetas da plataforma continental ao largo da Restinga de Massambaba, RJ. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 116 p. 1999.

SCARANO, FR. Structure, Function and Floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic Rainforest. Annals of Botany, v.90, p. 517-524, 2002.

SEREJO, C. S. Gammaridean and caprellidean fauna (Crustacea) associated with the sponge *Dysidea fragilis* Johnston at Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil. Bulletin of Marine Science v.63, n.2, p.363-385,1998.

SILVA, G. L; DOURADO, M. S. CANDELLA, R. N. "Estudo preliminar da climatologia da ressurgência na região de Arraial do Cabo, RJ." 2006. Disponível em: http://www.enapet.ufsc.br/anais/ESTUDO_PRELIMINAR_DA_CLIMATOLOGIA_DA_RESSURGENCIA_NA_REGIAO_DE_ARRAIAL_DO_CABO_RJ.pdf acessado em 10 de setembro de 2014.

SILVA, L. H. S; CAVALCANTI, A. A; DAMAZIO, C. M; FARUOLO, T. C. L. M. Levantamento das cianobactérias psâmicas em sedimentos superficiais marginais da Lagoa Azul, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. Anuário Instituto Geociências. Rio de Janeiro, v.31, n.1, 2008.

SILVA, L. H. S; DELFINO, D. O; LOPES, F. A. S; CAVALCANTI-IESPA, A. A; DAMAZIO-IESPA, C. M. Esteiras microbianas poligonais do brejo do Espinho, RJ. Revista de Geologia, v. 19, n.2, p.155-161, 2006.

SILVA, L. H. S; DAMAZIO-IESPA, C. M; CAVALCANTI IESPA, A. A. Estudo Sedimentológico e Geomicrobiológico das Esteiras Microbianas Tipo Filme da Lagoa Pitanguinha, Região dos Lagos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Anuário do Instituto de Geociências v.30, n.1 p.67, 2007.

SILVA, G. L., DOURADO, M. S. Estudo preliminar da climatologia da ressurgência na região de Arraial do Cabo, RJ. 2006.

SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M; ARAUJO, R. S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. EMBRAPA, p.142, 1994.

SOMNER, G. V. Sapindaceae. In: Costa, A. F. ; Dias, I. C. A flora do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e arredores, Rio de Janeiro, Brasil: Listagem, florística e fitogeografia. Museu Nacional, Rio de Janeiro. Série Livros, n. 8. p.126-128, 2001.

TENÓRIO, M. C., M. BARBOSA. Pesquisas arqueológicas no sítio Ponta de Cabeça, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. Anais da IV Reunião da Sociedade de Arqueologia Brasileira v.2, p.279-291, 1992.

THIENGO, S. C; FERNANDEZ, M. A. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: III-Baixas Mesoregion. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz v.97, p.43-46, 2002.

THOMAZ, L. D; MONTEIRO, R. Análise florística da comunidade halófila-psamófila das praias do Estado do Espírito Santo. Pp. 58-66. In: S. Watanabe (coord.). Anais do III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira. ACIESP, São Paulo. 1994.

TURCQ, B.; MARTIN, L.; FLEXOR, J. M.; SUGUIO, K. ; PIERRE, L. C. ; TASAYACO-ORTEGA, L. Origin and evolution of Quaternary coastal plain between Guaratiba and Cabo Frio, State of Rio de Janeiro , Brazil. In : Knoppers, B. A.; Bidone, E. D. ; Abrão, J. J. (eds.). Environmental geochemistry of coastal lagoon system of Rio de Janeiro Brazil. Série Geoquímica Ambiental v.6, p.25-46, 1999.

VECCHI, M. B; ALVES, M. A. S. New records os the restinga antwren *Formicivora littoralis* Gonzaga and Pacheco (Aves, Thamnophilidae) in the state od Rio de Janeiro, Brasil: inland

extended range and threats. *Brazilian Journal of Biology*. v.68, n.2, p.391-395, May 2008.

VIEIRA, R C. Leaf anatomy of three herbaceous bamboo species/ Anatomia foliar de três espécies de bambus herbáceos. *Brazilian Journal of Biology* v.62, n.4, p.907, 2002.

VILLAÇA, R., Y. YONESHIGUE-VALENTIN. Estrutura da comunidade de macroalgas do infralitoral do lado exposto da ilha de Cabo Frio (Arraial do Cabo, RJ). *Oecologia brasiliensis* v.12, n.2, p.3, 2008.

WANDENESS, A. W., A. M. ESTEVES. Meiofauna da zona entre-marés da praia dos Anjos, Arraial do Cabo, RJ. *Oecologia brasiliensis* v.3, n.1, 1997.

YANO, O; COSTA, D. P. Briófitas da restinga de Massambaba, Rio de Janeiro. Pp. 144-152. In: *Anais do 3º Simpósio de Ecossistema da Costa Brasileira*. Serra Negra, SP. ACIESP. 1993.

YANO, O; LUIZI-PONZO, A. P. *Chonecolea doellingeri* (Chonecoleaceae, Hepaticae), taxonomia e distribuição geográfica no Brasil *Acta Bot. Bras.* v.20 n.4, São Paulo, 2006.

ECOLOGIA E POTENCIAL REMEDIADOR DO CONSÓRCIO FMA - BACTÉRIA
ISOLADO DA RIZOSFERA DE *Remirea marítima*

RESUMO

As restingas são ambientes de grande importância e interesse científico, pois possui características que dificultam o estabelecimento populacional na linha de sucessão, como o solo distrófico. A microbiota tem um papel fundamental nesta sucessão, principalmente nos casos de contaminação por produtos persistentes e potencialmente mutagênicos. O potencial degradador se faz necessário para a mitigação de acidentes que possam vir a ocorrer, possibilitando ações de correção do ecossistema e para que seja eficaz, a incorporação destes métodos são aplicáveis à medida que conhecemos o ambiente. Para tanto, foram feitas análises da microbiota associada à raízes de *Remirea marítima* e do solo da formação vegetal presente na área de psamófila-reptante. Foram isolados esporos de FMA que posteriormente foram quantificados. A taxa de colonização de *R. marítima* por FMAs também foi avaliada. Bactérias presentes nos esporos de FMAs foram isoladas e foi verificada a sensibilidade das mesmas na presença de tolueno, as bactérias não demonstraram resistência ao hidrocarboneto. Bactérias isoladas da rizosfera de *R. marítima* foram cultivadas em meio líquido e sólido e o crescimento avaliado na presença e ausência de tolueno. Em meio sólido com concentrações de 2,5 a 20µl de tolueno as bactérias foram sensíveis ao hidrocarboneto, porém em 40 e 80µl apresentaram crescimento similar ao controle. Em meio líquido as bactérias demonstraram sensibilidade ao tolueno em todas as concentrações (2,5 a 80 µl). De acordo com nossos resultados o solo da vegetação psamófila-reptante possui grande quantidade de FMA dos Gêneros *Glomus sp.* e *Gygaspora sp.* e as raízes de *R. marítima* encontram-se abundantemente colonizadas por FMAs (96,67%). Nesse trabalho observamos que bactérias isoladas de esporos de FMAs não foram resistentes ao tolueno e bactérias isoladas da rizosfera de *R. marítima* demonstraram ser sensíveis em concentrações de 2,5 a 20µl de tolueno e não demonstraram variações nas concentrações de 40 e 80µl. Nossos resultados indicam um possível efeito protetor dos vegetais por FMAs quando na presença de tolueno, com uma ação que pode ocorrer sem uma efetiva participação de bactérias.

Palavras- chave: Restinga; biorremediação; hidrocarboneto; FMA.

ABSTRACT

The dunes are of great importance and scientific interest environments because it has characteristics that make it difficult to establish population in line of succession, as the dystrophic soil. Microorganisms have an essential role in this succession, especially in cases of contamination by persistent and potentially mutagenic products. The degrading potential is required to mitigate accidents that may occur, allowing corrective actions and ecosystem to be effective, the incorporation of these methods are applicable to the extent that we know the environment. Analysis of the microorganisms associated with the roots of *Remirea maritime* of vegetation and soil formation in this area psamófila-reptante were made. AMF spores were isolated were subsequently quantified. AMF spores were isolated were subsequently quantified. The rate of colonization by AMF *R. maritima* was also evaluated. Bacteria present in the spores of mycorrhizal fungi were isolated and verified the sensitivity thereof in the presence of toluene, the bacteria did not show resistance to hydrocarbon. Bacteria isolated from the rhizosphere of *R. maritima* were grown in liquid and solid medium and growth assessed in the presence and absence of toluene. In solid medium, toluene concentrations of 2,5 to 20 μ l the bacteria were sensitive to hydrocarbon, but in 40 and 80 μ l showed growth similar to the control. In liquid medium the bacteria were susceptible to toluene at all concentrations (2.5 to 80 μ l). According to our results the soil of vegetation psamófila-reptante has lots of genres AMF *Glomus sp.* and *Gigaspora sp.* and the roots of *R. maritime* are abundantly colonized by AMF (96.67%). We observed that bacteria isolated from spores of AMF were not resistant to toluene and bacteria isolated from the rhizosphere of *R. maritima* demonstrated to be sensitive to concentrations of 2.5 to 20 μ l of toluene and showed no variations in concentrations of 40 and 80 μ l. Our results indicate a possible protective effect of vegetables by AMF in the presence of toluene, with an action that can occur without effective participation of bacteria.

Keywords: Dune; bioremediation; hydrocarbon; AMF.

3.1 INTRODUÇÃO

O solo é formado por interações físico-químico-biológicas e é de grande interesse o seu conhecimento, pois é nele que está fundado todo o ecossistema terrestre (SAGGIN-JUNIOR; SILVA, 2006). As principais interações ocorrem no solo onde as raízes das plantas se desenvolvem, sendo chamado de rizosfera. É uma área rica em macro e micro-organismos, que interagem de forma positiva ou negativa do ponto de vista trófico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A simbiose geralmente é reconhecida como uma interação benéfica, onde prevalece a relação do tipo mutualista (SAGGIN JUNIOR; SILVA, 2006). Dentre as relações harmônicas diversas, as bactérias utilizam substâncias orgânicas liberadas pelas raízes como fontes de carbono e energia para seu crescimento e reprodução, em contrapartida oferecem compostos que são assimilados por elas oferecendo-lhes um aumento de suas biomassas, aumentando a produção de exsudatos que podem ser seletivos ou possuir propriedades que auxiliem no combate a poluição ambiental (KIRK *et al.*, 2005).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam simbiose obrigatória com a maioria das plantas terrestres constituindo uma forma antiga e fundamental na colonização, propiciando benefícios ecológicos (HELGASON; FITTER, 2005). Alguns vegetais podem ser encontrados em associação com FMAs e bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) constituindo estratégias adaptativas em condições adversas (ALMEIDA; VASCONCELOS; NESS, 1986), sendo assim têm sido apontados como organismos-chave na produtividade dos ecossistemas, situação esta que caracteriza a biorremediação, onde encontramos organismos vivos que são utilizados para reduzir ou remover os contaminantes do ambiente.

A fitorremediação é uma variação de biorremediação que utiliza plantas superiores que, associadas à população microbiana da rizosfera do vegetal, auxiliam na remoção de contaminantes de solos oriundo das mais diversas fontes de contaminação. A biorremediação é uma abordagem comum para limpeza de solos contaminados com produtos petrolíferos e uso de micro-organismos para decompor poluentes do solo (BANKS *et al.*, 2001). De acordo com Jacques e colaboradores (2007), após a degradação parcial, estes produtos podem gerar compostos lipossolúveis e bioacumuladores com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele.

Os derramamentos de petróleo são considerados hoje um dos principais problemas ambientais e têm se tornado mais frequente, pois diversas regiões costeiras foram afetadas com severos impactos (SANCOVSCHI; SILVA, 2006). Em consulta a diversos meios de comunicação digital se pode conhecer alguns dos maiores acidentes envolvendo petróleo, a saber, Galdino *et al.*, 2004; Bertoli; Ribeiro, 2006; Sancovschi; Silva, 2006; Trevizani; Biju, 2014.

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

3.2.1 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação tem sido relatada como uma técnica promissora e menos agressiva na remoção de produtos de origem industrial com difícil degradação e persistência em ambientes que sofreram contaminações acidentais como os produtos petrolíferos formados por cadeias carbônicas cíclicas com duplas ligações, hidrocarbonetos aromáticos (HA) (BANKS *et al.*, 2001; JACQUES *et al.*, 2007).

Uma vez que podemos considerar a biorremediação como promissora, a cautela torna-se primordial, pois a mesma pode ser limitada se as condições do solo não forem favoráveis a existência dos microrganismos degradadores (JACQUES *et al.*, 2007; MELLONI *et al.*, 2012). Sendo a umidade, a temperatura, o pH do solo e a disponibilidade de carbono, fósforo e nitrogênio limitantes a atividade dos micro-organismos.

3.2.2 FITORREMEDIAÇÃO

A fitorremediação é uma forma de biorremediação que utiliza vegetais com sistema radicular desenvolvido para propiciar o desenvolvimento de micorrizas que auxiliem na descontaminação de solos (BANKS *et al.*, 2001; revisto em JACQUES *et al.*, 2007) por metais pesados, compostos orgânicos, radionuclídeos e HPA, por meio da degradação, volatilização, estimulação, extração, contenção ou imobilização dos contaminantes.(VIEIRA, 2011). Grande parte das pesquisas sobre fitorremediação enfoca a capacidade de estocar metais pesados (WEIS; WEIS, 2004).

A fitorremediação pode ser dividida em 5 tipos de acordo com Pilon-Smits (2005) e confirmada por Vieira (2011), a saber:

- a) rizofiltração - técnica em que os contaminantes são removidos e retidos no tecido vegetal através da água;
- b) fitoextração - onde contaminantes são removidos do solo e retidos no tecido vegetal;
- c) fitotransformação - técnica que ocorre a degradação parcial ou total dos contaminantes através do metabolismo da planta;
- d) fitoestimulação - em que ocorre a estimulação da atividade dos microrganismos degradadores dos contaminantes pela rizosfera da planta;
- e) fitoestabilização, quando as plantas são utilizadas para reduzir a migração dos contaminantes no solo.

Dentre as técnicas acima, o que nos chama a atenção é a fitoestimulação, pois já foi observada a presença de bactérias na superfície das hifas fúngicas e nos seus esporos (AZCÓN,1989, PAULA *et al.*, 1991) resultando em maior efeito de micorrização com a exsudação de nutrientes pela planta, (HO, 1988; AZCÓN, 1989, PAULA *et al.*,1991) o que acelera o crescimento do vegetal e do FMA (BERBARA *et al.*, 2006), configurando então a fitorrizorremediação.

3.2.3 FMA

Vários autores propuseram classificações taxonômicas ao filo Glomeromycota, Schüßler; Schwarzott; Walker (2001), Goto (2009), Oehl (2011). Redecker (2013), no entanto, faz um quadro comparativo revisando estas classificações, propondo classificações mais atualizadas que assimilem dados morfológicos e moleculares.

Os FMA's são simbióticos obrigatórios (SIQUEIRA; COLOZZI-FILHO, 1986; NOVAIS, 2008; SCHUßLER; WALKER, 2010) colonizando as raízes de vários vegetais inferiores e superiores estando presentes no interior dos vegetais ou nos tecidos externos (ELIAS *et al.*, 2011). São caracterizados pela presença de hifas e ausência de rede de Hartig, porém, dependendo da espécie, pode haver formação de vesículas, estruturas globosas terminais ricas em lipídeos (MELLONI *et al.*, 2012; OEHL,2011). As hifas fúngicas desenvolvem-se externamente de modo contínuo no solo, formando uma rede de micélio extracelular proporcionando uma ligação entre a raiz e o solo conferindo maior absorção e

adsorção pelos vegetais (BERBARA *et al.*, 2006).

A colonização radicular inicia-se com a germinação do esporo ou com o crescimento das hifas formando os propágulos (MELLONI *et al.*, 2012) que pode proporcionar às plantas maior resistência aos estresses ambientais e com o aumento de seu comprimento alcança maiores profundidade e absorção de nutrientes. Além disto, as hifas externas produzem glomalinas, proteínas hidrofóbicas exsudadas no solo, produzindo agregados do solo que reduz processos erosivos (BERBARA *et al.*, 2006).

Estudos anteriores sobre micorrizas demonstraram que as plantas de dunas costeiras são abundantemente colonizadas por FMA, pois estabilizam as areias formando grandes agregados e influenciando na sucessão vegetal (ALARCON; CUENCA, 2005).

No entanto, nos últimos anos, tem sido dada atenção à obtenção de consórcios microbianos, que, comparativamente às culturas puras, têm-se mostrado mais efetivos na degradação de compostos em solos contaminados. Vários fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleorotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium*, tem sido relatados em estudos deste tipo (JACQUES *et al.*, 2007). Contudo, Paula *et al.*, (1991) observaram a presença de *Azospirillum lipoferum*, *Klebsiella* sp. E *A. diazotrophicus* dentro dos esporos de *Glomus clarum*.

3.2.4 BACTÉRIAS

Uma grande variedade de bactérias possui a capacidade de fixar ou disponibilizar o nitrogênio (N) para os vegetais, sendo consideradas, portanto, diazotróficas. Tal característica confere benefícios na nutrição e promoção do crescimento do vegetal (BORGES *et al.*, 2003) através de associações de micro-organismos como os esporos de FMAs e pela colonização bacteriana em hifas extra-radiculares de FMAs (BHOWMIK; SINGH, 2004; FARIA, 2002).

Desde 1950, estuda-se bactérias degradadoras de compostos, pertencentes principalmente aos gêneros *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, entre outros (JACQUES, 2005; revisto em JACQUES *et al.*, 2007) sendo justificada a associação entre fungos, bactérias e raízes de vegetais, pois várias vias metabólicas de degradação já foram identificadas em diferentes microrganismos. As mais estudadas, porém, são as do metabolismo aeróbico realizado pelas

bactérias, pelos fungos lignolíticos e pelos fungos não-lignolíticos.

3.2.5 BACTÉRIAS FORMADORAS DE BIOFILME

Algumas bactérias ao longo da evolução desenvolveram um sistema adaptativo que permite a formação de comunidades bacterianas com comportamento ordenado e extremamente eficazes na sobrevivência em ambientes hostis formando uma espécie de filme que as envolve.

Os biofilmes são geralmente definidos como comunidades microbianas associadas à superfície, rodeadas por uma substância polimérica extracelular (EPS) de matriz (LIMBERT *et al.*, 2013). Estruturas proteicas são importantes para formação de biofilme, como o Pili e as fímbrias. Estes apêndices de células são usados para aderir a células em outro organismo ou em diferentes superfícies.

A formação de um biofilme é um processo que compreende pelo menos cinco etapas: adesão inicial, adesão irreversível, adesão célula a célula, maturação e dispersão. Na etapa inicial, as células podem ser levadas pelo fluxo do líquido ou fluírem livremente. Com produção de matriz extracelular e/ou de adesinas específicas, a adesão torna-se permanente, podendo incluir pili ou fímbrias que permitem a adesão umas às outras e a várias superfícies (BARNHART; CHAPMAN, 2006).

A adesão célula a célula é importante na formação do biofilme e sua posterior maturação. Finalmente ocorre a dispersão de células (VAN HOUDT; MICHIELS, 2005).

Esta capacidade de adaptação permite que as bactérias respondam às condições estressantes, conferindo-lhes uma resistência aos antibióticos conforme revisto por Davies (2003). A sinalização celular entre elas permite a detecção e resposta do seu ambiente como a avaliação da densidade celular (Quorum Sensing ou QS).

Apesar de serem geneticamente idênticos ao resto da população, os biofilmes aumentam suas persistências no ambiente, e a presença de uma matriz celular protege as células constituintes de agressões externas. Matrizes extracelulares também agem como uma barreira de difusão de moléculas pequenas (SCHOENFELDER *et al.*, 2010)

3.2.6 VEGETAÇÃO PSAMÓFILA-REPTANTE - *Remirea marítima*

A formação psamófila-reptante fica localizada na faixa contígua atingida pelas ondas apenas nos períodos de tempestade e possuem alta tolerância as mobilidades destes períodos. Sua cobertura vegetal contribui de maneira significativa para a estabilidade das areias formando uma área entre o mar e as áreas interiores da planície. (CITADINI-ZANETE *et al.*, 2001).

O vegetal *Remirea marítima* é uma planta endêmica de restinga da família das Cyperaceae, cuja classificação é a seguinte: Reino: Plantae; Subreino: Tracheophyta; Superdivisão: Spermatophyta; Divisão: Magnoliophyta; Classe: Liliopsida; Subclasse: Commelinidae; Ordem Cyperales; Família: Cyperaceae; Gênero: *Remirea* Aubl.-Beachstar; Espécie: *Remirea marítima* Aubl.- Beachstar (ZECCA, 2008; USDA, NRCS, 2012). Possui ampla distribuição nas regiões litorâneas. É a única espécie que apresenta folhas hipoestomáticas com disposição dos estômatos apenas na face abaxial da folha. Estas características conferem os ajustes morfológicos necessários para reduzir a perda da água, diminuir a ação da intensidade de luz, permitindo uma maior eficiência, na colonização e sobrevivência destas espécies em ambientes estressantes, como as regiões costeiras tropicais e subtropicais (BOEGER; GLUZEZAK, 2006).

3.2.7 HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO

Os compostos que geram maior preocupação e interesse de estudo devido a sua toxicidade no processo de remediação, são: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (isômeros: *orto*, *meta*- e *para*-xileno). Esses compostos, conhecidos também como BTEX, são definidos como hidrocarbonetos, pois apresentam em sua estrutura aromática possuindo ligações duplas alternadas .

Os compostos BTEX são extremamente tóxicos para os seres humanos, pois atuam no sistema nervoso central como depressores gerando uma toxicidade crônica, e para o ambiente são prejudiciais devido a sua degradação parcial gerando um subproduto capaz de ocasionar efeitos mutagênicos, seletividade de organismos e modificações na estrutura ecológicas dos

sistemas naturais. (KEITH; TELLIERD, 1979; ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

O benzeno é o composto mais tóxico dentre os BTEX, segundo a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*), órgão da Organização Mundial da Saúde, o benzeno é uma substância cancerígena. (NAHAR, 2000; GAYLARD, 2005; IARC, 2006; NIOSH, 2006; JACQUES, 2007; ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Em solos contaminados por petróleo e seus derivados, existem outras classes de compostos que também são alvos de atenção, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), os compostos orgânicos voláteis (COV) totais e os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). Os compostos BTEX, HPA e HTP são escolhidos para serem estudados, devido principalmente, pela toxidez, mobilidade e persistência no ambiente. (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

3.2.8 TOLUENO

Tolueno (C_7H_8) possui peso molecular 92,14, sofre ebulição a $110,6^\circ C$; sua pressão de vapor é de 22mmHg a $20^\circ C$; se auto-inflama a $480^\circ C$ é um produto tóxico de difícil degradação. A toxidez aparente é caracterizada pela interação com a membrana plasmática na perda dos cátions Mg^2 e Ca^2 . É altamente volátil e de difícil solubilidade em água com coeficiente de 515mg/L a $23^\circ C$ (NAHAR, 2000).

Os produtos metabólicos do tolueno são o cresol (menos de 1%) e o metabólito intermediário benzaldeído. O benzaldeído é metabolizado a ácido benzóico o qual se conjuga com a glicina e forma o ácido hipúrico. Em humanos, mais de 75% do tolueno inalado é metabolizado a ácido hipúrico e é excretado na urina 12 horas após a exposição (SULLIVAN ; VAN ERT, 1992).

O tolueno provoca irritação no olho humano e sintomas de mal-estar em concentrações acima de 300 ppm no ar; provoca efeitos tóxicos severos acima de 1000 ppm., ocorrem vertigens, dificuldade em manter o equilíbrio e intensa cefaléia na região frontal. Concentrações mais elevadas podem determinar o aparecimento de coma narcótico (PETROBRAS, 2011).

Estudos realizados em animais testes apontam que concentrações diversas podem alterar ou provocar danos aos seus sistemas físicos como aponta Forster e colaboradores (1994), assim como os efeitos possuem vias metabólicas citotóxicas observadas em ratos

relatados por Barretos e colaboradores (2007).

3.2.9 RESULTADOS PRELIMINARES

Andrade (2012) realizou um estudo preliminar onde abordou o crescimento do vegetal *Brachiaria decumbens* na presença de FMAs isolados de formação psamófila-reptante de restinga e propágulos destes fungos encontrados nas raízes do vegetal *Remirea maritima*. Conforme demonstrado na figura (7) os resultados mais expressivos em relação à influência dos FMAs na sobrevivência das plantas submetida à presença do contaminante, foi o inoculado com fragmentos de raízes micorrizadas de *R. maritima*, com maior dosagem de tolueno (VMH₂) e em estresse hídrico onde apresentou o maior percentual médio de sobrevivência (89,6± 12,5). O inóculo com esporos e maior dosagem de tolueno, (VEH₁), também apresentou alto percentual médio de sobrevivência (81,7± 22,1), denotando uma aparente influência do fungo na sobrevivência do vegetal na presença de tolueno.

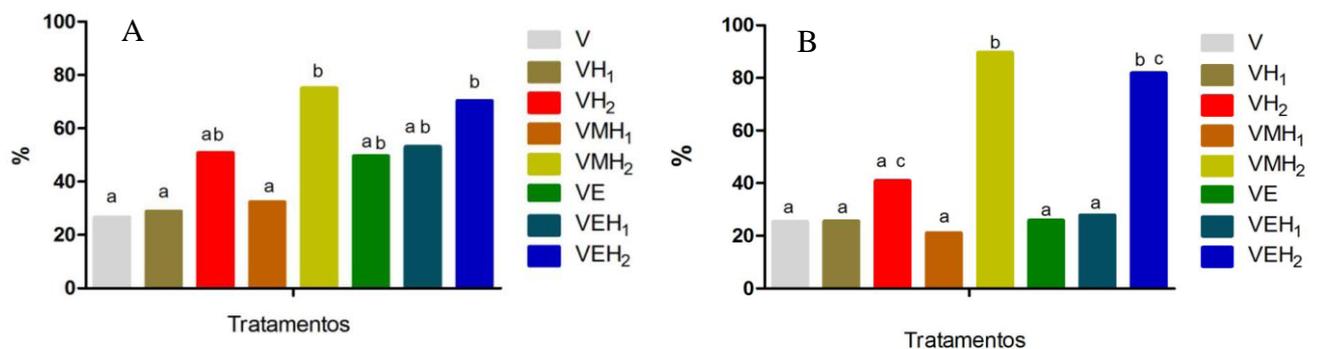


Figura 7 – Tratamento demonstrando o percentual médio de sobrevivência de *B. decumbens*. (A) Percentual médio de sobrevivência de *B. decumbens* após 25 dias de cultivo na presença FMAs e na presença de tolueno e antes do estresse hídrico de 5 dias (B) Percentual médio de sobrevivência de *B. decumbens* 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 ($p < 0,05$). **V**: vegetal sob ausência de hidrocarboneto (tolueno); **VH₁**: vegetal sob dose de menor concentração de tolueno em substrato (153 ml.200g-1 solo) **VH₂**: vegetal sob dose de maior concentração de tolueno em substrato (4,7ml. 200g-1 solo); **VE**: Vegetal sob presença de esporos de FMAs; **VEH₁**: Vegetal sob presença de esporos de FMAs e dose de menor concentração de tolueno em substrato (153ml.200g-1 solo); **VEH₂**: Vegetal sob presença de esporos de FMAs e maior concentração de tolueno em substrato (4,7ml. 200g-1 solo); **VMH₁**: vegetal sob presença de fragmentos de raízes micorrizadas de *Remirea marítima* e dose de menor concentração de tolueno em substrato (153ml.200g-1 solo); **VMH₂**: vegetal sob presença de fragmentos de raízes micorrizadas de *Remirea marítima* e dose de

maior concentração de tolueno em substrato (4,7ml.200g-1 solo) Cedido por: Ocimar Ferreira de Andrade.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo identificar a associação entre fungos e bactérias em vegetais de restinga e mensurar as condições no processo de resistência e de sobrevivência do vegetal e do consórcio associado em presença de tolueno.

3.3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a colonização micorrízica do vegetal *Remirea maritima*.
- Isolar bactérias da rizosfera do vegetal *Remirea maritima*.
- Verificar se bactérias associados aos FMAs interferem no processo de tolerância ao Tolueno.
- Verificar a resistência das bactérias na presença de Tolueno.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 LOCAL DA COLETA DE AMOSTRAS

Localizada no Estado do Rio de Janeiro, a restinga de Massambaba (fig 8) está no Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio, nos municípios de Saquarema, Araruama e Arraial do Cabo (22.92417° SUL; 42.22431° OESTE).

Compreende a Área de Proteção Ambiental de Massambaba (APA) criada por meio do Decreto 9.529, de 15/12/1986, com os objetivos de: preservar áreas remanescentes de restinga, lagoas costeiras e brejos, responsáveis pelo abrigo de inúmeras espécies de aves migratórias e *habitat* de espécies vegetais endêmicas; preservar inúmeros sítios arqueológicos, fundamentais para pesquisas científicas. Sua administração está a cargo do Instituto Nacional do Meio Ambiente INEA. O plano de manejo foi instituído pelo decreto 41.820 DE 16 de abril de 2009 na área delimitada em Zonas de Preservação da Vida Silvestre – ZPVS,

concentrado na sub-área ZPVS-D – que abrange parte do Brejo do Espinho. Apresenta uma área de 7.630 ha, contendo ao todo 26 km de praias, sendo que no seu ponto mais estreito possui 700 m de largura, enquanto no seu ponto mais largo mede aproximadamente 6.000 m (INEA, 2013). Estudos recentes indicam que sua formação se iniciou durante o Pleistoceno, há mais de 120.000 anos atrás, com o isolamento de seu corpo d'água, disposta em duas linhas de cordões arenosos costeiros associados a um complexo de comunidades vegetais que ocorrem na costa brasileira (TURCQ *et al.*, 1999; ARAÚJO; HENRIQUES, 1993). As restingas, assim como os brejos, constituem ambientes da Mata Atlântica (SCARANO, 2002). São providas de belezas naturais exuberantes, com representantes de interesse relevante em sua fauna, como o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) e o lagarto-branco-da-praia (*Liolaemus lutzae*), com potencial para pesquisa científica, pesca (no mar e na lagoa) e esportes náuticos (na Lagoa de Araruama, principal corpo d'água da APA), além de possuir diversas lagoas e brejos costeiros.

Entretanto, este cenário vem sofrendo, ao longo do tempo, diversas modificações antrópicas, que tiveram início com o extrativismo do sal. A chegada de atividades industriais que levou à formação de pequenos povoados fixados nas áreas da Restinga. Atualmente a especulação imobiliária e a ocupação de maneira ilegal contribuem para o processo de degradação da cobertura vegetal além das funções de recreação e turismo que tanto atraem a atenção das pessoas (DUNLEY, 2006).

Segundo Araújo (2000), as restingas que ocorrem no estado do Rio de Janeiro podem ser divididas de acordo com a sua flora e fisionomia, sendo influenciadas pela história geológica e pelo clima.

Essa região apresenta dois fatores importantes: uma grande área litorânea em relação ao oceano, e o fenômeno da ressurgência, que promove a subida das águas frias das correntes do fundo oceânico provinda do degelo trazendo consigo grande quantidade de nutrientes para a superfície. A presença de tal fenômeno torna essa região muito rica elevando, dessa forma, a quantidade e a diversidade de espécies (ARAÚJO, 2000; INEA, 2013).

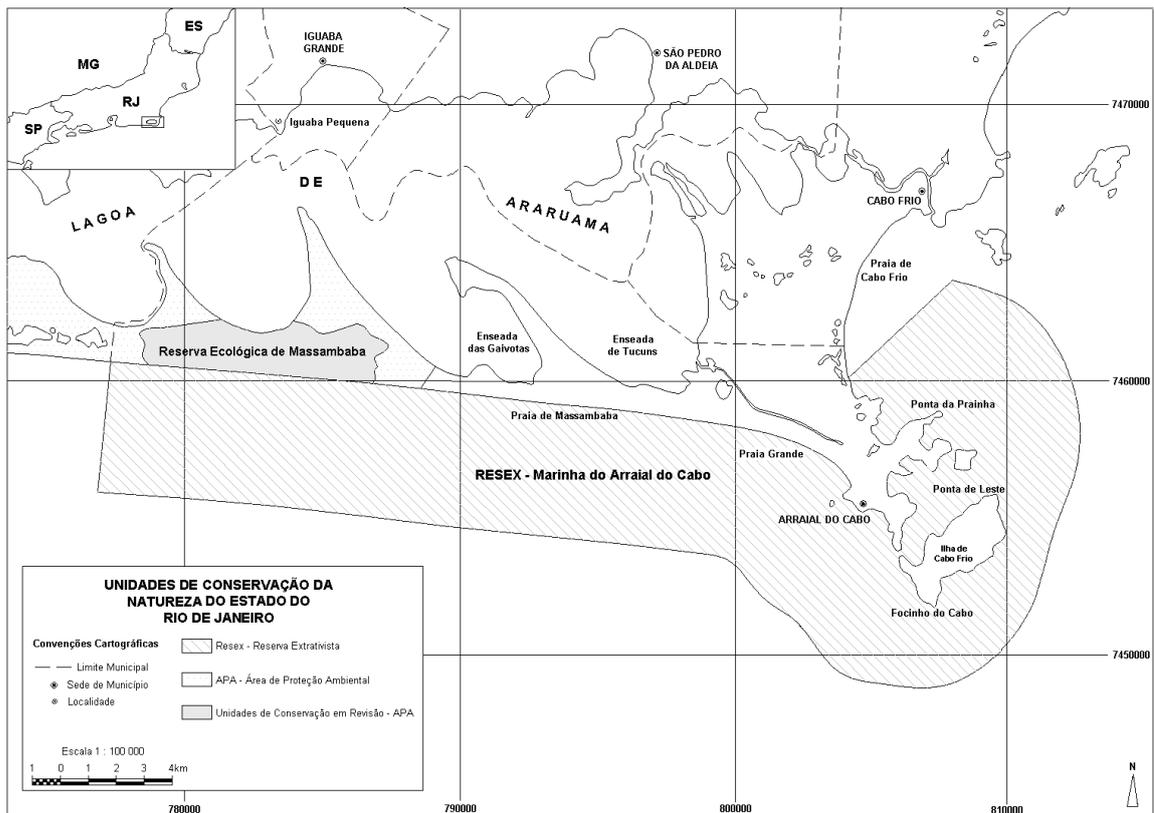


FIGURA 8: Mapa da abrangência da Restinga de Massambaba. fonte: Fonseca-Krueel, 2004

O clima do Centro de Diversidade de Cabo Frio é característico de um clima semi-árido quente, o que representa um contraste em relação ao resto do estado (BARBIÉRE, 1984). Há uma irregularidade no total pluviométrico e na distribuição das chuvas entre os anos, sendo, geralmente, os períodos mais chuvosos ocorrendo na primavera e no verão (BARBIÉRE, 1975). A média anual de precipitação é de cerca de 800 mm, com pluviosidade mensal de 40 mm no inverno, sendo que o balanço hídrico do solo é negativo ao longo do ano e a média anual da temperatura é de 25°C, com mínima de 12°C e máxima de 36°C (ARAÚJO, 1997).

As características marcantes do ecossistema de restinga, como dunas e formação vegetal, que apresenta alguns vegetais pioneiros sujeitos a degradação na primeira linha de sucessão na formação arbustiva aberta não inundável, influenciaram a opção de coletas. Esta formação é caracterizada pela ocorrência de moitas formadas por uma vegetação arbustiva,

intercaladas por areia nua e uma vegetação esparsa composta por espécies herbáceas ou subarborescentes, abrangendo ambas as formações vegetais pós-praia (halófila e psamófila-reptante), espécies essas que foram descritas por Araújo (2009) e aqui apresentadas na tabela 4.

Tabela 4- Descrição dos principais vegetais encontrados na Restinga de Massambaba da zona halófila-psamófila-reptante fonte: elaboração própria baseado segundo a divisão em áreas dos trabalhos de Carvalho e Sá (2011), Aguiar *et al.* (2011). Araújo *et al.* (2009), e Rocha-Pessôa *et al.* (2008).

Família	Espécies presentes na psamófila reptante
Amaranthaceae	<i>Alternanthera littoralis var. maritima</i>
	<i>Blutaparon portulacoides</i>
Apocynaceae	<i>Oxypetalum banksii ssp. corymbiferum</i>
Arecaceae	<i>Allagoptera arenaria</i>
Asteraceae	<i>Achyrocline satureioides</i>
Cactaceae	<i>Cereus fernambucensis</i>
Calyceraceae	<i>Acicarpha spatulata</i>
Convolvulaceae	<i>Ipomoea pes-caprae</i>
	<i>Ipomoea imperati</i>
Cyperaceae	<i>Remirea maritima</i>
Euphorbiaceae	<i>Chamaesyce thymifolia</i>
Fabaceae	<i>Canavalia rosea</i>
Poaceae	<i>Panicum racemosum</i>
	<i>Sporobolus virginicus</i>
	<i>Stenotaphrum secundatum</i>
Polygalaceae	<i>Polygala cyparissias</i>
Rubiaceae	<i>Mitracarpus frigidus</i>

O critério de coleta de solo dos vegetais presentes em ambas as formações foi delimitado dentro do sítio previamente estabelecido onde foram encontrados exemplares do vegetal *Remirea maritima*, simbiote de FMAs, como descrito por Andrade (2012). Tal simbiose aponta para sua importância ecológica devido à formação de exsudatos nestas associações, como citado por Berbara *et al.* (2006) e Kuster, (2010).

3.4.2 METODOLOGIA DE AMOSTRAGEM DO SOLO E PLANTAS PARA ESTUDO

As coletas foram realizadas a partir do limite leste da restinga de Massambaba, no bairro Figueira, e entre 25 e 50 m da linha de maré alta onde foram delimitados nove pontos de coleta, variando nos pontos de halófila e psamófila, em três áreas formando retângulos

paralelos ao mar de aproximadamente 40m comprimento por 15m de largura em pontos delimitados em cada quadrante. Em cada um dos pontos foram coletadas diversas amostras de rizosferas em tubos Falcon esterilizados e solo da comunidade da formação psamófila-reptante em sacos plásticos juntamente com exemplares de *Remirea maritima*. Os pontos de coleta (fig 9) foram realizados entre as partes mais baixas (A), medianas (B) e mais altas (C) das dunas frontais, onde a profundidade varia entre 10 a 40 cm dependendo do soterramento dos rizomas das plantas sob a areia solta.



FIGURA 9: Foto da primeira área de coleta com as marcações dos pontos de extração de amostras. Em (a) área mais próxima ao mar, (b) área mais instável com início de formação de duna e (c) porção estável com maior incidência de matéria orgânica. Foto: Maryéllen dos Reis.

A identificação de estruturas fúngicas e bactérias presentes nas raízes foram realizadas no vegetal *Remirea maritima* e parte da amostra das raízes coletadas na área de estudo foi utilizada para identificação de estruturas de micorrizas arbusculares e outras estruturas intra e intercelulares.

Todas as amostras identificadas individualmente foram transportadas para o laboratório separadas para o processamento. Aproximadamente 3 kg de solo foram extraídos em cada ponto da área de estudo.

No laboratório realizou-se a verificação do peso úmido em 80g de solo composto e averiguação do peso seco ficando este em estufa a 60°C por 2h, após a homogeneização e quarteamento das amostras (SILVA, 2009), foram separados 400g para posterior extração de esporos. As sobras de cada amostra de solo foram separadas para testes de crescimento e

inoculação de culturas puras e mistas de FMAs sob contaminação e não contaminação com tolueno. A extração dos esporos ocorreu em triplicata pelo método de peneiramento úmido descrito por Gerdermann e Nicolson (1963) em peneiras de 0.53mm e 0.45mm, seguindo-se a centrifugação em água e posteriormente em sacarose a 60% (JENKINS, 1964- modificado) para a contagem em mapa diário dos pontos.

As amostras de exsudatos presentes nas raízes foram inoculadas em meio de cultura sólido e líquido contendo LB, para isolamento das colônias bacterianas e posterior identificação e inoculação sendo as mesmas repicadas para a manutenção de suas colônias.

3.4.3 CONTAGEM DE ESPOROS

O isolamento dos esporos, após a extração pelo peneiramento úmido, foi realizado em vidro de relógio com o auxílio de alfinetes entomológicos e lupa estereoscópica (40x de aumento), sendo estes contados e separados conforme sua morfologia determinada pelo International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) e anotados em mapas diários.

3.4.4 COLORIZAÇÃO DE RAÍZES

As raízes armazenadas em Etanol 50% foram cortadas em fragmentos de 1 a 1,5 cm de comprimento, os quais foram depositados em Becker de 50 ml, e submetidos 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 bastante escuras, porém finas, e por isso são submetidas 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, são colocadas em Becker de 50 ml com solução de azul de trypan 0,05% durante 60 minutos a 90 °C em banho Maria. Utilizando a metodologia de coloração de raízes e visualização de colonização micorrízica (UFLA, 2013; SOUZA; GUERRA, 1998).

3.4.5 COLONIZAÇÃO DE MICORRIZAS.

No laboratório, as raízes foram lavadas e coradas para montagem das lâminas com 5 ou 6 fragmentos de um centímetro totalizando 30 fragmentos de raízes. As análises foram realizados no programa MYCOCALC (TROUVELOT *et al.*, 1986).

3.4.6 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DOS ESPOROS

Foram separados os esporos de *Glomus sp* das amostras centrifugadas. O isolamento dos esporos, após a extração pelo peneiramento úmido e centrifugação com sacarose a 60%, foi realizado em vidro de relógio com o auxílio de alfinetes entomológicos e lupa estereoscópica (40x de aumento). Os esporos após serem separados foram colocados em béquer de 50 ml e lavados com água destilada autoclavada, aspirados em seringa de 10 ml e colocados em meio LB sólido para o crescimento das culturas bacterianas. Após a verificação do crescimento, estas foram isoladas e novamente cultivadas em meio LB sólido.

3.4.7 TESTE DE DESINFESTAÇÃO DE ESPOROS

No teste de desinfestação superficial dos esporos de FMAs, foram utilizados 8 tratamentos, em triplicata, durante 7 dias, tratados com gentamicina e/ou hipoclorito de sódio. O experimento foi feito em placa de petri com Agar em cabine de segurança biológica Classe II A1 da Filterflux com auxílio da alça de platina e pipeta para inoculação, nos seguintes tratamentos: a) Controle – Esporos colocados *in natura*, b) Gentamicina – Esporos lavados com gentamicina 25ppm por 10 min., c) Hipoclorito – Esporos lavados com hipoclorito de sódio 0,5% por 3 min., d) Hipoclorito + Gentamicina – Esporos lavados com hipoclorito de sódio 0,5% por 3 min e com gentamicina 25 ppm por 10 min, e) Incorporada Gentamicina – Foi incorporada gentamicina 25ppm no Ágar e os esporos não tiveram tratamentos, f) Hipoclorito + Incorporada Gentamicina - Foi incorporada gentamicina 25ppm no Ágar e os esporos lavados com hipoclorito de sódio 0,5% por 3 min, g) Gentamicina + Incorporada Gentamicina - Foi incorporada gentamicina 25ppm no Ágar e os esporos lavados com gentamicina 25 ppm por 10 min, h) Hipoclorito + Gentamicina + Incorporada Gentamicina - Foi incorporada gentamicina 25ppm no Ágar e os esporos lavados com hipoclorito de sódio

0,5% por 3 min e com gentamicina 25 ppm por 10 min.

3.4.8 ANÁLISE DE DENSIDADE ÓTICA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DOS ESPOROS

As bactérias isoladas dos esporos foram submetidas a um novo crescimento em tubos de vidro com tampa de rosca contendo tolueno diluído em meio de cultura LB líquido em 8mL com as seguintes concentrações (tolueno/LB): 2,5 µl/ml, 5,0 µl/ml, 10 µl/ml, 20 µl/ml, 40 µl/ml .

3.4.9 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS BACTÉRIAS DA RIZOSFERA

Para obtenção das bactérias da rizosfera, as amostras de raízes foram acondicionadas em tubos tipo Falcon estéreis de 15 ml. No laboratório foram imersas em meio líquido salino 0,9% e agitadas em Vortex por 10 minutos com o objetivo de se obter as bactérias fortemente aderidas à raiz. Com o auxílio de uma alça de platina, os inóculos foram transferidos para placas de Petri contendo meios de cultura sólidos (LB+Ágar 2%, pH 7,5) devidamente identificados e incubados por 24 horas a uma temperatura de 25°C. Para manutenção das colônias fez-se o estriamento das bactérias em novas placas de 15 em 15 dias. Toda manipulação do material biológico fez-se em cabine de segurança biológica Classe II A 1 da Filterflux, a fim de eliminar interferências do ambiente e garantir a veracidade dos resultados.

3.4.10 COLORAÇÃO DE GRAM

A partir das culturas pura isoladas, retirou-se uma porção da cultura com auxílio da alça de platina e fez-se um esfregão em lâmina. As lâminas das bactérias isoladas são coradas de acordo com o método de Gram. Para tal há necessidade de fixar as células na lâmina passando-a sobre chama. Então a lâmina é coberta por solução de Cristal Violeta por um período de um minuto e, após eliminação do excesso da solução em água corrente, a lâmina é coberta por solução de Lugol por um períodos de um minuto. Em seguida, a lâmina é descorada com solução de Etanol-Acetona e lavada em água corrente. Para finalizar, a lâmina descorada foi coberta por Fucsina Fenicada de Gram por trinta segundos e lavada em água corrente e deixadas para secar em temperatura ambiente. A observação das lâminas foi

realizada com auxílio de um microscópio óptico na objetiva de imersão, levando em consideração a coloração e morfologia das células.

3.4.11 MEIO AGAR-AGAR EM PRESENÇA DE TOLUENO

A partir do isolado a bactéria formadora de biofilme foi submetida a um novo crescimento em AGAR-AGAR, feito o estriamento com auxílio da alça de Platina e na porção superior da placa de petri foi adicionada diretamente sobre o meio as concentrações geométricas de tolueno em 2,5 µl/ml, 5,0 µl/ml, 10 µl/ml, 20 µl/ml, 40 µl/ml e 80 µl/ml, colocadas para crescer em estufa de BOD ajustada para a temperatura de 25°C em posição inversa isolada com filme de PVC transparente.

3.4.12 MEIO AGAR-LB EM PRESENÇA DE TOLUENO

A partir do isolado a bactéria formadora de biofilme foi submetida a um novo crescimento em meio AGAR-LB, feito o estriamento com auxílio da alça de Platina e na porção superior da placa de petri foi adicionada diretamente sobre o meio as concentrações geométricas de tolueno em 2,5 µl/ml, 5,0 µl/ml, 10 µl/ml, 20 µl/ml, 40 µl/ml e 80 µl/ml, colocadas para crescer em estufa de BOD ajustada para a temperatura de 25°C em posição inversa isolada com filme de PVC transparente.

3.4.13 TOLERÂNCIA AO TOLUENO EM MEIO LB LÍQUIDO

A partir da cultura, as bactérias da rizosfera foram submetidas a um novo crescimento em tubos de vidro com tampa de rosca contendo tolueno diluído em meio de cultura LB líquido em 8mL. Retirou-se 100 µl/ml do meio líquido para cada amostra contendo um inóculo de $2,0 \times 10^{-4}$ ml/qsp, obtido através do método da diluição seriada e o número mais provável com o auxílio da câmara de Neubauer, foi incubado em cada diluição. Utilizou-se as

seguintes concentrações (tolueno/LB): 2,5 µl/ml, 5,0 µl/ml, 10 µl/ml, 20 µl/ml, 40 µl/ml, 80 µl/ml e 160 µl/ml em triplicatas. O tolueno (C₇H₈) utilizado no experimento é da marca Vetec, código 140 e possui peso molecular 92,14. Os tubos foram acondicionados em um agitador horizontal orbital digital IKA HS/KS 260 basic ajustado para rotação de 250rpm e estes foram mantidos dentro de uma incubadora tipo BOD da ACB Labor programada para 25°C. A leitura do crescimento bacteriano foi obtida a cada 24 e 48 horas através de densidade ótica, com o auxílio de um espectrofotômetro UV/V-1600 da Pró-análise ajustado para 600nm com o objetivo de se traçar uma curva de crescimento segundo o conceito de Lambert – Beer. Os resultados foram analisados de acordo com o programa Graph Pad Prism 6, com o teste One-Way ANOVA com significância de $P < 0.05$ segundo o pós teste de Tukey.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 CONTAGEM DE ESPOROS

Os esporos fúngicos foram coletados da rizosfera e do solo sendo os mesmos quantificados e separados por características morfológicas (fig 10). Na área de estudo, foi possível confirmar, por características morfológicas, a presença dos gêneros *Gigaspora* sp. e *Glomus* sp; já relatados como presentes em experimentos de biorremediação ou em áreas degradadas e em dunas litorâneas (STÜRMER; BELLEI, 1994; PAULA, 2006; OLIVEIRA, 2009; ANDRADE, 2012).

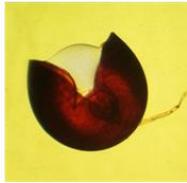
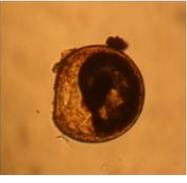
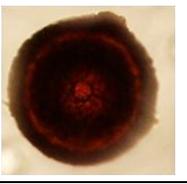
Gênero/espécie	Tamanho aprox	Total de esporos encontrados	Ocorrência Relativa	Frequência relativa	Imagem
<i>Gigaspora sp</i>	250-300 Mm	46	8/23	3%	
<i>Glomus sp</i>	150-200 Mm	443	15/23	26%	
<i>Glomus sp</i>	50Mm	248	9/23	15%	
<i>Glomus sp</i>	250-300Mm	106	10/23	6%	
<i>Glomus multicaule</i>	150-200 Mm	829	15/23	49%	
Outros não identificados		29	8/23	1%	

Figura 10 – Ocorrência e frequência de esporos encontrados no solo da psamófila-reptante.
Fotos: Ocimar Ferreira de Andrade.

3.5.2 COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE *Remirea maritima* POR FMA

Após a observação em microscópio óptico, os dados de colonização foram inseridos e calculados no programa MYCOCALC (TROUVELOT *et al.*, 1986) e os parâmetros utilizados foram: F% (frequência de colonização micorrízica no sistema radicular), M% (intensidade de colonização micorrízica no córtex da raiz) onde o micélio externo é avaliado, m% (intensidade de colonização micorrízica em fragmentos de raízes), A% (abundância de estruturas micorrízicas internas no sistema de raiz), a% (abundância de estruturas micorrízicas internas em fragmentos de raízes). Como resultado das amostras foram encontradas estruturas fúngicas como hifas intracelulares, vesículas e arbúsculos nas raízes analisadas. Os resultados por parâmetro foram: F%= 96,67; M%= 10,73; m%= 11,10; A%= 4,76; a%= 44,35. Os resultados demonstram que as estruturas FMAs se faz presente em quantidades significativas nas raízes (fig 11 e 12) onde a colonização da *Remirea maritima* por FMAs indica uma relação simbiótica entre esses organismos e a importância dessa conhecida relação para a manutenção do vegetal em solo distrófico.

Quantificação de FMA em raiz de *Remirea maritima*

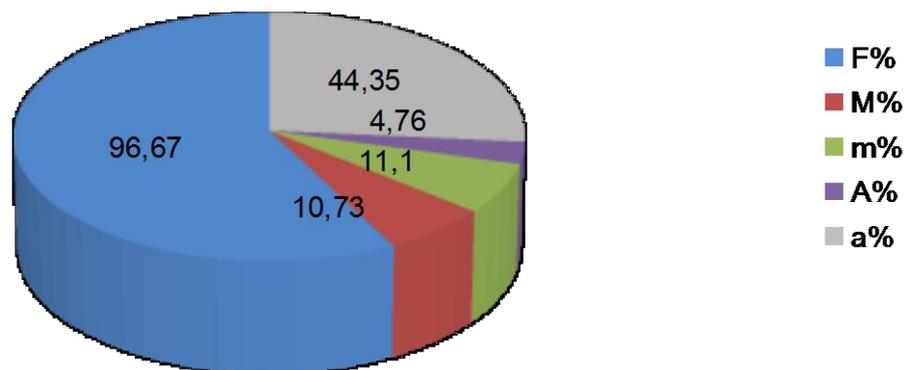


Figura 11 - Distribuição e porcentagem de colonização de FMA em raiz de *Remirea maritima*. Onde: F% (frequência de colonização micorrízica no sistema radicular), M% (intensidade de colonização micorrízica no córtex da raiz), m% (intensidade de colonização micorrízica em fragmentos de raízes), A% (abundância de estruturas micorrízicas internas no sistema de raiz), a% (abundância de estruturas micorrízicas internas em fragmentos de raízes)

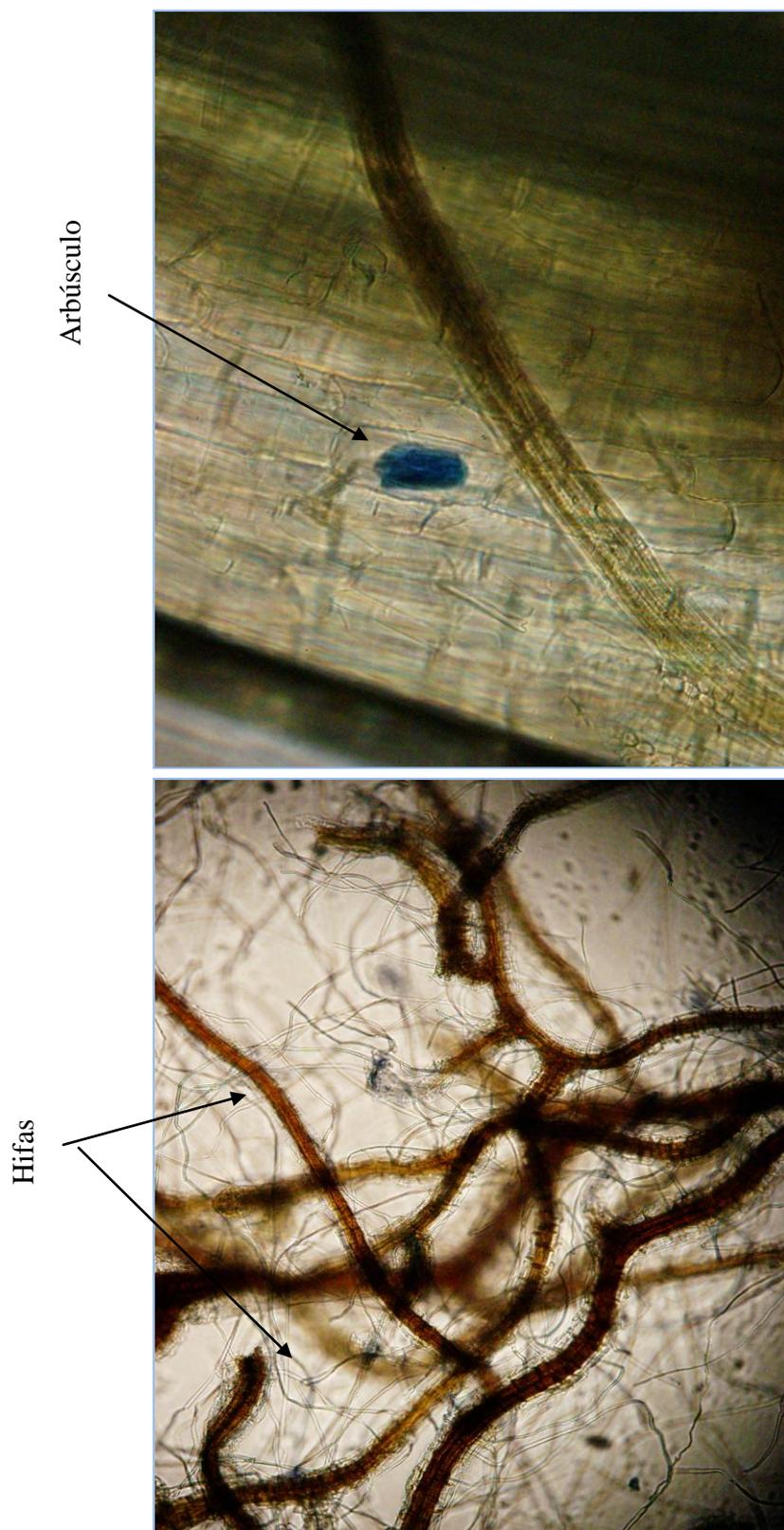


Figura 12 – Raízes de *Remirea maritima* (a) colonizadas por hifas, (b) Ocorrência de um Arbúsculo

3.5.3 BACTÉRIAS ISOLADAS DO FMA

Após a separação e quantificação dos glomerosporos, isolou-se os esporos do gênero *glomus sp*, encontrou-se 2 morfotipos bacterianos (fig 13) isolados deste esporo de FMA, o que demonstra um consórcio FMA-Bactéria associado as raízes de *R. marítima*.

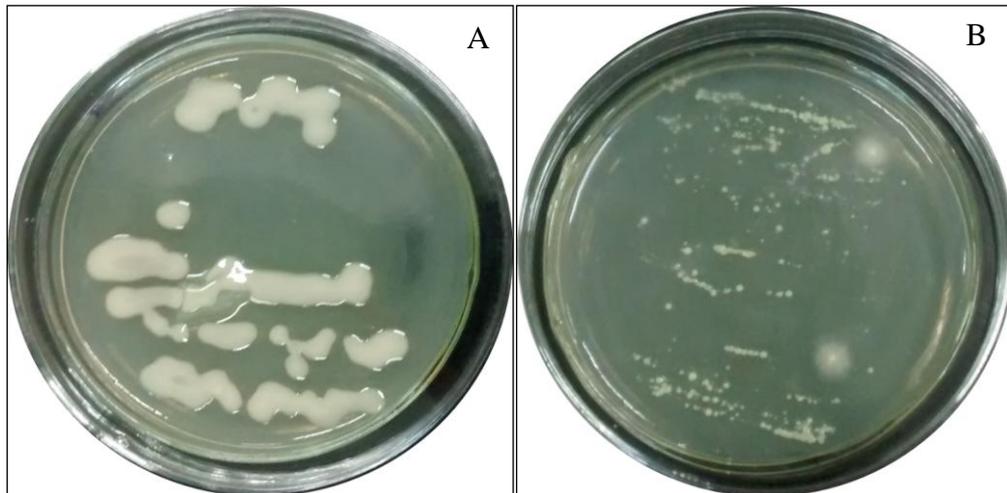


Figura 13 – Colônias bacterianas isoladas dos esporos de *Glomus sp*. Em (a) bactéria branca formada por bastonetes gram negativos e em (b) bactéria verde formada por cocos gram positivos. Foto: Marianne Nunes

3.5.4 VERIFICAÇÃO DOS EFEITOS DO TOLUENO NO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ISOLADOS DE *Glomus sp*.

Para verificar os efeitos do tolueno no crescimento de dois morfotipos bacterianos isoladas de *Glomus sp*., descritas como bactéria branca e bactéria verde, foram adicionadas doses crescentes de tolueno/LB 2,5 µl/ml, 5,0 µl/ml, 10 µl/ml, 20 µl/ml, 40 µl/ml em meio de cultura. Observou-se que houve um decréscimo dose-resposta do crescimento bacteriano, demonstrando a sensibilidade das duas cepas bacterianas ao tolueno (Fig. 14). Esses resultados indicam que a presença das bactérias isoladas dos esporos pode não ter interferência na tolerância de *B. decumbens* ao tolueno, quando na presença de FMAs, conforme demonstrado por Andrade (2012) (Fig. 7).

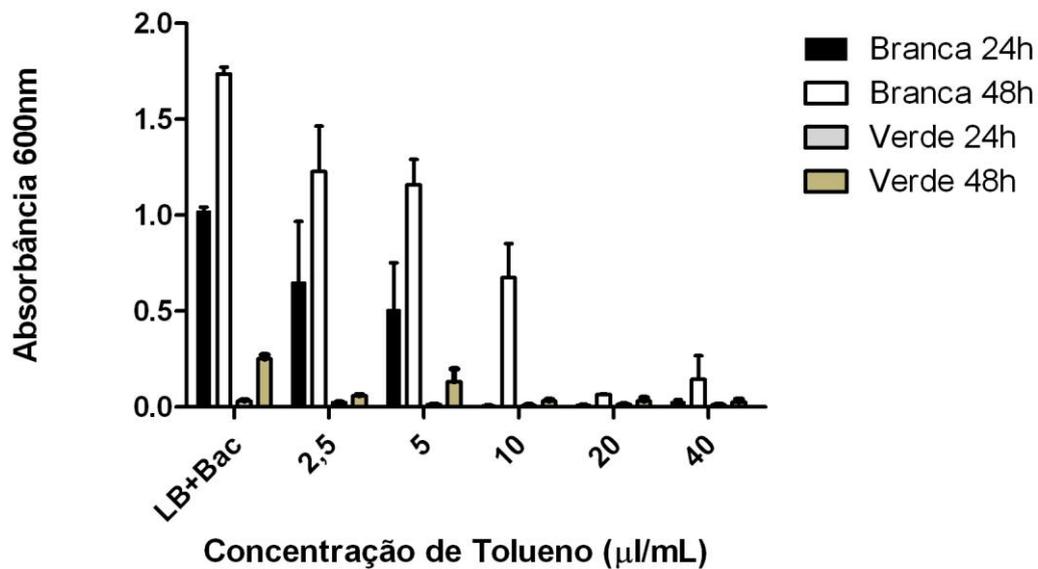


Figura 14 – Análise comparativa entre as bactérias Branca e Verde isoladas dos esporos mediante a presença de Tolueno em diferentes concentrações nos crescimentos em meio LB líquido observados em 24 e 48h com erro padrão .

3.5.5 - DESINFESTAÇÃO DE ESPOROS

Nos tratamentos de desinfestação de esporos, houve crescimento bacteriano quando adicionado gentamicina ao meio de cultura e quando esta foi inoculada em meio LB. Nos demais tratamentos não foram encontrados colônias bacterianas, como demonstradas na tabela (5).

Tabela 5 – Presença de Bactérias na desinfestação dos esporos

Tratamentos	presença de bactérias
Controle	+
Gentamicina	+
Hipoclorito	0
Hipoclorito e gentamicina	0
Gentamicina incorporada	+
Hipoclorito e gentamicina incorporada	0
Gentamicina e gentamicina incorporada	0
Hipoclorito mais gentamicina e gentamicina incorporada	0

Onde: (+) indica crescimento de colônias bacterianas e (0) ausência de colônias

bacterianas

Após a germinação da semente e do esporo, não foi identificado a presença de crescimento bacteriano quando este foi tratado com hipoclorito de sódio a 0,05%. O hipoclorito de sódio demonstrou ser eficiente na desinfestação de bactérias. Quando utilizado gentamicina no tratamento, as bactérias foram resistentes, porém é necessário mais experimentos para confirmar este resultado. Nos resultados de Andrade (2012) apesar dos esporos utilizados para a colonização da *B. decumbens* não terem sido desinfestados o hipoclorito de sódio a 0,5% foi utilizado para a desinfestação das sementes de *B. decumbens*, evitando a interferência de bactérias provenientes da semente. Quando verificado que as bactérias isoladas dos esporos de FMAs não são resistentes ao tolueno, podemos indicar que o efeito protetor a *B. decumbens* podem ser atribuídos apenas ao FMA.

3.5.6 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE *Remirea maritima*

Considerando as amostras das coletas realizadas, foram encontradas bactérias presentes na rizosfera da *Remirea maritima* (fig. 15) e as mesmas repicadas e isoladas configurando 9 colônias distintas para posterior identificação.

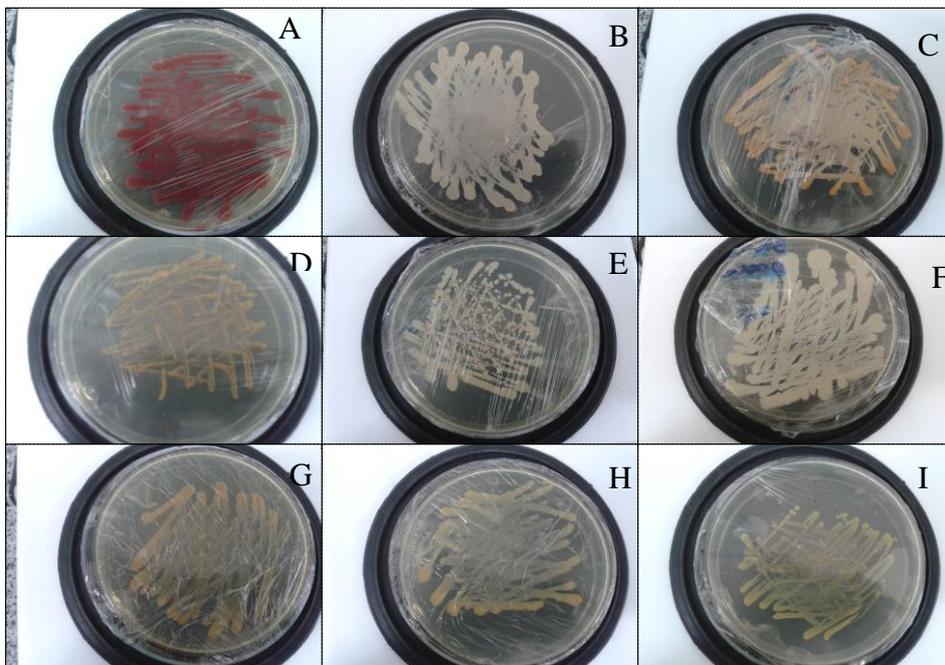


Figura 15- Bactérias isoladas da raiz do vegetal *Remirea maritima* (A) Rizosfera A, (B) 2C

Branca, (C) 3B Laranja , (D) 2C Amarela, (E) 2B Branca O, (F) 3B Branca Filme, (G) 2C Laranja, (H) 3B Bege e (I) 2B Verde. Fotos: Maryéllen dos Reis

3.5.7 COLORAÇÃO DE GRAM EM ISOLADOS BACTERIANOS

Foram identificadas segundo a coloração de Gram 9 morfotipos de isolados bacterianos (tab 6).

Tabela 6– Morfotipos encontrados na rizosfera de *Remirea marítima*, isoladas do crescimento em meio Agar-LB e cultivadas sob as mesmas condições com esfregaços realizados para a montagem de laminais segundo a técnica de coloração de Gram e observação em microscopia ótica para definição de morfotipos.

Bactérias isoladas	Coloração de Gram	Morfotipos
Rizosfera A	-	cocos
2C Branca	+	bastonetes
3B Laranja	+	cocos
2C Amarela	-	cocos
2B Branca O	+	bastonete
3B Branca Filme	+	bastonete
2C Laranja	+	bastonete
3B Bege	-	cocos
2B Verde	+	cocos

3.5.8 MEIO ÁGAR-AGAR COM TOLUENO UTILIZANDO A BACTÉRIA 3B BRANCA FILME

Após os resultados obtidos do crescimento bacteriano em meio de cultura contendo Ágar em presença de Tolueno (tab. 7), foi separada uma amostra da bactéria denominada 3B de cor branca formadora de filme, para um inóculo de $1,46 \times 10^5$ ml.

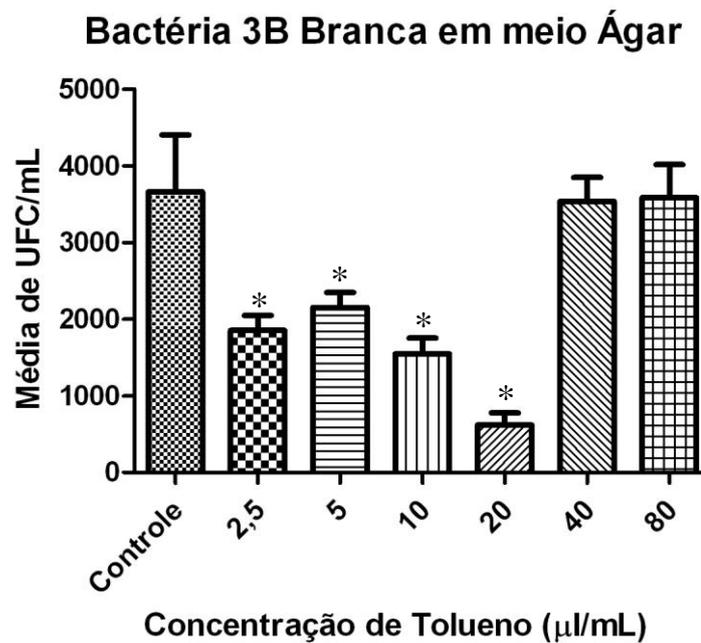


Figura 16 – Crescimento de UFC em meio sólido com adição de Tolueno após 96h. O experimento foi realizado em triplicata, $n=1$, com $p<0,05$; onde (*) indica significância no resultado em relação ao controle.

Os resultados indicam que o crescimento bacteriano (fig. 16) diminui na medida em que se eleva a concentração de tolueno até $20\mu\text{l}$, porém com $40\mu\text{l}$ e $80\mu\text{l}$ essa diminuição não é observada.

3.5.9 MEIO LB-AGAR EM PRESENÇA DE TOLUENO UTILIZANDO A BACTÉRIA 3B BRANCA FILME

Mediante os resultados obtidos, para comparar a bactéria formadora de biofilme 3B Branca em meio sólido Agar com meio sólido LB, foi testada na presença de Tolueno e o crescimento não demonstrou variação significativa (fig. 17) em relação ao crescimento que ocorreu de forma similar em meio Agar Puríssimo (fig 16).

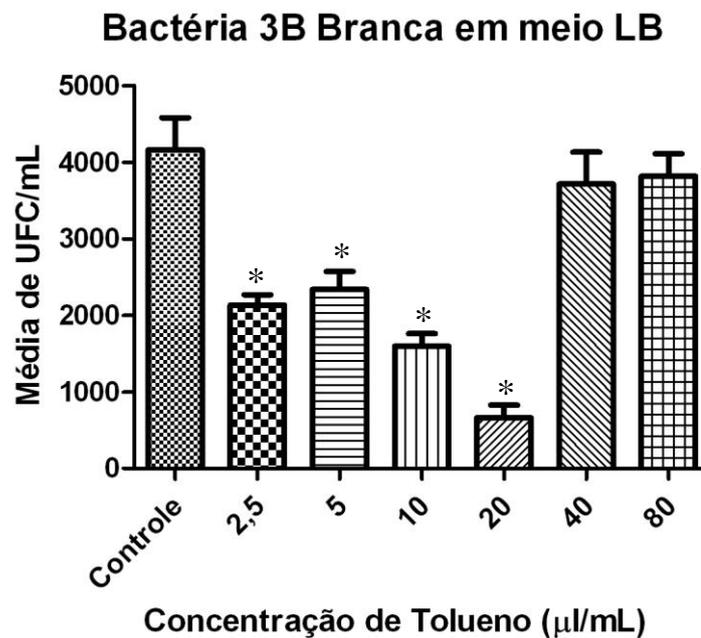


Figura 17 – Crescimento bacteriano em meio sólido com Tolueno após 96h. O experimento foi realizado em triplicata, n=1 com $p < 0,05$; onde (*) indica significância no resultado em relação ao controle.

As análises indicam uma variação em relação à concentração de Tolueno, demonstrando uma tendência na redução de formação de colônia, conforme se aumenta a dosagem do tolueno até 20µl/mL. Nas concentrações de 40 e 80 µl/mL não foi observado à interferência.

3.5.10 CRESCIMENTO BACTERIANO EM MEIO LÍQUIDO NA PRESENÇA DE TOLUENO.

Bactérias denominadas 3B Branca/Filme foram cultivadas em meio LB na presença e ausência de tolueno em concentrações crescentes e após 24 e 48h o crescimento foi avaliado por D.O. em 600nm (Fig. 18). As análises realizadas no programa Graphpad Prism 6 demonstraram que na presença do tolueno houve uma redução dose-resposta no crescimento bacteriano assim como observado em meio sólido Agar puríssimo e Ágar - LB.

Em comparação aos resultados obtidos pelo teste ANOVA, houve significância se comparados os dados do controle com as dosagens utilizadas.

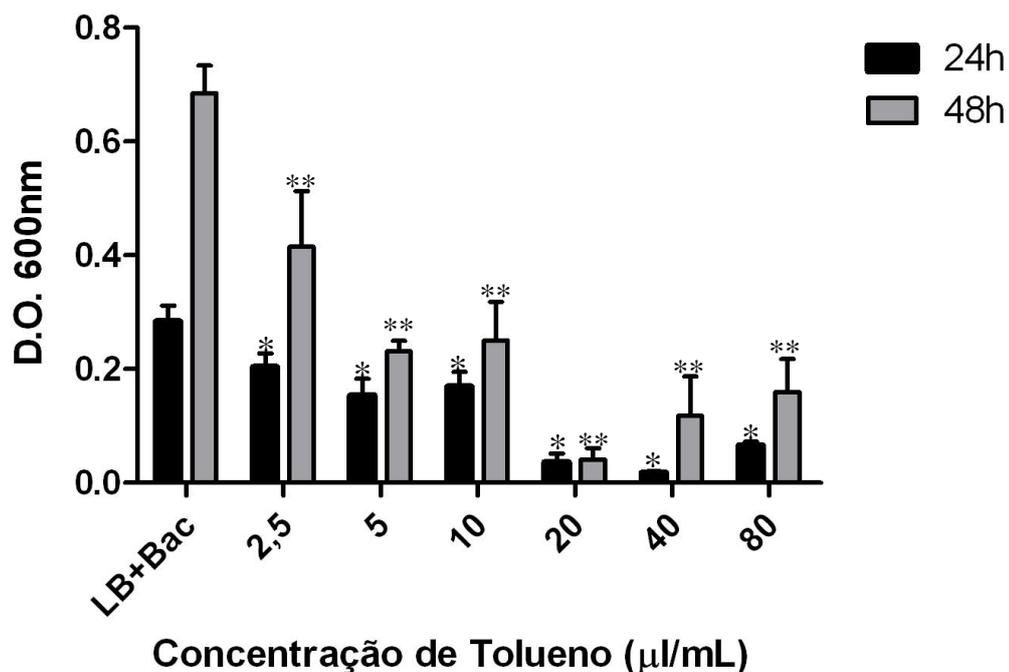


Figura 18- Efeito do Tolueno no crescimento da bactéria 3B Branca Filme. O Crescimento bacteriano foi verificado após 24 e 48 horas através de D.O. em 600nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos cinco vezes com $p < 0,05$; onde (*) e (**) indicam a significância no resultado em relação aos controles de 24h e 48h respectivamente.

As análises comparativas entre o crescimento de 24 e 48h demonstram que conforme a concentração de Tolueno é elevada, a D. O diminui indicando uma dose-resposta negativa em

relação ao crescimento bacteriano até a concentração de 20 µl/mL.

3.6 DISCUSSÃO

Estudos de identificação e caracterização de espécies e ecologia do solo de ambientes litorâneo empreendidos nas duas últimas décadas (THOMAZ; MONTEIRO, 1992; KOSKE, 1988; ASSUMPCÃO; 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. A identificação de espécies vegetais associadas a micro-organismos é fundamental para o entendimento da dinâmica dos ecossistemas de restinga e possibilita uma análise de risco mais aprofundada diante de uma eventual contaminação desse ecossistema. O estudo do potencial biorremediador dos micro-organismos de restinga associados a vegetais gera uma perspectiva para a aplicação da fitorrizoremediação na descontaminação de ecossistemas costeiros que estão constantemente ameaçados pela contaminação por hidrocarbonetos do petróleo.

Micro-organismos isolados de áreas contaminadas por petróleo e derivados vêm sendo estudados com a perspectiva de uso dos mesmos para biorremediação. Nessa abordagem, fungos e bactérias encontrados no solo contaminado passam por um processo natural de seleção, sendo potencialmente resistentes aos hidrocarbonetos (BENTO *et al.*, 2012). Nesse contexto as áreas estudadas estão contaminadas e os micro-organismos ali identificados, com potencial remediador, já estarão atuando para a recuperação do meio.

No caso de regiões que estão sob ameaça de contaminação e ainda encontram-se preservadas, qual é o potencial natural de remediação desses locais? Como podemos preservá-los para que os efeitos mitigadores naturais possam ocorrer? Quais são as características originais desses ecossistemas? Essas perguntas são o que nos levam a uma abordagem de análise de riscos que possa dar suporte às ações de tratamento e mitigação dos impactos causados pela poluição oriunda das atividades exploratório *off-Shore* e *on-Shore* do petróleo.

Existem vários relatos sobre os efeitos benéficos da interação FMA-bactéria (CLARK *et al.*, 1999; BHOWMIK; SINGH, 2004; BAREA *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2012; BENTO *et al.*, 2012). Outros autores já demonstraram a ocorrência de bactérias, na superfície e dentro de

esporos de FMAs (PAULA *et al.*, 1991; LI; STRZELCZYK, 2000; BIANCIOTTO *et al.*, 2004). As bactérias associadas a esporos de FMAs podem promover o crescimento e a rápida colonização de vegetais pelo fungo (BHOWMIK; SINGH, 2004). Azcón-Aguilar e Barea (1997) observam que a mesma promove o desenvolvimento e a sanidade do vegetal melhorando sua adaptação à medida que reduz os estresses ambientais. As bactérias podem auxiliar na nutrição nitrogenada, como o aumento do processo da redução assimilatória de nitrato disponível no solo (BODDEY *et al.*, 1986), pela fixação biológica do N₂ e pela produção de fitormônios (INIGUEZ *et al.*, 2004).

O solo não depende apenas de suas propriedades físicas ou químicas mas também da diversidade e atividade da microbiota. A manutenção da diversidade microbiana do solo é fundamental para a sua qualidade (BAREA *et al.*, 1997). Os FMA's são conhecidos como um componente-chave da microbiota que pode, potencialmente, melhorar a qualidade do solo. Zhang *et al.* (2014) fez um estudo em área salina com feijões castor inoculados com FMA e forneceu evidências que estes podem melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas do solo salino costeiro.

Neste trabalho quantificamos os esporos, identificamos no solo da formação psamófil-reptante e verificamos o grau de colonização das raízes de *R. maritima* com o objetivo de caracterizar essa conhecida associação entre FMA e vegetal.

Em estudos realizados por Andrade (2012), utilizando como modelo o vegetal *B. decumbens* em solo de restinga naturalmente conservado e artificialmente contaminado com tolueno, observou-se que na presença de FMAs o vegetal obteve maior crescimento quando comparado com solos contaminados e na ausência de FMAs. Esses resultados nos levaram a novos questionamentos em relação ao efeito protetor do FMA. Esses efeitos podem ser atribuídos somente ao FMA? Bactérias podem estar associadas a estes efeitos? Os FMAs utilizados nos experimentos de Andrade (2012), foram isolados do solo da formação vegetal psamófila-reptante e identificados em associação com a espécie vegetal *Remirea maritima*, por isso nesse trabalho, isolamos bactérias dos esporos do *Glomus sp.* e verificamos o crescimento da mesma na presença de tolueno. Em nossos resultados observamos que as bactérias denominadas Branca e Verde isoladas dos esporos de *Glomus sp.* não foram resistentes ao tolueno em concentrações de 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 e 40.0 µl/mL. Esses resultados nos indicam que as bactérias identificadas em associação com os esporos de FMA podem não ter participação na proteção da *B. decumbens* na presença de tolueno.

No ambiente rizosférico as bactérias podem estar diretamente associadas as raízes do vegetal e podem contribuir para o desenvolvimento do mesmo (KIRK *et al.*, 2005). Para verificarmos a influência de bactérias diretamente associadas a *R. maritima* no processo de proteção a contaminação por tolueno, isolamos nove cepas que foram caracterizadas pela morfologia e utilizamos uma delas que tem como característica a formação de BIOFILME. Bactérias formadoras de BIOFILME geralmente demonstram maior resistência a alterações ambientais (SCHOENFELDER *et al.*, 2010). Observamos em nossos resultados que na presença de tolueno em concentrações de 2.5, 5.0, 10.0 e 20.0 µl/mL há um decréscimo na formação de colônias da Bactéria formadora de biofilme demonstrando uma sensibilidade da mesma ao tolueno, porém quando utilizado concentrações de 40 e 80 µl/mL, aparentemente não há alteração na formação de colônias, fenômeno que precisa ser melhor avaliado.

As bactérias formadoras de BIOFILME em meio líquido LB apresentaram resultados semelhantes quando comparados com a formação de colônias na presença de tolueno em meio sólido, porém a resistência apresentada em concentrações de 40 e 80 µl/mL não foi observada.

Estas associações embora fossem evidenciadas, estudos que apontam a eficácia e a degradação do tolueno por estes consórcios precisam ser realizados.

Sendo assim indica-se que o experimento seja realizado com as demais bactérias isoladas da rizosfera do vegetal *Remirea maritima* com o intuito de verificar o potencial das demais colônias bacterianas encontradas.

Embora a tolerância ao tolueno em FMAs já tenha sido descritos por Andrade (2012), os estudos com outros morfotipos bacterianos podem fornecer evidências ou sugerir que os FMAs realmente são os veículos de degradação. Assim como os estudos com as demais colônias bacterianas também podem fornecer evidências de que o consórcio é mais eficiente do que os mesmos isolados.

3.7 CONCLUSÃO

As análises de raízes de *Remirea maritima* demonstraram que sua rizosfera apresenta abundância em comunidade de FMAs e bactérias, que juntos podem prover a formação de exsudados disponibilizando-os para o consórcio microbiano e também para o vegetal. Os isolados bacterianos não demonstraram resistência ao tolueno indicando que a ação protetora de *B. decumbens* pode estar relacionada exclusivamente pelo FMAs como demonstrado

anteriormente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE J. A; AUGUSTO, F; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados, Ecletica Química, São Paulo, v.35, n.3, Sept. 2010.

ANDRADE, O. F. Identificação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em formação vegetal psamófila-reptante: Ecologia e Micorrizorremediação. Dissertação (mestrado em Engenharia Ambiental)- Instituto Federal Fluminense IFF, Cabo Frio, 2012.

AGUIAR, T. M; SABBA-SRUR, A. U. O; SAMICO, G. F. Potencial nutritivo e características físicas e químicas do abajeru. Pesquisa Agropecuária Tropical, v.41, n.1, p.102-109, Mar 2011.

ALARCÓN, C; CUENCA, G. Arbuscular mycorrhizas in coastal sand dunes of the Paraguaná Peninsula, Venezuela. Mycorrhiza: v.16, n.1, p.1– 9, 2005.

ALMEIDA, R. T.; VASCONCELOS, I; NESS, R. L. L. Infecção micorrízica vesículo-arbuscular e nodulação de leguminosas arbóreas do Ceara, Brasil. Ciência Agrônômica, v. 17, n. 01, p. 89-97, 1986.

ARAÚJO, D. S. D - Cabo Frio Region. In DAVIES *et al.* (eds.), Centres of plant diversity a guide and strategy for their conservation, WWF/ IUCN, OXFORD. v. 3, p. 373-375. 1997.

ARAÚJO, D. S. D - Análise florística e fitogeográfica das restingas do Estado do Rio de Janeiro. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 176p. 2000.

ARAUJO, D.S.D; SÁ, C.F.C.; J.F. PEREIRA; D.S. GARCIA; M.V. FERREIRA; R.J.

PAIXÃO; S.M. SCHNEIDER ; V.S. FONSECA-KRUEL. Área de Proteção Ambiental da Massambaba, Rio de Janeiro: caracterização fitofisionômica e florística. Rodriguésia v. 60, n.1, p.54-84, 2009.

ARTURSSON, V; FINLAY, R. D; JANSSON, J. K. Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal restriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. Environ Microbiol v.7, p.1952–1966, 2005.

AZCÓN, R. Selective interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.21, n.5, p.639-644, 1989.

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

BANKS, M. K; SCHWAB, A.P; SMITH J. S. The Impact of Phytoremediation on the Toxicity of Soil Contaminants. In: International Containment ; Remediation Tecnology Conference and exhibition, Orlando, Florida, 10 -13 jun 2001. disponível em: <<http://www.containment.fsu.edu/cd/content/pdf/502.pdf>> Acesso em: 14 de jul de 2013.

BARBIÉRE, E. B. Ritmo climático e extração do sal em Cabo Frio. Rev. Bras. Geografia vol.37, n.4, p. 23-109, 1975 .

BARBIÉRE, E. B. Cabo Frio e Iguaba Grande, dois microclimas distintos a um curto intervalo espacial. Restingas: origem, estrutura, processos. Niterói, CEUFF, p.3-13, 1984.

BAREA, J.M; AZCÓN-AGUILAR, C., AZCÓN, R., 1997. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil–plant systems. In: Gange, A.C., Brown, V.K. (Eds.), Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems. Backwell, Cambridge, p. 65–77.

BAREA, J.M.; POZO, M.J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, v.56, p.1761-1778, 2005.

BARNHART, M. M; CHAPMAN, M. R. Curli biogenesis and function. Annu Rev Microbiol, v.60, p.131-147, 2006.

BARRETO, G. E. S; OLIVEIRA, E. S; VILLAR, F. A. G. A; SANTOS, G. S; LIMA, R. M. F; COSTA, S. L; COSTA, M. F. D; EGITO, E. S. T; EL-BACHÁ, R. S. Investigation of toxic factors affecting cells of rat brains exposed to 3-methylcatechol. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba , v. 50, n. 5, Sept. 2007.

BENTO, Ricardo Aparecido; Saggin-Júnior, Orivaldo José; PITARD, Rosa Maria; STRALIOTTO, Rosângela ; SILVA, Eliane Maria Ribeiro da ; TAVARES, Sílvio Roberto de Lucena ; LANDA, Frederico Henrique Teixeira Gerken ; MARTINS, Luiz Fernando ; VOLPON, Antônia Garcia Torres . Selection of Leguminous Trees Associated with Symbiont Microorganisms for Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soil. Water, Air and Soil Pollution (Dordrecht. Online), v. 223, p. 5659-5671, 2012.

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: 53 - 85, (ed. FERNANDES, M.S). 432p. 2006.

BERTOLI, A. L. C; RIBEIRO, M. D. S.. Passivo ambiental: estudo de caso da Petróleo Brasileiro SA-Petrobrás. A repercussão ambiental nas demonstrações contábeis, em consequência dos acidentes ocorridos. Revista de Administração Contemporânea v.10, n.2, p. 117-136, 2006.

BIANCIOTTO, V.; GENRE, A.; JARGEAT, P.; LUMINI, E.; BECARD, G.; BONFANTE, P. Vertical transmission of endobacteria in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* through generation of vegetative spores. Applied Environmental Microbiology, v.70, p.3600-3608, 2004

BHOWMIK, S. N.; SINGH, C. S. Mass multiplication of AM inoculum; effect of plant

growth-promoting rhizobacteria and yeast in rapid culturing of *Glomus mosseae*. Current Science, Bangalore, v.86, p.705-709, 2004.

BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. Plant and Soil, v.95, p.109-121, 1986.

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, Brasil. IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 73-82, jan./dez. 2006.

BORGES, C. A. L; CORDEIRO, Z. J. M; FRANCIELLI, M; SOUZA, L. S; SILVA, S. O; COELHO, E. F; LIMA, M. B; MEDINA, V. M; RITZINGER, C. H. S. P; FOLEGATTI, M. I. S; SOUZA, A. S; MESQUITA, A. L.M; CARVALHO, J. E. B; TRINDADE, A. V; ALMEIDA, C. O; MATOS, A. L; MEISSNER, J. L; CARVALHO, A. C. P.P. Cultivo da banana para o Agropólo Jaguaribe-Apodi, Ceará. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003.

CARVALHO, D.A; SÁ, C.F.C. Estrutura do estrato herbáceo de uma restinga arbustiva aberta na APA de Massambaba, Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia v.2, n.62, p.367-378. 2011.

CLARK, R.B; ZETO, S.K; ZOBEL. Arbuscular mycorrhizal fungal isolate effectiveness on growth and root colonization of *Panicum virgatum* in acidic soil. Soil Biology and Biochemistry, v.31, p.1757-1763, 1999.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nature Reviews Drug Discovery v.2, p.114-122, 2003.

DIAS, P.C; PEREIRA, M. S. F; MEGUMIKASUYA, M. C; PAIVA, H. N; OLIVEIRA, L. S; XAVIER, A. Micorriza Arbuscular e Rizóbios no Enraizamento e Nutrição de Mudanças de Angico-Vermelho. Revista Árvore, Viçosa-MG, v.36, n.6, p.1027-1037, 2012.

DUNLEY, B. S. Biologia reprodutiva de *Byrsonima sericea* (Malpigiaceae), em fragmentos de diferentes tamanhos na Restinga de Massambaba, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. 2006. 52 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ELIAS, E. P; CARVALHO, Q. C; SILVA, F. L. P; BATISTA, I. H; PEREIRA, J. O; OLIVEIRA, T. C. S; SOUZA, A. D. L. Estudo do potencial de biodegradação de petróleo por fungos isolados da macrófita aquática *Eichornia crassipes* sp. Anais Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

FARIA, S.M. Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 16p., Jan. 2002.

FONSECA-KRUEL, V. S; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil Acta Botânica Brasileira, v.1, n.18, p.177-190. 2004.

FORSTER, M. K. L; TANHAUSER, M; TANHAUSER, S.L. toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. Ver. Saúde pública, vol. 28, n.2, p.167-72, 1994.

GALDINO, C. A. B; SANTOS, E. M. *et al.* Passivo ambiental: revisão teórica de custos na indústria do petróleo. Revista Produção v.14, n.1, p.55, 2004.

GARG, N.; MANCHANDA, G. Effect of Arbuscular Mycorrhizal Inoculation on Salt-induced Nodule Senescence in *Cajanus cajan* (Pigeonpea). Journal Plant Growth Regulation, v.27, n. 02, p. 115-124, 2008.

GAYLARDE, C. C., BELLINASSO, M. L. e MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. Biotecnologia, ciência ; desenvolvimento. s/v. n. 34, p. 36-43, 2005.

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.

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 Botânica Brasileira. v.4, n.23, 1167-1170, 2009.

HELGASON, T., FITTER, A. The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologist, v.19, Part 3, 2005.

HO, I. Interaction between VA-mycorrhizae fungus and *Azotobacter* and their combined effects on growth of tall fescue. Plant and Soil, Dordrecht, v.105, p.291-293, 1988.

IARC – International Agency for Research on Cancer – Disponível em: <http://www.iarc.fr/index.php>.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. Molecular Plant-Microbe Interactions, v.17, p.1078-1085, 2004.

INEA, Instituto Estadual do Ambiente. Disponível em: http://www.inea.rj.gov.br/apa/apa_massambaba.asp. Acesso em 21 de jul de 2013.

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: 10 abril 2013.

JACQUES, R. J. S; BENTO, F. M; ANTONIOLLI, Z. I; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ciência Rural, v.37, n.4 Santa Maria July/Aug. 2007.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Report, v.48, p.692, 1964.

KEITH, L. H.; TELLIARD, W. A. Priority pollutants I : A perspective view. Environmental Science and technology, v. 13, p. 416-23, 1979.

KIRK, J.L.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H. ; TREVORS, J.T. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. Environ. Poll, v.133, p.455-465, 2005.

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.

LI, C.Y.; STRZELCZYK, E. Belowground microbial process underpin forest productivity. Phyton, v.40, p.129-134, 2000.

LIMA, K. S. B; MARTINS, M. A. N.; FREITAS, M. S. M; OLIVARES, F. L. Fungos micorrízicos Arbusculares, bactérias diazotróficas e adubação Fosfatada em mudas de Mamoeiro. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v.33, n.3, p. 932-940, 2011.

LIMBERT, G, R. BRYAN, *et al.* On the mechanics of bacterial biofilms on non-dissolvable surgical sutures: A laser scanning confocal microscopy-based finite element study. Acta biomaterialia v.9, n.5, p.6641-6652, 2013.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M; PARKER, J. Brock Biology Of Microorganisms. 9th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1046 p, 2000.

MELLONI, R; BELLEZE, G; PINTO, A. M. S; DIAS, L. B. P; SILVE, E. M; MELLONI, E. G. P; ALVARENGA, M. I. N; ALCÂNTARA, E. N. Métodos de controle de plantas daninhas e seus impactos na qualidade microbiana de solo sob cafeeiro. Revista Brasileira Ciências do Solo, v. 37, p.66-75, 2012.

MOREIRA, F.M.S. E SIQUEIRA, J.O.– Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras, Editora UFLA, 729 p. 2006.

NOVAIS, C. B. Colonização, esporulação e caracterização fenotípica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em cultura. Dissertação (mestrado em Agronomia)- Universidade federal de Lavras, UFLA. Lavras 2008.

NAHAR, N.; ALAUDDIN. M.; QUILTY; B. Toxic effects of toluene on the growth of activated sludge bacteria. World Journal of Microbiology ; Biotechnology. v.16, p. 307-311, 2000.

NIOSH: NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. NIOSH Carcinogen List, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/nas/rdrp/appendices/chapter5/a5-1.pdf>. Acesso em 20 mar. 2014

OEHL, F. *et al.* Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. International Mycological Association – Fungus, v.2, n.2, p.191–199. 2011.

OLIVEIRA, J. R. G; SOUZA, R. G; SILVA, F. S. B; MENDES, A. S. M; YANO-MELO, A. M. 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, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Sorghum vulgare*). Biology and Fertility of Soils, Berlin, v.11, p.111-115, 1991.

PAULA, A. M; SOARES, C. R. F. S; SIQUEIRA, J. O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental v.10, n.2, p.448–455, 2006.

PETROBRAS - DISTRIBUIDORA S.A. Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ, BR678. 2011. Disponível em : <http://www.br.com.br/wps/wcm/connect/153d2c004f1d75ad95beff88af0baa00/fispq-quim-sol-br-ae-tolueno.pdf?MOD=AJPERES>.

Acessado em 29 de jun de 2014

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology, Palo Alto, v.56, p.15-39, 2005.

PORCEL, R., R. AROCA, *et al.* Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. Agronomy for Sustainable Development v. 32, n.1, p.181-200, 2012.

REDECKER, D; SCHÜSSLER, A; STOCKINGER, H; STÜRMER, S. L; MORTON, J. B; WALKE, C. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycorrhiza, Review. abril de 2013.

ROCHA-PESSOA, T. C; NUNES-FREITAS, A. F; COGLIATTI-CARVALHO, L; ROCHA, C. F. D. Species composition of Bromeliaceae and their distribution at the Massambaba restinga in Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian Journal of Biology, v.2, n.68 p. 251-257, 2008.

SAGGIN-JUNIOR, O. J; SILVA, E. M. R. Micorriza Arbuscular – Papel, Funcionamento e Aplicação da Simbiose. Miolo Biota, capítulo 5, 150p, 2006. disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap5ID-Ap5xcs12HW.pdf>

SANCOVSCHI, M; SILVA, A. H. C. Evidenciação social corporativa: estudo de caso da empresa Petróleo Brasileiro SA. Sociedade, Contabilidade e Gestão v.1, n.1, 2006.

SCHOENFELDER, S.M.; LANGE, C.; ECKART, M; HENNIG, S; KOZYTSKA, S; ZIEBUHR, W. Success through diversity -How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. Int J Med Microbiol, v.300, n.6, p. 380-386, 2010.

SCHÜBLER, A; SCHWARZOTT, D; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol. Res. v.12, n.105 p.1413-1421. December 2001.

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.

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: 25 de jul.2013.

SIQUEIRA, J. O; COLOZZI-FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. In: Efeito do Fósforo no Estabelecimento e funcionamento da simbiose. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.10, p.207-211,1986.

SOUZA, F. A; GUERRA, J.G. M. Emprego de Técnicas do Número mais Provável (NMP) no Estudo de populações de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs). Seropédica: Embrapa. Agrobiologia – 34p, 1998.

STÜRMER, S.L; BELLEI, M.M.. Composition and seasonal variation of spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi in dune soils on the island of Santa Catarina, Brazil. Canadian Journal of Botany, v.72, n.3, 359-363. 1994.

SULLIVAN, J.B. ; VAN ERT, M. Alkybenzene solvents and aromatic compounds.In: Sullivan, J.B. ; Krieger,G.R.,ed. Hazardous materials toxicology clinical principles of environmental health. Baltimore, Willian ; Wilkins, p. 1086-104, 1992.

TAVARES, R. C; MENDES-FILHO, P. F; LACERDA, C.F; SILVA,J. Colonização micorrízica e nodulação radicular em mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) sob diferentes níveis de salinidade. Revista Ciência Agronômica, v. 43, n. 3, p. 409-416, jul-set, 2012.

TIAN, C. et al. Effect of inoculation with ecto and arbuscular mycorrhizae and Rhizobium on the growth and nitrogen fixation by black locust, *Robinia pseudoacacia*. New Forests, v.25, n.2, p.125-131, 2003

TREVIZANI, J. L. B; BIJU, B. R. P. *et al.* Auditorias ambientais compulsórias: instrumento para minimização de acidentes com derramamento de petróleo." Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade v.5, n.3, p. 200-218, 2014.

TROUVELOT, A.; KOUGH, J.L.; GIANINAZZIPEARSON, V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire: recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. (Ed.). Mycorrhizes: physiologie et génétique. Dijon: Inra. p. 217-220, 1986.

UFLA. Coleção de Fungos Micorrízicos da Faculdade Federal de Lavras. Disponível em < [http:// www.dcs.ufla.br/micorriza/fungos_micorrizicos_arbusculares.html](http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fungos_micorrizicos_arbusculares.html) > Acesso em: 05 jun. 2013.

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

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.

VAN HOUTDT R, MICHIELS CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Res Microbiol, v.156, n.5-6, p.626-33, 2005.

VIEIRA, G. E. G; SILVEIRA, C. R; CUTRIM, J; RIBEIRO, J. Avaliação dos principais aspectos da fitorremediação aplicados na redução da poluição no solo e água. Engenharia Ambiental – Espírito Santo do Pinhal, v. 8, n. 2, p. 182-192, abr. /jun. 2011.

VITORAZI FILHO, J. A; LIMA, K. B; FREITAS, M. S. M; MARTINS, M.A; OLIVARES, F. L. Crescimento De Mudanças De Maracujazeiro-Doce Inoculadas Com Fungos Micorrízicos Arbusculares e Bactérias Diazotróficas sob Diferentes Doses de Fósforo Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 34, n. 2, p. 442-450, Junho 2012.

WEIS, J.S.; WEIS, P. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. Environment International, Oxford, v.30, n.5, p.685-700, 2004.

ZHANG, H; ZAI, X; WU, X; QIN, P; ZHANG, W. An ecological technology of coastal saline soil amelioration. Ecological Engineering, v. 67, 80–88, 2014.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE J. A; AUGUSTO, F; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados, Eclética Química, São Paulo, v.35, n.3, Sept. 2010.

DAS, N; CHANDRAN, P. - Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: In Overview- Review Article SAGE-Hindawi Access to Research Biotechnology Research International v.1, 13 p., 2011.