

## Potencial biorremediador de Fungos Micorrizicos Arbusculares autóctones de formação Psamófila-Reptante da Restinga<sup>(1)</sup>.

**Marianne da Silva Nunes<sup>(2)</sup>; Janaína Silvano Marinho Teixeira<sup>(3)</sup>; Alan Mendonça Costa<sup>(4)</sup>; Maryellen de Castro Soares dos Reis<sup>(5)</sup>; Ocimar Ferreira de Andrade<sup>(6)</sup>; Victor Barbosa Saraiva<sup>(7)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos de CNPQ.

<sup>(2)</sup> Aluna de Iniciação Científica; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense; Cabo Frio, Rio de Janeiro; marinunes08@gmail.com; <sup>(3)</sup> Aluna de Iniciação Científica; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense; <sup>(4)</sup> Aluno de Iniciação Científica; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense; <sup>(5)</sup> Mestranda; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense; <sup>(6)</sup> Professor Mestre Colaborador; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense; <sup>(7)</sup> Professor Doutor; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.

**RESUMO:** Com a crescente percepção de impactos ambientais e à saúde dos seres vivos gerados pelo mau uso dos recursos naturais, vários estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de buscar diversas estratégias que poderão ser utilizadas para a descontaminação de ecossistemas expostos a crescentes ameaças de hidrocarbonetos do petróleo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de sobrevivência da *Bachiarria decumbens* associada a Fungos Micorrizicos Arbusculares (FMAs) isolados da rizosfera de *Remirea maritima* em solo de restinga contaminado com tolueno. A extração dos esporos de FMAs foi feita na área de formação de solo de Psamófila-reptante da Restinga de Massambaba, Arraial do Cabo – RJ pela técnica de peneiramento úmido. A contagem dos esporos foi feita em placa canelada com o auxílio de Lupa estereoscópica com iluminação. Como os FMAs são obrigatoriamente simbiotróficos, para avaliar os efeitos do tolueno no crescimento e na germinação do vegetal, foi feito um bioensaio com o vegetal *B. decumbens* inoculada ou não com FMAs e na ausência ou presença de duas concentrações (4,7ml e 153µl) de tolueno em B.O.D. por 30 dias, introduzida em solo autoclavado da área de estudo. Foi observado que uma média de 31 indivíduos do total de 60 semeados por tratamento germinou e que os tratamentos inoculados com FMAs e com dose mais concentrada de tolueno obtiveram maior número de indivíduos (17) resistentes ao estresse, o que pode ser consequência de influência de FMAs na sobrevivência do vegetal.

**Termos de indexação:** Biorremediação, Solo, Hidrocarboneto.

### INTRODUÇÃO

Segundo Brundrett (1991), os FMAs são comuns na grande maioria de ecossistemas terrestres, entre eles, as florestas tropicais e dunas

costeiras. Como a restinga é um dos ecossistemas litorâneos mais negligenciados, principalmente pela pressão imobiliária (ARAÚJO, 2009; BOHRER *et al* 2009), fazem necessárias pesquisas que venham caracterizar e quantificar a microbiota do solo e suas implicações ecológicas nesses ambientes. O ambiente de restinga, caracterizado por solos arenosos, pobres em argilas e matéria orgânica, além de baixa capacidade de reter água e nutriente (BRAGA, 2008), torna-se propício ao desenvolvimento de micro-organismos simbiotes. Abordando o caráter facultativo que algumas plantas apresentam em relação à simbiose com FMAs e destacando a dependência delas da associação com esses fungos em solo distrófico, Berbara e colaboradores (2006) citaram como exemplo a *Brachiarria decumbens*. Neste bioensaio, a decisão de utilizar *B. decumbens* como vegetal-teste, mediante presença de poluente, baseou-se em pesquisas sobre a utilização desta última em estudos de biorremediação de solos poluídos. O tolueno, um dos compostos voláteis participantes da composição da gasolina, tem despertado importante preocupação ambiental, por sua toxicidade (SILVA, 2009, OLIVEIRA; ARBILLA; SILVA, 2007). Nesse contexto, nosso trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de sobrevivência da *Brachiarria decumbens* associada a Fungos Micorrizicos Arbusculares (FMAs) isolados da rizosfera de *Remirea maritima* em solo de restinga contaminado com tolueno.

### MATERIAL E MÉTODOS

Local de Coleta: Restinga de Massambaba, no bairro Figueira- Ao longo de 2,4 Km de praia, a partir do limite leste da restinga de Massambaba, no bairro Figueira, e entre 25 e 50 m da linha de maré alta, foram delimitados 5 sítios, tendo distanciamento entre eles variado entre 250 a 900m, formando retângulos paralelos ao mar. Cada sítio foi composto por 3 parcelas de

aproximadamente 40m comprimento por 15m de largura. Para coleta de amostras de rizosferas da comunidade da formação psamófila-reptante variou-se os pontos de coleta, em zigue-zague, entre as partes mais baixas e mais altas das dunas frontais. Ao todo foram realizadas 5 campanhas, obtendo-se, em cada uma delas, 3 amostras compostas por 10 subamostras em cada transecto

A extração de esporos dos FMAs no solo foi realizada pela técnica da decantação e peneiramento úmido (Souza e Guerra, 1998). A contagem dos esporos, após a extração, foi feita em placa canaletada com o auxílio de Lupa estereoscópica com iluminação (SILVA et al, 2003). O bioensaio foi realizado em B.O.D. com fotoperíodo, para avaliar os efeitos do tolueno no crescimento e na colonização micorrízica de *B. decumbens* durante o período de quatro semanas. Foram utilizados 40 vasos com capacidade para 240 ml, preenchidos com aproximadamente 60% do seu volume. Após preparação e separação do substrato (peneiramento, autoclavagem e pesagem) utilizou-se 200g do mesmo para receber a inoculação de FMAs e/ou o poluente (solo-teste). No fundo de cada vaso foram adicionados 80g de substrato e, acima do solo-teste, foram aplicados 50g do mesmo substrato, com o objetivo de minimizar a volatilização do tolueno durante o experimento. Neste estudo as concentrações de 4,7 ml e 0,153µl de tolueno foram misturadas a 10 ml de água (Ogbo, 2008) para serem adicionadas a cada 200g de solo-teste e homogeneizados. Imediatamente a cada homogeneização de um vaso, inseriu-se o volume de 50 g de substrato seco acima do solo-teste. Quanto à inoculação do substrato com FMAs, segundo Saggin Junior e Silva (2002), uma hifa infectiva pode ser originada de um esporo germinado ou “mesmo de um pedaço de micélio fúngico ligado a algum fragmento de raiz, forma um apressório na superfície da raiz, que é por onde a penetração ocorre (ponto de infecção)”. Com base em constatações como esta, neste estudo foram utilizados fragmentos de raízes micorrizadas de *Remirea maritima* visando comparar os resultados desses tratamentos com o inoculado apenas com glomerosporos. O delineamento experimental foi desenvolvido na presença ou ausência de esporos (E), fragmentos de raízes micorrizadas de *Remirea maritima* (M), 153µl de tolueno (T1), 4,7ml de tolueno (T2) em grupos experimentais totalizando oito tratamentos, com cinco repetições. Neste experimento, em cada cova (6 covas por vaso) foram colocadas 2 sementes (sementes previamente tratadas em um teste de germinação), e aplicadas doses de 300 µl do

inóculo de glomerosporos (com 4 esporos em média). Ou seja, nos tratamentos inoculados (VE, VEH1 e VEH2), em cada vaso, foram colocados aproximadamente 24 esporos. Em seguida, os tratamentos permaneceram em condições controladas em B.O.D., com temperatura 25°C. A germinação foi monitorada em uma base diária. A partir do 18º dia não se observou mais qualquer germinação até o final do experimento, no qual foram obtidos os dados para o cálculo de percentagem de germinação (%G). As quantificações da biomassa, altura foliar e comprimento de raízes principais foram realizadas ao final do experimento. As medidas de comprimento foliar foram realizadas na folha primária (plúmula) de cada plântula. As regas diárias ocorreram com o emprego de 20-40 ml de água, ou de acordo com a necessidade da plântula. Após 30 dias de cultivo, os comprimentos das folhas e das raízes principais foram feitos com a utilização de paquímetro, e para determinar a biomassa foliar, as plantas foram desidratadas em estufa de secagem (80°C por 1h e meia) e pesadas em balança digital. No 25º dia após a semeadura foi aplicado a todos os tratamentos um estresse hídrico, suspendendo as regas periódicas, para avaliar a sobrevivência das plântulas nessas condições. Para a análise da germinação foi calculada a porcentagem de germinação (GASPAR-OLIVEIRA, 2007) em cada tratamento. Os dados foram organizados em tabelas e os resultados submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste de Tukey com  $p < 0,05$ , no programa estatísticos GraphPad Prism, versão 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

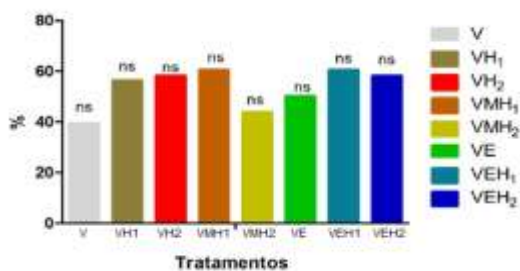
Na tabela 1 são observadas as distribuições de totais e médias obtidas do bioensaio. Nota-se que a germinação das sementes manteve-se numa média de 31 indivíduos ( $51 \pm 6,2\%$ ) do total semeado germinaram, média próxima à obtida no teste de germinação ( $45 \pm 14,4\%$ ) onde não foi utilizado hidrocarboneto. Entende-se que não houve influência do hidrocarboneto e dos FMAs na germinação da *B. decumbens*. Quanto ao número de sobreviventes observou-se que os tratamentos VMH2 e VEH2 obtiveram maior número de indivíduos resistentes ao estresse, o que pode ser consequência de influência de FMAs na sobrevivência do vegetal. Observou-se também que esse mesmos tratamentos obtiveram maior Mft.

Trat.	G <sub>t</sub>	Mf <sub>t</sub> (mg)	Mf (mg)	Cr (cm)	Af (cm)
V	28	9,1	3,0ns±1,7	3,5 ns±2,0	6,2 ns±0,2
VH1	30	11,3	3,8 ns±2,3	3,8 ns±1,0	4,9 ns±1,1
VH2	31	23,7	4,7 ns±2,4	4,1 ns±1,4	5,4 ns±0,7
VMH1	31	11,3	2,3 ns±0,4	3,5 ns±1,04	5,1 ns±0,5
VMH2	25	34,8	7,0 ns±4,3	3,4 ns±1,0	5,5 ns±1,4
VE	32	13,7	3,4 ns±1,8	4,3 ns±1,4	5,9 ns±1,2
VEH1	38	23,4	7,8 ns±4,2	3,2 ns±0,6	7,7 ns±1,7
VEH2	30	29,5	5,9 ns±3,3	3,0 ns±1,5	5,3 ns±0,7

**Tabela 1 – Trat.:** tratamentos. **V:** vegetal; **VH1:** vegetal e 153 µl de hidrocarboneto; **VH2:** vegetal e 4,7ml de tolueno; **VE:** vegetal e esporos de FMAs; **VEH1:** vegetal, esporos de FMAs e 153µl de tolueno; **VEH2:** vegetal, esporos de FMAs e 4,7ml de tolueno; **VMH1:** vegetal, fragmentos de raízes micorrizadas de *R. marítima* e 153µl de tolueno; **VMH2:** vegetal, fragmentos de raízes micorrizadas de *R. marítima* e 4,7ml de tolueno. **2-Mf, Af e Cr** : médias de massa seca foliar, altura foliar e comprimento da raiz, respectivamente, com desvio padrão. **G<sub>t</sub>:** Germinação total. **Mf<sub>t</sub>:** massa seca foliar total por tratamento após estresse hídrico; 3- Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p< 0,05, n=5)

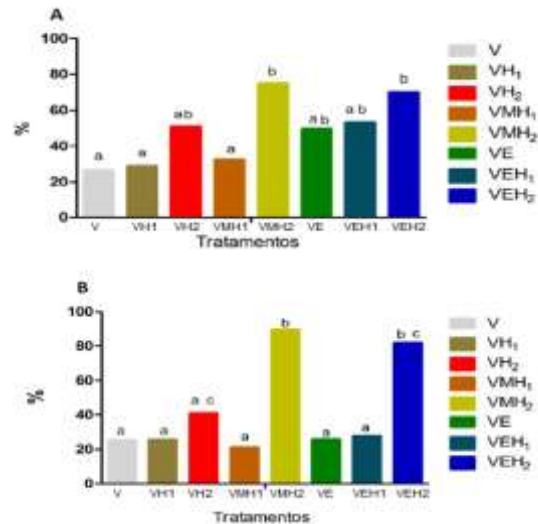
Na figura 1 são observados os percentuais de germinação e de sobrevivência do vegetal-teste. Esses percentuais foram calculados levando-se em consideração o percentual de cada vaso, obtendo-se a partir daí a média que cada tratamento apresentava.

**Figura 1-** Percentuais de germinação de sementes de *B. decumbens* em 30 dias de cultivo na presença FMAs e tolueno.



Os resultados mais expressivos em relação à influência dos FMAs na sobrevivência das plantas submetida a estresse hídrico na presença do contaminante estão apresentados nas figuras 2A e 2B, onde foi observado que os tratamentos inoculados com fragmentos de raízes micorrizadas de *R. marítima* (VMH2) e com esporos de FMAs (VEH2), ambos com a maior concentração de tolueno, apresentaram os maiores percentuais médios de sobrevivência após o estresse aplicado (89,6± 12,5 e 81,7± 22,1, respectivamente). Demonstrando que houve uma aparente influência do fungo no crescimento do vegetal na presença de tolueno.

**Figura 2- (A)** Percentual médio de sobrevivência de *B. decumbens* após 25 dias de cultivo na presença FMAs e na presença de tolueno e antes do estresse hídrico de 5 dias **(B)** Percentual médio de sobrevivência de *B. decumbens* após 30 dias de cultivo na presença FMAs e tolueno, após estresse hídrico de 5 dias. Letras iguais no topo das barras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).



O desempenho do vegetal sem inoculação e submetido à concentração maior de tolueno, implica em um estudo mais aprofundado do potencial fitorremediador da *B. decumbens*, que na ausência de FMAs pode utilizar um dos caminhos metabólicos da fitorremediação. Os tratamentos que apresentaram menor percentual de plântulas sobreviventes à cessação de regas foram os não-inoculados ou inoculados que receberam dose de tolueno em menor concentração. Neste bioensaio não se optou por realizar desinfestação dos esporos nem dos fragmentos de raízes de *R. marítima* utilizados no inoculo, Soares (2009) cita mecanismos metabólicos associados a bactérias promotoras do crescimento de plantas simbióticas de FMAs que podem melhorar o desempenho da planta sob condições de estresse e aumentar o rendimento. Tais mecanismos simbióticos podem estar envolvidos na utilização do hidrocarboneto pelo fungo como fonte de carbono, refletindo em maior crescimento micelial e maior influência na sobrevivência da planta. Observou-se ainda que o tratamento controle (V), apesar do percentual de germinação (46,7 ± 17,3) ter se mantido estatisticamente similar ao da média do experimento (51,0 ± 6,2%), obteve o menor percentual total de sobrevivência (26,5 ± 12,5 %) após o estresse hídrico, o que pode refletir os efeitos distróicos do solo sobre o vegetal, e, conseqüentemente, a dificuldade do vegetal resistir a estresse abiótico na ausência de micorrizas. Quanto à análise de variância não ter revelado efeito significativo no percentual de germinação das sementes, Gorgosz (2010) destaca a importância de pesquisas que



avaliaram a ação inibitória do efeito tóxico do petróleo sobre a germinação de sementes de diversas espécies vegetais, destacando que a germinação de sementes pode ser inibida pelo efeito tóxico do petróleo ou por condições desfavoráveis do solo. Paula (2007) aponta que os efeitos tóxicos de poluentes orgânicos também podem ocorrer sobre FMAs, inibindo a colonização micorrízica.

### CONCLUSÃO

No bioensaio, a presença de propágulos de FMAs de *R. maritima* promoveu maior tolerância ao poluente e ao estresse hídrico em *B. decumbens*, cujo percentual médio de sobrevivência para os tratamentos com maior concentração de tolueno, inoculados com fragmentos de raízes micorrizadas de *R. maritima* provenientes da área de estudo, foi de 89,6%. Este resultado indica a importância desse vegetal, e sua associação com FMAs, em processos de biorremediação de solos contaminados com hidrocarboneto do petróleo.

### REFERÊNCIAS

- ARAUJO, D. S. D. *et al.* Área De Proteção Ambiental De Massambaba, Rio De Janeiro: Caracterização Fitofisionômica e Florística - **Rodriguésia** 60 (1): 067-096. 2009.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A; FONSECA, H. M. A. C. Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito Além da Nutrição. In **Nutrição Mineral das Plantas**. SBCS, Viçosa, 2006: 53 -85, (ed. FERNANDES, M.S.). 432p.
- BOHRER, C. B. A. *et al.* Mapeamento Da Vegetação E Do Uso Do Solo No Centro De Diversidade Vegetal De Cabo Frio, Rio De Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 60 (1): 001-023. 2009.
- BRAGA, T. V. S. **Associações com fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio em *Allagoptera arenaria* (Gomes) O. Kuntze na restinga de Marambaia, R.J.** 2008. 33 f. Monografia, programa de graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.
- BRUNDRETT, M. Mycorrhizas in natural ecosystems. **Adv. Ecol. Res.** 21, 171–313.1991. Disponível em <<http://pt.scribd.com/doc/51667302/Mycorrhizas-in-Natural-Ecosystems>> Acesso em 01 jun 2011.
- CAMPOS, S. de . Tóxicos/Intoxicações - Tolueno-Propriedades e Características. 2004. Disponível em <<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/12098>> acesso em 01 de set 2012.
- FORSTER, L. M. K; *et al.* Toxicologia DO tolueno: Aspectos relacionados ao Abuso. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v 28, n. 2, abril 1994. Disponível a partir do <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89101994000200011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101994000200011&lng=en&nrm=iso)>.
- Acesso em 02 de setembro 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101994000200011>.
- GASPAR-OLIVEIRA, C. M. *et al.* Manutenção da umidade do substrato durante o teste de germinação de *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 3, p.46-53, 2007
- GOGOSZ, A.M. *et al.* Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. **Braz. J. Biol.**, 2010, vol. 70, no. 4, p. 977-986
- OGBO, M.E.; OKHUOYA, J.A.; ANAZICIH, O.C. 2006. Effet of different levels of spent lubricating oil on the growth of *Pleurotus tuber-regium* friesinger. *Nigerian Journal of Botany* 19(2):266-70
- OLIVEIRA, K.M.P.G. de; ARBILLA, G. ; SILVA, L.S.V. Monitoramento de BTEX em um Posto de Combustíveis na Cidade de Niterói. XI Encontro da SBQ-Rio de Janeiro Universidade Federal Fluminense, out 2007.
- PAULA, A. M. ; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J.O.-Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*- R. Bras. Ci. Solo, 31:805-811, 2007.
- SAGGIN JÚNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. : Micorriza Arbuscular - Papel, funcionamento e aplicação da simbiose.. In: Adriana Maria de Aquino; Renato Linhares de Assis. (Org.). **Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável**.1ed.Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, v. 1, p. 101-149.
- SILVA, C. M. *et al.* Production of phenol-oxidases and peroxidases by fungi isolated from irrigated rice. **Braz. J. Microbiol.** [online]. 2003, vol.34, suppl.1, pp. 53-55. ISSN 1517-8382.
- SILVA, L. J. **Processo de Landfarming para Tratamento de Resíduos Oleosos**. PROGRAMA EQ-ANP Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural Processo. UFRJ. 2009. Disponível em: < <http://www.eq.ufrj.br/prh13/download/?prh13-processo-de-landfarming-tratamento-residuos-oleosos.pdf> > (Dissertação de Mestrado). Acesso em: 06 jun.2010.
- SOARES, S.A.G. *et al.* Efeito de bactérias na germinação de fungos Micorrízicos arbusculares e co-inoculação em mudas de abacaxizeiro. **Caatinga (Mossoró,Brasil)**, v.22, n.2, p.31-38, abril/junho de 2009.
- SOUZA, 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 1516-06.