

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

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs) E *DARK SEPTATE ENDOPHYTES* (DSE): IDENTIFICAÇÃO EM VEGETAIS DO MANGUEZAL DE GARGAÚ, SÃO FRANCISCO DE ITABAPOANA, RJ (BRASIL)

THAÍS DOS SANTOS ALENCAR

**CABO FRIO/RJ
2016**

THAÍS DOS SANTOS ALENCAR

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs) E *DARK SEPTATE ENDOPHYTES* (DSE): IDENTIFICAÇÃO EM VEGETAIS DO MANGUEZAL DE GARGAÚ, SÃO FRANCISCO DE ITABAPOANA, RJ (BRASIL)

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

Orientador: Prof^o. D.Sc. Victor Barbosa Saraiva
Co-orientador: Prof^o. M.Sc. Ricardo Pacheco Terra

**CABO FRIO/RJ
2016**

Biblioteca Anton Dakitsch
CIP - Catalogação na Publicação

A368f Alencar, Thais dos Santos
Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e Dark Septate Endophytes (DSE): identificação em vegetais do manguezal de Gargaú, São Francisco de Itabapoana, RJ (Brasil) / Thais dos Santos Alencar - 2016.
73 f.: il.

Orientador: Victor Barbosa Saraiva
Coorientador: Ricardo Pacheco Terra

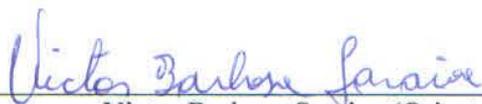
Dissertação (mestrado) -- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, campus Campos Centro, Curso de Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental, Campos dos Goytacazes, RJ, 2016.
Referências: f. 65 a 73.

1. Metais pesados. 2. Hidrocarbonetos de petróleo. 3. manguezais . 4. Biorremediação. I. Saraiva, Victor Barbosa , orient. II. Terra, Ricardo Pacheco , co-orient. III. Título.

Dissertação intitulada “Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e *Dark Septate Endophytes* (DSE): identificação em vegetais do manguezal de Gargaú, São Francisco de Itabapoana - RJ (Brasil)” elaborada por Thaís dos Santos Alencar e apresentada publicamente perante a Banca Examinadora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental na área de concentração Meio Ambiente e Materiais, linha de pesquisa Desenvolvimento e Sustentabilidade do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.

Aprovada em 26/10/2016.

BANCA EXAMINADORA:



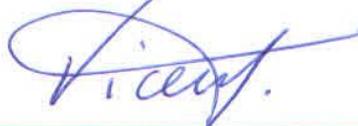
Victor Barbosa Saraiva (Orientador)

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



Ricardo Pacheco Terra (Co-orientador)

Mestre em Ciência Animal/ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense



Vicente de Paulo Santos de Oliveira

Doutor em Engenharia Agrícola/Universidade Federal de Viçosa
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense



Marina Satika Suzuki

Doutora em Biociências e Biotecnologia/Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram importantes no caminhar deste mestrado. Algumas foram responsáveis por ter tornado a caminhada um pouco mais fácil e talvez tenham sido indispensáveis para que eu pudesse ter chegado ao término deste trabalho e de mais este passo em minha vida. A estas pessoas quero dizer meu muito obrigado.

Primeiramente agradeço a Deus. Obrigada Senhor por sempre estar comigo em todos os momentos da minha vida e pela certeza de que estive comigo neste mestrado em cada passo que dei. Pelo teu carinho, amor e pela força, principalmente nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, pela companhia e ajuda de sempre. Pelas tantas vezes que me buscou no ponto de ônibus à noite, fez meu café nas madrugadas e manhãs de viagem e tantas outras coisas que nem caberiam aqui se fossem escritas. Muito obrigada por todo seu esforço e doação totalmente gratuitos e de coração.

Ao meu pai, que sempre torceu e torce por mim e pelo meu crescimento.

À minha avó Gessy que sempre me coloca em suas orações e deseja o meu melhor.

Aos meus irmãos Lucas, Carol e Arthur.

Ao Robinho, Silvana e Nicolay, que me acolheram em Macaé como se eu fosse um membro da família e foi assim que me sentia toda vez que ficava na casa de vocês. Não tenho nem como agradecer a receptividade. Vocês foram muito importantes e diminuíram com certeza, pelo bom acolhimento, conversas e amizade, o peso da jornada. Muito obrigada!

À minha amiga Claudiane e seu esposo João, que também com generosidade e amizade me receberam tão bem em seu lar. Amiga, obrigada pela sua amizade. Adorei os tempos que passei com você. Conte sempre comigo.

Ao meu orientador, Victor Saraiva, por acreditar que o nosso trabalho daria certo, mesmo com a distância. Agradeço por ter apostado e confiado em mim. Acredito que seu otimismo me levou também a confiar e acreditar que tudo daria certo. Creio que mesmo em meio às dificuldades da distância conseguimos alcançar bem o nosso objetivo.

Ao meu co-orientador, Ricardo Terra, pela ajuda e disposição de sempre nas saídas de campo a Gargaú.

Ao professor Vicente agradeço grandemente a preocupação e disponibilidade de sempre para ajudar neste trabalho. Sei que sempre torceu por mim e meus amigos mestrando.

Agradeço à Upea, na pessoa do professor Vicente que sempre disponibilizou o necessário para as saídas de campo, aos servidores, ao Sérgio, Arthur e Carol do Labfoz pela ajuda nas

vezes que utilizei o laboratório, ao seu Dadau pela ajuda com o barco, aos motoristas, em especial Marquinhos e ao Charles por toda ajuda no campo e boa convivência. Obrigada a todos.

Aos professores do mestrado pelo ensinamento e conhecimento transmitido e à minha turma. Adorei tê-los como colegas de caminhada! Em especial agradeço a Marla pela amizade que surgiu. Pelos momentos compartilhados nas ansiedades de trabalhos e provas, nas estradas e na alegria em cada etapa concluída. Sua amizade foi muito importante pra mim Marla e com certeza levarei para vida!

Ao professor Ocimar, por toda ajuda dada neste trabalho e conhecimento transmitido. Muito obrigada, Ocimar!

Aos colegas conhecidos no Lemam: Janaína e Marianne (agradeço o acolhimento em suas casas quando precisei), Aline, Murillo, Nayara, Clarissa, Eduardo, Pablo (agradeço pelo envio das fotos), Vitor, Flávia. Em especial ao Alan, por toda ajuda no ensinamento das técnicas e nas análises, por ter disponibilizado seu tempo para estar no laboratório comigo. Sua presença me ajudou com certeza para que eu seguisse adiante mais feliz. Não tenho nem como agradecer por tudo. Muito obrigada!

À minha amiga Ana Escocard, que mesmo longe esteve sempre disposta a ajudar no que eu precisasse.

Ao seu Herval de Gargaú, que com toda disposição nos ajudou com o barco quando necessitamos, pelas histórias contadas e conhecido transmitido.

Ao seu Amaro, taxista.

Ao IFF pela formação e ensino de qualidade e todo suporte necessário ao desenvolvimento do estudo e pesquisa.

Ao IFF Cabo Frio pela concessão da bolsa de mestrado.

“A cada dia basta o seu cuidado.”

(Mateus 6, 34)

RESUMO

Embora o manguezal seja um ecossistema com grande produtividade e importância, está vulnerável a diversos impactos como o aporte de contaminantes. Metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo estão entre os que mais ameaçam o funcionamento e equilíbrio de manguezais. Características de seu sedimento e sua localização costeira contribuem para retenção e deposição destes poluentes. Este trabalho apresenta uma revisão sobre manguezais, sua importância e contaminação por metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo (artigo científico I). O segundo artigo que compõe esta dissertação buscou investigar a ocorrência de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e *Dark Septate Endophytes* (DSE) em associação com vegetais do manguezal de Gargaú, São Francisco de Itabapoana, RJ. A literatura científica tem relatado a importância destes fungos na sobrevivência de plantas em locais com metais e hidrocarbonetos e também na biorremediação de locais contaminados por estes e na estabilização de metais. Pesquisas que busquem alternativas ecológicas de remediação de manguezais precisam avançar devido à importância do ecossistema e por estar sujeito à contaminação. Neste trabalho foi verificada a ocorrência destes fungos e frequência de colonização em raízes de plântulas coletadas no manguezal de Gargaú. Esporos de FMA foram separados e quantificados de amostras de sedimento coletadas. Observou-se que as raízes estavam colonizadas por FMA e DSE. A taxa de colonização por FMA foi de 18% em BF (Buraco Fundo) e de 72% em BR (Braço Rio). Em BF a taxa de colonização por DSE foi de 29% e em BR de 47%. Uma média de 6 esporos por 50 mL de solo foram encontrados em BF e de 5 em BR. Estes resultados são relevantes uma vez que poucos estudos têm sido conduzidos sobre a presença de FMA e DSE em manguezais em todo mundo. No Brasil não há relatos da ocorrência destes fungos em manguezais. Dada a importância dos mesmos em ambientes contaminados por metais e hidrocarbonetos, considera-se que os FMAs e DSE são alternativas promissoras de biorremediação em manguezais impactados, sugerindo-se que pesquisas avancem na verificação de seu potencial biorremediador e na tolerância de vegetais deste ecossistema.

Palavras-chave: Metais pesados; hidrocarbonetos de petróleo; manguezais; FMA; DSE; biorremediação.

ABSTRACT

Although the mangrove is an ecosystem with high productivity and importance, it is vulnerable to various impacts as contaminant input. Heavy metals and petroleum hydrocarbons are among those that threaten the functioning and balance of mangroves. Characteristics of its sediment and its coastal location contribute to retention and deposition of pollutants. This paper presents an overview of mangroves, their importance and contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons (scientific article I). The second article that makes up this thesis sought to investigate the occurrence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and Dark Septate Endophytes (DSE) in association with plants mangrove of Gargaú, São Francisco de Itabapoana, RJ. The scientific literature has reported the importance of these fungi on the survival of plants in places with metals and hydrocarbons, and also in the bioremediation of contaminated sites for these and metals stabilization. Research seeking ecological alternatives mangroves remediation need to advance because of the importance of the ecosystem and be subject to contamination. This study evaluated the occurrence of these fungi and frequency of colonization in seedling roots collected in mangrove of Gargaú. Spores of AMF were separated and quantified of collected sediment samples. The roots were observed to be colonized by AMF and DSE. The AMF colonization rate was 18% in BF (Buraco Fundo) and 72% in BR (Braço do Rio). In BF the rate of colonization by DSE was 29% and in BR of 47%. An average of 6 spores per 50 mL of soil were found in BF and 5 in BR. These results are relevant since few studies have been conducted on the presence of AMF and DSE in mangroves worldwide. In Brazil there are no reports of occurrence of these fungi in mangroves. Given the importance of these environments contaminated by metals and hydrocarbons, it is considered that the AMF and DSE are promising bioremediation alternatives in impacted mangroves, suggesting that research advance in checking your potential biorremediador and in the plant tolerance of this ecosystem.

Keywords: Heavy metals; petroleum hydrocarbons; mangroves; AMF; DSE; bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1

Imagem do manguezal do estuário do Rio Paraíba do Sul com marcação (em amarelo) dos locais de coleta. Fonte: Programa Google Earth.....46

FIGURA 2

Locais de coleta das amostras. (A) Buraco Fundo e (B) Braço do Rio. Fonte: Programa Google Earth.....47

FIGURA 3

Manguezal do Buraco Fundo. Fotos da autora.....47

FIGURA 4

Floresta de mangue à beira do braço do Rio Paraíba do Sul. Fotos da autora.....48

FIGURA 5

Plântulas de *Avicennia* sp. (A) e *Laguncularia* sp. (B) coletadas no Buraco Fundo e Braço do Rio, respectivamente. Fotos da autora.....49

FIGURA 6

Observação de estruturas de FMA e DSE em raízes de *Avicennia* coletadas no Buraco Fundo. (A) ARB: Arbúsculo. (B) MIC: Microescleródio e (C) HDSE: Hifas de DSE. Aumento de 1000x. Fotos da autora.....51

FIGURA 7

A – F: Estruturas de FMA e DSE em raízes de *Avicennia* sp. coletadas no Buraco Fundo. G – O: Estruturas fúngicas em raízes de *Laguncularia* sp. coletadas no Braço do Rio. HFMA: Hifa de FMA (A, B, G e H). HDSE: Hifa de DSE (B, C, D, K, L e M). MIC: Microescleródio (E, F, N e O). ESP: Esporo (G e K). HOF: Hifa de outro fungo (G, J e K). VES: Vesícula (I). Aumento de 1000x.....52

FIGURA 8

Dados de colonização por FMA e DSE em raízes de *Avicennia* sp. e *Laguncularia* sp. coletadas no Buraco Fundo (A) e Braço do Rio (B), respectivamente. Onde: F% (frequência de colonização fúngica no sistema radicular), M% (intensidade de colonização fúngica no córtex da raiz), m% (intensidade de colonização fúngica em fragmentos de raízes), a % (abundância de estruturas fúngicas internas em fragmentos de raízes), A% (abundância de estruturas fúngicas internas no sistema de raiz).....57

FIGURA 9

Frequência de colonização de FMA e DSE em raízes de *Avicennia* sp. e *Laguncularia* sp. coletadas no manguezal de Gargaú.....58

FIGURA 10

Alguns dos tipos de glomerosporos extraídos do solo coletado do Buraco Fundo e Braço do Rio. A – H: Glomerosporos encontrados no solo coletado no Buraco Fundo. I – R: Glomerosporos encontrados no solo coletado no Braço do Rio. Imagens D, H, N e Q sob lente com aumento de 1000x. Demais imagens sob lente com aumento de 400x. Detalhe para hifas do tipo DSE em N e Q.....64

LISTA DE QUADRO

QUADRO 1

Quantificação de glomerosporos das amostras de solo coletadas no manguezal de Gargaú. As médias foram obtidas por contagem em triplicata (50 ml) de cada ponto de coleta. O desvio padrão da média também é apresentado.....61

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADRO.....	x
SUMÁRIO.....	xi
1 APRESENTAÇÃO	13
2 ARTIGO CIENTÍFICO I.....	14
CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS E HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO: UMA AMEAÇA PARA OS MANGUEZAIS	
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
2.1 INTRODUÇÃO.....	16
2.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.2.1 O ecossistema manguezal.....	17
2.2.2 Importância do manguezal.....	19
2.2.3 Principais contaminantes que afetam os manguezais.....	20
2.2.3.1 Metais.....	20
2.2.3.2 Hidrocarbonetos de petróleo.....	25
2.3 CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
3 ARTIGO CIENTÍFICO II.....	35
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs) E <i>DARK SEPTATE ENDOPHYTES</i> (DSE): IDENTIFICAÇÃO EM VEGETAIS DO MANGUEZAL DE GARGAÚ, SÃO FRANCISCO DE ITABAPOANA, RJ (BRASIL)	
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
3.1 INTRODUÇÃO.....	37
3.2 REVISÃO DE LITRATURA.....	38
3.2.1 Biorremediação.....	38

3.2.1.1 Fitorremediação e rizorremediação.....	39
3.2.2 Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs).....	40
3.2.3 <i>Dark Septate Endophytes</i> (DSE).....	43
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.3.1 Local de coleta das amostras.....	46
3.3.2 Metodologia de amostragem do solo e plantas para estudo.....	48
3.3.3 Avaliação das Raízes de <i>Avicennia</i> sp. e <i>Laguncularia</i> sp.....	49
3.3.4 Extração, contagem e identificação de esporos.....	50
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.4.1 Resultados preliminares.....	50
3.4.2 Identificação de estruturas fúngicas em raízes de <i>Avicennia</i> sp. e <i>Laguncularia</i> sp.....	52
3.4.3 Colonização de raízes de <i>Avicennia</i> sp. e <i>Laguncularia</i> sp. por FMA e DSE	57
3.4.4 Quantificação e tipos de glomerosporos encontrados.....	61
3.5 CONCLUSÃO.....	65
3.6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 APRESENTAÇÃO

Os manguezais são ecossistemas costeiros, típicos de regiões onde há encontro de água doce e salgada. É um dos ecossistemas mais produtivos do planeta, no entanto, é também um dos mais afetados pela ação humana (ALVES, 2001).¹ Os manguezais estão vulneráveis a diversas pressões negativas como a contaminação por poluentes como metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo. Estes podem ser altamente tóxicos para a biota e causar efeitos danosos no metabolismo de plantas e animais, podendo persistir por anos no ambiente (BURNS *et al.*, 1993).

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) colonizam uma ampla variedade de plantas terrestres estabelecendo com elas uma relação simbiótica (GIANINAZZI e GIANINAZZI-PEARSON, 1986; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Estudos apontam o potencial biorremediador destes fungos e indicam que plantas colonizadas por FMA possuem maior capacidade de nutrição e crescimento em locais contaminados por metais e hidrocarbonetos de petróleo do que as não colonizadas (BENTO, 2008; NAKATANI *et al.*, 2008; ANDRADE, 2012).

Os *Dark Septate Endophytes* (DSE) ou fungo endofítico septado escuro estão entre os colonizadores mais abundantes de raízes das plantas (JUMPPONEN e TRAPPE, 1998). Os DSE estão frequentemente associados a ambientes com metais pesados. Segundo estudos, estes fungos têm aumentado a tolerância de vegetais a estes contaminantes, porém, pouco ainda tem sido relatado sobre esta associação (LI *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2015).

Quanto ao manguezal, ainda existem poucos estudos verificando a ocorrência de FMA e DSE neste ecossistema. Dada a importância destes fungos, seja na tolerância de vegetais a contaminantes como metais e hidrocarbonetos ou na biorremediação de ambientes contaminados, é de extrema importância que estudos sejam feitos no sentido de verificar sua ocorrência em manguezais, uma vez que os mesmos são susceptíveis ao aporte destes contaminantes.

Esta dissertação é composta pelo artigo científico I (qualificação), que apresenta uma revisão sobre os manguezais e a contaminação por metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo, e pelo artigo científico II, que teve como objetivo verificar a ocorrência de FMA e DSE no manguezal do estuário secundário do rio Paraíba do Sul, situado na localidade de Gargaú, município de São Francisco de Itabapoana, RJ, Brasil.

¹ As referências contidas nesta apresentação estão na seção “Referências Bibliográficas” dos artigos I e II.

2 ARTIGO CIENTÍFICO I

CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS E HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO: UMA AMEAÇA PARA OS MANGUEZAIS

RESUMO

Os manguezais estão presentes na zona estuarina de costas tropicais e subtropicais e são de grande importância ecológica, pois protegem a costa, imobilizam contaminantes, são fonte de alimento e refúgio para diversos organismos. Além disso, são importantes também sob o ponto de vista econômico e social. A pressão antrópica pode afetar negativamente o ambiente de manguezais. Os metais pesados estão entre os principais contaminantes que causam impactos negativos sobre estes. Dejetos industriais, fertilizantes, dentre outros, são fontes de metais pesados que, uma vez nos rios, correm em direção ao mar e chegando a áreas de manguezal podem se depositar. Os poluentes orgânicos também podem causar efeitos adversos em manguezais. Dentre as potenciais fontes de contaminação do ecossistema por estes estão os derrames de petróleo e derivados. Nas últimas décadas, a poluição por metais e hidrocarbonetos de petróleo em manguezais está recebendo maior atenção. O número de derrames de petróleo próximos ao ecossistema tem aumentado especialmente em locais onde a indústria do petróleo vem crescendo, assim como estudos têm relatado grandes concentrações de metais em seu sedimento. Estes relatos são preocupantes dada a importância que o ecossistema possui. Neste artigo é apresentada uma revisão sobre os manguezais, suas características, importância e sobre os principais contaminantes que ameaçam o ecossistema: metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo.

Palavras-chave: Manguezais; metais pesados; hidrocarbonetos de petróleo.

ABSTRACT

Mangroves are present in the estuarine area of tropical and subtropical coasts and are of great ecological importance, protecting the coast, immobilize contaminants, are a source of food and refuge for many organisms. Moreover, they are also important from an economic and social point of view. The human pressure can negatively affect the environment of mangroves. Heavy metals are among the major contaminants that cause negative impacts on this ecosystem. Industrial discharges, fertilizers, among others, are sources of heavy metals that, once in the rivers, run towards the sea and reaching areas of mangrove can deposit. Organic pollutants can also cause adverse effects on mangroves. Among the potential sources of contamination of the ecosystem by these are the oil spills and derivatives. In recent decades, the pollution by metals and petroleum hydrocarbons in mangroves are getting more attention. The number of oil spills near the ecosystem has increased especially in places where the oil industry has been growing, thus as studies have reported large concentrations of metals in their sediment. These reports are worrisome because the importance of the ecosystem. This article presents a review of mangroves, their characteristics, their importance and the main contaminants that threaten the ecosystem: heavy metals and petroleum hydrocarbons.

Keywords: Mangrove; heavy metals; hydrocarbon petroleum.

2.1 INTRODUÇÃO

O ecossistema manguezal é um dos mais produtivos do planeta e possui relevante importância ecológica. Oferece diversos serviços como a proteção da região costeira da erosão, fixação e imobilização de contaminantes, é fonte de nutrientes para áreas costeiras adjacentes, berçário e local de refúgio, alimentação e reprodução de várias espécies. Além disto, os manguezais são importantes social e economicamente, pois servem como fonte de renda de populações que vivem em seu entorno pela venda de diversos pescados advindos ou providos por este ecossistema (ALVES, 2001).

Por estarem localizados na zona costeira, os manguezais estão entre os ambientes mais vulneráveis à degradação pelas atividades humanas. Construções de moradias, especulação imobiliária e projetos industriais avançam sobre o mesmo, destruindo-o ou afetando sua produtividade apesar de sua importância já mencionada. Os manguezais são ambientes que recebem grande aporte de contaminantes, transportados em grande parte pelos rios. Dentre estes contaminantes podem-se citar os metais pesados, que possuem como principal fonte de liberação neste ambiente despejos de resíduos industriais e de esgotos, mineração, derrames de petróleo e uso de fertilizantes, e os poluentes orgânicos, advindos em sua maior parte de derrames da indústria petrolífera. Estes contaminantes alcançam os manguezais, podendo se depositar nestes, causando diversos efeitos negativos e afetando seu equilíbrio (FELLENBERG, 1980; FORSTNER e WITTMANN, 1983; LACERDA *et al.*, 1993; JACQUES *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2013).

Neste trabalho é apresentada uma revisão sobre o ecossistema manguezal, sua importância e sobre os metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo, principais contaminantes que afetam negativamente os manguezais.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1 O ecossistema manguezal

O manguezal é um ecossistema costeiro, típico de regiões onde há encontro de água doce e salgada como estuários, baías, deltas e lagoas costeiras, estando sujeito a regime de marés (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). Seu ponto de origem ocorreu nas regiões dos

oceanos Índico e Pacífico, distribuindo-se pelo mundo com o auxílio das correntes marinhas durante o processo de separação dos continentes (WALSH, 1974; CHAPMAN, 1975).

A distribuição geográfica dos manguezais se dá nas zonas intertropicais e apresentam maiores dimensões à medida que se aproximam da linha do Equador, devido à grande quantidade de energia solar que incide nesta região (WALSH, 1974). Estima-se que no planeta existem cerca de 162.000 km² de manguezais (USP, 2016). No Brasil, esse ecossistema é encontrado ao longo de praticamente toda a costa, estabelecido numa área de aproximadamente 25.000 km², que vai desde a foz do Rio Oiapoque, no estado do Amapá, até o município de Laguna, em Santa Catarina, representando mais de 12% dos manguezais do planeta (ALVES, 2001; USP, 2016).

O calor e a luminosidade são condições fundamentais para o desenvolvimento de manguezais. O clima é, portanto, um dos fatores limitantes para sua ocorrência. Os manguezais precisam de temperaturas médias acima de 20°C, por isso, não se desenvolvem bem em regiões temperadas, de clima mais frio. Locais abrigados, de baixa energia marinha também são imprescindíveis para a ocorrência deste ecossistema, constituindo outra grande limitação para seu desenvolvimento (WALSH, 1974).

Os manguezais se estabelecem em locais onde há a deposição de sedimentos, geralmente associados a planícies costeiras de baixa declividade. O substrato onde se desenvolvem são geralmente inconsolidados, devido às inundações diárias de maré. São formados por sedimentos de granulometria mais fina como argila e silte, carreados de rios, mas também podem ser formados por areia vinda da área oceânica, trazida por marés, ondas e ventos. O solo dos manguezais possui cores acinzentadas a pretas, devido à decomposição de matéria orgânica e à saturação de água. Estes fatores reduzem os níveis de oxigênio no sedimento dos manguezais e o torna rico em H₂S (sulfeto de hidrogênio), que, ao entrar em contato com o ar atmosférico, sofre redução e transforma-se em H₂SO₄ (ácido sulfúrico), acidificando o pH do sedimento e conferindo a este o odor forte característico dos manguezais (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; ALVES, 2001). O solo predominante em manguezais é halomórfico e de caráter tiomórfico, correspondendo aos Gleissolos e Organossolos. A diferenciação de horizontes ao longo do perfil ocorre apenas em áreas marginais, onde há desenvolvimento de um horizonte superficial com textura variável, desde argilosa até arenosa (AGEITEC- EMBRAPA, 2016).

As marés desempenham papéis de grande importância na formação e desenvolvimento dos manguezais: favorecem o estabelecimento de espécies de plantas halófitas, resistentes à

salinidade, enquanto inibe o desenvolvimento das espécies que não toleram ambientes salinos, transportam sedimentos, matéria orgânica, propágulos, servem como via aos animais, promovem a oxigenação do substrato. Além das marés, o aporte de água doce também tem papel fundamental no equilíbrio do ecossistema, pois além de transportar nutrientes, equilibra o pH ácido e diminui a salinidade excessiva da água do mar permitindo o desenvolvimento adequado das espécies vegetais, uma vez que o excesso de sal também é fator limitante à sobrevivência destas. As inundações de maré ocorrem de uma a duas vezes durante 24 horas e seu intervalo (amplitude) varia de acordo com a latitude, aumentando à medida que estão mais próximas da linha do Equador. Esta variação está diretamente relacionada à altura dos vegetais e à área de manguezal, pois à medida que há maior variação das marés, maiores são os vegetais do manguezal e maior a área que as plântulas halófitas podem se instalar (ALVES, 2001; SOFFIATI, 2014).

A vegetação do manguezal, denominada mangue, desenvolveu mecanismos de adaptação, fisiológicos e anatômicos, que a permitisse sobreviver em um ambiente com alta salinidade, de substrato anóxico e frouxo. O manguezal possui baixa riqueza de espécies, uma vez que poucas são as que desenvolveram tais mecanismos de adaptação e são capazes de tolerar este ambiente. Assim, poucas são as espécies vegetais ditas exclusivas deste ecossistema (TOMLINSON, 1986).

No Brasil, as florestas de mangue são compostas basicamente por três gêneros de plantas lenhosas: *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora* (BARROS, *et al.*, 2000), sendo também encontradas em alguns manguezais plantas do gênero *Conocarpus* (USP, 2016). Além das espécies lenhosas exclusivas do manguezal ocorrem também neste ambiente vegetais associados como espécies do gênero *Hibiscus* e epífitas como bromélias, samambaias, orquídeas, algas e líquens (TOMLINSON, 1986).

Para sobreviver em meio à alta salinidade as espécies exclusivas de manguezal desenvolveram a capacidade de excretar o excesso de sal por minúsculos poros presentes em suas folhas, como ocorre com o gênero *Avicennia*, que suporta altas concentrações de sal. Outro mecanismo de adaptação é a formação de comportas capazes de barrar a entrada de sal em excesso pelo fechamento de lenticelas, que são poros situados acima do solo em raízes denominadas pneumatóforos. Os pneumatóforos se distribuem radialmente abaixo da superfície do solo, emitindo ramificações verticais em direção à superfície e auxiliam a planta na captação de ar atmosférico e troca de gases com o ambiente pelas lenticelas presentes neles. Com a subida e descida da maré, as lenticelas abrem-se e fecham-se. A planta fica

submetida a uma situação de estresse quando há imersão constante dos pneumatóforos, o que a obriga a desenvolver lenticelas acima do nível da água. A formação destas raízes pode ser observada nos gêneros *Avicennia* e *Laguncularia*. Uma forma de se fixar melhor no substrato inconsolidado é o enraizamento em forma de roda, desenvolvido por espécies do gênero *Rhizophora*. Além disso, o desenvolvimento de raízes aéreas (também chamadas de raízes adventícias) e de ramificações denominadas rizóforos, que partem do caule crescendo em direção ao solo (gravitropismo positivo) auxiliam na sustentação da planta. Estas estruturas podem ser observadas em espécies do gênero *Rhizophora*. As plantas exclusivas de manguezal são vivíparas, ou seja, suas sementes germinam enquanto ainda estão ligadas à planta-mãe. Os embriões se desenvolvem e transformam-se em propágulos que são liberados no ambiente, possuindo grandes quantidades de reservas nutritivas que os permitem sobreviver enquanto flutuam na água até encontrarem local adequado a sua fixação ou enquanto enraízam-se no solo. A viviparidade é outro mecanismo de adaptação ao ambiente (TOMLINSON, 1986; SOFFIATI, 2014).

A vegetação característica dos manguezais está distribuída em faixas ao longo de um gradiente ecológico, a chamada zonação. Cada manguezal possui seu padrão de zonação e não cabe um mesmo padrão geral para todos. Assim, exigências da espécie como salinidade, imersão, solo, etc. irão determinar quais se estabelecerão em determinado local. (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

A fauna deste ecossistema é bastante diversificada devido à grande variedade de nichos ecológicos, consequência da peculiaridade de sua vegetação (PEREIRA e ALVES, 1999). Neste ambiente podem ser encontrados vermes, moluscos, crustáceos, insetos, peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos. O manguezal pode ser frequentado em caráter permanente, semi-permanente e em caráter ocasional. O caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) é um exemplo de espécie que se encontra exclusivamente neste ecossistema. Há espécies que utilizam o ambiente durante uma parte de sua vida, para se proteger de predadores, na época de reprodução e/ou para obtenção de alimento (NOVELLI, 2004).

2.2.2 Importância do manguezal

O ecossistema manguezal é gerador de diversos bens e serviços e apresenta relevante importância tanto do ponto de vista ecológico, como econômico e social. Funciona como uma barreira natural à ação erosiva das ondas e marés, protegendo a linha costeira; retém

sedimentos transportados pelos rios o que permite a ocupação e propagação da vegetação; fixa e imobiliza contaminantes, como metais pesados; constitui importante fonte de detritos para as áreas costeiras adjacentes pela produção de serrapilheira e ciclagem de nutrientes, sendo um ambiente altamente nutritivo; funciona como ponto de repouso, alimentação e abrigo para aves migratórias; suas águas calmas, rasas e ricas em nutrientes possibilitam a reprodução e desenvolvimento de várias espécies, muitas de interesse econômico como peixes e crustáceos, funcionando como verdadeiros berçários naturais. O consumo e venda destes pescados é muitas vezes a principal forma de subsistência de populações que vivem próximas aos manguezais (ALVES, 2001).

Apesar de sua grande importância, os manguezais estão entre os ecossistemas mais ameaçados do planeta. Por desenvolverem-se em regiões litorâneas, locais com intenso crescimento populacional e industrial, os manguezais vêm sofrendo constantes pressões que cada vez mais desequilibram seu funcionamento e causam sua destruição. A sobre-exploração de seus recursos e o crescente desenvolvimento da região costeira têm ocasionado grandes perdas da área de manguezais em todo mundo. De acordo com Rosen (2000) aproximadamente 50% de cobertura de manguezais já foram destruídas no planeta.

Os manguezais estão sujeitos a diversos contaminantes. Efluentes industriais, esgotos, derrames de petróleo, atividades de mineração e fertilizantes são fontes potenciais para entrada de metais pesados e de substâncias orgânicas como hidrocarbonetos de petróleo neste ecossistema. Estes poluentes podem ser altamente tóxicos aos organismos biológicos, desequilibrando o funcionamento do ecossistema (DSIKOWITZKY *et al.*, 2011; KABATA-PENDIAS, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2013).

2.2.3 Principais contaminantes que afetam os manguezais

2.2.3.1 Metais Pesados

O termo metal pesado tem sido usado para definir um grupo heterogêneo de elementos, incluindo metais, semi-metais e não metais que possuem número atômico maior que 20 ou peso específico maior que 5 g cm^{-3} (MALAVOLTA, 1994). Outra denominação encontrada na literatura para metais pesados é “elementos traço”, pois são encontrados na natureza em baixas concentrações, da ordem de partes por bilhão (ppb) a partes por milhão (ppm) (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994; ESTEVES, 1998).

Os metais pesados ocorrem naturalmente no ambiente por intemperismo e desagregação das rochas, erosão do solo, fontes termais e atividades vulcânicas (FORSTNER e WITTMANN, 1983). No entanto atividades antrópicas como o despejo de resíduos industriais e de esgotos, mineração, derrames de petróleo e uso de fertilizantes são importantes fontes de liberação destes elementos no ambiente (FELLENBERG, 1980; MOREIRA *et al.*, 2013). Os metais pesados são considerados poluentes graves, pois, ao contrário do observado para os contaminantes orgânicos, não são degradados por processos naturais, podendo persistir por anos no ambiente (GUIMARÃES, 2006).

Mesmo em baixas concentrações estes elementos possuem alta toxicidade e uma vez presente no solo, no ar ou na água, podem adentrar a cadeia alimentar e se bioacumular. Dependendo do metal este pode biomagnificar ao longo da cadeia, causando sérios problemas aos animais, plantas e até ao homem (PINHEIRO *et al.*, 2012).

Por se tratarem de áreas abrigadas, de baixa energia marinha, com altas taxas de sedimentação e alto teor de matéria orgânica, os manguezais são ambientes favoráveis à acumulação por metais pesados. Estes contaminantes podem vir associados ao material particulado em suspensão de origem fluvial ou dissolvidos em suas águas, depositando-se nos manguezais. Devido a estas características, este ecossistema pode apresentar altos níveis de metais pesados, mesmo que não haja fontes pontuais dos mesmos, atuando como sumidouro. Os manguezais funcionam como uma barreira geoquímica, retendo os poluentes (LACERDA *et al.*, 1993; LACERDA e SALOMONS, 1998).

Por ser altamente redutor, constituído de partículas finas e rico em matéria orgânica, o sedimento de manguezal age como quelante de metais, o que favorece sua acumulação e conseqüentemente o torna menos disponível para biota local. Os metais tendem a ser adsorvidos nas partículas do sedimento e formar complexos com a matéria orgânica. Esta é um dos principais complexantes orgânicos naturais e podem definir a biodisponibilidade dos metais para o ambiente. A precipitação dos metais pesados é favorecida pelo elevado pH e pela reação com óxidos e hidróxidos de ferro (Fe) e manganês (Mn). A degradação microbiana da matéria orgânica no sedimento de manguezal cria um ambiente anóxico que é ideal para a redução bacteriana de sulfato a sulfeto e de Fe^{3+} a Fe^{2+} , levando à formação de pirita (FeS_2). A pirita pode atuar como importante imobilizante de metais pesados principalmente através da co-precipitação e adsorção à sua superfície. Os efeitos deletérios da toxicidade dos metais podem ser reduzidos grandemente pela complexação destes com ligantes inorgânicos ou orgânicos (ODUM, 1972; FERREIRA, 2002).

No entanto, diversas variáveis físico-químicas e biológicas irão determinar a permanência dos metais nos diversos compartimentos ambientais e sua remobilização. Eventuais mudanças de pH, potencial redox, salinidade, oxigênio dissolvido e temperatura podem influenciar nos níveis de toxicidade e biodisponibilidade dos metais (LACERDA, 1998). A remobilização destes elementos também pode ocorrer quando a capacidade de retenção do sedimento está saturada. A retirada da vegetação de mangue promove o revolvimento do sedimento e é outro fator que pode remobilizar estes contaminantes, tornando-os disponíveis. Os metais pesados que antes estavam estocados no sedimento se transformam em uma fonte de poluição secundária ao serem carregados para áreas adjacentes pela ação das marés e/ou incorporados a vegetais, entrando na cadeia alimentar e ficando disponíveis para os organismos (TAM e WONG, 1993; LACERDA, 1998).

Os sedimentos são os principais acumuladores de metais nos manguezais, apresentando concentrações destes muito mais elevadas quando comparadas às presentes na coluna d'água por exemplo. Desta forma, os sedimentos constituem-se importantes indicadores da qualidade do ambiente. No entanto, apenas simples determinações da concentração de metais no sedimento não oferecem informações precisas sobre a biodisponibilidade e o potencial tóxico que estes podem causar no ambiente. Os metais se tornam mais tóxicos quando estão biodisponíveis do que na forma complexada por ligantes orgânicos ou adsorvida no material particulado. A fração dos metais nos sedimentos considerada biodisponível é aquela que se encontra na fase dissolvida, ou seja, na água intersticial. Os metais de origem natural são acumulados nas frações mais profundas, fortemente ligados aos minerais dos sedimentos e dificilmente serão remobilizados em condições naturais. Já os advindos de ação antrópica se acumulam principalmente nas primeiras frações (RUBIO *et al.*, 1991; KENNISH, 1992).

Altos níveis de metais no meio podem resultar em elevadas concentrações na biota. Uma vez biodisponíveis, os metais podem ser incorporados aos vegetais do manguezal e como não são biodegradáveis, se acumulam em seus tecidos, podendo causar efeitos nocivos. Ao serem absorvidos pela planta, estes contaminantes podem ser transportados da raiz para a arte aérea e reagir com moléculas da membrana celular, afetando importantes processos fisiológicos. Estes contaminantes também são incorporados à fauna do manguezal, podendo causar distúrbios nos seus processos metabólicos (RAHMAN *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2012).

Vários estudos têm verificado a ocorrência de metais pesados em sedimentos de manguezais em todo mundo (MCCONCHIE *et al.*, 1988; CHAN, 1992; TAM *et al.*, 1995; BORGES *et al.*, 2007; FORTUNATO *et al.*, 2012), assim como em tecidos de mangue (TAM *et al.*, 1995; ONG CHE, 1999; SAIFULLAH *et al.*, 2002; EINOLLAHIPEER *et al.*, 2013) e acumulados na fauna (MTANGA e MACHIWA, 2007; BANCI, 2008, PINHEIRO *et al.*, 2012).

Organismos animais que vivem em manguezais com elevados níveis de concentração de metais pesados estão sujeitos a acumularem estes contaminantes. Mais estudos são necessários na caracterização dos efeitos tóxicos dos metais para a fauna nestes ambientes. A maioria destes é realizada em macroinvertebrados bentônicos. Estes organismos possuem baixa mobilidade e acumulam maiores concentrações de metais quando comparado com organismos que vivem, por exemplo, na água (CHAPMAN *et al.*, 1998). O caranguejo uçá (*Ucides cordatus*) é um macroinvertebrado que tem sido muito estudado para verificação da acumulação e toxicidade de metais, além de ser bom indicador de impactos ambientais em manguezais, devido características da espécie como, por exemplo, longo ciclo de vida, baixa taxa de crescimento, fácil captura e ser exclusiva de manguezais (SILVA, 2011; FRAGOSO, 2013). Pinheiro e colaboradores (2012) quantificaram a acumulação de seis metais: cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercúrio (Hg), manganês (Mn) e chumbo (Pb) em órgãos de *Ucides cordatus* de áreas do manguezal de Cubatão, SP. Exceto Hg e Pb, todos os outros metais foram encontrados nos órgãos deste macroinvertebrado, sendo que o Cr se mostrou acima dos níveis seguros para consumo humano. Ferreira e colaboradores (2010) encontraram altos níveis de metais no fígado e rins de *Nycticorax nycticorax* (Garça-da-noite), um organismo de topo de cadeia, mostrando assim que os metais podem ser bioacumulados e biomagnificados via teia alimentar. Embora os organismos possuam eficientes processos de desintoxicação de metais, em concentrações muito altas estes contaminantes podem causar graves efeitos tóxicos como o rompimento da integridade da membrana celular, acarretando falência de órgãos e morte (MACFARLANE e BURCHETT, 2001).

Quando estão biodisponíveis, os metais podem ser absorvidos pelos vegetais do manguezal e se acumular em diversos tecidos. A concentração do metal nos diferentes tecidos depende de fatores como idade da planta e o tipo de tecido em que irá acumular (SILVA *et al.*, 1990; SARANGI *et al.*, 2002). Silva e colaboradores (1990) observaram diferenças na absorção de Cr, Cu e Zinco (Zn) em tecidos de *Rizophora mangle*. Concentrações de metais tendem a ser maiores na raiz do que na parte aérea dos vegetais de mangue, uma vez que na

parte área como folhas, podem ser mais tóxicas para o vegetal, interferindo em importantes processos fisiológicos. Podem levar a depleção de moléculas como a clorofila, afetando a fotossíntese e gerar estresse oxidativo, causando sérios danos ao vegetal (SILVA *et al.*, 1990; RAHMAN *et al.*, 2009).

Os vegetais de manguezal possuem diversos mecanismos de defesa e desintoxicação na resposta à exposição por metais. A imobilização em vacúolos em células das raízes é um deles. Além disto, a alta concentração de metais pode induzir as células a produzir proteínas chamadas metalotioneínas que se ligam a estes metais intracelularmente, causando redução dos efeitos nocivos sobre as células. A atividade de peroxidases no combate ao estresse oxidativo também têm sido relatadas (MACFARLANE e BURCHETT, 2001; ZHANG *et al.*, 2007). Segundo Lacerda e colaboradores (1986), certos mecanismos de adaptação de mangues à salinidade também estão relacionados à absorção de metais. Espécies do gênero *Rizophora* são sal-excludentes, separam a água doce por um sistema de filtros na superfície da raiz. Este mecanismo parece ser eficiente no sentido de evitar a absorção de alguns metais. As espécies de mangue respondem de forma diferenciada aos metais, sendo que a concentração de um mesmo metal pode variar em diferentes espécies bem como entre indivíduos de uma mesma espécie (UNTAWALE *et al.*, 1980).

A baixa toxicidade de certos metais pesados para espécies vegetais do manguezal principalmente pelo fato de não estarem, na maioria das vezes, disponíveis para serem absorvidos, mostra que o aporte destes contaminantes nestas áreas pode não ser fator tão grande de estresse para as espécies de mangue. Além disto, os mecanismos de defesa e desintoxicação mencionados anteriormente parecem ser os responsáveis pela certa tolerância que as espécies vegetais do manguezal têm a elevadas concentrações de metais pesados (LEWIS, *et al.*, 2011).

Segundo Lewis e colaboradores (2011), poucos esforços têm sido feitos para se determinar a significância e os efeitos de metais pesados sobre os manguezais. Embora o número de estudos tenha crescido nos últimos anos, um número maior é necessário a fim de se conhecer os efeitos causados pelo contaminante tanto de forma isolada quanto em combinação com diversos fatores, sejam variáveis abióticas ou bióticas. São escassos os estudos que demonstrem os potenciais efeitos tóxicos de contaminantes sob condições realistas. Muitas vezes a abordagem experimental é inconsistente e limita a avaliação destes efeitos a escalas geográficas locais e a poucas espécies e estressores. Deve ser dada prioridade na realização de estudos com espécie vegetais de manguezais na fase inicial de vida,

determinando-se as concentrações limite de metais que causarão efeitos tóxicos nestes em combinações com diversos fatores ambientais e na presença de vários contaminantes.

2.2.3.2 Hidrocarbonetos de petróleo

O petróleo é derivado de matéria orgânica, depositada em fundo de lagos e mares que ao longo de milhões de anos sofreu inúmeras transformações químicas. É constituído por uma mistura de diferentes compostos orgânicos, destacando-se os hidrocarbonetos, compostos de hidrogênio e carbono, que constituem até 98% da composição total de petróleo (FONSECA, 1992).

Os hidrocarbonetos aromáticos são aqueles que possuem anel benzênico na sua estrutura. Estes podem ser monoaromáticos: possuem um anel aromático, também conhecidos como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos - isômeros: *orto*-, *meta*- e *para*-xileno) e poliaromáticos (HPAs): possuem dois ou mais anéis aromáticos. Os HPAs são altamente hidrofóbicos e são menos solúveis à medida que possuem mais anéis aromáticos, sendo, geralmente encontrados adsorvidos a partículas do solo (BONILLA *et al.*, 2009). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) considera 16 HPAs como Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), podendo ser carcinogênicos e mutagênicos devido sua capacidade de reagir com o DNA. Os BTEX por sua vez, são compostos de grande preocupação ambiental devido sua alta toxicidade e ampla mobilidade no ambiente, uma vez que apresentam alta solubilidade em água (COSTA *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2010). São considerados compostos carcinogênicos e mutagênicos pela Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (*International Agency for Research on Cancer* - IARC), órgão da Organização Mundial da Saúde, sendo o benzeno o mais tóxico entre os BTEX (JOHNSON *et al.*, 2003).

Acidentes envolvendo derrames de petróleo e derivados afetam mares e zonas costeiras causando enormes danos ambientais. Os acidentes na indústria do petróleo ocorrem principalmente pelas atividades destinadas à sua exploração como extração, transporte, refino, transformação e utilização (JACQUES *et al.*, 2007). Embora os grandes vazamentos causem preocupações e recebam maiores destaques quando comparados com pequenos vazamentos, pequenos derramamentos de petróleo podem causar enormes prejuízos ambientais devido ao grau de toxicidade dos compostos derramados.

Por serem ecossistemas costeiros, os manguezais são ambientes propícios de serem impactados por hidrocarbonetos de petróleo, provenientes de derrames, sendo um dos principais locais de destino dos compostos oleosos. Especialmente em países onde a indústria petrolífera vem crescendo, áreas de manguezal têm sido afetadas o que causa sérios efeitos negativos ambientais e econômicos a estas regiões. Diversos trabalhos têm relatado a contaminação de manguezais por petróleo e seus derivados provenientes de acidentes da indústria petrolífera (CLARK e WARD, 1994; BOTELHO, 2003; GIRI *et al.*, 2011; BIOMASS RESEARCH, 2014; NOAA, 2014). No Brasil, pode-se mencionar trabalhos sobre a contaminação de manguezais da Baía de Guanabara, RJ, devido ao acidente ocorrido no ano 2000 (BOTELHO, 2003; SOARES *et al.*, 2003; BAYARDINO, 2004; FARIAS, 2006) e de manguezais da Baía de Todos os Santos, Bahia, afetados por derrames de petróleo (VEIGA, 2003; QUEIROZ e CELINO, 2008; MOREIRA *et al.*, 2011).

Características dos manguezais já mencionadas anteriormente fazem com que, assim como os metais, os poluentes orgânicos se acumulem em seu sedimento. Estes poluentes afetam a fauna e flora do manguezal, podendo causar diversos efeitos negativos ao ecossistema, afetando seu equilíbrio e produtividade.

Uma vez no manguezal o poluente orgânico tende a se depositar; as lenticelas dos pneumatóforos sofrem com isto sufocamento, o que impossibilita a respiração das raízes e a troca gasosa com o meio. Em consequência, pode ocorrer morte de indivíduos e abertura de clareiras, como ocorrido em manguezais da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil, após o acidente que causou derramamento de 1,3 milhão de toneladas de petróleo (SOARES, *et al.*, 2003). A diminuição de árvores torna o manguezal vulnerável a perturbações como a erosão, por exemplo (DUKE *et al.*, 2000). A redução da produção de folhas e assim de detritos diminui a exportação de matéria orgânica para áreas adjacentes, afetando a produtividade destas áreas. A população de decompositores, importantes para a ciclagem de nutrientes do meio, também pode ser afetada (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1988). O depósito de petróleo e derivados no manguezal pode não levar à morte das árvores diretamente, no entanto, pode torná-las enfraquecidas e mais suscetíveis a outros tipos de estresses (SNEDAKER, *et al.*, 1997; DUKE *et al.*, 2000). Diminuição na produção de sementes e queda de folhas estão entre as consequências observadas em manguezais impactados por compostos oleosos. Clark e Ward (1994) observaram que plantas de mangue afetadas por um acidente de petróleo no sul da Austrália diminuiram drasticamente a produção de sementes após 17 meses do derramamento. Em um manguezal atingido por derramamento de petróleo

em Porto Rico, foi observada, após 85 dias, perda de 90% da biomassa foliar (CINTRÓN *et al.*, 1981).

A fauna que reside ou utiliza o manguezal é grandemente afetada por poluentes orgânicos que podem causar, dentre outros danos, a morte direta de indivíduos por sufocamento ou por absorção de frações tóxicas solúveis. Os hidrocarbonetos podem causar distúrbios na reprodução e respiração provocando efeitos adversos no metabolismo e fisiologia dos animais presentes no manguezal, além de possuírem capacidade carcinogênica e mutagênica. A mobilidade de moluscos, crustáceos, peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos fica comprometida, assim como é reduzida a tolerância a predadores, infecções e outros estresses (BLUMER, 1971; SUCHANEK, 1993; JOHNSON *et al.*, 2003; IARC, 2015). Pesquisadores australianos observaram que diversas espécies de peixes importantes economicamente que cresciam em áreas manguezal no sul da Austrália impactadas por derramamento de petróleo ocorrido no ano de 1992 apresentaram menor taxa de crescimento quando comparadas a peixes que cresciam em áreas não contaminadas pelo derramamento. Estes resultados indicam que os compostos oleosos retardam o crescimento de várias espécies de interesse comercial (CONNOLLY e JONES, 1996). Os efeitos negativos causados pelos compostos orgânicos em manguezais levam ao comprometimento da produtividade costeira local e de áreas adjacentes, uma vez que o manguezal é considerado berçário natural e local de reprodução e desenvolvimento de espécies de interesse econômico como peixes e crustáceos.

Fatores como quantidade, composição, grau de toxicidade do poluente orgânico que chega ao manguezal irão interferir no tempo que o manguezal pode levar pra se recuperar da perturbação (PROFFITT *et al.*, 1995). A degradação de poluentes orgânicos em manguezais tende a ser mais lenta que outros locais, isto por causa da característica anóxida de seu sedimento, podendo se estender por 20 anos ou mais o tempo de recuperação (BURNS *et al.*, 1993). De acordo com Brito e colaboradores (2009), os danos causados pelos poluentes orgânicos aos manguezais, em algumas situações, podem ser permanentes.

Segundo Jacobi e Schaeffer-Novelli (1990), estudos sobre o tempo de residência de diferentes classes de hidrocarbonetos e sua biodisponibilidade em florestas de manguezais do Brasil são necessários para relacionar as concentrações tóxicas dos poluentes com os efeitos sobre a biota como também o tempo de recuperação. É necessário maior conhecimento sobre o comportamento destes poluentes orgânicos, principalmente em manguezais do Brasil. Assim como para os metais pesados, faltam dados sobre os efeitos combinados dos compostos

orgânicos com diversos fatores ambientais sobre a biota bem como os efeitos causados por diferentes concentrações.

2.3 CONCLUSÃO

Esta revisão apresenta as características dos manguezais, sua importância e também vulnerabilidade quanto ao recebimento de contaminantes, como metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo. Como relatado, os efeitos negativos destes para biota de manguezais podem ser enormes. O funcionamento do ecossistema fica comprometido, podendo ser permanentes, a depender do grau de contaminação, os danos causados ao manguezal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITEC - EMBRAPA. Agência Embrapa de informação Tecnológica. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_mata_sul_pernambucana/arvore/CONT000gt7eon7j02wx7ha087apz2c3xd0do.html. Acesso em 01 de Set de 2016.

ALVES, J. R. P. **Manguezais: educar para proteger**. Rio de Janeiro: FEMAR: SEMADS, 2001.

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.

BANCI, K. R. S. **A influência de metais pesados na diversidade genética de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae) em manguezais do Litoral Paulista**. Monografia de Conclusão de Curso, Universidade Estadual Paulista (UNESP) – *Campus Experimental do Litoral Paulista*, São Vicente, SP, 55p. 2008.

BARROS, H. M. *et al.* **Gerenciamento participativo de estuários e manguezais**. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2000.

BAYARDINO, R. A. **A petrobras e o desafio da sustentabilidade ambiental**. Monografia de conclusão de curso. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Instituto de Economia, 2004.

BLUMER, M. **Scientific aspects of the oil spill problem**. Environ. Aff., 1:54-73, 1971.

BONILLA, N. B.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G.; GONZÁLEZ, R. R. **Comparison of ultrasonic and pressurized liquid extraction for the analysis of polycyclic aromatic compounds in soil samples by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry**. Talanta, v. 78, p. 156-164, 2009.

BORGES, A. C., DIAS, J. C., MACHADO, W.; PATCHINEELAM, S. R. **Distribuição espacial de ferro, cobre e chumbo em sedimentos de manguezal em um gradiente de degradação na baía de Guanabara (Estado do Rio de Janeiro)**. Química Nova, vol. 30, n. 1, 66-69, 2007.

BOTELHO, A. L. M.. **Análise da contaminação por óleo na apa de guapimirim – RJ Aspectos Geoquímicos e Sócioambientais. Dissertação de mestrado**, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, 2003.

BRITO, E. M., DURAN, R., GUYONEAUD, R., GONI-URRIZA, M., GARCIA DE OTEYZA, T., CRAPEZ, M. A., *et. al.* **A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio de Janeiro, Brazil)**. Marine Pollution Bulletin, 58, 418–423, 2009.

BURNS, K.A., S.D. GARRITY, A; S.C. LEVINGS. **How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil spills?** Marine Pollution Bulletin 26(5):239-248, 1993.

CHAN, H. M. **Heavy metal concentrations in coastal sea water and sediments from Tolo Harbour, Hong Kong**. In: Morton, B. (Ed.), The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China. Hong Kong University Press, Hong Kong, pp. 621e-628, 1992.

CHAPMAN, P. M.; WANG, F., JANSSEN, C., PERSOONE, G., ALLEN, H.E., **Ecotoxicology of metal in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment and remediation**. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 55, 2221–2243, 1998.

CHAPMAN, V. J.; WALSH. G.; SNEDAKER, S. C.; TEAS, H. **Mangrove biogeography. In: International Symposium of the biology and managemant of mangroves**. Proccedings Gainesville: University of Florida. v.1, 1975.

CLARKE, P. J.; WARD, T. J. **The response of southern hemisphere saltmarsh plants and gastropods to experimental contamination by petroleum hydrocarbons**. Journal of Experimental Biology and Ecology, The Hague, v. 175, n. 1, p. 43-57, 1994.

CONNOLLY, R.M.; JONES. G. K. **Determining effects of an oil spill on fish communities in a mangrove - seagrass ecosystem in southern Australia**. Australasian Journal of Ecotoxicology 2:3 -15, 1996.

COSTA, A. H. R.; NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. **Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato**. Eng. Sanit. Ambient. v. 14 n 2, p. 265 – 274, 2009.

DSIKOWITZKY, L.; NORDHAUS, I.; JENNERJAHN, T. C.; KHRYCHEVA, P.; SIVATHARSHAN, Y.; YUWONO, E.; SCHWARZBAUER, J. **Anthropogenic organic contaminants in water, sediments and benthic organisms of the mangrove -fringed Segara Anakan Lagoon, Java, Indonesia**. Marine Pollution Bulletin. 62 851–862, 2011.

DUKE, N. C.; BURNS, K. A.; SWANNELL, R. P. J.; DALHAUS, O.; RUPP, R. J. **Dispersant Use and a Bioremediation Strategy as Alternate Means of Reducing Impacts of Large Oil Spills on Mangroves: The Gladstone Field Trials.** Marine Pollution Bulletin Vol. 41, Nos. 7±12, pp. 403±412, 2000.

EINOLLAHIPEER, F.; KHAMMAR, S.; SABAGHZADEH, A. **A Study on Heavy Metal Concentration in Sediment and Mangrove (*Avicenia marina*) Tissues in Qeshm Island, Persian Gulf.** Journal of Novel Applied Sciences. 2 (10): 498-504, 2013.

ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de Limnologia.** Rio de Janeiro, Interciência/Finep. 602p. 1998.

FARIAS, C. O. **Avaliação da degradação de óleo em sedimentos de manguezal: Estudo de caso, Baía de Guanabara, RJ.** Tese de doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2006.

FELLENBERG, G. **Introdução aos Problemas da Poluição Ambiental.** Ed. Pedagógica e Universitária Ltda. São Paulo, 1980.

FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. P.; CUNHA, C. de L. N. da. **Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax* (Garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil.** Revista da Gestão Costeira Integrada, v.10, n.2, p. 229-241, 2010.

FERREIRA, T. O. **Solos de mangue do Rio Grumahú (Guaruja – SP): pedologia e contaminação por esgoto doméstico.** Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. 2002.

FONSECA, M. R. M. **Química: química orgânica.** São Paulo: FTD, 1992.

FORSTNER, U.E.; WITTMANN, G.T.W. **Metal Pollution in the Aquatic Environment.** 2º ed. Springer-Verlag, 485 p. 1983.

FORTUNATO, J. M.; HYPOLITO, R.; MOURA, C. L.; NASCIMENTO, S. C. **Caracterização da contaminação por metais pesados em área de manguezal, município de Santos (SP).** Revista do Instituto Geológico, São Paulo, 33 (1), 57-69, 2012.

FRAGOSO, C.P. **Mercúrio em compartimentos bióticos e abióticos do manguezal da foz do rio Paraíba do Sul (RJ), utilizando a composição elementar e isotópica do carbono e do nitrogênio.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

GIRI, C.; OCHIENG, E.; TIESZEN, L.L.; ZHU, Z., SINGH, A.; LOVELAND, T.; MASEK, J., DUKE, N. **Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data.** Global Ecology and Biogeography 20, 154-159, 2011.

GUIMARÃES, F. P. **Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa.** Tese apresentada ao programa de Pós- Graduação em botânica como exigência para obtenção do título de Magister Scientiae pela UFV. 87, p. 2006.

IARC – International Agency for Research on Cancer – Disponível em: <http://www.iarc.fr/index.php>. Acesso em julho de 2015.

JACOBI, C. M.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Oil spills in mangroves a conceptual model based on long-term field observations**. *Ecological Modelling*, 52, 53-59, 1990.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. *Ciência Rural*. 37 (4):1192-1201, 2007.

JOHNSON, S.J.; WOOLHOUSE, K.J.; PROMMERA H.; BARRYA, D.A.; HRISTOFI, N. **Contribution of Anaerobic Microbial Activity to Natural Attenuation of Benzene in Groundwater**. *Engineering Geology*. Edinburgh, v. 2186, p. 1-7, 2003.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. Fourth ed. CRC Press/Taylor and Francis Group, New York, 2011.

KENNISH, M. J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. CRC Press. 494 p. 1992.

LACERDA, L.D. **Biogeochemistry of Trace Metals and Diffuse Pollution in Mangrove Ecosystems**. International Society for Mangrove Ecosystems, Okinawa, 1998.

LACERDA, L.D.; REZENDE, C.E.; JOSÉ, D.M.V.; FRANCISCO, M.C.F. **Metallic compositions of mangrove leaves from the Southeastern Brazilian coast**. *Revista Brasileira de Biologia* 46, 395e399, 1986.

LACERDA, L. D.; SALOMONS, W. **Mercury contamination from gold and silver mining: A chemical time bomb**. Springer Verlag, Berlin, 146 p. 1998.

LANGEVELD, J.W.A., DELANY, S. **The impact of oil exploration, extraction and transport on mangrove vegetation and carbon stocks in Nigeria**. *Biomass Research report* 1401, 2014.

LEWIS. M.; PRYOR; R.; WILKING, L. **Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: A review**. *Environmental Pollution*. 159:2328-2346, 2011.

MACFARLANE, G.R.; BURCHETT, M.D. **Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.** *Marine Pollution Bulletin* 42, 233 - 240. 2001.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificação e fatos**. São Paulo, Produquímica. 153p. 1994.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M.E. **Comportamento de cobre, Cd, cromo, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH**. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 197p. 1994.

MCCONCHIE, D.M., MANN, A.W., LINTER, M.J., LONGMAN, D., TALBOT, V., GABELISH, M.J. **Heavy metals in marine biota, sediments, and waters from the Shark Bay area, Western Australia.** Journal of Coastal Research 4, 51-72, 37, 1988.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2ª ed. Lavras: Editora UFLA, 720p. 2006.

MOREIRA, I. T. A; OLIVEIRA, O. M. C; TRIGUIS, J. A; SANTOS, A. M. P; QUEIROZ, A. F. S; MARTINS, C. M. S; SILVA, C. S; JESUS, R. S. **Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's).** Microchemical Journal 99 376–382, 2011.

MTANGA, A.; MACHIWA, J.F. **Assessment of heavy metal pollution in sediment and polychaete worms from the Mzinga Creek and Ras Sege mangrove ecosystems, Dares Salaam, Tanzania, Western Indian Ocean.** Journal of Marine Science 6, 125-135, 2007.

NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). **Oil spills in mangroves: planning and response considerations.** National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, Office of Response and Restoration. 2014.

NOVELLI, Y.S; JÚNIOR, C.C.; ROSA, M.T. **Manguezais.** São Paulo: Ática, 2004.

ODUM, E.P. **Ecologia.** 3.ed. México, Nueva Editorial Interamericana, 639p. 1972.

ONG CHE, R.G. **Concentration of seven heavy metals in sediments and mangrove root samples from Mai Po, Hong Kong.** Marine Pollution Bulletin 39, 269 e 279, 1999.

PEREIRA, F. O.; ALVES, J.R.P. **Conhecendo o manguezal.** Apostila técnica, Grupo Mundo da Lama, RJ. 4a ed. 10p. 1999.

PINHEIRO, M. A. A.; SILVA, P.P. G.; DUARTE L. F. de A.; ALMEIDA, A. A.; ZANOTTO, F. P. **Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae).** Ecotoxicology and Environmental. Safety 81:114-121, 2012.

PROFFITT, E.E., DEVLIN, D.J.; LINDSEY, M. **Effects of oil on mangrove seedlings grown under different environmental conditions.** Marine Pollution Bulletin 30 (12):788-793, 1995.

QUEIROZ, A.F.S.; CELINO, J. J. **Impacto ambiental da indústria petrolífera em manguezais da região norte da baía de todos os santos (Bahia, Brasil).** Boletim Paranaense de Geociências, n. 62-63, p. 23-34, Editora UFPR, 2008.

RAHMAN, M. M.; CHONGLING, Y.; RAHMAN, M. M; ISLAM, K. S. **Accumulation, distribution and toxicological effects induced by chromium on the development of mangrove plant *kandelia candel* (L.) Druce.** Ambi-Agua, Taubaté. v. 4, n. 1, p. 6-19, 2009.

ROSEN, M.A. **World Resources 2000 e 2001: People and Ecosystems, the Fraying Web of Life**. World Resources Institute, Washington DC, USA, 2000.

RUBIO, R.; LOPEZ- SANCHEZ, I. F; RAURET, G. **La espeiciacion silida de trazas de meyales en sedimentos. Aplicacion a sedmentos muy contaminados**. Ani. de Quim., 87,599 – 605, 1991.

SAIFULLAH, S.M., KHAN, S.H., ISMAIL, S. **Distribution of nickel in a polluted mangrove habitat of the Indus Delta**. Marine Pollution Bulletin 6, 570- 576, 2002.

SARANGI, R.K., KATHIRESAN, K., SUBRAMANIAN, A.N. **Metal concentrations in five mangrove species of the Bhitarkanika, Orissa, east coast of India**. Indian Journal of Marine Science 31, 25-253, 2002.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar**. São Paulo, Caribbean Ecological Research, 64p. 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y., RODRIGUES, F. O.; CONTRN-MOLERO, G., **Mangroves: a methodology for oil pollution impact assessment**. Abstr. JOA Mexico 88 (288.57), p. 99, 1988.

SILVA, C.A.R., LACERDA, L.D., REZENDE, C.E. **Metals reservoir in a red mangrove forest**. Biotropica 22, 339E345,1990.

SILVA, P. P. G. **Contaminação por metais (Cd, Cu, Pb, Cr, Mn e Hg) e avaliação do impacto genotóxico em *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae), em dois manguezais do estado de São Paulo**. Trabalho de conclusão (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista. xiv, 62 p. São Vicente, 2011.

SNEDAKER, S. C.; BIBER, P. D.; ARAÚJO, R. J. **Oil spills and mangroves: an overview**. In: Proffitt, C.E. (ed.), **Managing Oil Spills in Mangrove Ecosystems: Effects, Remediation, Restoration, and Modeling**. OCS Study MMS 97-0003. New Orleans: U.S. Department of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region. pp. 1-18. 1997.

SOARES, M. L. G.; CHAVES, F. O.; CORRÊA, F. M.; SILVA, C. M. G.; JR.. **Diversidade estrutural de bosques de mangue e sua relação com distúrbios de origem antrópica: O caso da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro)**. Anuário do Instituto de Geociências – UFRJ, 26, 101–116. 25, 2003.

SOFFIATI, A. **Os manguezais do sul do Espírito Santo e do norte do Rio de Janeiro com alguns apontamentos sobre o norte do sul e o sul do norte**. 2ª ed.rev., ampl. atual. Campos dos Goytacazes (RJ): Essentia Editora, 2014.

SUCHANEK, T. H. **Oil impacts on marine invertebrate populations and communities**. American Zoologist, v. 33, p. 510-523, 1993.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. **Retention of nutrients and heavy metals in mangrove sediments receiving waste water of different strengths**. *Ellviron. Tech.*, 14, 719 – 729, 1993.

TOMLINSON, P. B. **The botany of mangroves**. Cambridge University Press, New York, 1986.

UNTAWALE, A.G.; WAFAR, S.; BHOSALE, N. B. **Seasonal variation in heavy metal concentration in mangrove foliage**. *Mahasagar Bulletin of National Institute Oceanography* 13, 215-223,1980.

USEPA - Environmental Protection Agency. **How to effectively recover free product at leaking underground storage tanks sites – a guide for state regulators**. Washington, 1996.

USP. Universidade de São Paulo. Disponível em: http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=70&. Acesso em 01 de Set de 2016.

VEIGA, I. G. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da baía de todos os santos / Bahia. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo, Macaé, 2003.**

WALSH, G. E. **Mangroves: a review**. In: REIMHOLD, R.; QUEEN, W. (edits). *Ecology of Halophytes*. New York: Academic Press, 1974.

ZHANG, G.C., LEUNG, K.K., WONG, Y.S., TAM, N.F.Y. **Germination, growth and physiological responses of mangrove plant (*Bruguiera gymnorhizza*) to lubricating oil pollution**. *Environmental Experimental Biology* 60, 127-136, 2007.

3 ARTIGO CIENTÍFICO II

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs) E *DARK SEPTATE ENDOPHYTES* (DSE): IDENTIFICAÇÃO EM VEGETAIS DO MANGUEZAL DE GARGAÚ, SÃO FRANCISCO DE ITABAPOANA, RJ (BRASIL)

RESUMO

Os manguezais são ecossistemas costeiros sujeitos ao aporte de contaminantes. Metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo são uma ameaça para manguezais e uma vez neste ambiente podem alterar seu funcionamento e produtividade. A biorremediação é uma técnica que utiliza organismos vivos como plantas e microrganismos (fungos e bactérias) para remover ou reduzir poluentes no ambiente. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e *Dark Septate Endophytes* (DSE) são fungos que estão associados de forma simbiótica a diversas espécies de vegetais. Estudos têm revelado a importância destes fungos para espécies de plantas crescidas em ambientes contaminados e sua importância na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos ou na estabilização de metais em solos poluídos pelos mesmos. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência destes fungos associados com plantas do manguezal de Gargaú, situado no estuário secundário do rio Paraíba do Sul. Plântulas de *Avicennia* sp. e *Laguncularia* sp. e sedimento foram coletados em dois pontos do manguezal: Buraco Fundo (BF) e Braço do Rio (BR) e levados para o laboratório para realização das análises. As raízes foram clarificadas e coradas segundo técnica de Souza e Guerra (1998) - adaptada e UFLA (2015). As porcentagens de colonização por FMA e DSE foram realizadas pelo método de Trouvelot e colaboradores (1986). A extração de esporos foi realizada pelo método de decantação e peneiramento úmido de acordo com Gerdemann e Nicolson (1963). Os esporos foram separados e contados, seguido de montagem de lâminas com resina PVLG e PVLG + MELZER para observação em microscópio. Foi verificado que as raízes estavam colonizadas por FMA e DSE. Observou-se maior taxa de colonização por FMA (72%) e DSE (47%) em BR. Em BF as taxas de colonização por FMA e DSE foram 18% e 29%, respectivamente. Uma média de 6 esporos por 50 mL de solo foram encontrados em BF e de 5 em BR. Constatou-se que as plantas coletadas no manguezal de Gargaú estavam colonizadas por FMA e DSE. Acredita-se que estes fungos sejam uma alternativa viável para serem utilizados em programas de biorremediação futuros em manguezais contaminados.

Palavras-chave: Manguezais; metais pesados, hidrocarbonetos de petróleo; biorremediação; FMA; DSE.

ABSTRACT

Mangroves are coastal ecosystems subject to contaminant intake. Heavy metals and petroleum hydrocarbons are a threat to mangroves and once in this environment may alter its operation and productivity. Bioremediation is a technique that uses living organisms such as plants and microorganisms (fungi and bacteria) to remove or reduce pollutants in the environment. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and Dark Septate Endophytes (DSE) are fungi that are associated symbiotically with various plant species. Studies have revealed the importance of these fungi to plant species grown in contaminated environments and its importance in the bioremediation of soils contaminated with hydrocarbons or stabilizing metals in soils polluted by them. The aim of this study was to verify the occurrence of these fungi associated with mangrove plants Gargaú, situated in the estuary secondary of Paraíba do Sul river. Seedlings *Avicennia* sp. and *Laguncularia* sp. and sediment were collected at two points of the mangrove: Buraco Fundo (BF) and Braço do Rio (BR) and taken to the laboratory for analysis. The roots were clarified and stained according to the technique of Souza and Guerra (1998) - adapted and UFLA (2015). The percentages of colonization by AMF and DSE were performed by the method of Trouvelot and collaborators (1986). The spore extraction was carried out by the decantation and wet sieving method according to Gerdemann and Nicolson (1963). The spores were separated and counted, followed by coverslipping with PVLG and PVLG + MELZER resin for observation under a microscope. It was found that the roots were colonized by AMF and DSE. There was a higher rate of colonization by AMF (72%) and DSE (47%) in BR. In BF the Colonization rates by AMF and DSE were 18% and 29%, respectively. An average of 6 spores per mL was found in soil in BF and 5 in BR. It was observed that the plants collected in mangrove Gargaú were colonized by AMF and DSE. It is believed that these fungi are a viable alternative for future use in bioremediation of contaminated mangrove programs.

Keywords: Mangroves; heavy metals, petroleum hydrocarbons; bioremediation; AMF; DSE.

3.1 INTRODUÇÃO

A poluição dos solos por contaminantes inorgânicos e orgânicos é um problema mundial e vem aumentando gradativamente devido à expansão das atividades industriais. A crescente conscientização dos efeitos nocivos da poluição para o ambiente e para saúde humana levou a um aumento acentuado na investigação de diversas estratégias que poderão ser utilizadas para a descontaminação de ambientes poluídos.

Os manguezais são ecossistemas susceptíveis à interferência de poluentes inorgânicos como os metais pesados e orgânicos como os hidrocarbonetos de petróleo. A biorremediação torna-se uma técnica promissora na descontaminação deste tipo de ambiente (GAYLARDE *et al.*, 2005). A Introdução seletiva de microrganismos específicos com grande capacidade biodegradante na rizosfera de uma planta pode acelerar a recuperação de solos contaminados com produtos químicos inorgânicos e orgânicos (SILVA, *et al.*, 2006; GONÇALVES, 2012).

Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e do tipo *Dark Sepate Endophytes* (DSE) colonizam raízes de diversas espécies vegetais (GIANINAZZI e GIANINAZZI-PEARSON, 1986; JUMPPONEN e TRAPPE, 1998; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Estudos têm relatado seus papéis na tolerância de plantas a contaminantes como metais e hidrocarbonetos de petróleo e na biorremediação de ambientes contaminados (SILVA, *et al.*, 2006; BENTO, 2008; ANDRADE, 2012; LI *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2015). A respeito de sua importância, estes fungos podem ter relevante papel em áreas de manguezal impactadas por atividades antrópicas.

Ainda são escassos trabalhos sobre a presença de FMA e DSE em manguezais e pouco se conhece sobre a ecologia destes fungos neste ecossistema, tornando-se imprescindíveis estudos que avancem no sentido de verificar sua ocorrência e os papéis da interação destes fungos com o ecossistema manguezal.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo verificar a existência de FMA e DSE associados aos vegetais do manguezal de Gargaú, São Francisco de Itabapoana, RJ, sendo objetivos específicos: verificar a ocorrência de estruturas de FMA e DSE em raízes das plantas coletadas, verificar a taxa de colonização fúngica das raízes e extrair e quantificar esporos de FMA das amostras de sedimento coletadas.

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

3.2.1 Biorremediação

A biorremediação é uma técnica que utiliza organismos vivos como microrganismos e plantas para remover ou reduzir poluentes no ambiente. Dentre as tecnologias utilizadas para o tratamento de ambientes contaminados, a biorremediação tem se destacado por ser uma alternativa eficaz, de menor custo e ecologicamente mais adequada no tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação como os hidrocarbonetos de petróleo, por exemplo, e metais tóxicos (GAYLARDE *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2010).

Microrganismos como bactérias e fungos são considerados eficazes na descontaminação de ambientes, sendo comumente utilizados em processos de biorremediação devido sua abundância, reciclagem de grande parte das moléculas da biosfera e sua capacidade de biodegradar e biotransformar diversos contaminantes, tornando-os produtos com nenhuma ou pouca toxicidade (KATAOKA, 2001; GAYLARDE *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2010).

Vários fatores ambientais podem interferir em um processo de biorremediação, e assim, acelerar ou reduzir a taxa de degradação das moléculas poluentes pelos microrganismos. Dentre os principais fatores estão: temperatura, luz, matriz onde a substância é encontrada, presença de oxigênio, potencial redox do meio, nutrientes, estrutura e composição química do poluente (JACQUES *et al.*, 2007).

Pode-se utilizar, no processo de biorremediação de locais contaminados, microrganismos autóctones (do próprio local) ou alóctones (de outro local). O tratamento pode ser *in situ*, ou seja, no próprio local da contaminação ou *ex-situ*, realizado em lugar diferente de onde houve a contaminação, sendo preciso escavar e remover o solo contaminado para outro lugar, o que aumenta o custo do tratamento, tornando-o menos atrativo que o tratamento no local (ANDRADE *et al.*, 2010). *Landfarming*, compostagem, biorreatores e biopilhas estão entre as técnicas empregadas para biorremediação *ex situ*, sendo esta última uma das mais utilizadas. As principais técnicas empregadas na biorremediação *in situ* são a bioestimulação (atenuação natural acelerada) e a bioaugmentação. O processo de bioestimulação consiste na otimização das condições ambientais e em adicionar nutrientes (orgânicos e inorgânicos) no local a ser tratado, favorecendo assim o crescimento da população de microrganismos do meio e aumento da taxa de degradação do poluente. Na

técnica de bioaumentação são introduzidos no local contaminado microrganismos alóctones (não originários do ambiente onde ocorre a contaminação) com o objetivo de aumentar a microbiota local e assim a taxa de degradação do contaminante (BENTO *et al.*, 2003; SILVA, 2009; ANDRADE *et al.*, 2010).

3.2.1.1 Fitorremediação e Rizorremediação

A fitorremediação é um tipo de biorremediação que utiliza espécies vegetais com o objetivo de remover, transformar ou imobilizar contaminantes como metais pesados, compostos orgânicos e radioativos presentes no solo e na água (ACCIOLY e SIQUEIRA, 2000; SUSARLA *et al.*, 2002; DINARDI, 2003; GRATÃO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2013). A fitorremediação mostra-se vantajosa quando comparada com técnicas tradicionais, como bombeamento e tratamento, ou remoção física da camada contaminada, principalmente pela eficiência (PIRES *et al.*, 2005) e baixo custo (SUSARLA *et al.*, 2002).

Os manguezais são ambientes vulneráveis a compostos tóxicos. Alguns estudos demonstram que certas espécies de mangue são grandes acumuladoras de metais, sendo importantes na fitoestabilização de contaminantes em manguezais impactados. Almahasheer e colaboradores (2014) verificaram a acumulação de metais em *Avicennia marina* de manguezais de uma baía no leste da Arábia Saudita e encontraram maiores concentrações em raízes que no sedimento, concluindo que esta espécie faz a depuração de sedimentos contaminados por metais, alocando os mesmos em seus tecidos. Pakzadtoochaei (2013), estudando a mesma espécie em manguezais da costa Iraniana, verificou que esta acumula metais como cádmio (Cd), cobre (Cu), níquel (Ni) e zinco (Zn) em vários tecidos sem apresentar nenhuma injúria ou lesão. Espécies de mangue também são potenciais fitorremediadoras de locais contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Moreira e colaboradores (2011) observaram que mudas de *Rizophora mangle* apresentaram, após 90 dias, maior eficiência na remoção de hidrocarbonetos de um sedimento de manguezal contaminado (87%) quando comparado com a biorremediação intrínseca (técnica que se baseia na ação dos fatores naturais para remediação do ambiente), mostrando que a fitorremediação por *Rizophora mangle* é uma alternativa promissora de descontaminação em ambientes de manguezal.

Os microrganismos simbioses que vivem na rizosfera (interface raiz-solo) de vegetais fitorremediadores possuem importante papel no aumento do potencial remediador de solos

contaminados por metais tóxicos ou compostos orgânicos. Denomina-se rizorremediação a biorremediação realizada pela associação microrganismos-plantas (JONER e LEYVAL, 2003; KUIPER *et al.*, 2004; BENTO, 2008).

A associação da microbiota do solo com as raízes das plantas têm se demonstrado um mecanismo útil na biorremediação *in situ* de solos contaminados. O processo de biorremediação se torna mais eficiente em um solo coberto por vegetação uma vez que o sistema radicular dos vegetais favorece uma rizosfera composta por uma maior densidade de microrganismos. As raízes das plantas liberam exsudatos como açúcares e aminoácidos que estimulam o crescimento de fungos e bactérias ao redor da raiz, além de provocarem maior aeração do meio promovendo transformações aeróbias próximas à raiz (BENTO, 2008).

Em locais contaminados por compostos orgânicos como petróleo e seus derivados e por metais tóxicos, a rizorremediação mostra-se uma técnica importante na remediação. Microrganismos presentes na rizosfera participam da degradação dos compostos orgânicos, uma vez que estes não podem ser absorvidos pelas plantas, e utilizam o carbono dos contaminantes como fonte de energia (BENTO, 2008). Em ambientes contaminados por metais, os fungos micorrízicos, por exemplo, associados a raízes de plantas podem favorecer a retenção de metais nas raízes evitando a translocação para parte aérea, o que evita distúrbios maiores causados pelo contaminante ao vegetal (CHRISTIE *et al.*, 2004). A técnica que consiste na utilização de fungos micorrízicos para a remediação de solos contaminados é chamada micorizorremediação (KHAN, 2006).

Dentre os fungos associados a raízes de vegetais e que possuem importante papel em ambientes contaminados estão os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e os fungos do tipo *Dark Septate Endophytes* (DSE).

3.2.2 Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs)

Micorrizas são associações entre alguns tipos de fungos de solo e raízes de plantas (SCHÜBLER *et al.*, 2001) e distinguem-se em dois grandes grupos: as ectomicorrizas e as endomicorrizas. As ectomicorrizas são predominantes em florestas de clima temperado, podendo ser encontradas também em algumas árvores de clima tropical. A penetração do fungo se dá intercelularmente no córtex da raiz, não ocorrendo penetração celular (SMITH e READ, 2008). As hifas crescem nos espaços entre as células do córtex envolvendo-as e formam uma estrutura conhecida como rede de Harting. Os fungos ectomicorrízicos

modificam a morfologia das raízes sendo possível detectá-los visualmente. Nas endomicorrizas, as hifas fúngicas penetram inter e intracelularmente as células do córtex da raiz formando estruturas em seu interior e não se verifica modificação anatômica aparente na morfologia da raiz (BERBARA, *et al.*, 2006). O tipo mais comum de endomicorrizas são as micorrizas arbusculares (MA).

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) são pertencentes ao filo monofilético Glomeromycota e colonizam uma ampla variedade de plantas terrestres (cerca de 70 a 90 % das plantas estabelecem uma relação simbiótica com estes fungos) (GIANINAZZI e GIANINAZZI-PEARSON, 1986; SCHÜBLER, 2001; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Pode-se dizer também que esta relação é mutualística, visto que ambos os organismos se beneficiam da associação (BERBARA *et al.*, 2006). Os FMAs favorecem o crescimento da planta hospedeira, uma vez que aumentam sua área de captação de água e nutrientes, principalmente fósforo, ao passo que as plantas fornecem fotoassimilados necessários ao desenvolvimento e reprodução destes fungos (BERBARA *et al.*, 2006; SMITH e READ, 2008).

Os FMAs se reproduzem assexuadamente, não existindo evidências, segundo Berbara e colaboradores (2006), que se reproduzam de forma sexuada. São constituídos por uma rede de hifas, geralmente asseptadas, com vários núcleos no mesmo citoplasma. O conjunto de hifas, o micélio, tem a capacidade de se diferenciar em diferentes outras células. Os FMAs são simbiotróficos obrigatórios e só completam seu ciclo de vida na presença da raiz hospedeira (BERBARA *et al.*, 2006).

A colonização das raízes pelos FMAs se dá por hifas que se originam de propágulos encontrados no solo na forma de esporos, micélio e fragmentos de raízes colonizadas. Os exsudados liberados pela planta susceptível à micorrização na rizosfera e fatores físico-químicos podem estimular o desenvolvimento das hifas e a colonização das raízes (BERBARA *et al.*, 2006; PARNISKE, 2008).

Uma vez em contato com a raiz, há a formação de um apressório nas células da epiderme, o que permite a entrada e desenvolvimento das hifas nos espaços entre células. Ao chegar ao córtex radicular as hifas se ramificam dentro e entre as células formando estruturas chamadas arbúsculos. Estas estruturas ramificadas formam invaginações na plasmalema, o que aumenta a superfície de contato com a célula vegetal e torna os arbúsculos principal local de troca de metabólitos entre o FMA e a planta (HARRISON, 1999; BERBARA *et al.*, 2006). Por um lado o vegetal fornece fotoassimilados ao fungo e este, os elementos minerais extraídos do solo. A hifa intrarradicular se torna extremamente fina após penetrar a parede

celular da célula vegetal, o que permite eficiente troca de nutrientes entre os organismos devido ao aumento da superfície entre as membranas celulares dos simbioses. Já as hifas extrarradiculares, por serem finas e longas, são mais eficientes na captura de nutrientes que as raízes, podendo explorar volumes do solo inatingíveis por estruturas radiculares (BERBARA *et al.*, 2006). No espaço inter e intracelular do córtex da raiz também podem ser formadas estruturas ovais ou esféricas chamadas vesículas. Estas estruturas podem ser formadas por certos gêneros de FMA e possuem a função de armazenar lipídeos e grânulos de glicogênio, funcionando como órgão de reserva para o fungo (BERBARA *et al.*, 2006; OEHL, 2011). Alguns FMAs possuem as chamadas células auxiliares cuja função também é servir de reserva para o fungo. Estas células são ricas em lipídeos e são formadas fora das raízes (MORTON e BENTIVENGA, 1994).

Os esporos de FMAs são estruturas que reúnem todas as informações genômicas do fungo, podem permanecer anos no solo, suportar situações ambientais adversas e ao encontrarem uma situação favorável, podem germinar e dar início a uma nova simbiose (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Os esporos do filo Glomeromycota são chamados de glomerosporos (GOTO e MAIA, 2006). A identificação taxonômica dos FMAs têm se baseado principalmente nas características morfológicas de seus esporos como cor, tamanho, forma e características da parede como tipo e quantidade (WALKER, 1983; MORTON e BENNY, 1990; WALKER e VESTBERG, 1998). Este tipo de identificação pode ser dificultada uma vez que diferenças nas características dos esporos nem sempre são evidentes (GOTO *et al.*, 2009). Diversos fatores podem influenciar na identificação como maturidade dos esporos, esporos parasitados e com paredes degradadas e poucos esporos encontrados no local de coleta. A taxonomia dos FMAs baseada em análise molecular tem avançado e se torna uma ferramenta importante na superação de dificuldades de identificação baseadas nos caracteres morfológicos. O avanço nas análises moleculares em taxonomia dos FMAs permite que se chegue a novas descobertas e classificações destes fungos (SCHÜBLER *et al.*, 2001, SCHÜBLER e WALKER, 2010; GOTO 2012; OEHL *et al.*, 2011, 2014); REDECKER *et al.*, 2013).

A associação entre vegetais e FMA pode auxiliar no estabelecimento, crescimento e sobrevivência das espécies, sobretudo em ambientes estressantes (BRUNDRETT e KENDRICK, 1996; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Os FMAs podem aumentar a tolerância de plantas submetidas a ambientes poluídos por metais e compostos orgânicos, uma vez que as mesmas, quando colonizadas por estes fungos, possuem maior capacidade de nutrição.

Assim, os FMAs podem amenizar o estresse causado pelos contaminantes (SILVA, *et al.*, 2006; BENTO, 2008; ANDRADE, 2012). Alguns estudos têm revelado a capacidade dos FMAs em biodegradar compostos derivados do petróleo, como os hidrocarbonetos (PAULA *et al.*, 2006; NAKATANI *et al.*, 2008; PINTO, 2016).

Pesquisas preliminares têm sido desenvolvidas com o objetivo de verificar a ocorrência de relação simbiótica entre FMAs e plantas de manguezal. Em trabalhos realizados em manguezais da Índia (SENGUPTA e CHAUDHURI, 2002; KUMAR e GHOSE, 2008; SOUZA e RODRIGUES, 2013) e da China (WANG *et al.*, 2010) observou-se a ocorrência de colonização de vegetais por FMA. Entretanto, estes ainda são escassos. Pesquisas neste sentido são importantes uma vez que estes ambientes são propícios a serem impactados por poluentes inorgânicos e orgânicos. A presença de FMA, portanto, pode indicar maior tolerância das espécies vegetais aos contaminantes como também seu potencial biodegradador em manguezais contaminados.

3.2.3 *Dark Septate Endophytes* (DSE)

Os fungos do tipo *Dark Septate Endophytes* (DSE) ou fungos endofíticos septados escuros constituem o grupo mais abundante de fungos endofíticos de raízes de plantas. Os fungos chamados endofíticos ocorrem dentro do tecido de vegetais (WILSON, 1995). O termo “DS hifas” ou hifas escuras septadas foi introduzido por Read e Haselwandter (1981) para designar hifas septadas, escuras, estéreis que formam microescleródios que ocorrem em raízes de diversas plantas alpinas. Posteriormente o termo ganhou novo nome. O termo *Dark Septate Endophytes* (DSE) foi utilizado por Stoyke e Currah (1991) para descrever fungos que formam hifas septadas parcialmente ou totalmente melanizadas dentro de tecidos saudáveis de raiz.

Os DSE são frequentemente encontrados no córtex, epiderme e sobre a superfície de raízes. Colonizam uma ampla variedade de plantas de diferentes regiões do planeta, possuindo baixa ou nenhuma especificidade pelo hospedeiro. Raízes de mais de 600 espécies de plantas foram relatadas serem colonizadas por DSE (JUMPPONEN e TRAPPE 1998). Trabalhos têm relatado a ampla associação de espécies de DSE com raízes de plantas alpinas (AHLICK e SIEBER, 1996; JUMPPONEN e TRAPPE 1998). Verifica-se também sua associação com diversos outros vegetais (JUMPPONEN e TRAPPE 1998; PEREIRA *et al.*, 2011; LIKAR e REGVAR, 2013; SEERANGAN e THANGAVELU, 2014).

A colonização de raízes por DSE segue um padrão similar em diferentes plantas (JUMPPONEN e TRAPPE, 1998). A colonização inicial ocorre normalmente por hifas que crescem entre células epidérmicas e podem colonizar o espaço entre células corticais ao longo do eixo principal da raiz. Eventualmente as hifas penetram nas células corticais externas. Uma vez na camada da epiderme as hifas crescem paralelamente para o eixo principal da raiz e de célula em célula dentro da epiderme. As hifas passam entre as células da epiderme pela penetração de estreitos tubos unidos a sua parede (CURRAH *et al.*, 1993).

A classificação dos DSE é uma questão problemática porque suas estruturas reprodutivas sexuais e assexuais são raras ou ausentes ou produzidas sob condições específicas. A morfologia geralmente é usada para classificações iniciais, no entanto, técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para uma classificação mais confiável de espécies (AHLICH e SIEBER 1996; CARTER *et al.*, 1997). Evidências moleculares demonstram afinidade de muitos DSE com os Ascomicetos (LOBUGLIO *et al.*, 1996; JUMPPONEN e TRAPPE, 1998) sendo classificados como pertencentes a este grupo (JUMPPONEN, 2001; ADDY *et al.*, 2005). A reprodução dos DSE ainda não é bem conhecida. A fragmentação micelial pode ser a principal forma de dispersão destes fungos, sendo também possível a dispersão por conidiósporos. A reprodução sexual também pode ocorrer, embora nenhuma conexão dos estados anamorfos (assexual) e telomorfos (sexual) tenha sido estabelecida (CURRAH *et al.*, 1993).

Estudos têm relatado que os DSE são encontrados, muitas vezes, em co-existência com diferentes tipos de fungos micorrízicos como os FMAs (JUMPPONEN e TRAPPE, 1998; ANDRADE, 2012; SEERANGAN e THANGAVELU, 2014). Segundo Livingston e Blaschke (1984), a colonização de DSE ocorre frequentemente em partes mais velhas da raiz, o que pode ser um indicativo sobre a preferência deste fungo por tecidos mais velhos, como também de que o DSE pode estar reciclando nutrientes de células senescentes para células mais jovens.

Acredita-se que os DSE atuem como promotores do crescimento vegetal, facilitando a aquisição de nutrientes (LINGFEI *et al.*, 2005; RODRIGUEZ, *et al.*, 2009). O trabalho de Jumpponen e colaboradores (1998), por exemplo, demonstrou que o DSE *Phialocephala fortinii* facilitou a absorção de nitrogênio e fósforo em *Pinus contorta*. Alguns DSE possuem a capacidade de produzir enzimas extracelulares como laccases, lipases, amilases e polifenol oxidases, algumas envolvidas em processos como degradação da lignina. Enzimas lignofíticas

e celulíticas geralmente são requeridas quando o fungo penetra as paredes da célula hospedeira (AHLICH, 1997).

Os DSE ocorrem muitas vezes em ambientes estressados e estão frequentemente associados a vegetais expostos a metais pesados. A presença de melanina na parede celular fúngica do DSE tem importante papel na sobrevivência destes fungos a ambientes adversos, conferindo aos mesmos resistência a temperaturas extremamente frias e quentes, bem como tolerância a metais pesados. Estudos revelam que a melanina diminui a toxicidade dos metais (GADD, 1993; LI *et al.*, 2012). Enzimas também são outro importante agente de tolerância a metais. Trabalhos têm mostrado que enzimas antioxidantes como glutatona (GSH), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) têm suas atividades aumentadas em DSE submetidos a altas concentrações de metais. Estas enzimas representam importante mecanismo de defesa celular contra os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio, na exposição a metais (BAN, *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2015; ZHAN *et al.*, 2015).

Estudos indicam que o fungo DSE pode desempenhar um importante papel na proteção de plantas expostas a metais pesados, aumentando sua tolerância a estes (LIKAR e REGVAR, 2013).

Alguns estudos preliminares relatam a presença de DSE em manguezais (SENGUPTA e CHAUDHURI, 1994; WANG e LI, 2003). No entanto, apesar destes trabalhos, praticamente não são encontrados na literatura estudos sobre a presença de DSE em ambientes de manguezal. A microbiota deste ecossistema ainda é pouco conhecida e mais estudos são necessários a fim de se fazer sua caracterização. É provável que estes organismos estejam em associação com raízes de vegetais de manguezais, principalmente naqueles contaminados por metais pesados. Assim, os DSE podem ser importantes aliados de espécies de mangue na proteção e tolerância destas a metais pesados bem como indicadores da presença destes contaminantes em manguezais.

Pouco se conhece a respeito da interação entre DSE e FMA e os vegetais de manguezal. Os estudos são poucos e ainda estão no início. No Brasil não há relatos da ocorrência destes fungos em manguezais. Pesquisas que avancem neste sentido, de modo a se verificar a presença de DSE e FMA neste ecossistema, se tornam extremamente importantes, visto a importância, já relatada neste estudo, destes fungos na biorremediação e na proteção e sobrevivência de espécies vegetais a ambientes estressantes.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Local de coleta das amostras

O presente estudo foi conduzido no manguezal de Gargaú, situado no estuário secundário do Rio Paraíba do Sul, no município de São Francisco do Itabapoana - RJ (21°36'00" S e 41°03'00" W) (Figura 1).



Figura 1: Imagem do manguezal do estuário do Rio Paraíba do Sul com marcação (em amarelo) dos locais de coleta. Fonte: Programa Google Earth.

O manguezal do estuário do Rio Paraíba do Sul possui uma área estimada em 725 hectares (ha) e é o maior do Norte Fluminense (BERNINI *et al.*, 2010). Sua floresta é constituída pelo mangue siriba ou preto (*Avicennia germinans*), mangue branco (*Laguncularia racemosa*) e mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) (BERNINI e RESENDE, 2004).

Segundo Santos (2008) Gargaú está estimada em torno de 3 mil habitantes e o manguezal situado nesta localidade desempenha importante papel, pois, a cata de caranguejos e o pescado, que estão diretamente ligados ao manguezal, são as principais atividades econômicas da população de Gargaú (ROCHA, 2013). No entanto, este manguezal vem sofrendo constantes ameaças, De acordo com Soffiati (2014), a urbanização está entre os

principais problemas que afligem o manguezal de Gargaú, com casas avançando sobre este. Dentre outros problemas estão as obras de dragagem efetuadas no Canal de Gargaú, sobrecaptura de caranguejo-uçá e guaiamum, descarte de óleo por barcos motorizados. O descarte de lixo e esgoto completa o quadro de poluentes a causar impactos ao manguezal.

Foram realizadas 3 coletas no manguezal de Gargaú. Sendo as duas primeiras para testes. A primeira coleta foi realizada no dia 11/05/2015, a segunda no dia 01/10/2015 e a terceira coleta no dia 07/03/16. Foram escolhidos dois pontos (Figura 2) para coleta das amostras: Buraco Fundo ($21^{\circ}35'5.15''$ S e $41^{\circ}3'39.72''$ O) e Braço do Rio ($21^{\circ}34'35.85''$ S e $41^{\circ}3'25.64''$ O).



Figura 2: Locais de coleta das amostras. (A) Buraco Fundo e (B) Braço do Rio. Fonte: Programa Google Earth.

Buraco Fundo é o nome do bairro de Gargaú onde estão localizadas a maioria das moradias do local. Este bairro é margeado por um manguezal que ficou conhecido como manguezal do Buraco Fundo. Pela proximidade das casas, este manguezal é um dos mais antropizados. Recebe constantes cargas de esgoto e lixo, sofre com aterramento e abertura de clareiras. O solo do local é argiloso (Figura 3).



Figura 3 – Manguezal do Buraco Fundo. Fotos da autora.

O outro ponto de coleta está localizado no braço do Rio Paraíba do Sul, próximo à abertura do estuário secundário do Rio. Este braço do rio forma uma laguna, local bem frequentado por banhistas em épocas de calor. O local de coleta, no entanto, está situado mais distante de onde há ocorrência de atividades humanas. O solo do local, diferente do Buraco Fundo, é arenoso (Figura 4).



Figura 4: Floresta de mangue à beira do braço do Rio Paraíba do Sul. Fotos da autora.

3.3.2 Metodologia de amostragem do solo e plantas para estudo

Para a verificação da presença de FMA e DSE no manguezal de Gargaú, amostras de plântulas de mangue e de sedimento foram coletadas nos dois pontos de coleta. No campo, observou-se que em cada local de coleta dominava florestas compostas por uma determinada espécie ou gênero. Com base em características das plantas como cor do pecíolo e morfologia das folhas, por exemplo, constatou-se que as plântulas coletadas no Buraco Fundo eram *Avicennia* sp. e as coletadas no Braço do Rio, *Laguncularia* sp. (Figura 5). Uma média de 5 plântulas foram coletadas por local. As amostras de solo e de plântulas foram retiradas com auxílio de pá a uma profundidade de, em média, 10 cm e raio de 2 m. Em cada local de coleta foram recolhidas em torno de 4 amostras de solo, formando uma amostra composta de aproximadamente 2 Kg. No Buraco Fundo, as amostras estavam a aproximadamente 4 m da linha d'gua da maré e no Braço do Rio as amostras coletadas estavam imersas na água, sendo este ponto de coleta local mais sujeito às alterações de maré, o que faz com que os indivíduos fiquem submersos, quando a maré está alta (Figura 4).

As amostras foram adicionadas em sacos plásticos e transportadas em um recipiente com gelo para o Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM) em Cabo Frio – RJ onde foram realizadas as análises.



Figura 5: Plântulas de *Avicennia* sp. (A) e *Laguncularia* sp. (B) coletadas no Buraco Fundo e Braço do Rio, respectivamente. Fotos da autora.

3.3.3 Avaliação das Raízes de *Avicennia* sp. e *Laguncularia* sp.

A avaliação das raízes foi realizada logo após a lavagem com água, seguindo de tratamento de clarificação por KOH 10% (30 minutos/70 ° C em banho maria) e a neutralização com HCl a 2% (30 minutos a temperatura ambiente). Finalmente, a raiz foi corada com azul de Trypan 0,05% durante 10 minutos a 70 ° C em banho-maria (SOUZA e GUERRA, 1998 – adaptado; UFLA, 2015). Após estarem coradas as raízes foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm a 1,5 cm de comprimento. As porcentagens de colonização por FMA e DSE foram realizadas pelo método de Trouvelot e colaboradores (1986), utilizando o sistema de classificação de 0 a 5 para observação de micélio (hifas), onde: 0 (0%), 1 (< 1%), 2 (< 10%), 3 (< 50%), 4 (> 50%) e 5 (> 90%) e de A0 a A3 para estruturas de FMA (arbúsculos, vesículas e esporos) e de DSE (microescleródios), onde: A0 (nenhuma estrutura), A1 (poucas estruturas), A2 (frequentes) e A3 (abundantes). Foram feitas 6 lâminas com 5 fragmentos cada, totalizando 30 fragmentos de raízes de cada plântula. As análises foram realizadas em triplicadas sendo utilizados três indivíduos e gerando um total de 90 fragmentos de raízes de cada ponto de coleta. As lâminas foram montadas com 50% de glicerol e observadas em microscópio óptico (Novel BM 2100) acoplado a uma câmera fotográfica (Toup CAM UCOS05100KPA). As imagens foram tratadas no programa Toup

Lite. Após observação das lâminas, os resultados foram inseridos no programa MYCOCALC (www.dijon.inra.fr/mychintec/) para obtenção das taxas de colonização.

3.3.4 Extração, contagem e identificação de esporos

Anteriormente ao procedimento de extração de esporos foi realizada a homogeneização e quarteamento do substrato a fim de se obter uma amostra significativa (SILVA, 2009). Dos aproximadamente 2 kg de substrato coletados em cada ponto de coleta, foram separadas 3 subamostras de 400 g cada. Foi realizado o quarteamento de cada uma destas subamostras e retirados 50 g (em triplicatas) de cada uma, totalizando 9 subamostras de 50 g que foram utilizadas para extração e quantificação do número de esporos presentes.

Para extração de esporos pelo método de decantação e peneiramento úmido, peneiras com malhas de 420 e 53 μm foram utilizadas, seguido de centrifugação em água a 3000 rpm por três minutos e em solução de sacarose a 50% a 2000 rpm durante dois minutos (GERDEMANN e NICOLSON, 1963). 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. Foram montadas lâminas com resina PVLG e PVLG + MELZER e os esporos observados sob microscópio óptico para identificação, realizada com auxílio de publicações de pesquisadores especialistas em taxonomia de FMAs e do banco de dados INVAM (International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Resultados preliminares

Em coleta realizada no mês de maio de 2015 para testes foi possível verificar preliminarmente que as raízes de *Avicennia* sp. estavam colonizadas por FMA e DSE. A ocorrência dos dois fungos no manguezal de Gargaú pôde ser constatada por meio da observação de estrutura semelhante a arbúsculo de FMA e de hifas septatadas escuras e estruturas semelhantes a microescleródios de DSE em células da raiz de *Avicennia* sp. conforme mostrado na Figura 6.

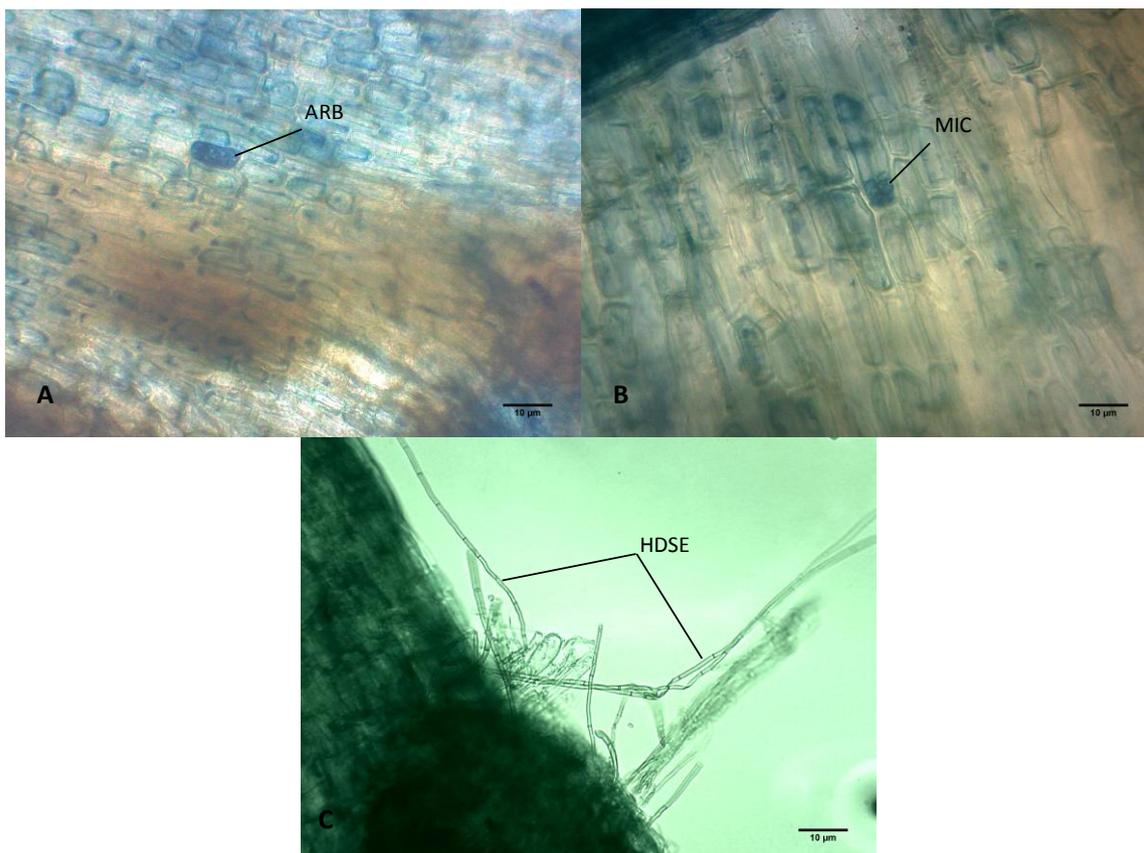


Figura 6: Observação de estruturas de FMA e DSE em raízes de *Avicennia* sp. coletadas no Buraco Fundo. (A) ARB: Arbúsculo. (B) MIC: Microescleródio e (C) HDSE: Hifas de DSE. Aumento de 1000x. Fotos da autora.

Com a verificação de estruturas de FMA e DSE em amostras coletas no Buraco Fundo foi possível constatar a ocorrência de relação simbiótica entre os fungos e vegetais do manguezal de Gargaú, não sendo necessária, nesta primeira análise-teste, realização de análise nas amostras coletadas no outro ponto de coleta. A partir de então foram realizados procedimentos com os materiais coletados para aprendizado das técnicas laboratoriais.

A seguir são mostrados os resultados das análises referentes à coleta realizada em março de 2016, utilizados nesta dissertação.

3.4.2 Identificação de estruturas fúngicas em raízes de *Avicennia* sp. e *Laguncularia* sp.

Verificou-se, nas raízes analisadas, a presença de estruturas de FMA e DSE (Figura 7).

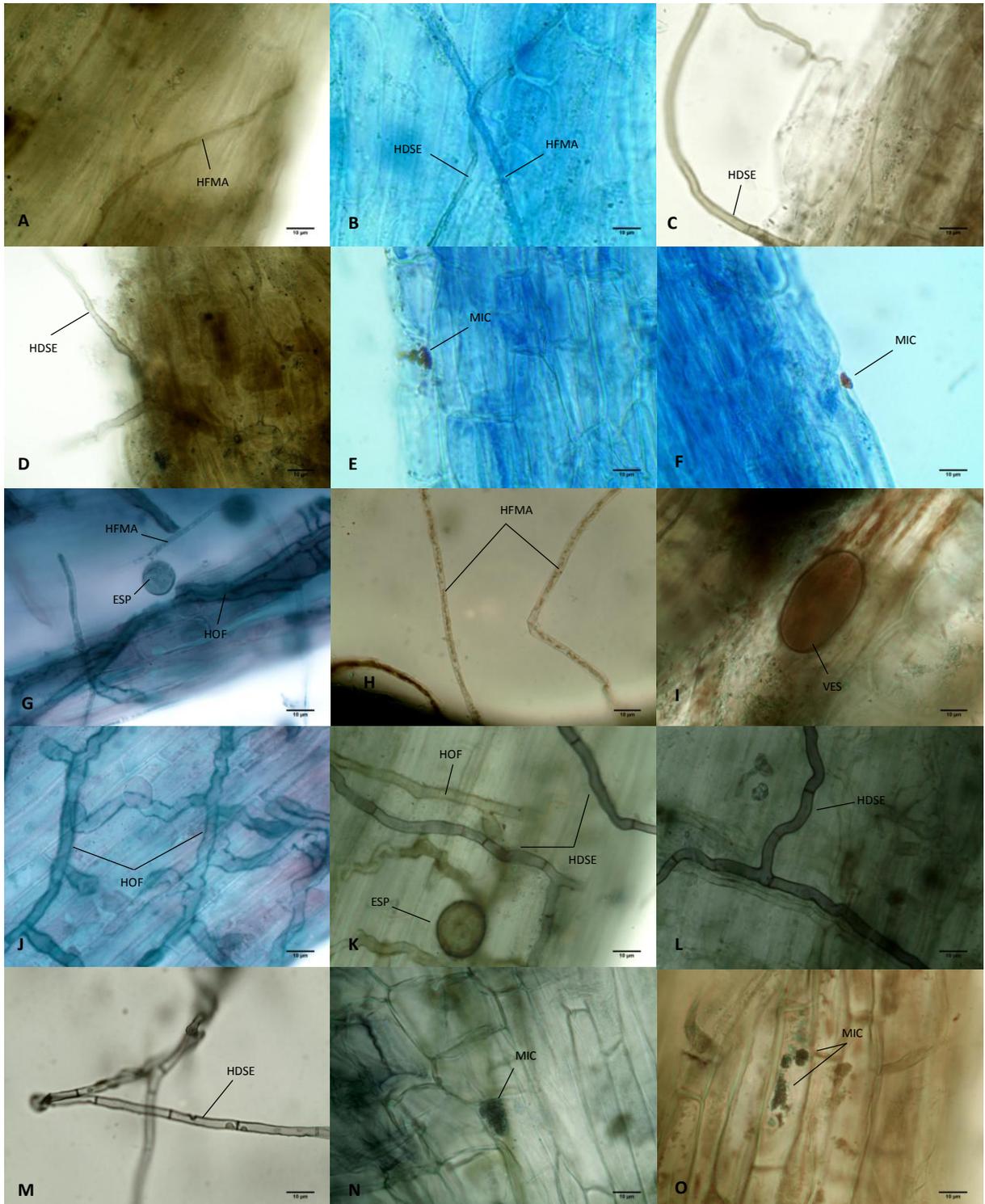


Figura 7: A – F: Estruturas de FMA e DSE em raízes de *Avicennia* sp. coletadas no Buraco Fundo. G – O: Estruturas fúngicas em raízes de *Laguncularia* sp. coletadas no Braço do Rio. HFMA: Hifa de FMA (A, B, G e H). HDSE: Hifa de DSE (B, C, D, K, L e M). MIC: Microescleródio (E, F, N e O). ESP: Esporo (G e K). HOF: Hifa de outro fungo (G, J e K). VES: Vesícula (I). Aumento de 1000x.

Estruturas como esporos (Figura 7, G e K), hifas hialinas de FMA (Figura 7, A, B, G e H), vesícula (Figura 7, I), hifas septadas escuras (DSE) (Figura 7, B, C, D, K, L e M) e microescleródios (Figura 7, E, F, N e O) puderam ser observadas nos fragmentos de raízes analisados, confirmando que estes vegetais do manguezal de Gargaú são simbiontes de FMA e DSE. Outro tipo fúngico também pôde ser observado nas amostras do Braço do Rio (Figura 7, G, J e K). As raízes coletadas neste local estavam grandemente colonizadas por ele. Este fungo possui hifas septadas, porém não-melanizadas como as do *Dark Septate Endophytes* (DSE), podendo ser comparado às ectomicorrizas.

Os FMAs proporcionam diversos benefícios para os vegetais que colonizam. Favorecem o estabelecimento da planta, crescimento e sobrevivência, o que explica o fato de a maioria destas, cerca de 90%, estabelecerem relação simbiótica com estes fungos (GIANINAZZI e GIANINAZZI-PEARSON, 1986; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os trabalhos existentes sobre FMAs em manguezais têm avançado na tentativa de investigar sobre a relação destes fungos com as espécies de mangues, seu comportamento e papel no ecossistema. Sengupta e Chaudhuri (2002) verificaram a associação de FMA com espécies de mangue do estuário do rio Ganges, na Índia. Eles observaram que os FMAs são comuns nas raízes de mangue e das plantas associadas do local de estudo. Estruturas como hifas intra e inter-celulares, arbúsculos e vesículas foram bem aparentes nas espécies de mangue. Em estudo realizado por Souza e Rodrigues (2013) também na Índia, observou-se que apenas 1 das 17 espécies coletadas não estava colonizada por FMA. Estes estudos demonstram que espécies de manguezal estabelecem relação simbiótica com os FMAs. Wang e colaboradores (2010) observaram, em experimento realizado em casa de vegetação, que plantas de mangue inoculadas com FMA tiveram um aumento no crescimento e na absorção de nutrientes como Nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), o que sugere que os FMAs desempenham papéis de relevante importância no desenvolvimento dos manguezais. Apesar dos trabalhos citados, ainda há poucos estudos no sentido de verificar a presença destes fungos em manguezais.

Os FMAs possuem grande importância, sobretudo em ambientes estressados, pois auxiliam no estabelecimento e favorecem o crescimento do vegetal (SMITH e READ, 2008). Estudos têm mostrado o potencial dos FMAs na proteção de plantas expostas a metais pesados e na retenção destes em seus tecidos. Silva e colaboradores (2006) observaram que a *Brachiaria decumbens* inoculada com FMAs foi capaz de extrair metais pesados de solo contaminado. Os fungos favoreceram a retenção dos metais na raiz e a redução na parte aérea

do vegetal, amenizando a toxicidade dos metais. Cabral e colaboradores (2010) verificaram a capacidade de retenção de metais nos tecidos de FMAs cultivados *in vitro*. Os resultados mostraram que tecidos de *Glomus clarum* apresentaram elevada capacidade de retenção de cobre (Cu), cádmio (Cd) e chumbo (Pb), enquanto que para zinco (Zn), maior retenção ocorreu em micélio de *Gigaspora gigantea*, sendo, estes isolados, considerados promissores em programas de biorremediação.

O papel dos fungos micorrízicos arbusculares em locais contaminados por petróleo e derivados também têm sido evidenciado em pesquisas científicas. Paula e colaboradores (2006) observaram crescimento de biomassa de alfafa (*Medicago sativa* L.), braquiária (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) e sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), inoculados com uma mistura de isolados de FMA e crescidos sobre solo extraído de área de *landfarming* de resíduo petroquímico. Resultado parecido com o verificado por Bento (2008), em que espécies de leguminosas arbóreas inoculadas com FMAs apresentaram bons resultados de crescimento em solo contaminado por petróleo bruto, sendo estes fungos sugeridos para serem usados como inoculantes nas mudas em áreas contaminadas por petróleo. Em estudo realizado em casa de vegetação com Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) submetida a diferentes concentrações de óleo diesel (0%, 0,5%, 1%, 2% e 3%), Pinto (2016) verificou que esta espécie quando inoculada com o FMA promoveu, mesmo em curto prazo, a fitorremediação de solo contaminado por óleo diesel.

A agregação do solo realizada pelos FMAs por meio de suas hifas extrarradiculares e pelos exsudados que liberam no meio favorecem a retenção de contaminantes. Dentre estes exsudados está a glomalina, uma glicoproteína que possui importante papel na estabilização do solo, promovendo, em locais contaminados, a quelação dos contaminantes (BERBARA *et al.*, 2006). Os FMAs também podem estabilizá-los pela adsorção a componentes da parede celular de hifas (CABRAL *et al.*, 2010). Desta forma, é diminuída a absorção dos contaminantes pelas raízes das plantas.

Os estudos citados acima revelam o benefício dos FMAs para espécies vegetais em solos poluídos por compostos orgânicos e inorgânicos, evidenciando que plantas micorrizadas têm melhor desempenho em locais estressantes do que aquelas não-micorrizadas, além de indicarem o uso dos FMAs como potencial agente biorremediador e evidenciam também a importância destes fungos em programas de revegetação de solos contendo contaminantes.

Os *Dark Septate Endophytes* ou DSE colonizam diversos vegetais e acredita-se, que assim como os FMAs, promovem o crescimento da planta, auxiliando na captação de

nutrientes (LINGFEI *et al.*, 2005; RODRIGUEZ, *et al.*, 2009). A descoberta destes fungos é relativamente recente e pouco se sabe ainda sobre eles (JUMPPONEN e TRAPPE, 1998). Com relação aos manguezais alguns poucos trabalhos relatam a ocorrência dos *Dark Septate Endophytes* neste ecossistema, sendo ainda ínfimo o número de publicações científicas que demonstrem a associação dos DSE com plantas de mangue.

Sengupta e Chaudhuri (1994) encontraram DSE e FMAs em associação com raízes de plantas de mangue e da vegetação associada em manguezais situados no estuário do rio Ganges, na Índia. Wang e Li (2003) observaram que espécies de manguezais de Qinzhou (China) estavam colonizadas por DSE e FMAs e verificaram que os DSE ocorrem mais extensivamente que os FMAs, colonizando as raízes, sozinhos ou na presença destes. O mesmo pôde ser observado neste estudo, em que ambos os fungos foram encontrados colonizando raízes de *Avicennia* sp. e *Laguncularia* sp. (Figura 7). Na literatura científica encontram-se diversos trabalhos relatando a co-ocorrência de DSE e FMA na colonização de vegetais (LINGFEI, *et al.*, 2005; KAI e ZHIWEI, 2006; LI e GUAN, 2007; WAGG *et al.*, 2008; SCERVINO *et al.*, 2009; SEERANGAN e THANGAVELU, 2014).

Os DSE estão frequentemente associados a plantas de ambientes com alta concentração de metais pesados (BAN, *et al.*, 2012; LIKAR e REGVAR, 2013; ZHAN *et al.*, 2015). Estudos têm evidenciado que estes fungos podem desempenhar um importante papel na proteção de plantas expostas a metais, aumentando sua tolerância a estes. Likar e Regvar (2009) rastream a distribuição de comunidades fúngicas nas raízes de Salgueiro (*Salix Caprea*) em locais contaminados por metais. Foi observado que grande diversidade de DSE ocorreu em locais com altas concentrações de metais pesados. Estes mesmos pesquisadores verificaram o papel de DSE na fisiologia da árvore de Salgueiro crescendo em locais enriquecidos com metais (LIKAR e REGVAR, 2013). Eles observaram que os DSE aumentaram os níveis de clorofila da planta em comparação com as plantas de Salgueiro não inoculadas com DSE e que houve redução da acumulação de metais em folhas, concluindo que os DSE aumentaram a tolerância da planta aos metais. Segundo estes autores a redução da acumulação de metais em Salgueiro pode ter sido resultado da quelação destes contaminantes no solo, absorção pela parede celular e sequestro intracelular de metais pelos fungos. Li e colaboradores (2010) observaram que plantas de milho (*Zea mays* L.) inoculadas com DSE tolerante a metais e crescidas em solo contendo Pb, Zn e Cd apresentaram crescimento de biomassa quando comparadas com aquelas que cresciam em solo não contaminado. A colonização das plantas pelo DSE aumentou a tolerância destas aos metais, restringindo a

translocação de metais das raízes para parte aérea. Segundo os pesquisadores, a simbiose entre DSE e plantas de milho pode ser uma estratégia eficiente para a sobrevivência em ambientes com metais pesados.

Alguns estudos demonstram o potencial fitorremediador de espécies de mangue em manguezais impactados por metais (PAKZADTOOCHAEI, 2013; ALMAHASHEER *et al.*, 2014) e por hidrocarbonetos de petróleo (MOREIRA *et al.*, 2011). A associação de microrganismos com potencial biorremediador a espécies fitorremediadoras pode acelerar o processo de biorremediação de áreas contaminadas. FMAs e DSE associados a plantas de mangue podem ser uma alternativa eficiente de rizorremediação em manguezais impactados por metais e compostos orgânicos.

Tecnologias de tratamento de locais contaminados que utilizam microrganismos para tal fim têm se mostrado eficazes, de menor custo e ecologicamente mais adequadas (GAYLARDE *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2010). Técnicas de biorremediação *in-situ* como a bioaumentação são promissoras de serem utilizadas em manguezais contaminados por petróleo e derivados. Gonçalves (2012) observou que a bioaumentação utilizando o fungo *Aspergillus* spp. na biorremediação de solo de manguezal contaminado por petróleo, apresentou bons resultados, sendo verificada diminuição de hidrocarbonetos. Peixoto e colaboradores (2009) verificaram que plantas de *Laguncularia racemosa* crescidas em microcosmo contendo consórcio microbiano e contaminado com 1% de diesel tiveram sua sobrevivência aumentada em 35%, além de observarem redução pela metade nos níveis de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) no sedimento com consórcio em comparação ao sedimento sem o consórcio microbiano.

FMAs e DSE tolerantes à metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo possuem grande capacidade para serem utilizados em programas futuros de biorremediação de manguezais impactados por estes contaminantes através da técnica de bioaumentação, devido sua resistência, seus papéis no crescimento vegetal e no aumento de tolerância do mesmo e na degradação e estabilização dos contaminantes. Experimentos laboratoriais que verifiquem o comportamento e eficiência destes fungos na degradação de compostos orgânicos e estabilização de metais em sedimento de manguezal bem como seus papéis na tolerância de plantas de mangue submetidas a diferentes níveis destes poluentes são imprescindíveis na busca de respostas mais precisas que possam auxiliar futuros programas de biorremediação em manguezais contaminados.

3.4.3 Colonização de raízes de *Avicennia* sp. e *Laguncularia* sp. por FMA e DSE

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 fúngica no sistema radicular), M% (intensidade de colonização fúngica no córtex da raiz), m% (intensidade de colonização fúngica em fragmentos de raízes), a% (abundância de estruturas fúngicas internas em fragmentos de raízes), A% (abundância de estruturas fúngicas internas no sistema de raiz) (Figura 8). A colonização fúngica diz respeito à colonização por FMA ou DSE (identificados por meio do micélio) e as estruturas fúngicas dizem respeito às estruturas típicas de FMA como arbúsculos, vesículas e esporos e de DSE (microescleródios). Como resultados das amostras foram encontrados hifas, vesículas, esporos e microescleródios.

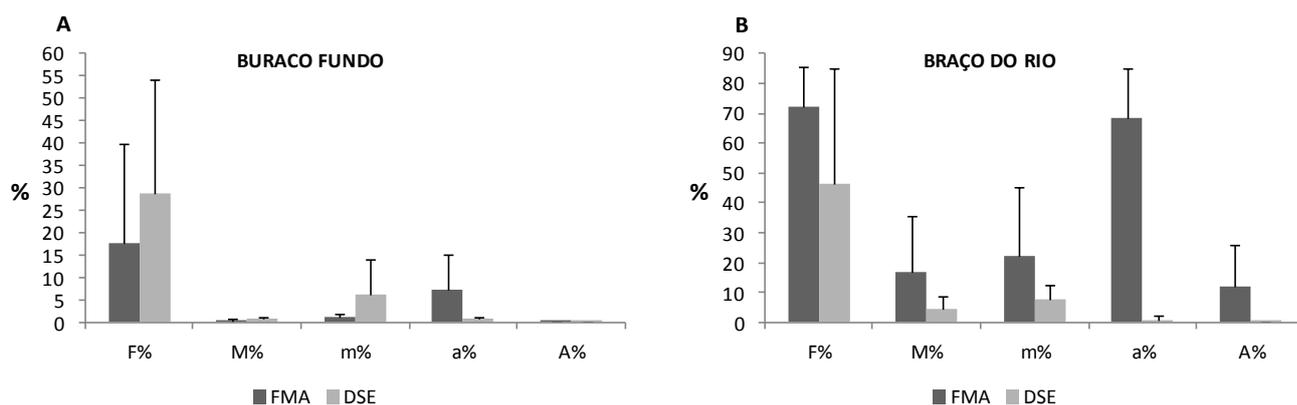


Figura 8: Dados de colonização por FMA e DSE em raízes de *Avicennia* sp. e *Laguncularia* sp. coletadas no Buraco Fundo (A) e Braço do Rio (B), respectivamente. Onde: F% (frequência de colonização fúngica no sistema radicular), M% (intensidade de colonização fúngica no córtex da raiz), m% (intensidade de colonização fúngica em fragmentos de raízes), a% (abundância de estruturas fúngicas internas em fragmentos de raízes), A% (abundância de estruturas fúngicas internas no sistema de raiz). As barras indicam o desvio padrão.

Os resultados por parâmetro das raízes coletadas no Buraco Fundo por colonização por FMA foram: F%= 18; M%= 0; m%= 1; a%= 0; A%= 7 e por DSE: F%= 29; M%= 1; m%= 6; a%= 0; A%= 1. Nas raízes coletadas no Braço do Rio os resultados para FMA foram: F%= 72; M%= 17; m%= 22; a%= 12; A%= 68 e para DSE: F%= 47; M%= 4; m%= 8; a%= 0; A%= 1. Os resultados demonstram que as estruturas de FMAs e DSE estão presentes nas raízes de *Avicennia* sp. e *Laguncularia* sp. coletadas no manguezal de Gargaú.

A frequência de colonização mostra o percentual de colonização das raízes pelos dois fungos (Figura 9).

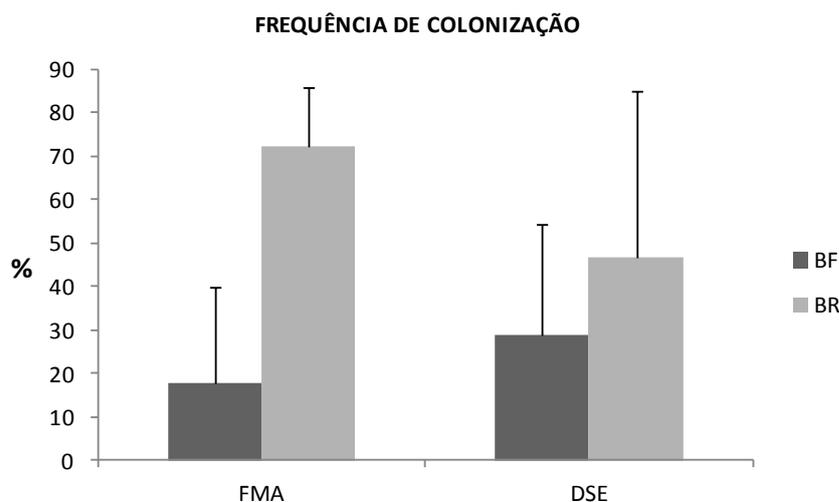


Figura 9: Frequência de colonização de FMA e DSE em raízes de *Avicennia* sp. e *Laguncularia* sp. coletadas no manguezal de Gargaú.

A frequência de colonização das raízes das plantas coletadas por FMA foi de 18% para BF e de 72% para BR. No estudo de Wang e colaboradores (2010), a porcentagem de colonização de raízes por FMA em diferentes espécies de mangue de manguezais na China, variou de 10% até 80%. Souza e Rodrigues (2013) encontraram variações de 6% a 77% na colonização de plantas de mangue na Índia. Nestes trabalhos não há relatos de contaminação destes manguezais. Os valores de colonização destes estudos mostram-se semelhantes aos do presente estudo. A frequência de colonização das raízes das plantas por DSE foi de 29% para BF e de 47% para BR. A taxa de colonização observada em BR mostra-se semelhante ao encontrado por Li e Guan (2007) que observaram uma taxa de colonização média por DSE de 47,4% em espécies de plantas (herbáceas) do gênero *Pedicularis*, do noroeste da China.

De acordo com a figura 9, pode-se observar que as raízes coletadas em BR estavam mais colonizadas por FMA do que as coletadas em BF, o mesmo padrão verificado para DSE. Na comparação entre os dois fungos por local de coleta, em BF observa-se maior colonização das raízes por DSE que por FMA, diferentemente de BR que apresentou raízes mais colonizadas por FMA.

É possível que características de BR como possuir solo arenoso, ser um local com formação inicial de floresta de mangue e estar sujeito a inundações frequentes de maré resultem na alta taxa de colonização por FMA neste local, devido ao importante papel destes fungos na estabilização e agregação do solo (BERBARA *et al.*, 2006). Maior colonização por DSE também foi observada em BR quando comparado com BF.

BF é um local próximo a moradias e margeado por um canal formado por águas oriundas do mar e do rio Paraíba do Sul, que recebe constantes descargas de lixo, esgoto, gasolina que vazam de embarcações, etc., sendo um local que tende a reter contaminantes, por ser mais restrito e com pouca circulação de água. Embora menor colonização por DSE tenha sido observada neste local quando comparado a BR, as plantas estavam mais colonizadas por este fungo do que por FMA.

Estudos relatam a ocorrência de metais pesados nos sedimentos do manguezal de Gargaú. Rangel (2008), dentre outros objetivos, avaliou a distribuição dos metais alumínio (Al), ferro (Fe), cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb), vanádio (V) e zinco (Zn) em sedimentos de fundo do manguezal de Gargaú entre 1995 (resultados de outros pesquisadores disponíveis na literatura) e 2006, após derramamento de efluentes industriais ocorridos neste ano em afluentes do rio Paraíba do Sul. Em seu estudo foi observado diminuição das concentrações de metais quando comparados com estudos realizados desde 1995. Quanto à contaminação por petróleo, entretanto, não há evidências. Silva (2011) verificou que bactérias coletadas em sedimentos do manguezal de Gargaú foram capazes de produzir biossurfactantes em meio contendo petróleo, embora as análises tenham indicado que não há contaminação de origem petrogênica no sedimento analisado.

A presença de DSE pode ser um indicador ambiental de contaminação, uma vez que são frequentemente encontrados em locais com altas concentrações de metais. No entanto, somente pela presença DSE não se pode afirmar que o manguezal de Gargaú esteja contaminado. Embora estudos tenham verificado a ocorrência de metais no sedimento de fungo deste manguezal, análises recentes de sedimento seriam necessárias para afirmar que o mesmo está contaminado por metais.

Menor colonização das plantas ocorridas em BF pelos dois fungos pôde ser observada, sendo a colonização por FMA neste local menor que por DSE. A taxa de P no solo é um dos fatores que pode limitar o desenvolvimento de FMA. Wang e colaboradores (2010) verificaram diminuição da colonização de plantas de mangue por FMA em solos com altos níveis de P. Todavia, verificaram em seu estudo que o decréscimo de colonização também ocorreu em solo com baixos níveis de P, sugerindo que solos com níveis altos ou suficientemente baixos de P são capazes de inibir a colonização por FMA.

Poucas estruturas de DSE foram observadas em BF e BR (Figura 8, A e B, a%, A%), enquanto estruturas de FMA como hifas, esporos e vesículas foram abundantes nas raízes de BR (Figura 8, B, a%). Vesículas não foram observadas em raízes de plantas de BF, somente

poucas hifas e esporos. Pôde-se verificar a presença de estrutura semelhante a arbúsculo (Figura 6, A) somente nas amostras coletadas para teste, não sendo porém observada posteriormente.

Wang e colaboradores (2010) investigando a simbiose entre FMA e espécies de mangue de dois manguezais no sul da China, verificaram a ocorrência de vesículas nas raízes estudadas enquanto arbúsculos foram raros ou ausentes. Resultados semelhantes aos de Sengupta e Chaudhuri (2002) e aos do presente estudo, o que indica que vesículas são estruturas comumente presentes em plantas de manguezal. Segundo Miransari (2011), vesículas de FMA podem acumular íons de sódio e cloreto em ambientes halófitos. Possivelmente este seja o motivo da frequente ocorrência de vesículas em plantas de manguezal. Os FMAs são capazes de suportar ambientes com teores de sais moderados, no entanto, a alta salinidade pode ter efeitos negativos sobre estes fungos. A germinação de esporos e consequente crescimento da hifa, por exemplo, podem ser reduzidos com aumento da salinidade (JUNIPER e ABBOTT, 1993). Kumar e Ghose (2008) observaram que a frequência micorrízica e a riqueza de esporos de FMA em manguezais na Índia estavam negativamente correlacionadas com a salinidade do solo.

Wang e colaboradores (2010) observaram também que houve simbiose entre FMA e plantas de mangue expostas a condições de inundação por mais de 11 horas por dia, indicando que há espécies de FMA que suportam condições de baixa concentração de oxigênio (hipoxia), embora também tenham observado supressão da colonização por FMA em condições de hipoxia por longo tempo nos dois manguezais estudados. Em Gargaú a cheia e baixa da maré ocorrem 2 vezes ao dia. As plântulas coletadas em BR ficam, por dia, inundadas por aproximadamente 12 horas, semelhante ao que ocorre no estudo de Wang e colaboradores (2010). Em nosso estudo, a situação de hipoxia não foi um fator que levou à ausência de colonização, sendo ao contrário, observada alta taxa de colonização das plantas do local por FMA (72%). Seerangan e Thangavelu (2014) observaram baixa incidência de DSE em macrófitas aquáticas da Índia. Apenas 5 das 58 espécies analisadas estavam colonizadas por este fungo. Segundo estes pesquisadores as condições anaeróbicas do local de estudo podem afetar a colonização das plantas por DSE, no entanto sugerem que estudos futuros sejam realizados para o melhor entendimento dos fatores que inibem a colonização das espécies estudadas por DSE.

Pouco se conhece, portanto, sobre fatores que interferem na taxa de colonização de DSE em vegetais de determinados ambientes, principalmente em manguezais. Os estudos

sobre estes fungos são ainda iniciais e se baseiam em determinar sua ocorrência e grau de colonização. Sabe-se, porém, que os DSE estão presentes em ambientes com diversos tipos de estresses, possuindo capacidade de resistir bem a condições ambientais extremas.

Estruturas de outro tipo fúngico foram observadas em nosso estudo em raízes de *laguncularia* sp. coletadas em BR (Figura 7, G, J e K). O micélio deste fungo é semelhante ao de ectomicorrizas encontradas no trabalho de (WAGG *et al.*, 2008). Estes pesquisadores verificaram a co-ocorrência de ectomicorrizas, FMAs e DSE em raízes plantas alpinas crescidas em solo contendo herbicida. Apesar da semelhança, não é possível afirmar com certeza que os fungos encontrados em nosso estudo sejam ectomicorrizas, sendo necessários mais estudos como análises moleculares, por exemplo, para constatação.

3.4.4 Quantificação e tipos de glomerosporos encontrados

A quantificação de glomerosporos dos dois pontos de coleta está apresentada no quadro abaixo:

Quadro1: Quantificação de glomerosporos das amostras de solo coletadas no manguezal de Gargaú. As médias foram obtidas por contagem em triplicata (50 ml) de cada ponto de coleta. O desvio padrão da média também é apresentado.

	Buraco Fundo	Braço Rio
Média	6 ± 3,5	5 ± 2
Total	55	48

Em 50 mL de solo de cada ponto de coleta obteve-se uma média de 6 esporos em BF e 5 em BR. No total, foram separados 103 esporos, sendo 55 de BF e 48 de BR.

Sengupta e Chaudhuri (2002), observando 33 espécies de mangue e associadas pertencentes a 4 estágios de sucessão fisiográficos quanto à colonização por FMA, observaram no estágio de sucessão I, por exemplo, onde haviam 9 espécies de mangue, 170 esporos em 10 g de sedimento da rizosfera destas plantas, o que dá, de acordo com nossas observações, uma média de 18 esporos associados à rizosfera de cada uma destas plantas. Este valor é considerado alto se comparado com nosso estudo, uma vez que 50 mL de sedimento equivaleram a uma média de 65 g. No entanto, em nosso estudo a extração de esporos foi feita de sedimento próximo às plântulas coletadas e não da rizosfera.

Seerangan e Thangavelu (2014) encontraram 4 a 8 esporos por 100 g de solo da zona de raiz de espécies de macrófitas de zonas úmidas da Índia. Os pesquisadores observaram que os esporos fúngicos estavam presentes em apenas 9 das 55 espécies analisadas. Além disto, os esporos de FMA estavam ausentes em zonas de raiz de várias raízes de plantas micorrizadas, o que pode sugerir que o processo inicial de colonização de plantas aquáticas seja realizado por outros tipos de propágulos como hifas extrarradiculares e raízes micorrizadas, uma vez que a taxa de colonização por FMA média de raízes das espécies estudadas foi de 68%, considerada alta. Tal fato pode estar acontecendo em nosso estudo, o que explica a baixa quantidade de esporos encontrada e alta taxa de colonização das raízes por FMA em BR, por exemplo (Figura 9).

Segundo Zhao (1999) fatores como sazonalidade, idade das plantas hospedeiras, características do solo, como por exemplo, quantidade de P e umidade podem interferir na densidade de esporos. Com relação à sazonalidade, porém, Bonfim (2015) não observou variação no número de esporos extraídos de solo de Mata Atlântica, variando apenas a colonização radicular, sendo maior no verão e outono. Maior variação do número de esporos ocorreu em diferentes altitudes, com maior número na floresta de maior altitude (1000 m). O número de esporos encontrados por Bonfim (2015) foi menor que 12 em 50 g de solo. Em seu estudo, Kumar e Ghose (2008) observaram que a disponibilidade de P estava negativamente correlacionada com a riqueza de esporos de FMA em manguezais da Índia.

Vinte e oito espécies de FMA foram encontradas por Souza e Rodrigues (2013) em rizosfera de dezesseis espécies de mangue situadas na Índia, sendo identificados cinco gêneros: *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* e *Entrophospora*. Dentre estes, *Glomus* foi o gênero mais abundante. Também na Índia, Kumar e Ghose (2008) encontram um total de 44 espécies de FMA dos gêneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* e *Scutellospora* em rizosfera de 15 espécies de mangue e uma associada, sendo *Glomus* o gênero mais abundante. Seis espécies pertencentes aos gêneros *Glomus* e *Acaulospora* foram identificados em rizosfera de 16 espécies de mangue de dois manguezais da China por Wang e colaboradores (2010). Estes gêneros estão entre os principais relatados na utilização em experimentos de biorremediação (PAULA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006; BENTO, 2008; CABRAL, 2008).

Após separação e contagem dos esporos foram preparadas lâminas para observação e identificação dos mesmos em microscópio. Diversos tipos de esporos foram encontrados, com alguns esporos diferentes em cada local de coleta (Figura 10). Consultas ao site INVAM e a

publicações de pesquisadores especialistas em taxonomia de FMA foram feitas, porém o fato de haver diferentes tipos de esporos, mas pequeno número de um determinado tipo tornou difícil a identificação. Optou-se então deixá-los todos sob a nomenclatura de glomerosporos.

A germinação dos esporos de FMA dá origem a uma hifa que, na presença de seu hospedeiro, se desenvolve e o coloniza. Hifas de FMA são hialinas e geralmente asseptadas (BERBARA *et al.*, 2006). No entanto, observou-se, em dois esporos, hifas semelhantes a de fungos do tipo DSE, septadas e melanizadas (Figura 10, N e Q). A co-ocorrência de FMA e DSE têm sido relatada na literatura em raízes de plantas. No entanto, não há relatos da ocorrência de hifas de DSE em esporos de FMA, o que necessita maiores investigações.

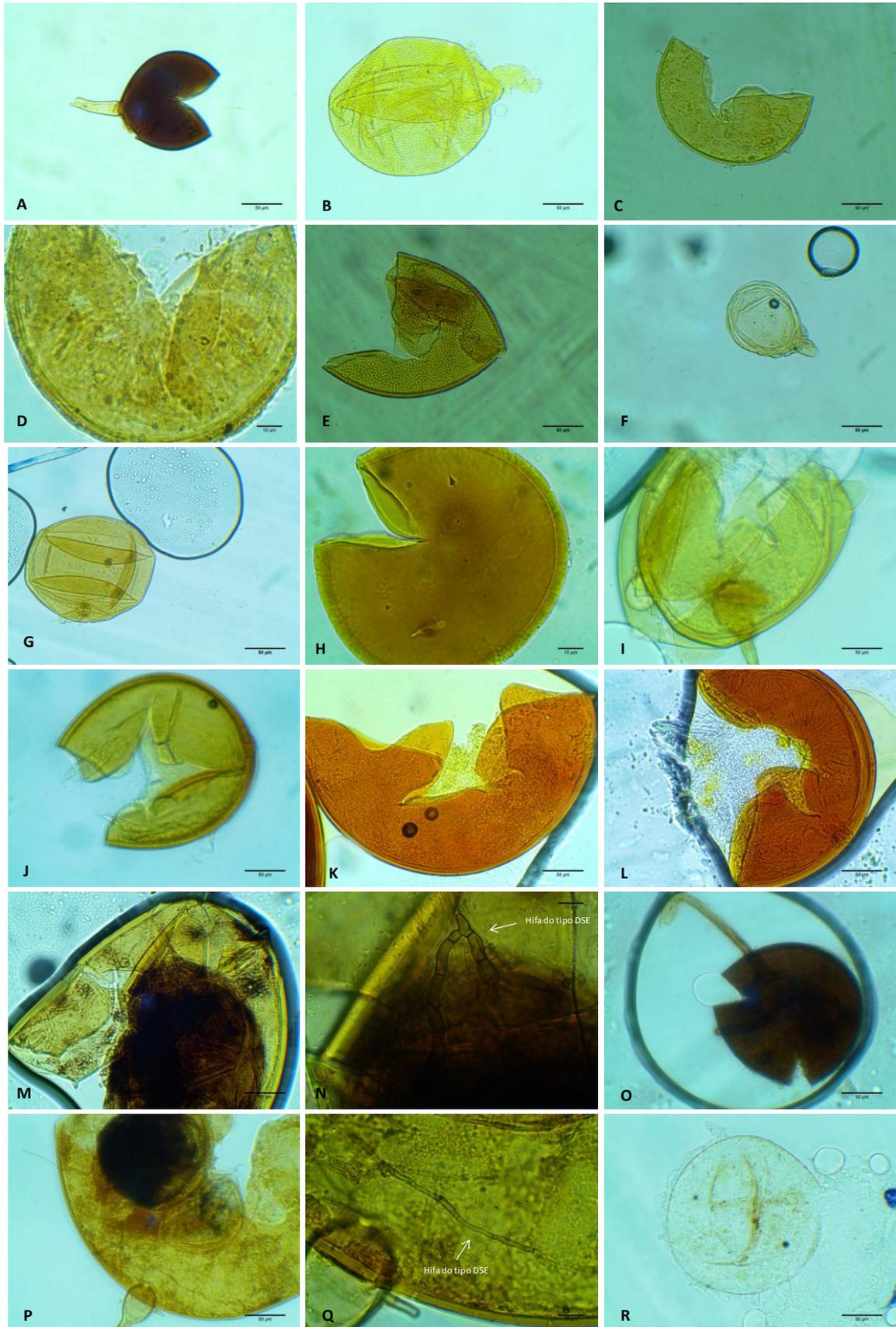


Figura 10: Alguns dos tipos de glomerosporos extraídos do solo coletado do Buraco Fundo e Braço do Rio. A – H: Glomerosporos encontrados no solo coletado no Buraco Fundo. I – R: Glomerosporos encontrados no solo coletado no Braço do Rio. Imagens D, H, N e Q sob lente com aumento de 1000x. Demais imagens sob lente com aumento de 400x. Detalhe para hifas do tipo DSE em N e Q.

3.5 CONCLUSÃO

Neste estudo foram observadas estruturas de FMA como hifas, vesículas e esporos em raízes de plantas coletadas no manguezal de Gargaú, São Francisco de Itabapoana - RJ. Também foram encontrados esporos no sedimento coletado. Desta forma, verificou-se a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares neste manguezal. A presença de hifas septadas melanizadas e estruturas semelhantes a microescleródios foram observadas nas raízes analisadas, constatando que os DSE estão associados a vegetais do manguezal de Gargaú. Outro tipo fúngico foi observado nas raízes coletas, semelhantes a ectomicorrizas, entretanto não foi possível afirmar que eram estes fungos.

3.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Novos estudos que abordem a ecologia e ocorrência dos FMAs e DSE em manguezal como também o seu potencial na biorremediação de manguezais contaminados por metais e hidrocarbonetos devem ser conduzidos. Algumas sugestões podem ser dadas, como:

- Verificar em microcosmos com sedimento e plantas de manguezal, se há degradação de hidrocarbonetos de petróleo e estabilização de metais pesados por FMA e DSE e verificar a tolerância destes em diferentes concentrações dos poluentes e seus papéis na sobrevivência e crescimento das plantas;
- Coletar sedimento para análise da presença de metais pesados e verificar a ocorrência dos fungos e taxas de colonização em locais mais e menos antropizados, correlacionando com as concentrações de metais, caso sejam encontrados;
- Verificar a taxa de colonização de FMA e DSE correlacionando com fatores como sazonalidade, P, pH, salinidade, tempo de exposição à inundação, etc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. **Contaminação química e biorremediação do solo.** Tópicos em Ciência do Solo, Viçosa, v.1, p.299-351, 2000.

ADDY, H.D.; PIERCEY, M. M.; CURRAH, R. S. **Microfungal endophytes in roots.** Botany 83:1-13, 2005.

AHLICH K.; SIEBER T.N. **The profusion of dark septate endophytic fungi in nonectomycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs.** *New Phytol* 132:259–270, 1996.

AHLICH, K. **Vorkommen und Charakterisierung von dunklen, septierten Hyphomyceten (DSH) in Gehölzwurzeln.** PhD Dissertation, Swiss Federal Institute of Technology, Department of Forest Sciences, Zürich, Switzerland, 1997.

ALMAHASHEER, H. B.; AL-TAISAN, W. A.; MOHAMED, M. K. **Metals Accumulation in Grey Mangrove (*Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.) Inhabiting Tarut Bay, Eastern Saudi Arabia.** *Journal of Agricultural Science*, vol. 6, n. 1, 2014.

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. de. **Identificação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em formação vegetal psamófila-reptante: ecologia e micorriorremediação.** Dissertação (Mestrado). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 2012.

BAN, Y.; TANG, M.; CHEN, H.; XU, Z.; ZHANG, H.; YANG, Y. **The Response of Dark Septate Endophytes (DSE) to Heavy Metals in Pure Culture.** *PLOS ONE*. Volume 7, Issue 10, 2012.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. **Bioremediation of soil contaminated by diesel oil,** *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34 (Supl.1), p. 65-68, 2003.

BENTO, R. A. **Simbioses Radiculares e a Fitorremediação de Solo Contaminado por Resíduos Oleosos de Refinaria de Petróleo.** Trabalho de conclusão de curso (Monografia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

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.

BERNINI, E.; FERREIRA, R.; CARVALHO E SILVA, F. L.; MAZUREC, A. P.; NASCIMENTO, M. T. e REZENDE, C. E. **Alterações na cobertura vegetal do manguezal do estuário do rio Paraíba do Sul no período de 1976 a 2001.** *Revista da Gestão Costeira Integrada*, 2010.

BERNINI, E.; REZENDE, C. E. **Estrutura da vegetação em florestas de mangue do estuário do rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** *Acta Botanica Brasilica*, 18(3): 491-502, 2004.

BONFIM, J. A. **Fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos dark septate em áreas de Mata Atlântica em um gradiente altudinal.** Tese de doutorado. Universidade de São Paulo (USP). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP, 2015.

BRUNDRETT, M.C.; KENDRICK, W.B. **A developmental study of early stages in vesicular arbuscular mycorrhiza formation.** *Canadian Journal Botany*, 66: 184–194, 1996.

CABRAL, L.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; PINTO, J. E. B. P. **Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrízicos arbusculares.** Quim. Nova, Vol. 33, No. 1, 25-29, 2010.

CARTER, D.A.; BURT, A.; TAYLOR, J. W.; KOENIG, G.L.; DECHAIR, O. B.; WHITE, T.J. **A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*.** Electrophoresis 18:1047–1053, 1997.

CHEN, J.; XU, Q. X.; SU, Y.; SHI, Z. Q.; HAN, F. **Phytoremediation of Organic Polluted Soil.** Bioremediation & Biodegradation. 4:3, 2013.

CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B. **Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc.** Plant and Soil, v.261, p.209-217, 2004.

CURRAH, R. S.; TSUNEDA, A. **Vegetative and reproductive morphology of *Phialocephala fortinii* (Hiphomycetes, Mycelium radialis atrovirens) in culture.** Transactions of Mycological Society in Japan 34:345-356, 1993.

DINARDI, A. L. *et al.* **Fitorremediação.** III fórum de estudos contábeis 2003. Rio Claro (SP), 2003.

GADD, G.M. **Interactions of fungi with toxic metals.** New Phytologist, vol. 124, n. 1, pp. 25-60, 1993.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; 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 84 from soil by wet sieving and decanting.** Transactions of the British Mycological Society, v.46, p. 235-244, 1963.

GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. **Progress and headaches in endomycorrhiza biotechnology.** Symbiosis 2, 139–149, 1986.

GONÇALVES, O. **Biorremediação de substrato de manguezal Contaminado com petróleo, através da adição de Nutrientes (glicerina bruta e torta de mamona) e Fungos *aspergillus* spp ou *penicillium* spp.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia. Salvador – BA, 2012.

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

GOTO, B. T.; MAIA, L. C. **Glomerospores: a new denomination for the spores of Glomeromycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota.** Mycotaxon, v. 96, 129-132, 2006.

GOTO, B. T.; SILVA, G.A.; ASSIS, D. M. A.; SILVA, D. K. A.; SOUZA, R. G.; FERREIRA, A. C. A.; JOBIM, K.; MELLO, C. M. A.; VIEIRA, H. E. E.; MAIA, L. C.; OEHL, F. **Intraornatosporaceae (Gigasporales), a new family with two genera and two new species.** Mycotaxon 119: 117-132, 2012.

GRATÃO, P. L.; PRASAD, M. N. V.; CARDOSO, P. F.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. **Phytoremediation: Green technology for the clean up of toxic metals in environment.** Braz. J. Plant Physiol., v. 17, n. 1, p. 53-64, 2005.

HARRISON, M. **Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis.** Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v.50, p.361-389, 1999.

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: julho/2016.

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.

JONER, E.; LEYVAL, C. **Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions.** Agronomie, EDP Sciences, 23 (5-6), pp.495-502, 2003.

JUNIPER, S.; ABBOTT, L. **Vesicular arbuscular mycorrhizas and soil salinity.** Mycorrhiza 4:45-57, 1993.

JUMPPONEN, A. **Dark septate endophytes – are they mycorrhizal?** Mycorrhiza 11:207-211, 2001.

JUMPPONEN, A.; MATTSON, K. G.; TRAPPE, J.M. **Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter.** Mycorrhiza 7:261-265, 1998.

JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J.M. **Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonising fungi.** New Phytol 140:295-310, 1998.

KAI, W.; ZHIWEI, Z. **Occurrence of Arbuscular Mycorrhizas and Dark Septate Endophytes in Hydrophytes from Lakes and Streams in Southwest China.** Internat. Rev. Hydrobiol. 91:1, p. 29-37, 2006.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”.** Tese de doutorado apresentado ao instituto de biociências, Unesp-Rio Claro, 2001.

KHAN, ABDUL G. **Mycorrhizoremediation - an enhanced form of phytoremediation.** Journal of Zhejiang University Science B Volume 7, Number 7, 503-514, DOI: 10.1631 - 2006.

KUIPER, I. , LAGENDIJK E. L, BLOEMBERG, G. V & LUGTENBERG, B. J. J. **Mol Plant Microbe Interact** v.17, p. 6-15, 2004.

LI, A-R.; GUAN, K-Y. **Mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Pedicularis* species from northwest of Yunnan Province, China.** *Mycorrhiza*, 17:103–109, 2007.

KUMAR, T.; GHOSE, M. **Status of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the Sundarbans of India in relation to tidal inundation and chemical properties of soil.** *Wetlands Ecol Manage*, 16:471–483, 2008.

LI, H.Y.; LI, D. W.; HE, C. M.; ZHOU, Z. P.; MEI, T. **Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China.** *Fungal Ecol* 5: 309–315, 2012.

LI, T.; LIU, M.J.; ZHANG, X.T.; ZHANG, H.B.; SHA, T.; ZHAO, Z. W. **Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*.** *Sci Tot Environ* 409:1069–1074, 2011.

LIKAR M.; REGVAR, M. **Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil.** *Sci Total Environ* 407:6179–6187, 2009.

LIKAR, M.; REGVAR, M. **Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L.** *Plant Soil* 370:593–604, 2013.

LINGFEI, L.; YANG, A.; ZHAO, Z.W. **Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in Southwest China.** *FEMS Microbiology Ecology*, v.54, p.367-373, 2005.

LIVINGSTON, W. H.; BLASCHKE, H. **Deterioration of mycorrhizal short roots and occurrence of *Mycelium radicans atrovirens* on declining Norway spruce in Bavaria.** *European Journal of Forest Pathology* 14:340-348, 1984.

LOBUGLIO, K. F.; BERBEE, M. L.; TAYLOR, J. W. **Phylogenetic origins of the asexual mycorrhizal symbiont *Cenococcum geophilum* Pr. And other mycorrhizal fungi among the ascomycetes.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 287-294. 1996.

MIRANSARI ,M. **Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 89:917–930, 2011.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2^a ed. Lavras: Editora UFLA, 720p. 2006.

MOREIRA, I. T. A; OLIVEIRA, O. M. C; TRIGUIS, J. A; SANTOS, A. M. P; QUEIROZ, A. F. S; MARTINS, C. M. S; SILVA, C. S; JESUS, R. S. **Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's).** *Microchemical Journal* 99 376–382, 2011.

MORTON, J. B; BENNY, J. L. **Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zigomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and**

Gigasporineae, with and emendations of Glomaceae. Mycotaxon, v. 37, 471-491, Apr./June 1990.

MORTON, J. B.; BENTIVENGA, S.P. **Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zigomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups.** Plant and Soil, The Hague, v. 159, n. 7, p. 47-59, 1994.

NAKATANI, A. S. Siqueira, J. S.; Soares, C. R. F. S.; Lambais, M. R. **Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de “landfarming” de resíduos petroquímicos.** R. Bras. Ci. Solo, 32:1501-1512, 2008.

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

OEHL, F.; SÁNCHEZ-CASTRO, I.; PALENZUELA, J.; SILVA, G.A. **Paleospora spanni, a new arbuscular mycorrhizal fungus from Swiss agriculture soils.** Nova Hedwigia, 100: 101-114, 2014.

PAKZADTOOCHAEI, S. **Comparing the concentration of heavy metals (Cd, Cu, Ni and Zn) in the sediment and different tissues of *Avicenna marina* in Iranian coasts of the Oman Sea.** International Research Journal of Applied and Basic Sciences, vol. 4 (3), 561-569, 2013.

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

PARNISKE, M. **Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses.** Nature Reviews Microbiology, v. 6, p. 763-775, 2008.

PEIXOTO, R. S., SILVA, R. F., ROSADO, A. S. **Biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados.** Microbiologia in foco, 8, 17–30, 2009.

PEREIRA, G. M. D.; RIBEIRO, K. G.; JÚNIOR, P. I. F.; VITAL, M. J. S.; KASUYA, M. C. M.; ZILLI, J. L. **Ocorrência de fungos endofíticos “dark septate” em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.46, n.3, p.331-334, 2011.

PETERSON, R. L.; BONFANTE, P. **Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas.** Plant and Soil, v. 159, p. 79-88, 1994.

PINTO, H. C. A. **Potencial fitorremediador de sabiá (*mimosa caesalpinifolia* benth.) associada a fungo micorrízico arbuscular em solo contaminado com óleo diesel.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Campos dos Goytacazes – RJ, 2016.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A. CECON, P. R.; PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B. **Fitorremediação de solos contaminados com tebuthiuron utilizando-se espécies cultivadas para adubação verde.** Planta Daninha. v. 23, n.4 , p.711-717, 2005.

RANGEL, T. P. **Determinação de metais em sedimentos de fundo na região da mineradora de Mirai/MG e na bacia inferior do rio Paraíba do Sul/RJ.** Monografia de conclusão de curso. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ, 2008.

READ D.J.; HASELWANDTER K. **Observation on the mycorrhizal status of some alpine plant communities.** *New Phytol* 88:341–352, 1981.

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*, 2013.

ROCHA, E. F. C. d. **A ocupação do ecossistema de manguezal: um estudo etnográfico na comunidade do Buraco Fundo, em Gargaú- São Francisco do Itabapoana-RJ.** Monografia (Especialização em Educação Ambiental). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

RODRIGUEZ, R.J.; WHITE, F.A. JR.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R.S. **Fungal endophytes: diversity and functional roles.** *New Phytol* 182:314–330, 2009.

SCERVINO, J. M.; GOTTLIEB, A.; SILVANI, V. A.; PERGOLA, M.; FERNANDEZ, L.; GODEAS, A. M. **Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*.** *Soil Biology & Biochemistry* 41 1753–1756, 2009.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. **A new fungal phylum, the Glomeromycota : phylogeny and evolution.** *Mycological Research*, v.105, p. 1413–1421, 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.

SEERANGAN, K.; THANGAVELU, M. **Arbuscular Mycorrhizal and Dark Septate Endophyte Fungal Associations in South Indian Aquatic and Wetland Macrophytes.** *Hindawi Publishing Corporation Journal of Botany Volume*, Article ID 173125, 14 p. 2014.

SENGUPTA, A.; CHAUDHURI, S. **Arbuscular mycorrhizal relations of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India.** *Mycorrhiza* 12:169–174, 2002.

SENGUPTA A.; CHAUDHURI, S. **Atypical root endophytic fungi of mangrove plant community of Sundarban and their possible significance as mycorrhiza.** *J Mycopathol Res* 32:29–39, 1994.

SHEN, M.; ZHAO, D. K.; QIAO, Q.; LIU, L.; WANG, J. L.; CAO, G. H.; LI, T.; ZHAO, Z. W. **Identification of Glutathione S-Transferase (GST) Genes from a Dark Septate Endophytic Fungus (*Exophiala pisciphila*) and Their Expression Patterns under Varied Metals Stress.** *Journal pone*, April 17, 2015.

SILVA, A. M. F. D. **Biodegradação de petróleo e produção de biosurfactante por bactérias nativas do sedimento do manguezal de Gargaú, São Francisco do Itabapoana – RJ.** Monografia de conclusão de curso. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ, 2011.

SILVA, L. J. **Processo de Landfarming para Tratamento de Resíduos Oleosos.** PROGRAMA EQ-ANP Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural Processo. UFRJ. 2009.

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

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

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis.** Academic Press, San Diego, Calif, USA, 2008.

SOFFIATI, A. **Os manguezais do sul do Espírito Santo e do norte do Rio de Janeiro com alguns apontamentos sobre o norte do sul e o sul do norte.** 2ª ed.rev., ampl. atual. Campos dos Goytacazes (RJ): Essentia Editora, 2014.

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

SOUZA, J. D.; RODRIGUES, B. F. **Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi in mangroves of Goa in West India.** *Journal of Forestry Research.* Article ID196527,7 pages, 2013.

STOYKE G, CURRAH, R. S. **Endophytic fungi from the mycorrhizae of alpine ericoid plants.** *Can J Bot* 69:347–352, 1991.

SUSARLA, S.; MEDINA V F.; MUCCHICHEON S C. **Phytoremediation an ecological solution to organic chemical contamination.** *Ecological Engineering*, 18. 247-658, 2002.

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_micorrzicos_arbusculares.html](http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fungos_micorrzicos_arbusculares.html) > Acesso em: maio/2015.

- WAGG, C.; PAUTLER, M.; MASSICOTTE, H. B.; PETERSON, R. L. **The co-occurrence of ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal, and dark septate fungi in seedlings of four members of the Pinaceae.** *Mycorrhiza* 18:103–110, 2008.
- WALKER, C. **Taxonomic concepts in the Endogenaceae: spore wall concepts in species descriptions.** *Micotaxon*, v. 18, p. 443-455, 1983.
- WALKER, C.; VESTBERG, M. **Synonymy amongst the arbuscular mycorrhizal fungi: *Glomus claroideum*, *G. maculosum*, *G. multisubstensum* and *G. fistulosum*.** *Annals of Botany*, v.82, p.601-624, 1998.
- WANG, G., LI, H. **Primary Investigation on Radicular Endophytes of Mangrove at Qinzhou Bay in Guangxi.** *Guangxi Florestry Science*, 2003.
- WANG, Y.; QIU, Q.; YANG, Z.; HU, Z.; TAM, N. F. Y.; XIN, G. **Arbuscular mycorrhizal fungi in two mangroves in South China.** *Plant and Soil*, vol. 331, no. 1, pp. 181–191, 2010.
- WILSON, D. **Endophyte: the evolution of a term and clarification of its use and definition.** *Okios*. 73, 274-276, 1995.
- ZHAN, F.; HE, Y.; LI, T.; YANG, Y.; TOOR, G. S.; ZHAO, Z. **Tolerance and Antioxidant Response of a Dark Septate Endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila* to Cadmium Stress.** *Bull Environ Contam Toxicol* 94:96–102, 2015.
- ZHAO, Z. W. **Population composition and seasonal variation of VA mycorrhizal fungi spores in the rhizosphere soil of four Pteridophytes.** *Acta Botanica Yunnanica*, 21: 437–441, 1999.