

POTENCIAL FITORREMEIADOR DE SABIÁ  
(*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) ASSOCIADA A FUNGO  
MICORRÍZICO ARBUSCULAR EM SOLO CONTAMINADO COM  
ÓLEO DIESEL

**HELOISA CINTRA ALVES PINTO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2016

POTENCIAL FITORREMEIADOR DE SABIÁ  
(*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) ASSOCIADA A FUNGO  
MICORRÍZICO ARBUSCULAR EM SOLO CONTAMINADO COM  
ÓLEO DIESEL

**HELOISA CINTRA ALVES PINTO**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.”

Orientador: Prof. Marco Antonio Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

37/2016

Pinto, Heloisa Cintra Alves

Potencial fitorremediador de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) associada a fungo micorrizico arbuscular em solo contaminado com óleo diesel / Heloisa Cintra Alves Pinto. – Campos dos Goytacazes, 2016.

66 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Solos. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Marco Antonio Martins.

Área de concentração: Produção vegetal com foco em microbiologia dos solos.

Bibliografia: f. 50-66.

1. BIORREMEDIAÇÃO 2. HIDROCARBONETOS 3. LEGUMINOSA 4. MICORRIZA I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Solos II. Título

CDD

363.7396

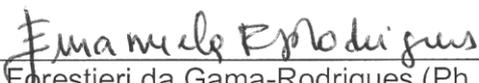
POTENCIAL FITORREMEIADOR DE SABIÁ  
(*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) ASSOCIADO A FUNGO  
MICORRÍZICO ARBUSCULAR EM UM SOLO CONTAMINADO COM  
ÓLEO DIESEL

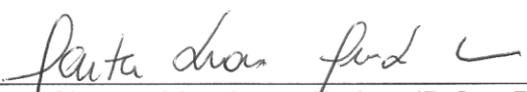
**HELOISA CINTRA ALVES PINTO**

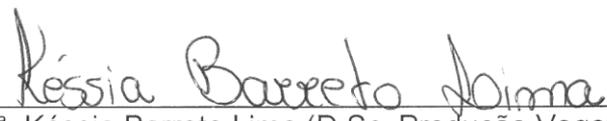
"Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal."

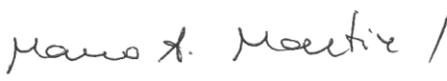
Aprovada em 25 de fevereiro de 2016

Comissão Examinadora:

  
Prof<sup>a</sup>. Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues (Ph.D., Ciência do Solo) – UENF

  
Prof<sup>a</sup> Marta Simone Mendonça Freitas (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

  
Prof<sup>a</sup>. Késsia Barreto Lima (D.Sc, Produção Vegetal) - FAETEC

  
Prof. Marco Antonio Martins (Ph.D., Microbiologia do Solo) – UENF  
Orientador

## **Dedico**

A Deus;

Ao meu amado e querido avô Edmar Pinto (*in memoriam*).

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelas bênçãos, proteção e cuidado em cada detalhe da minha vida;  
Aos meus pais, Alvino e Gisélia, pelos ensinamentos, investimento, incentivo, companheirismo, orações e, principalmente, por todo amor a mim dedicado;  
A Heverton, pela força, paciência e perseverança, fundamentais para superarmos juntos essa caminhada a distância. Obrigada por tudo!  
A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e aos professores das disciplinas cursadas, pelos ensinamentos transmitidos;  
A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo;  
Ao Professor Marco Antônio, pelo impulso acadêmico, pela orientação, pela confiança depositada, pelas críticas e sugestões durante a realização desse trabalho, e por respeitar e identificar com tanto cuidado as minhas características;  
À Prof<sup>a</sup>. Emanuela Forestieri, por ter aberto as portas do LSOL126 no ano de 2013 para que eu pudesse fazer um estágio, fazendo brotar em mim a vontade de fazer parte dessa universidade junto à equipe de solos;  
À amiga e orientadora na graduação, Prof<sup>a</sup>. Patrícia Barreto, por acreditar no meu potencial, e por toda ajuda antes e durante minha caminhada na UENF;

Ao Prof. Almy Junior, por ter cedido o espaço na casa de vegetação no momento da condução do experimento. À Prof<sup>a</sup>. Marta Simone, por ter me dado um direcionamento inicial para que os meus objetivos fossem bastante claros no desenvolvimento desse trabalho;

A Milene e Bernardo por terem acolhido e hospedado a mim e a minha mãe logo quando chegamos a Campos. Agradeço a gentileza, o cuidado, a simpatia e a boa vontade que vocês tiveram e têm com a gente;

Às minhas amigas e companheiras de casa, antigas e novas, Tássia, Laura, Dani e Laís, pela cumplicidade de cada uma de vocês;

À Técnica Andréia Riter, por toda ajuda, conselhos, competência, paciência em ensinar, e, claro, pelas brincadeiras e risadas diárias. Aos Técnicos Kátia, Vanilda, Ederaldo e Acácio, por toda ajuda durante as análises. Ao funcionário de apoio de campo Sr. Zélio pelo apoio físico em casa de vegetação;

Aos companheiros de Laboratório, Raphael e Rosana, pelo companheirismo e colaboração. A Késsia e Sumaya, pelas doses a mais de alegria deixadas em suas idas ao laboratório. A Armando, que sempre tinha uma dica de literatura importante para o entendimento das micorrizas. Em especial ao meu amigo Fernando, que esteve sempre ao meu lado, fazendo papel de amigo, companheiro e *papito*;

Aos amigos e parceiros de disciplinas, Fabrício, Laís, Nathânia, Jovi, Kari e Rose, pela ajuda, amizade e momentos incríveis que compartilhamos;

A Thaís e Giovanna por todo auxílio que me foi dado, além da agradável companhia. A Taiane pelas orações, auxílio, e suas palavras de amor e fé que fizeram os meus dias mais leves;

À amiga Renata Santos, que, junto com seu marido Rafael e sua filhinha Olga, me hospedaram em sua casa em Seropédica e cuidaram de mim. Obrigada por terem me recebido e por terem sido tão amáveis!

À Prof<sup>a</sup>. Maria Elizabeth, pela oportunidade de realizar parte desse trabalho no laboratório de Fauna do Solo, na Embrapa Agrobiologia, e ao Técnico Roberto Oliveira pela ajuda. Em especial a Rafael Scoriza, por ter intermediado todo esse processo, e por toda colaboração tanto na execução das avaliações quanto na construção de ideias e análise dos dados ao longo desse trabalho;

Enfim, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para essa conquista.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1. Objetivos Específicos .....	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1. Óleo diesel e os Hidrocarbonetos .....	4
3.2. Fitorremediação .....	7
3.3. Sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.) .....	9
3.4. Fungos Micorrízicos Arbusculares .....	11
3.5. Ensaio ecotoxicológicos .....	14
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
4.1 Local de condução do experimento .....	16
4.1.1 Delineamento experimental.....	18
4.1.2 Características do solo.....	18
4.1.3 Preparo do inóculo .....	19

4.1.4 Tratamento das sementes.....	20
4.1.5 Instalação do experimento .....	20
4.1.6 População microbiana total no solo .....	21
4.1.7 Avaliação dos índices biométricos .....	21
4.1.8 Análise nutricional da parte aérea.....	22
4.1.9 Avaliação da taxa de colonização micorrízica.....	22
4.1.10 Análise estatística .....	22
4.2 Ensaio ecotoxicológicos .....	22
4.2.1 Análise estatística .....	24
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
5.1 Índices Biométricos .....	25
5.2 Índice SPAD.....	29
5.3 Taxa de Colonização Micorrízica .....	32
5.4 Teor e conteúdo nutricional da parte aérea .....	34
5.5 População microbiana total no solo .....	38
5.6 Ensaio Ecotoxicológicos.....	41
<b>6. RESUMO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>49</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

## RESUMO

PINTO, HELOISA CINTRA ALVES, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro, 2016. Potencial fitorremediador de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) associada a fungo micorrízico arbuscular em solo contaminado com óleo diesel. Orientador: Marco Antonio Martins.

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o potencial fitorremediador da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., utilizando como indicadores a sobrevivência e a reprodução de *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* em ensaios ecotoxicológicos, em diferentes concentrações de óleo diesel no solo e verificar se a associação com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Claroideoglossum etunicatum* poderia influenciar nesse processo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com delineamento em blocos casualizados (DBC), em arranjo fatorial 2 x 5, sendo 2 tratamentos microbiológicos (com e sem inoculação com o FMA *Claroideoglossum etunicatum*) e 5 concentrações de óleo diesel (0%, 0,5%, 1%, 2% e 3%), com quatro repetições. Foram avaliados: índice Soil-Plant Analysis Development (SPAD); população microbiana total no solo; índices biométricos: altura, diâmetro do coleto, massa seca da parte aérea, massa seca das raízes, número de folíolos, área foliar e características do desenvolvimento radicular (volume e comprimento); análise nutricional da parte

aérea; avaliação da taxa de colonização micorrízica e ensaios ecotoxicológicos. O solo contaminado com óleo diesel refletiu em redução no índice SPAD, inibição na colonização micorrízica, crescimento limitado da *M. caesalpiniiifolia*, além da redução das UFC de fungos e bactérias totais no solo, demonstrando seu elevado potencial de impacto. Apesar do baixo crescimento das plantas, a *M. caesalpiniiifolia* apresentou 100% de sobrevivência, independente do tratamento utilizado. Os teores nutricionais demonstraram que independente da inoculação com o FMA *Claroideoglossum etunicatum*, a *Mimosa caesalpiniaefolia* acumulou quantidades satisfatórias de nitrogênio, cálcio, potássio, fósforo e magnésio, mesmo em solo contaminado com óleo diesel, porém, a análise dos conteúdos nutricionais revelou o efeito prejudicial do óleo diesel na aquisição desses nutrientes pelas plantas. Os ensaios ecotoxicológicos demonstraram que mesmo em um curto prazo, a leguminosa arbórea *Mimosa caesalpiniiifolia* promoveu a fitorremediação de solo contaminado por óleo diesel, principalmente quando inoculada com o FMA *Claroideoglossum etunicatum*. No entanto, embora tenha sido comprovada a fitorremediação, os resultados obtidos não permitem indicar com detalhes como isto ocorreu. A *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. demonstrou capacidade de tolerância ao contaminante e pode ser indicada como espécie com potencial fitorremediador em solo contaminado com óleo diesel em pequenas concentrações, sobretudo quando inoculada com o FMA *Claroideoglossum etunicatum*. Diante da atenuação dos efeitos tóxicos do óleo diesel no solo promovida pela *Mimosa caesalpiniiifolia*, precisam ser realizados nossos estudos, através de um tempo maior de avaliação, para determinar com detalhes quais são os mecanismos de fitorremediação estimulados por essa espécie vegetal.

**Palavras-chave:** biorremediação, hidrocarbonetos, leguminosa, micorriza.

## ABSTRACT

PINTO, HELOISA CINTRA ALVES, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2016. Phytoremediation potential of sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) associated with arbuscular mycorrhizal fungi in soil contaminated with diesel oil. Advisor: Marco Antonio Martins.

This study aimed to evaluate the phytoremediation potential of *Mimosa caesalpinifolia* Benth. species, using as indicators the survival and reproduction of *Folsomia candida* and *Enchytraeus crypticus* in ecotoxicological tests, in different diesel concentrations in soil and verify that the association with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) *Claroideoglossum etunicatum* could influence this process. The experiment was conducted in a greenhouse in a randomized block design (RBD) in factorial 2 x 5, 2 microbiological treatments (with and without inoculation with the AMF *Claroideoglossum etunicatum*) and 5 diesel oil concentrations (0% 0.5%, 1%, 2% and 3%), with four replications. Were evaluated index Soil-Plant Analysis Development (SPAD); the total microbial population in the soil; biometric indices: height, stem diameter, shoot dry weight, dry weight of roots, number of leaflets, leaf area and characteristics of root growth (volume and length); nutritional analysis of the shoot; root colonization rate and ecotoxicological tests. The soil contaminated with diesel reflected in reduced SPAD index, inhibition of mycorrhizal colonization, limited growth of *M.*

*caesalpiniiifolia*, besides the reduction of CFU total fungi and bacteria in the soil, demonstrating its high potential impact. Despite the low growth of plants, *M. caesalpiniiifolia* showed 100% survival, regardless of the treatment used. The nutritional content showed that independent inoculation with the AMF *Claroideoglossum etunicatum*, *Mimosa caesalpiniaefolia* accumulated satisfactory amounts of nitrogen, calcium, potassium, phosphorus and magnesium, even in soil contaminated with diesel oil, however, the analysis of the nutritional content revealed the detrimental effect diesel oil in the acquisition of these nutrients by plants. The ecotoxicological tests have shown that even in a short term, leguminous *Mimosa caesalpiniiifolia* promoted the phytoremediation of soil contaminated by diesel oil, especially when inoculated with AMF *Claroideoglossum etunicatum*. However, although it has been proven to phytoremediation, the results obtained allow not indicate in detail how this occurred. *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. demonstrated ability of tolerance to contaminants and may be indicated as a species with phytoremediation potential soil contaminated with diesel oil at low concentrations, especially when inoculated with AMF *Claroideoglossum etunicatum*. Given the mitigation of the toxic effects of diesel oil in the soil promoted by *Mimosa caesalpiniiifolia* need to be carried out our studies, through a long evaluation to determine in detail what are the phytoremediation mechanisms stimulated by this plant species.

**Keywords:** bioremediation, hydrocarbons, leguminous, mycorrhizal.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP (2015a), o consumo de petróleo e seus derivados no país tem aumentado consideravelmente, principalmente devido ao aumento da frota de veículos automotores, contribuindo, desta forma, para o aumento do risco de possíveis acidentes ambientais ao longo da cadeia produtiva de seus derivados. Esses acidentes podem ser provocados por falhas mecânicas ou humanas nas atividades de extração, transporte e armazenamento, representando ameaça de contaminação do solo e água através dos hidrocarbonetos derivados de petróleo, que, mesmo em baixas concentrações, podem ser perigosos à saúde humana, bem como ao meio ambiente (Souza et al., 2010).

De acordo com a Confederação Nacional do Transporte – CNT (2012), o óleo diesel é um combustível derivado do petróleo que possui uma composição complexa, constituído especialmente por hidrocarbonetos que são formados por átomos de carbono, hidrogênio e, em menores concentrações, por enxofre, nitrogênio e oxigênio. Além disso, relacionados aos produtos de petróleo refinado, como é o caso do óleo diesel, os chamados de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzenos e xilenos) são gerados durante o processo de destilação (Robbins et al., 1993).

Acredita-se que uma técnica eficaz na recuperação de solos contaminados com óleo diesel é a fitorremediação, que utiliza plantas e suas associações com microrganismos para remediar áreas contaminadas, contribuindo na melhoria das características físicas e químicas do local (Gratão et al., 2005; Peuke e Rennenberg, 2005; Kavamura e Esposito, 2010; Colodete et al., 2014). A recuperação de locais contaminados com hidrocarbonetos pode ser facilitada utilizando-se plantas associadas a fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), visto que a micorrização aumenta a resistência da planta a diferentes tipos de estresse (Leyval et al., 2002). Estes fungos também proporcionam maior crescimento vegetal, devido à melhor absorção de nutrientes, principalmente o fósforo (P) (Rabie, 2005).

A grande maioria das espécies de leguminosas são plantas micorrizáveis, possuindo, na associação com FMAs, um incremento na eficiência de absorção de nutrientes (Barea e Azcón-Aguilar, 1983). A espécie leguminosa arbórea *Mimosa caesalpinifolia* Benth., conhecida como sabiá, que, em habitat natural, encontra-se geralmente associada a fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (Almeida, 1986), pode ser uma espécie viável para utilização em processos de bio/fitorremediação em solos contaminados por óleo diesel.

Os ensaios ecotoxicológicos são ferramentas capazes de refletir a eficácia de ações de remediação, avaliando a qualidade de um solo contaminado (Sisinno et al., 2006). A ecotoxicologia pode ser definida como o estudo dos riscos que as substâncias químicas perigosas podem causar no ecossistema (Lynch et al., 2001). Dessa forma, os testes de toxicidade, através da medida de biodisponibilidade dos contaminantes, são capazes de fornecer subsídios para o estabelecimento de conexão entre a contaminação de uma área e seus efeitos ecológicos resultantes (Linhurst et al., 1995), antes que esses efeitos possam se manifestar em nível de população, comunidades e ecossistemas (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008).

Nesse sentido, entre as espécies de plantas leguminosas arbóreas com características ecológicas de constituir simbiose, a sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) apresenta-se com potencial de criar um ecossistema mais equilibrado capaz de fornecer subsídios para potencializar o processo de fitorremediação em solo contaminado com óleo diesel.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar o potencial fitorremediador da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., utilizando como indicadores a sobrevivência e a reprodução de *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* em ensaios ecotoxicológicos, a diferentes concentrações de óleo diesel no solo e verificar se a associação com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Claroideoglossum etunicatum* pode influenciar nesse processo.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a tolerância de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. ao óleo diesel, através do crescimento e da sobrevivência da espécie em solo contaminado com diferentes concentrações do contaminante;
- Avaliar a influência do fungo micorrízico arbuscular *Claroideoglossum etunicatum* na tolerância das plantas ao óleo diesel;
- Avaliar o potencial fitorremediador da *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. através de testes ecotoxicológicos de sobrevivência e reprodução de *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus*.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Óleo diesel e os Hidrocarbonetos**

Com o surgimento da revolução industrial e da consequente mudança na sociedade, o século XIX foi marcado pela necessidade do aumento de fontes energéticas, passando a ser utilizadas fontes não renováveis como os combustíveis fósseis. Assim, o petróleo ganhou destaque devido ao seu alto poder energético (Silva et al., 2003).

O petróleo pode ser definido como uma mistura de hidrocarbonetos constituída de diferentes moléculas compostas por átomos de hidrogênio e carbono e, em parte menor, oxigênio, nitrogênio e enxofre, agrupados de maneira variável (Zílio e Pinto, 2002). Dentre esses hidrocarbonetos, os policíclicos aromáticos (HPAs) constituem um grupo de alta persistência no meio ambiente (Aguiar et al., 2012).

Segundo a ANP (2015b), a produção total de petróleo no Brasil no mês de janeiro de 2015 atingiu 2,469 milhões de barris diários de petróleo. Isso

representa um aumento de 20,3% na produção de petróleo se comparado com o mesmo mês em 2014.

Cerca de 93,4% da produção de petróleo do Brasil foram extraídos de campos marítimos. Na bacia de Campos, Roncador foi o campo de maior produção de petróleo, com uma média de 346,6 mil barris por dia, e Marlim, o campo marítimo com maior número de poços produtores, 61 no total (ANP, 2015b).

O comércio de óleo diesel no Brasil é regulamentado pela ANP e pela Lei Federal 9.478/97 (Lei do Petróleo), e, de acordo com a CNT (2012), o óleo diesel é o derivado do petróleo mais popular no Brasil, especialmente em motores de combustão. Isso se deve à maior durabilidade dos motores movidos a diesel, além de apresentar menores preços quando comparado a outros combustíveis (Chhibber et al., 2012).

O diesel é oriundo do processo de destilação fracionada de petróleo cru, composto de uma mistura de alcanos de cadeias simples e ramificadas, bem como de compostos cíclicos e aromáticos, na faixa de 9 a 28 átomos de carbono em sua cadeia, e, em menor proporção, por oxigênio, nitrogênio e enxofre (Adam e Duncan, 1999; Dal Forno, 2006; Bucker et al., 2011).

Sua disseminação teve início no início do século XX, quando havia abundância de petróleo e o seu refino era de baixo custo, fazendo com que os óleos vegetais fossem substituídos pelo óleo refinado de petróleo, denominado "óleo diesel" (Silva e Freitas, 2008).

Segundo a empresa Petróleo Brasileiro S. A. – PETROBRAS (2012), os principais tipos de óleo diesel são: tipo A (diesel automotivo) e tipo B (diesel metropolitano). O diesel tipo B difere do tipo A por possuir no máximo 0,5 % de enxofre e ter adição de biodiesel.

Comparando as vendas de combustíveis no mercado brasileiro entre 2013 e 2014, observa-se um acréscimo no consumo de óleo diesel B e de biodiesel de 2,49% e 16,45%, respectivamente. Isso ocorreu devido ao aumento do teor de adição de biodiesel ao óleo diesel A de 5% para 6% em julho de 2014, e de 6% para 7% em novembro de 2014 (ANP, 2015a).

Como consequência das atividades econômicas e industriais, solos e corpos hídricos são contaminados com hidrocarbonetos de produtos

petroquímicos, gerando impactos e limitando seus usos (Marques et al., 2011; Neves et al., 2012).

A contaminação do solo causada por petróleo e seus derivados, que ocorre principalmente através de vazamentos pontuais dos tanques subterrâneos de armazenamento em postos de abastecimento, é refletida em inúmeros danos ambientais (Brito et al., 2010). Isso ocorre devido à elevada toxicidade apresentada pelos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), compostos orgânicos voláteis (COV) e os chamados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), comuns em áreas contaminadas por petróleo e derivados (Andrade et al., 2010).

O solo, quando contaminado com óleo diesel, tem suas características físico-químicas e biológicas alteradas decorrentes da hidrofobicidade dos hidrocarbonetos presentes no contaminante (Lozano-Garcia et al., 2011), além de ter sua capacidade de produção reduzida, com consequentes perdas econômicas (Thapa et al., 2012).

A ANP, através da Resolução nº 50/2013, estabeleceu as mais recentes especificações de óleo diesel com baixo teor de enxofre. Em 2009, iniciou a migração do óleo diesel S1800 para o S500 e em 2012 a entrada do novo diesel com o mais baixo teor de enxofre na época, o S50, contendo 50 ppm de enxofre em sua composição, substituído desde 2013 pelo S10 (ANP, 2013).

O S10 possui teor máximo de enxofre de 10 ppm (partes por milhão) e foi desenvolvido visando a mais nova geração de motores diesel que foram feitos para emitirem teores reduzidos de material particulado e NOx, comparados àqueles produzidos até dezembro de 2011 (PETROBRAS, 2012). Através dessa redução no teor de enxofre há uma restrição na emissão de gases nocivos durante a combustão do óleo, tornando-o menos poluidor (CNT, 2012).

ANP determinou em 1º de janeiro de 2014 que somente os tipos S10 e S500 (10 partículas por milhão – ppm / 500 ppm) podem ser vendidos no país, ao mesmo tempo em que extinguiu do mercado o diesel S50 e S1800 para a frota de caminhões, ônibus e outros veículos comerciais leves. Dessa forma, o óleo diesel automotivo atualmente consiste em uma mistura de 5% de biodiesel e 95% de óleo mineral (PETROBRAS, 2012).

O biodiesel ganhou espaço na substituição total ou parcial do petrodiesel, sem modificações mecânicas relevantes ou gastos em manutenção, devido às

suas propriedades físico-químicas se apresentarem similares ao diesel (Demirbas, 2009; Chhibber, 2012). Tratando-se de um combustível oriundo de fontes renováveis, o biodiesel é derivado da reação química de óleos vegetais, gordura animal ou outros produtos existentes na biomassa, com álcool na presença de um catalisador (Cunha, 2008; Demirbas, 2008).

A utilização do biodiesel sugere vantagens em termos ambientais, pois sua combustão gera menor quantidade de poluentes, diminuindo a emissão atmosférica de óxidos de enxofre, monóxido de carbono, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e material particulado (Demirbas, 2009; Aworanti et al., 2012). Comparado aos combustíveis convencionais, o biodiesel possui ainda uma vantagem quanto à sua biodegradabilidade, que é favorecida pelas cadeias de hidrocarbonetos alifáticos, na faixa de 16 a 18 átomos de carbono em sua cadeia (ácidos graxos), ausência de moléculas aromáticas, propriedades higroscópicas e disponibilidade de ligações éster de alta energia (Passman et al., 2005; Leung et al., 2006; Demirbas, 2009; Knothe, 2010).

Tendo em vista a grande ameaça ambiental que a contaminação do solo por petróleo e seus derivados representa, torna-se importante a avaliação dos seus efeitos tóxicos em locais contaminados (Knothe, 2010; Leme et al., 2011; Masakorala et al., 2013) com perspectivas de ações sustentáveis capazes de mitigar os impactos advindos da atividade de exploração de petróleo.

### **3.2 Fitorremediação**

A legislação brasileira determina que as áreas contaminadas precisam ser remediadas com o propósito de minimizar a perturbação ambiental e promover a recuperação dos ecossistemas (Souza et al., 2010), porém, as técnicas convencionais utilizadas para a remediação de solos contaminados por HPA são muito onerosas, demoradas e por vezes ineficientes. Nesse sentido, várias alternativas mais sustentáveis de remediação têm sido desenvolvidas a fim de reduzir os riscos ambientais (Accioly e Siqueira, 2000; Nocentini et al., 2000; Rock, 2003, Van Aken et al., 2010).

Entre as diversas técnicas de despoluição ambiental que vêm sendo desenvolvidas, pode-se destacar a biorremediação, que consiste em uma técnica de baixo custo, já que não há uso de equipamentos que consomem energia e necessitem de manutenção, além de auxiliar no controle da erosão, restauração

do local e possuir maior aceitação pública (Muratova et al., 2008; Gerhardt et al., 2009; Kathi e Khan, 2011).

Esta técnica baseia-se na aceleração do processo natural de biodegradação de certas substâncias em ambientes poluídos, através de plantas e microrganismos visando reduzir a concentração e/ou a toxicidade de determinados poluentes (Salt et al., 1998).

Dentro da biorremediação insere-se a fitorremediação, que utiliza plantas que são bastante promissoras para a descontaminação de uma diversidade de poluentes ambientais orgânicos e inorgânicos, para a extração, imobilização e/ou degradação de contaminantes, visando mitigar as áreas contaminadas (Macek et al., 2000; Burken, 2003; Coutinho e Barbosa, 2007). A fitorremediação é uma estratégia adotada na descontaminação de sítios afetados por compostos xenobióticos, que persistem no ambiente, tais como o petróleo e seus derivados (Coutinho e Barbosa, 2007; Lamego e Vidal, 2007; Andrade et al., 2010; Nie et al., 2011; Vieira et al., 2011; Aguiar et al., 2012; Colla et al., 2013; Tramontini, 2013; Naseri et al., 2014).

Apesar de suas limitações, a fitorremediação é uma técnica eficaz e pode ser classificada dependendo dos mecanismos empregados. São eles: *Fitoestabilização* - processo que utiliza a planta para limitar a biodisponibilidade do contaminante, reduzindo a mobilidade do poluente no solo; *Fitoextração* - prática aplicada especialmente para metais, que envolve a absorção do contaminante pelas raízes com posterior transferência para a parte aérea onde é estocado; *Fitovolatilização* - utiliza da capacidade metabólica de plantas e microrganismos associados à rizosfera para converter os poluentes em compostos voláteis em formas não tóxicas com posterior liberação para a atmosfera; *Rizofiltração* – emprega o sistema radicular de plantas terrestres na absorção, concentração e/ou precipitação dos poluentes de um meio aquoso, especialmente metais pesados ou elementos radiativos; *Fitoestimulação* (ou rizodegradação) – degrada os poluentes orgânicos por micro-organismos na rizosfera da planta (Glass, 1999; Newman, 2004; Gratão, 2005; Pilon-Smits, 2005; Kaimi et al., 2006; Wenzel, 2009; Coutinho et al., 2015).

Na demanda por alternativas para descontaminar áreas afetadas por diferentes compostos orgânicos, tem-se destacado soluções que envolvam a eficiência na descontaminação de forma simples e com baixo custo. Entretanto,

segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB (2013), apesar das suas diversas vantagens, a fitorremediação é a técnica menos empregada para remediar as áreas contaminadas.

Entre as limitações apresentadas pela fitorremediação de compostos orgânicos em geral, destacam-se a dificuldade para selecionar plantas, o longo tempo requerido para obtenção de descontaminação, o clima e as condições edáficas que podem interferir no crescimento da planta, e o impedimento na introdução da planta no local contaminado devido a um elevado nível de contaminação (Cunningham et al., 1996; Macek et al., 2000). Para tanto, é de fundamental importância que a planta escolhida para esse processo possua boa capacidade de absorção, um sistema radicular profundo, alta produção de biomassa, elevada taxa de crescimento e que demonstre resistência ao poluente (Coutinho e Barbosa, 2007; Lamego e Vidal, 2007).

### **3.3 Sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.)**

A *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. é uma espécie de leguminosa arbórea tropical pertencente à família Leguminosae e subfamília Mimosoideae, comumente conhecida como sabiá, sansão-do-campo, unha-de-gato, cebiá e angiquinho-sabiá, que exibe resistência à seca e desenvolve-se bem em áreas degradadas (Rizzini, 1978; Almeida et al., 1986; Almeida et al., 1987; Burity et al., 2000; Stamford e Silva, 2000; Lorenzi, 2002; Figueirôa et al., 2005; Carvalho, 2007; Mendonça et al., 2008; Balbinot et al., 2010).

A espécie possui um sistema radicular bem desenvolvido, apropriado para absorver e reciclar nutrientes de horizontes mais profundos do solo, sendo acumulados na superfície na forma de serapilheira, expressa por uma baixa relação C/N, sendo fonte eminente de matéria orgânica (Franco e Faria, 1997).

As mudas alcançam altura desejável para plantio com aproximadamente três meses após a semeadura (Carvalho, 2006). As árvores maiores, na idade adulta, chegam a atingir dimensões aproximadas de 10 m de altura e 30 cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido a 1,30 m do solo) (Carvalho, 2007).

Graças à sua forma entouceirada, sua madeira é empregada como cerca viva (Lorenzi, 2002), e devido à sua rusticidade, é amplamente cultivada para fins de estacas e caibros, geralmente com diâmetro de 8 cm, podendo ser utilizada entre 4 e 6 anos de idade (Carvalho, 2007).

Seus frutos são do tipo legumes articulados, planos, de até 10 cm de comprimento e até 13 mm de espessura. Suas flores são brancas agrupadas em espigas cilíndricas e às vezes organizadas em panículas terminais. Suas sementes possuem dormência tegumentar, são lisas e duras, medindo de 5 a 8 mm de diâmetro (Rizzini, 1978; Figueirôa et al., 2005).

Nativa do bioma Caatinga (Maia, 2004), o sabiá é uma espécie que ocorre do estado do Maranhão até a Bahia (Lorenzi, 2002; Figueirôa et al., 2005), com presença relevante no Estado do Rio de Janeiro, onde se desenvolve facilmente apesar do clima úmido (Barneby, 1991; Aguiar Sobrinho, 1995; Gonçalves et al., 1999), e desponta como subespontânea, sendo observada de forma asselvajada em Campos (Carvalho, 2007).

O sabiá possui grande importância na medicina caseira (Lorenzi, 2002; Maia, 2004), é considerada uma planta que representa importante fonte de pólen e néctar para as abelhas (Figueirôa et al., 2005) e é utilizada na alimentação animal (Lima et al., 2008) devido ao seu elevado teor proteico (Stamford et al., 1997). Além disso, apresenta boa tolerância à contaminação e fácil visualização dos sintomas de fitotoxidez, indicando, através de diversos estudos, ser uma espécie com potencial fitorremediador para contaminantes orgânicos (Pereira et al., 2012; Souza et al., 2012), apresentando bons resultados de estabelecimento e crescimento em solos contaminados com HPAs em concentrações variando entre 1 e 7 % (Ribeiro, 2009; Bento et al., 2012).

A espécie apresenta capacidade de associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio e com fungos micorrízicos arbusculares (Mendes, et al., 2013). Diversos estudos sobre o crescimento e a sobrevivência de mudas de *M. caesalpinifolia* com associação micorrízica, demonstram que os microorganismos promoveram os melhores índices de desenvolvimento da espécie vegetal (Araújo, 2012; Oliveira et al., 2012; Silva, 2012; Mendes, et al., 2013; Oliveira e Alixandre, 2013), provavelmente devido ao alongamento da área de captação de nutrientes como o P, Zn e Cu, através das hifas do fungo, que alcançam as raízes através de difusão, e serão utilizados pelas plantas em seus processos fisiológicos (Jesus et al., 2005; Stürmer et al., 2009; Malusá et al., 2012).

Entretanto, a *Mimosa caesalpinifolia* Benth. é ainda pouco empregada por não conseguir despertar grande interesse, na maioria das vezes pela

escassez de informações relativas à sua ecologia e silvicultura, o que torna eminente a necessidade de realizar estudos com essa espécie.

### **3.4 Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs)**

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são organismos biotróficos obrigatórios de grande parte das espécies florestais já identificadas, tratando-se de hospedeiros de raízes metabolicamente ativas, constituindo uma relação de simbiose mutualista conhecida como micorriza arbuscular (Schenk et al., 1982; Linderman, 1994; Moreira e Siqueira, 2006). Grande parte das angiospermas e diversas gimnospermas pteridófitas e briófitas formam associação com os FMAs (Smith e Read, 2008) que, provavelmente, predominam na maior parte dos ecossistemas tropicais, especialmente nos sistemas agrícolas, representando quase 50 % da biomassa microbiana de solo (Olsson et al., 1999).

A inoculação com FMAs promove o estabelecimento e maior sobrevivência das mudas no campo e é indicada na produção de mudas em viveiro (Souza et al., 2006; Soares e Carneiro, 2010; Angelini et al., 2013), porém, apesar de possuir grande potencial de mercado no Brasil, inoculantes micorrízicos ainda não são produzidos comercialmente (Siqueira et al., 2002). Por outro lado, é importante considerar que a dependência micorrízica de uma planta não é igual para toda espécie de fungo inoculado, podendo apresentar-se de levemente negativa até altamente positiva (Sieverding, 1991).

A relação micorrízica representa um fenômeno com benefícios recíprocos, pois as plantas fornecem ao fungo compostos de carbono fixado via processos fotossintéticos e, em contrapartida, os fungos suprem as plantas de nutrientes (Moreira e Siqueira, 2006). Os principais benefícios dessa relação relacionam-se a diversas alterações metabólicas que surgem e são refletidas positivamente sobre o crescimento e a nutrição da planta (Berbara et al., 2006; Colozzi Filho e Nogueira, 2007). Além disso, no que se refere à fitorremediação, a inoculação de FMAs pode aumentar a retenção do contaminante nas raízes ou em outros tecidos das plantas através dos processos de fitoestimulação e fitoextração (Göhre e Paszkowski, 2006).

A taxonomia dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) vem sofrendo grandes alterações ao longo dos anos. Redecker et al. (2013) apresentaram a classificação taxonômica dos fungos micorrízicos arbusculares (Filo

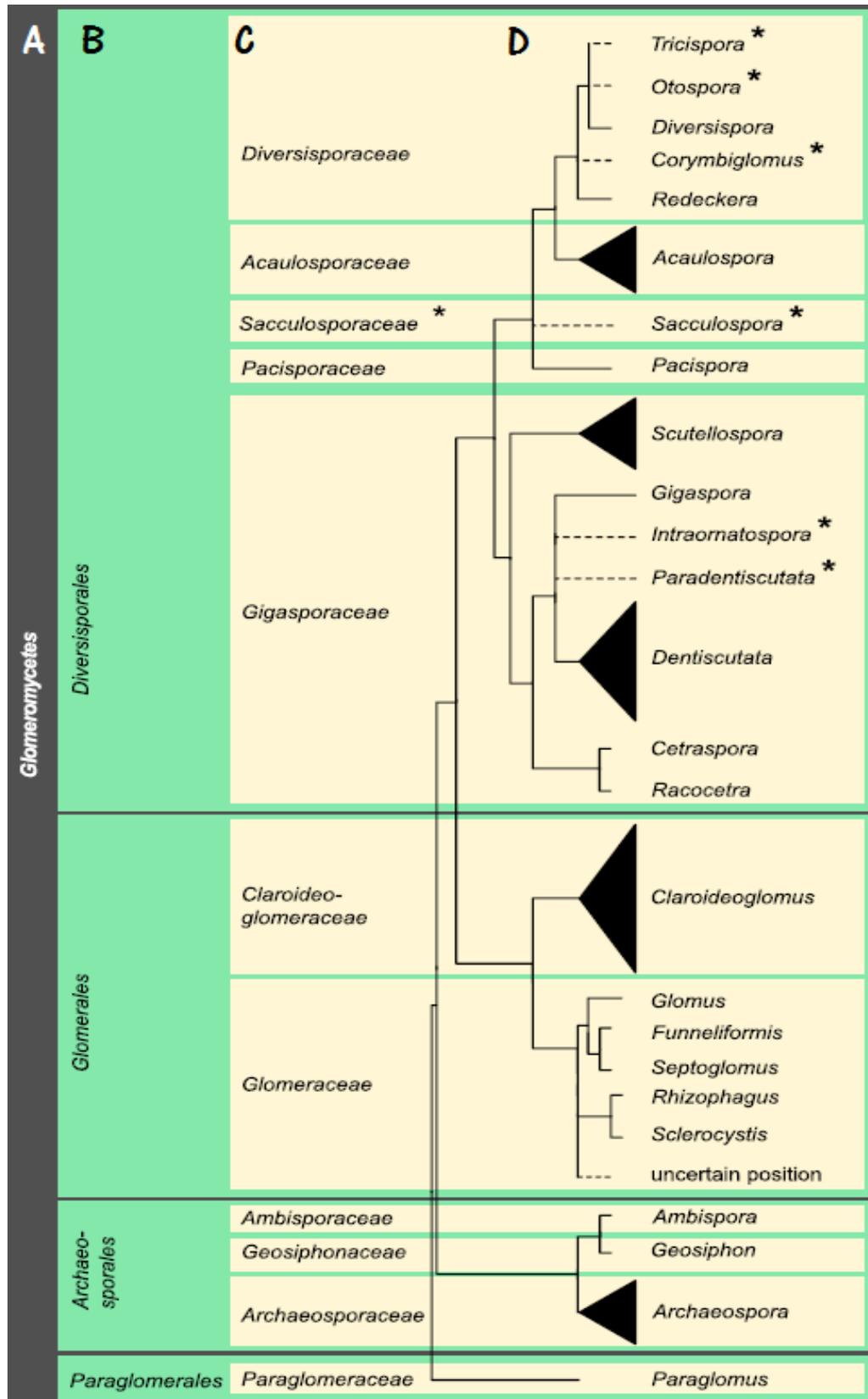
*Glomeromycota*) da forma mais consensual entre a comunidade científica (Figura 1).

O crescimento das plantas beneficiadas pelos FMAs pode relacionar-se à ação biofertilizadora e biorreguladora sobre o hospedeiro, através do acesso a nutrientes pouco disponíveis (Cardoso et al., 2010), bem como da produção e acúmulo de substâncias reguladoras de crescimento (García-Garrido et al., 2002).

Na simbiose micorrízica, há um movimento bidirecional de íons atuando na interface fungo-planta, onde a absorção de nutrientes ocorre especialmente via transportadores específicos que se encontram nas membranas de células de raízes e hifas, e tem seu aporte de energia fornecido pelos sistemas de transporte primários, constituídos pelas bombas de prótons, envolvidos na adaptação energética necessária ao estabelecimento da interação simbiótica FMA-plantas (Rea et al., 1992; Morsomme e Boutry, 2000; Ramos et al., 2005).

A colonização de sistemas radiculares por FMAs pode alterar o comportamento estomático das plantas hospedeiras (Augé, 2000). Assim, as plantas micorrizadas podem apresentar maiores taxas de transpiração e menores resistências estomáticas, proporcionando-as maior disponibilidade de fotoassimilados através do aumento na concentração de CO<sub>2</sub> intracelular (Schwob et al., 1998; Diniz et al., 2010). Isso só é possível devido à existência de correlações positivas entre o número de estômatos e a taxa fotossintética (Castro et al. 2003; Cavalcante e Conforto, 2002).

Muitas espécies leguminosas são eficazes na fixação de nitrogênio através de simbiose entre suas raízes e bactérias do gênero *Rhizobium* spp. (Stamford e Silva, 2000), que, do mesmo modo que os fungos micorrízicos arbusculares, contribui na absorção de água e nutrientes (Miranda, 2008; Nogueira et al., 2012; Chagas Junior et al., 2010; Brahma Prakash e Sahu, 2012), bem como na tolerância da planta a vários estresses (Siqueira et al., 1999).



**Figura 1.** Classificação taxonômica dos FMAs: classe (A), ordens (B), famílias (C) e gêneros (D). As linhas tracejadas indicam gêneros de posição incerta, e os asteriscos apontam para insuficiência de provas.

A necessidade da reabilitação de áreas degradadas e da utilização de plantas como opção para descontaminação do solo (Baker et al., 1994) torna a interação de micorriza e leguminosa um fator que possibilita maior competitividade e sucesso da vegetação (Melloni et al., 2003), podendo contribuir no processo de fitorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos derivados por petróleo, no qual a natureza hidrofóbica desses compostos limita drasticamente o desenvolvimento das plantas (Joner e Leyval, 2001; Joner e Leyval, 2003; Volante et al., 2005; Alarcón et al., 2008; Gao et al., 2010; Yu et al., 2011).

Isso só é possível porque os micro-organismos podem colonizar diversos nichos, através das mais diversas formas de interações, habitando inclusive em condições extremas (Andreote et al., 2009; Ramos-Zapata et al., 2011).

Em áreas degradadas, o ideal é utilizar-se de fungos com grande potencial simbiótico que garanta a sua eficiência no auxílio à recuperação dessas áreas (Colodete et al., 2014). Nesse sentido, o *Claroideoglomus etunicatum* (= *Glomus etunicatum*) atende a esse requisito por se tratar de um fungo bastante comum em ecossistemas brasileiros e um dos fungos mais frequentemente utilizados como isolados experimentais no Brasil (Stürmer e Siqueira, 2006).

Apesar disso, sabe-se que as plantas podem responder de maneira diferenciada a diversos FMAs, seja entre isolados de fungos de diferentes espécies ou entre isolados de uma mesma espécie (Munkvold et al., 2004; Smith et al., 2004), pois os efeitos causados pela inoculação com FMA dependem de fatores como o tipo de FMA e de substrato, o pH do solo, a espécie vegetal e a quantidade de nutrientes disponíveis (Entry et al., 2002; Caldeira et al., 2003; Tang et al., 2009; Martinez e Johnson, 2010). Por isso, a eficiência na colonização e os efeitos sobre as plantas hospedeiras precisam ser mais estudados.

### **3.5 Ensaios Ecotoxicológicos**

Em solos contaminados por petróleo e seus derivados, os compostos orgânicos BTEX, HPA e HTP são considerados os mais tóxicos em nível de persistência no meio ambiente e efeitos carcinogênicos e mutagênicos (Andrade et al., 2010). No entanto, estudos que buscam avaliar a toxicidade de áreas contaminadas, bem como as consequências desta contaminação ao meio ambiente como um todo, são escassos no Brasil (Sisino, 2006).

Geralmente a avaliação da eficiência e do progresso da remediação é realizada através da concentração química do contaminante no solo. Entretanto, além de gerar altos custos, esse tipo de análise é limitado por sua incapacidade de considerar as interações com condições específicas do solo, a presença de elementos químicos desconhecidos (do próprio contaminante ou de metabólitos gerados durante o processo), a toxicidade sobre a biota e os impactos nas funções do solo (Vaajasaari et al., 2002; Wilson et al., 2002; Plaza et al., 2005; Maila et al., 2005; Molina-Barahona et al., 2005; Geissen et al., 2008; Hentati et al., 2013). Em contrapartida, os ensaios ecotoxicológicos abordam todas estas limitações (Vaajasaari et al., 2002), permitindo uma melhor avaliação para monitorar a biorremediação (Saterbak et al., 2000; Molina-Barahona et al., 2005).

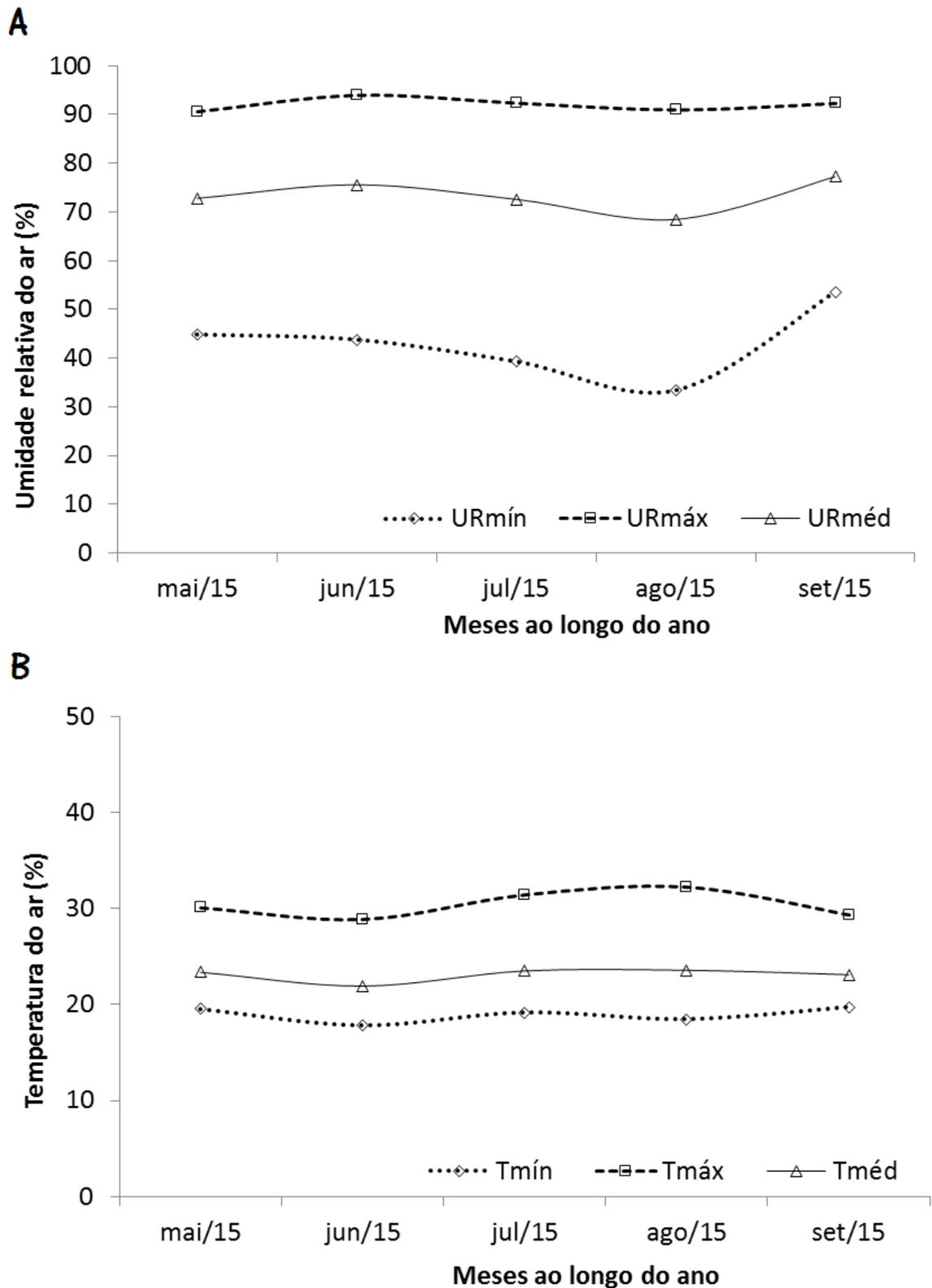
Nesse sentido, Marwood et al. (1998) estudando a toxicidade na biorremediação de solo contaminado com óleo diesel, através de ensaios toxicológicos, verificaram que quimicamente houve biodegradação dos HTP, no entanto, nem todos os ensaios tiveram redução da toxicidade, demonstrando dessa forma que a análise química foi insuficiente na predição dos efeitos negativos do contaminante.

Nos ensaios ecotoxicológicos, a avaliação dos efeitos da contaminação em organismos individuais é a forma mais comumente utilizada, devido à resposta rápida que os organismos fornecem a respeito do risco ambiental (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008). Além disso, após processo de remediação, os ensaios ecotoxicológicos podem auxiliar na avaliação da capacidade de recuperação ecológica do sítio contaminado, uma vez que análises químicas, por si só, não representam que as concentrações remanescentes dos contaminantes ainda não serão tóxicas (Sisinno et al., 2006).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local de condução do experimento**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes - RJ (Latitude= 21° 45' S; Longitude = 41° 20' W; Altitude= 11 m). Segundo a classificação climática de Köppen, o clima da região é classificado como tropical úmido (Aw), com verão chuvoso, inverno seco e temperatura média anual em torno de 24°C. Durante o período experimental as condições ambientais foram monitoradas através de uma miniestação meteorológica WhatchDog 2900ET, sendo a umidade relativa e temperatura do ar apresentadas na Figura 2.



**Figura 2:** Elementos meteorológicos na casa-de-vegetação, no período experimental (maio a setembro de 2015), em Campos dos Goytacazes: umidade relativa do ar (A) - máxima (URmax), mínima (URmin) e média (URmed), e temperatura do ar (B) - máxima (Tmax), mínima (Tmin) e média (Tmed).

#### 4.1.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados (DBC), em arranjo fatorial 2 x 5, sendo 2 tratamentos microbiológicos (com e sem inoculação com o FMA *Claroideoglossum etunicatum*) e 5 concentrações de óleo diesel, baseado em volume de diesel por peso de solo (0%, 0,5%, 1%, 2% e 3%), com quatro repetições, tendo como unidade experimental um vaso contendo 3 kg de solo com 3 plântulas/vaso, totalizando 40 vasos. Tais concentrações foram definidas a partir dos resultados obtidos em um teste de germinação de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) associada a fungo micorrízico arbuscular em solo contaminado com seis concentrações de óleo diesel (0%, 0,5%, 1%, 2%, 3% e 4%).

#### 4.1.2 Características do solo

O solo destinado ao preparo do inóculo do FMA bem como ao experimento, classificado como Latossolo Amarelo, predominantemente argiloso, foi coletado na Escola Técnica Estadual Agrícola Antônio Sarlo, localizada no Município de Campos dos Goytacazes, RJ. O solo foi coletado na profundidade de 0-20 cm, peneirado em malha de 2 mm, misturado com areia lavada na proporção de 1:1 (v:v) e esterilizado em autoclave à temperatura de 121°C por 2 horas, a fim de eliminar patógenos e FMAs nativos (Souza et al., 2006), apresentando as características químicas descritas na tabela 1.

**Tabela 1:** Características químicas do solo.

M.O	$\text{g dm}^{-3}$	9,83
pH		6,00
P		18,00
S		5,00
Fe	$\text{mg dm}^{-3}$	106,70
Cu		0,32
Zn		3,50
Mn		25,24
B		0,22
K		2,00
Ca		12,20
Mg		7,50
Al	$\text{mmol}_c\text{dm}^{-3}$	0,00
H+Al		10,20
SB		23,00
CTC		33,20

Matéria orgânica (M.O), potencial hidrogeniônico em água (pH), fósforo (P), enxofre (S), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), boro (B), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), alumínio (Al), acidez potencial (H+Al), soma de bases (SB), capacidade de troca de cátions (CTC).

#### 4.1.3 Preparo do inóculo

A espécie de fungo micorrízico arbuscular (FMA) testada (*Claroideoglomus etunicatum*) foi obtida a partir do Banco de Inóculo do Setor de Microbiologia do Solo da UENF/CCTA do Laboratório de Solos. Para a multiplicação do inóculo foram utilizadas plantas de milho (*Zea mays*). As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, durante 15 minutos. Em seguida, as mesmas foram lavadas com água destilada, por quatro vezes consecutivas. O plantio foi realizado em vasos contendo solo e inóculo, mantidos em casa de vegetação por um período de 90 dias. Transcorridos os primeiros 60 dias a parte aérea foi podada e os vasos foram cobertos com folhas de papel, mantidos sem irrigação por 30 dias, para facilitar a esporulação do fungo. A mistura do solo contendo raízes colonizadas e esporos do FMA foi utilizada como inóculo, sendo conservada em câmara fria a 4°C, até a instalação do experimento. Foi verificada a quantidade de fósforo no solo (Tabela 1), que se manteve abaixo do nível crítico para *M. caesalpiniiifolia* Benth. (Gonçalves et al.,2013), para garantir a baixa disponibilidade deste nutriente tendo em vista que quando existe um baixo valor de P no solo a planta exsuda substâncias que fomentam a taxa de colonização (Nagahashi e Douds, 2007).

Foi realizada a contagem de esporos no inóculo através da técnica de peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e de centrifugação e flutuação em sacarose (Jenkins, 1964). A quantificação dos esporos foi realizada em placas de acrílico com anéis concêntricos, sob microscópio estereoscópico (40x).

#### **4.1.4 Tratamento das sementes**

Foram utilizadas sementes de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. adquiridas comercialmente, sem tratamento químico, com taxa de germinação de 90%. Como tratamento prévio essas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (0,5%) por 15 minutos, seguido de lavagem em água corrente. A exposição de sementes com dormência tegumentar a altas temperaturas é um meio eficaz para a sua germinação (Hartmann e Kester, 1978), por isso, as sementes de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. foram imersas em água a 80°C até o resfriamento total (Nascimento e Oliveira, 1999; Passos et al., 2007; Leal et al., 2008).

#### **4.1.5 Instalação do experimento**

O óleo diesel foi adquirido em um posto de abastecimento de combustível da PETROBRAS localizado no município de Campos dos Goytacazes – RJ, armazenado em recipiente de vidro, e posteriormente incorporado homogeneamente ao solo em cada nível de contaminação. O contaminante utilizado é do tipo S10, que possui teor máximo de enxofre de 10mg/kg (ppm = partes por milhão) e foi desenvolvido visando emitir teores reduzidos de material particulado e NOx (PETROBRAS, 2012). Após as contaminações, separou-se 500 g de solo de cada concentração do contaminante, que foram inseridos individualmente em recipientes de vidro e fechados com tampa de rosca vedante para a realização dos ensaios ecotoxicológicos a fim de determinar o potencial fitorremediador da *M. caesalpinifolia* Benth. O restante do solo contaminado foi inserido em vasos de barro (3 kg de solo/vaso) e dispostos na casa de vegetação para determinação da tolerância da espécie vegetal ao contaminante.

O solo permaneceu incubado por 30 dias, permitindo a perda dos compostos mais voláteis, e, durante esse mesmo período, as sementes foram colocadas para germinar em bandejas de plástico contendo o solo sem

contaminação utilizado para todo o experimento, e transplantadas após 30 dias sendo transferidas 3 plântulas com o mesmo padrão de crescimento para cada vaso, permanecendo em casa de vegetação durante 90 dias. Irrigações diárias foram realizadas, utilizando-se água desionizada durante o período de condução experimental. No momento do transplante foram adicionados 50 cm<sup>3</sup> vaso<sup>-1</sup> de inóculo contendo 1.565 esporos, aplicado a uma profundidade de aproximadamente 3 cm nos vasos dos tratamentos correspondentes.

Aos 30 e 45 dias foram realizadas adubações nitrogenadas (nitrato de amônio) em todas as unidades experimentais (20 mg kg<sup>-1</sup>).

#### **4.1.6 População microbiana total no solo**

A quantificação da população heterotrófica total do solo foi realizada no tempo inicial e final através do método de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). O método consiste na extração e deposição de uma suspensão de solo em placas de Petri, com meio ágar-nutriente (bactéria) e Meio de Martin para (fungos), inoculação em estufa de cultura e posterior contagem do número de colônias formadas.

Pesou-se 10g de solo que foram transferidos para Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina (0,85%) esterilizada. Após a extração procedeu à diluição seriada até 10<sup>-6</sup>. Pipetou-se 0,1 mL nas diluições 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> para as placas com o meio ágar-nutriente para bactéria e as diluições 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> com meio Martin para fungo. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas para bactérias e 72 horas para fungos. Após o período de incubação o número de micro-organismos por grama de solo foi contabilizado através da equação: [N° colônias x (1/ diluição) x (1/alíquota) ] /massa do solo seco.

#### **4.1.7 Avaliação dos índices biométricos**

Foram realizadas avaliações mensais de altura, medida com régua graduada, diâmetro do coleto, medido com paquímetro digital, e contabilizado o número de folíolos. A cada 15 dias o índice Soil-Plant Analysis Development (SPAD) foi obtido utilizando-se o aparelho Chlorophyll Meter SPAD-502 (Minolta®), com medições feitas a partir da média dos quatro folíolos terminais. Aos 90 dias foram feitas avaliações da área foliar com aparelho modelo Licor

3100, e das características do desenvolvimento radicular (volume e comprimento) com auxílio do aparelho WinRhizo®. Além disso, a parte aérea e as raízes foram secas em estufa a 65 °C por 72 horas e pesadas para determinação da massa seca, em seguida a parte aérea foi triturada em moinho do tipo Willey e armazenada em frasco hermeticamente fechado para posterior determinação dos teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg).

#### **4.1.8 Análise nutricional da parte aérea**

O material vegetal foi submetido à oxidação pela digestão sulfúrica, onde foi obtido o extrato, no qual foi determinado o nitrogênio pelo método de Nessler (Jackson, 1965), o fósforo pelo método colorimétrico do molibdato (Malavolta et al., 1997), o potássio por fotometria de emissão de chama, o cálcio e magnésio por espectrofotometria de absorção atômica.

#### **4.1.9 Avaliação da taxa de colonização micorrízica**

A porcentagem de colonização micorrízica das raízes foi determinada após a coloração pelo método descrito por Grace e Stribley (1991), adaptado com duas submersões em KOH (10%) a 90°C, por 10 minutos. Os segmentos de raízes em lâminas foram levados ao microscópio óptico para a observação da presença de estruturas de FMAs.

#### **4.1.10 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância de forma distinta para cada parâmetro avaliado, e posteriormente ao teste Dunnet ( $p < 0,05$ ) para comparação entre as concentrações do contaminante, e ao teste T ( $p < 0,05$ ) para avaliação do efeito da inoculação e diferenças entre os tempos iniciais e finais, através do programa SISVAR 5.3 Build 77 (Ferreira, 2011).

### **4.2 Ensaios ecotoxicológicos**

Ao final do experimento coletou-se uma amostra composta de 500 g de solo das quatro repetições por tratamento. Estes foram inseridos individualmente em recipientes de vidro e fechados com tampa de rosca vedante. Assim, os

ensaios ecotoxicológicos foram realizados utilizando solo sem planta (tempo inicial), com planta, e com planta + FMA, para cada concentração de óleo diesel avaliada.

Foram avaliadas a eficiência de fitorremediação e biodisponibilidade de contaminantes por meio de ensaios de sobrevivência e reprodução de *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* (Figura 3), realizados no laboratório de Fauna do Solo, na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ. Para isso, seguiu-se as normas obrigatórias e recomendadas da ABNT NBR ISO 11267 (2011) e ABNT NBR ISO 16387 (2012), respectivamente.

As concentrações de óleo diesel utilizadas no presente estudo basearam-se em volume de diesel (ml) por peso de solo (kg): 0%, 0,5%, 1%, 2% e 3%. Todavia, para os ensaios ecotoxicológicos, as concentrações do contaminante precisam ser expressas em peso/peso, resultando em 0; 4,27; 8,53; 17,06 e 25,59 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Inicialmente, as amostras de solo foram umedecidas com água destilada entre 40 a 60% à sua capacidade de retenção de água, sendo medidos o pH e umidade. Os ensaios foram conduzidos em câmara de incubação com controle de temperatura (18 a 22 °C), fotoperíodo (16 h de luz para 8 h de escuro) e intensidade luminosa (400 a 800 lux). A umidade do solo foi monitorada semanalmente através do peso inicial dos recipientes-testes, adicionando água destilada quando necessário. Os organismos também foram submetidos a solo artificial tropical (ABNT NBR 15537, 2014) para avaliar a adequação às condições ambientais dos ensaios.



**Figura 3.** Indivíduos de *Folsomia candida* (A) e *Enchytraeus crypticus* (B) utilizados nos ensaios ecotoxicológicos.

Para os ensaios utilizou-se recipientes cilíndricos transparentes (80 ml) com tampa, contendo 30 g de solo úmido em cinco replicados para cada tratamento. Uma sexta réplica, sem organismos e alimento é utilizada para avaliar o pH e a umidade ao final. Ambos os ensaios duraram 28 dias.

Os indivíduos de *E. crypticus* foram criados em placas de petri contendo meio ágar, em um ambiente de temperatura constante de  $20 \pm 2$  °C. Em cada recipiente foram inseridos dez indivíduos ovados, selecionados e coletados em estereomicroscópio. No início do ensaio foi inserido como alimento 50 mg de aveia em flocos finos. Após 14 dias foi adicionado superficialmente mais 25 mg de aveia. Ao final do ensaio os recipientes foram preenchidos com solução de rosa de bengala em 1% de etanol e contados os indivíduos adultos e os juvenis sob estereomicroscópio, permitindo avaliar a sobrevivência e a reprodução dos organismos.

Os indivíduos de *F. candida* foram criados em substrato formado por gesso e carvão ativado, na proporção de 8:1. Em cada recipiente foram adicionados dez indivíduos com 10 a 12 dias de vida. No início foram adicionados como alimento 2 mg de fermento seco granulado. Após 14 dias esta quantidade foi reposta superficialmente. Ao final, nos solos contendo os organismos são transferidos para um recipiente maior (500 ml), sendo inserida água destilada até sua total cobertura e promovendo uma leve agitação com espátula. Este procedimento causa a flutuação dos organismos vivos. Algumas gotas de tinta de carimbo na cor azul-escuro foram utilizadas para colorir o líquido e assim destacar os organismos. Os indivíduos adultos são contados visualmente e os juvenis através da contagem manual em fotografias no software ImageToll®.

#### **4.2.1 Análise estatística**

Os dados obtidos de reprodução e sobrevivência foram submetidos à análise de variância e posteriormente ao teste de Dunnett, para o cálculo do NOEC (maior concentração que não causa efeito na reprodução) e LOEC (menor concentração que causa efeito na reprodução). Os valores de  $EC_{50}$  (concentração efetiva que causa efeitos em 50% dos juvenis) foram obtidos através do modelo não linear Exponencial ( $p < 0,05$ ). Ambas as análises foram realizadas no software STATISTICA 7.0 (StratSoft, 2004).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Índices Biométricos

Observou-se que a inoculação com o FMA aumentou significativamente os índices biométricos das mudas de *Mimosa caesalpinifolia* no solo controle, quando comparados com os tratamentos sem inoculação (Tabela 2). Houve incremento de mais de 40% para a altura da parte aérea e o diâmetro do coleto, de mais de 60% para a área foliar e o número de folíolos e de mais de 100% para a massa seca da parte aérea, massa seca das raízes e o volume das raízes (Tabela 2). Diversos estudos sobre o crescimento e a sobrevivência de mudas de *Mimosa caesalpinifolia* com associação micorrízica, comprovaram que estes micro-organismos são capazes de promover maiores índices biométricos (Oliveira et al., 2012, Araújo, 2012, Silva, 2012, Mendes, et al., 2013, Oliveira e Alixandre, 2013).

**Tabela 2.** Índices biométricos da *Mimosa caesalpinifolia* aos 90 dias para os tratamentos sem e com micorriza, em função da concentração de óleo diesel: altura parte aérea (APA); diâmetro do coleto (D); massa seca da parte aérea (MSPA); massa seca das raízes (MSR); área foliar (AF); número de folíolos (NF); volume das raízes (VR) e comprimento das raízes (CR).

Concentração (%)	Tratamento Microbiológico	APA	D	MSPA	MSR	AF	NF	VR	CR
		(cm)	(mm)	----(g vaso <sup>-1</sup> )----		(cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	(un planta <sup>-1</sup> )	(cm <sup>3</sup> )	(cm)
0	Sem micorriza	14,18b	2,13b	2,58b	1,86b	387,62b	32,38b	9,37b	2161,36a
	Com micorriza	20,23a	3,07a	6,08a	5,38a	633,09a	53,00a	19,45a	2549,94a
0,5	Sem micorriza	8,06*a	1,00*a	1,40*a	1,00*a	211,59*a	22,50b	5,55*a	1415,76*a
	Com micorriza	9,81*a	1,47*a	1,86*a	1,38*a	271,06*a	29,88a	7,48*a	1578,16*a
1	Sem micorriza	6,77*a	1,04*a	1,06*a	0,77*a	176,76*a	23,00a	3,90*a	822,70*a
	Com micorriza	8,74*a	1,40*a	1,28*a	0,81*a	206,91*a	27,00a	3,92*a	1030,94*a
2	Sem micorriza	3,59*a	0,71*a	0,65*a	0,57*a	106,90*a	15,75*a	3,41*a	704,36*a
	Com micorriza	6,74*a	0,97*a	0,96*a	0,75*a	180,45*a	24,00a	4,57*a	1047,45*a
3	Sem micorriza	3,83*a	0,40*a	0,41*a	0,41*a	58,99*a	4,13*a	3,09*a	613,38*a
	Com micorriza	3,69*a	0,42*a	0,54*a	0,59*a	79,90*a	7,63*a	4,42*a	847,33*a
CV (%)	-	66,94	67,93	100,35	115,30	74,36	62,95	85,40	55,64

Coefficiente de Variação (CV). Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, para cada concentração, não diferem entre si, pelo teste t, em 5% de probabilidade. Médias, nas colunas, para cada concentração, com asterisco (\*) diferem do controle em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Por outro lado, nos tratamentos contaminados com óleo diesel observou-se que a inoculação das plantas com o FMA não influenciou os índices biométricos avaliados (Tabela 2). É possível que a toxicidade do óleo diesel tenha sido um fator limitante para o sucesso da simbiose e o crescimento da *M. caesalpiniiifolia*, tendo em vista que as plantas apresentaram reduções significativas a partir da primeira concentração de contaminante. Corroborando com esse resultado, Hernández-Ortega et al. (2012), avaliando os FMAs na espécie *Melilotus albus* em substrato contaminado com óleo diesel, verificaram que o contaminante afetou negativamente o crescimento da planta.

Rezende (2006) e Bardelli-da-Silva (2006) observaram que plântulas de *Schinus terebinthifolius* e *Sebastiania commersoniana* germinadas em solo contaminado com óleo diesel apresentam redução da área e biomassa foliar. Da mesma forma, Merkl et al. (2005a) relataram redução de 48%, 75% e 26% para altura da parte aérea e de 60%, 65% e 66% para área foliar nas espécies de *C. mucunoides*, *C. brasilianum* e *S. Capitata*, respectivamente, quando germinadas em solo contaminado com petróleo em comparação com o controle. Exemplos adultos de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl em solo contaminado com petróleo também apresentaram menor área foliar (Maranho et al., 2006).

Ao final do experimento, a altura da parte aérea das plantas em solo contaminado apresentou na concentração de 3% uma redução de 73% para o tratamento sem fungo e de 82% para o tratamento com fungo, quando comparados com os valores apresentados no controle. O diâmetro do coleto, a área foliar e a massa seca da parte aérea, tiveram redução de mais de 80% na concentração de 3% para os tratamentos com e sem fungo quando comparados com os valores apresentados no controle. Balliana (2015), avaliando a tolerância de mudas de *Canavalia ensiformis* em substrato contaminado com óleo diesel, verificou que as plantas do tratamento solo contaminado apresentaram baixos valores de comprimento do caule, biomassa aérea e área foliar em relação às plantas do tratamento solo não contaminado.

O efeito da inoculação no número de folíolos foi observado até a primeira concentração do contaminante, não diferindo estatisticamente do controle. Para esta característica, no geral, houve diferença estatística dos tratamentos em solo contaminado quando comparados ao controle nas concentrações 2 e 3%, com redução de 51,4% e 87,2% para os tratamentos sem fungo e de 54,7% e 85,9%

para os tratamentos com fungo, respectivamente. Segundo Alkio et al. (2005), a espécie *Arabidopsis thaliana* também apresentou redução no número de folhas em solo contaminado com HPAs devido ao efeito tóxico do contaminante.

A contaminação com óleo diesel proporcionou redução significativa para todos os índices biométricos radiculares (Tabela 2), demonstrando que o nível de toxicidade do óleo diesel utilizado no experimento afetou o sistema radicular. Resultados diferentes foram relatados por Ribeiro (2009) e Bento et al. (2012), que observaram boa resposta de estabelecimento e crescimento de *M. caesalpiniiifolia* em solos contaminados com HPAs em concentrações variando entre 1 e 7 %.

As plantas em solo contaminado apresentaram redução de 78%, 67% e 71,6% na concentração de 3%, para massa seca, volume e comprimentos das raízes, respectivamente, nos tratamentos sem fungo quando comparados com os valores apresentados no controle. Na mesma concentração e para os mesmos índices, nos tratamentos com fungo, houve redução de 89%, 77,2% e 66,8% em relação ao controle. Esses resultados corroboram os do estudo feito por Balliana (2015), que, avaliando a tolerância de mudas de *Canavalia ensiformis* em substrato contaminado com óleo diesel, verificou menores valores no volume radicular e na massa seca da raiz em relação às plantas do tratamento solo não contaminado. Assim, as propriedades hidrofóbicas do óleo podem ter afetado a absorção de água no solo, provocando perturbações no desenvolvimento das raízes (Amakiri e Onofeghara, 1983).

O tempo entre a contaminação do solo com óleo diesel e o plantio afeta a resposta da planta a contaminação (Bona et al. 2011), pois nesse período há volatilização de parte dos compostos fitotóxicos (Adam e Duncan, 2002). Dessa forma, o período de 30 dias no qual o solo permaneceu incubado não foi suficiente para minimizar as alterações estruturais causadas na *M. caesalpiniiifolia*, que podem estar relacionadas à presença desses compostos voláteis no óleo diesel. O mesmo foi verificado para mudas de *Canavalia ensiformis* em substrato contaminado com óleo diesel, no qual o período de 30 dias entre a contaminação e o plantio se mostrou insuficiente na redução da toxicidade do solo sem que ocorresse modificação no sistema radicular (Balliana, 2015).

Na seleção de plantas com potencial para a fitorremediação, faz-se necessário identificar aquelas que são tolerantes ao contaminante e entender como elas reagem à contaminação (Bona et al., 2011). Nesse sentido, apesar do baixo crescimento das plantas, a *M. caesalpinifolia* apresentou 100% de sobrevivência, independente do tratamento utilizado.

## 5.2 Índice Soil-Plant Analysis Development (SPAD)

Ao longo do experimento, no controle constatou-se que os folíolos das plantas jovens inoculadas apresentaram um valor de índice SPAD significativamente maior que o apresentado pelas plantas sem inoculação (Tabela 3). Este comportamento pode estar relacionado à baixa resistência estomática em plantas micorrizadas (Diniz et al., 2010), que pode ocasionar o aumento da atividade fotossintética (Nemec e Vu, 1990; Sanchez-Diaz et al., 1990). Em contrapartida, para as plantas nos solos contaminados, o índice SPAD não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com e sem inoculação.

**Tabela 3.** Índice SPAD de *Mimosa caesalpinifolia*, para os tratamentos com fungo e sem fungo, em função da concentração de óleo diesel.

Concentração %	Tratamento Microbiológico	Índice SPAD					
		Tempo em dias					
		15	30	45	60	75	90
0	Sem micorriza	28,40b	28,93a	31,10a	32,93b	37,33b	39,28b
	Com micorriza	33,90a	34,35a	35,45a	38,18a	45,10a	52,30a
0,5	Sem micorriza	23,05a	23,43a	27,10a	27,73a	29,03*a	36,98b
	Com micorriza	19,75*a	21,00*a	25,45*a	26,65*a	27,58*a	43,48a
1	Sem micorriza	18,75*a	18,95*a	19,43*a	22,88*a	23,03*a	27,38b
	Com micorriza	17,88*a	19,40*a	19,93*a	20,68*a	26,43*a	33,73*a
2	Sem micorriza	13,03*a	16,03*a	16,83*a	16,98*a	23,08*a	23,93*b
	Com micorriza	15,08*a	15,58*a	18,25*a	18,35*a	23,93*a	36,90a
3	Sem micorriza	13,58*a	13,65*a	15,53*a	15,80*a	17,03*a	19,85*a
	Com micorriza	10,95*a	11,88*a	12,65*a	13,08*a	14,95*a	17,60*b
CV (%)	-	37,76	38,23	33,93	35,43	34,56	37,01

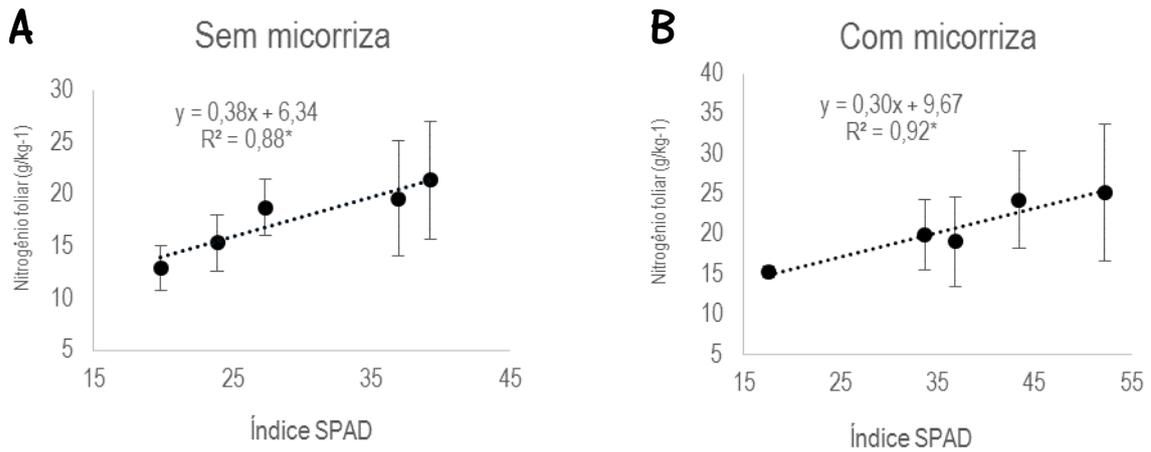
Coeficiente de Variação (CV). Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, para cada concentração, não diferem entre si, pelo teste t, em 5% de probabilidade. Médias, nas colunas, para cada concentração, com asterisco (\*) diferem do controle em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Os índices SPAD encontrados sugerem que o óleo diesel tenha afetado as plantas logo nos primeiros 15 dias, que pode ser decorrente de alterações nas características físico-químicas e biológicas no solo causadas pela barreira física do contaminante (Merkl et al., 2005b), apresentando na concentração de 3% uma redução de 52,2% para o tratamento sem fungo e de 67,7% para o tratamento com fungo, quando comparados com os valores apresentados no controle (Tabela 3).

Em geral, nos solos contaminados, as plantas apresentaram valores que diferiram significativamente dos encontrados no tratamento controle. Isso indica a ação prejudicial do contaminante às plantas, uma vez que diversos óleos são considerados fitotóxicos (Baker, 1970), capazes de causar repelência da água no solo (Johnsen et al., 2005; Thavasi et al., 2011), mediante o recobrimento de suas partículas por compostos orgânicos hidrofóbicos (Vogelmann et al., 2010, 2013).

Aos 30 e 45 dias foram realizadas adubações nitrogenadas em todas as unidades experimentais ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e não houve diferença significativa em nenhum tratamento para todas as concentrações. Entretanto, a partir dos 60 dias, o controle apresentou aumento gradativo nos valores SPAD com diferença significativa para todos os tratamentos com inoculação. Provavelmente isso ocorreu nas plantas como uma resposta positiva à adubação nitrogenada, refletindo externamente em folhas verdes e abundantes, demonstrando assim a correlação positiva que existe entre a intensidade do verde (Argenta et al., 2001; Bonfim-Silva et al., 2011; Braun et al., 2015) com o teor de nitrogênio nas plantas (Blackmer e Schepers, 1995; Braun et al., 2013) (Figura 4).

Em solos contaminados com óleo os nutrientes encontram-se menos disponíveis, especialmente o nitrogênio (De Jong, 1980; Adam e Duncan, 2002), tornando a planta mais debilitada, e, provavelmente por esse motivo, o aumento dos valores e a diferença significativamente maior nas plantas inoculadas, nas concentrações 0,5 e 2%, observada somente ao final do experimento, podem assinalar uma aquisição tardia de nitrogênio.



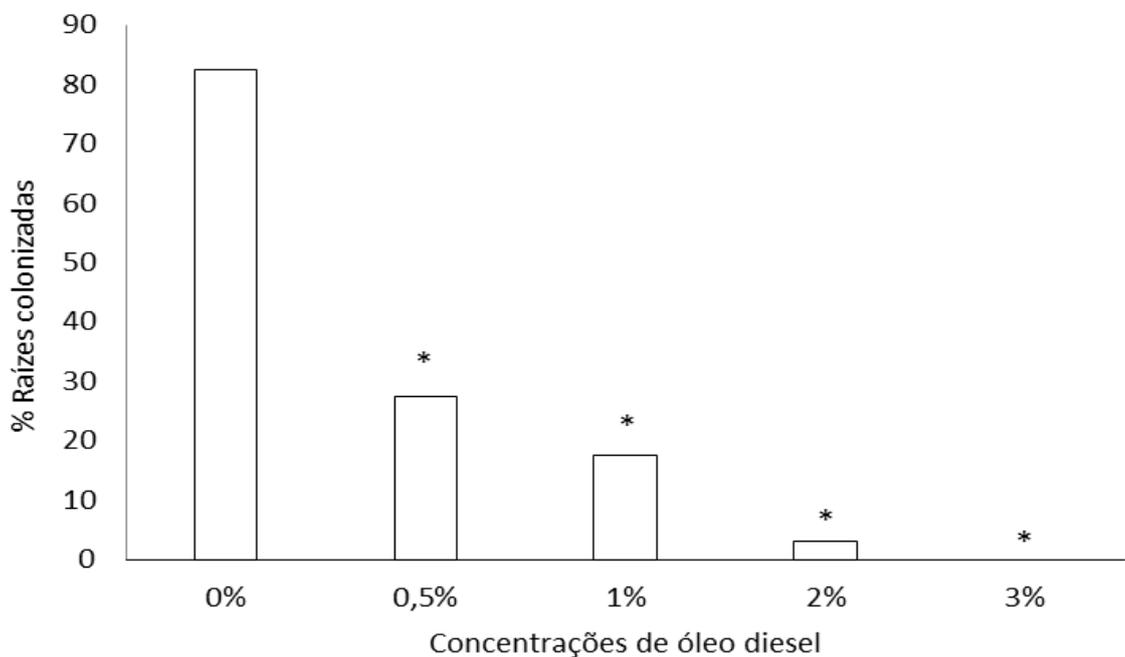
**Figura 4.** Relação entre teores de N e Índice SPAD aos 90 dias em plantas sem micorriza (A) e com micorriza (B) no controle. Barras verticais representam desvio padrão da média. \* significativo em 5 % de probabilidade.

Aos 90 dias, na concentração de 3%, a redução do índice SPAD para o tratamento com inoculação foi de 49,5% e para o sem inoculação foi de 66,35%, quando comparados com os valores apresentados no controle. Nesse tempo, na ausência de micorriza, o índice SPAD médio foi de 29,5. Cipriani (2011) verificou que a *M. caesalpinifolia*, exposta à contaminação com arsênio, nos tratamentos com micorriza, sofreu diminuição no índice SPAD com o aumento da concentração de contaminante.

As plantas do solo contaminado apresentaram sintomas foliares como ressecamento, amarelecimento e queda das folhas mais velhas, intensificando-se com o passar dos dias. Sintomas parecidos foram encontrados para a mesma espécie quando em substrato contaminado com arsênio, apresentando clorose e diminuição do índice SPAD (Cipriani, 2011). Balliana (2015), avaliando a tolerância de mudas de *Canavalia ensiformis* em substrato contaminado com óleo diesel, verificou que as plantas do tratamento solo contaminado apresentaram clorose. Além disso, estudos com outras espécies vegetais em solos contaminados com hidrocarbonetos apresentaram necroses foliares (Alkio et al., 2005; Gogosz et al., 2010).

### 5.3 Taxa de Colonização Micorrízica

Em solo contaminado, observou-se que a porcentagem de colonização micorrízica em *M. caesalpinifolia* foi reduzida significativamente com o aumento da concentração do óleo diesel, a partir da primeira concentração (Figura 5). Hidrocarbonetos de diesel foram detectados em raízes de gramíneas e leguminosas crescendo em solos contaminados (Pichtel e Liskanen, 2001), e Hernández-Ortega et al. (2012) demonstraram que os FMAs foram capazes de promover aumento significativo na degradação desses hidrocarbonetos na rizosfera. Assim, a interação de plantas com os FMAs pode contribuir no processo de fitorremediação (Joner e Leyval, 2001; Joner e Leyval, 2003; Volante et al., 2005; Alarcón et al., 2008; Gao et al., 2010). Entretanto, no presente estudo observa-se que a toxicidade do óleo diesel, além de ter sido um fator limitante para o crescimento das plantas (Tabela 2), restringiu a colonização com esta espécie de fungo micorrízico, evidenciada através da sua sensibilidade ao contaminante.



**Figura 5.** Colonização micorrízica de *Mimosa caesalpinifolia* inoculada com *C. etunicatum* em solo contaminado com óleo diesel aos 90 dias. Barras marcadas com asterisco (\*) diferem do controle em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Paula et al. (2007), estudando os efeitos de diferentes concentrações de antraceno e creosoto sobre o crescimento e a colonização micorrízica, observaram que na espécie *Pueraria phaseoloides* os contaminantes foram capazes de reduzir de maneira acentuada a colonização micorrízica da planta inoculada com o *Claroideoglo mus etunicatum*, diminuindo cerca de 90 % em relação ao controle. Apesar disso, os HPAs não foram capazes de afetar o crescimento da espécie, ao contrário dos resultados encontrados neste trabalho. Tang et al. (2009) e Lima (2014), avaliando a influência da inoculação com FMAs no crescimento de plantas sob diferentes concentrações de óleo diesel no solo, verificaram que o aumento das concentrações de óleo diesel diminuiu a colonização micorrízica.

Em solos sem contaminação, o *Claroideoglo mus etunicatum* quando associado a leguminosas (Flores-Aylas et al., 2003; Sugai et al., 2011) e especificamente ao sabiá (Mergulhão et al., 2001; Oliveira et al., 2012; Pontes et al., 2012, Oliveira e Alixandre, 2013), apresentou resultados positivos para o crescimento da espécie vegetal, corroborando o presente estudo, onde o benefício da micorriza no crescimento da *M. caesalpiniiifolia* ficou evidenciado (Tabela 2).

Dessa forma, o menor crescimento das mudas de *M. caesalpiniiifolia* sem inoculação quando comparado às mudas inoculadas (Tabela 2) nessas condições restritivas de fósforo (Tabela 1) reflete a dependência da espécie aos FMAs em condição natural. Esses resultados reforçam os do estudo feito por Oliveira e Alixandre (2013), que, avaliando a influência da inoculação de FMA e níveis de fertilização fosfatada nos parâmetros biométricos em mudas de *M. caesalpiniaefolia*, verificaram o benefício da colonização micorrízica por *C. etunicatum* no desenvolvimento da espécie em solo com baixos teores de P.

Apesar da espécie *M. caesalpiniiifolia* exibir resistência à seca (Rizzini, 1978), e desenvolver-se bem em áreas degradadas (Mendonça et al., 2008), o presente estudo demonstra que o óleo diesel S-10 causou inibição na colonização e no crescimento da espécie, além de possuir grande potencial de impacto mesmo em se tratando de um combustível mais refinado que os seus antecessores contendo tão baixo teor de enxofre.

Segundo Browen (1980), os FMAs podem habitar em solos com pH de 2,7 a 9,2 em função da capacidade apresentada pela espécie de fungo para

germinar e colonizar o hospedeiro. Siqueira e Franco (1988) relatam que os gêneros de FMAs *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Acaulospora* atuam em condições de pH que variam entre 4,0 e 6,0, ao passo que *Glomus* varia entre o pH 6,0 e 8,0. Como no solo controle a colonização micorrízica foi bastante acentuada, pode-se inferir que o pH=6,0 (Tabela 1) foi favorável para a germinação dos esporos de *C. etunicatum* (= *Glomus etunicatum*). Resultado semelhante foi encontrado por Benedetti et al. (2005), que, avaliando a influência de plantas de coberturas sobre FMAs durante e após o cultivo com milho, encontraram alta ocorrência de *G. etunicatum* em solo com pH de 6,1.

Apesar disso, o óleo diesel reduziu drasticamente a capacidade de colonização das raízes de *M. caesalpinifolia* pelo FMAs, demonstrando seu efeito fitotóxico. Efeito semelhante foi encontrado por Driai et al. (2015), que, analisando o impacto de concentrações crescentes de óleo diesel sobre o desenvolvimento de FMA, verificaram que o aumento da concentração de óleo diesel diminuiu significativamente a formação de arbúsculos e vesículas. Ainda segundo os autores, a presença de óleo diesel em concentrações de até 1% causou significativa redução na germinação de esporos, na alongação de hifas e no modo de germinação dos esporos do fungo micorrízico *Rhizophagus irregulares*, sugerindo um efeito fungicida do óleo diesel. Corroborando os resultados dos autores, Kirk et al. (2005) verificaram que o crescimento do tubo germinativo e o crescimento extrarradical de FMAs é significativamente reduzido em concentrações iguais ou menores que 1% de óleo diesel.

#### **5.4 Teor e conteúdo nutricional da parte aérea**

Os teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea das plantas micorrizadas, no tratamento sem contaminação com óleo diesel (controle), foram significativamente maiores que os apresentados pelas plantas sem inoculação (Tabela 4). Estes resultados corroboram com estudos que relataram que os FMAs podem favorecer as plantas através da maior absorção de nitrogênio (Govindarajulu et al., 2005) e fósforo (Fernandes, 2006; Kahneh et al., 2006).

**Tabela 4.** Teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) na parte aérea de *Mimosa caesalpinifolia*, para os tratamentos sem e com micorriza, em função da concentração de óleo diesel aos 90 dias.

Concentração %	Tratamento Microbiológico	N	P	K	Ca	Mg
		g/kg <sup>-1</sup>				
0	Sem micorriza	21,36b	1,16b	12,75a	14,15a	3,49a
	Com micorriza	25,21a	1,78a	12,22a	15,05a	3,55a
0,5	Sem micorriza	19,63a	1,11a	11,78a	13,79a	2,60a
	Com micorriza	24,30a	1,31*a	10,03a	14,84a	3,00a
1	Sem micorriza	18,74a	1,03a	10,69a	13,06b	2,22a
	Com micorriza	19,94a	1,21*a	9,50*a	14,88a	2,31*a
2	Sem micorriza	15,34a	0,99b	9,64a	12,19a	1,97*a
	Com micorriza	19,08a	1,18*a	8,75*a	13,27a	2,16*a
3	Sem micorriza	12,95a	0,74*b	6,86*a	11,20*a	1,34*a
	Com micorriza	15,30*a	1,00*a	5,72*a	11,61*a	1,52*a
CV (%)	-	27,60	24,40	27,38	13,08	37,75

Coeficiente de Variação (CV). Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, para cada concentração, não diferem entre si, pelo teste t, em 5% de probabilidade. Médias, nas colunas, para cada concentração, com asterisco (\*) diferem do controle em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Os valores apresentados no presente estudo para os teores de nitrogênio e fósforo (Tabela 4) não se encontram muito distantes dos valores recomendados por Gonçalves et al. (2013), que, verificando o teor e o conteúdo de macronutrientes em razão da aplicação de crescentes concentrações de fertilizantes em mudas de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., indicaram em termos de nível crítico os valores de 16 a 17,3 g kg<sup>-1</sup> de N e 1 a 1,5 g kg<sup>-1</sup> de P na parte aérea, para promoção de melhor crescimento da planta.

Nas plantas em solos contaminados, o teor de nitrogênio não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com e sem inoculação, com exceção da concentração 3% do óleo diesel nas plantas inoculadas, onde apresentou menores valores quando comparado ao controle. Os teores de fósforo apresentaram reduções significativas nas plantas inoculadas para todas as concentrações do óleo diesel, quando comparados ao controle.

Os teores de potássio, cálcio e magnésio da parte aérea das plantas, apresentados na tabela 3, estão dentro dos valores de nível crítico indicados por Gonçalves et al. (2013) para melhor crescimento de mudas de *Mimosa*

*caesalpiniaefolia* Benth., que são de 5,7 a 7,1 g kg<sup>-1</sup> de K, 10 a 14,4 g kg<sup>-1</sup> de Ca, e 1,3 a 2,4 g kg<sup>-1</sup> de Mg.

Na maioria dos tratamentos, os teores de potássio, cálcio e magnésio não apresentaram diferenças estatísticas para os tratamentos com e sem micorriza (Tabela 4). Esse resultado reforça o estudo de Siqueira et al. (1994), que aponta como não sendo substanciais os efeitos dos FMAs nos teores de K, Ca e Mg na planta. Corroborando com esses resultados, Moraes et al. (2010), avaliando a resposta de seis FMAs na colonização, crescimento e estado nutricional de mudas de seringueira com três e seis meses de transplante em solos sem contaminação, verificaram que os teores foliares de N, P, K, Ca e Mg das plantas inoculadas e não-inoculadas não diferiram estatisticamente.

Os teores de potássio diferiram estatisticamente do controle nas concentrações de 1 e 2% nos tratamentos com micorriza, e na concentração de 3% para tratamento com e sem micorriza (Tabela 4). O cálcio diferiu do controle apenas na concentração de 3% para o tratamento com e sem micorriza. Já o magnésio diferiu do controle na concentração de 1% para o tratamento com micorriza, e nas concentrações de 2 e 3 % para os tratamentos com e sem micorriza.

Os conteúdos de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio na parte aérea das plantas micorrizadas, no tratamento sem contaminação (controle) e na concentração de 0,5% de óleo diesel foram significativamente maiores que os apresentados pelas plantas sem inoculação (Tabela 5). Estes resultados corroboram estudos que demonstram a maior absorção de vários nutrientes em plantas micorrizadas (Freitas et al., 2006; Tellechea, 2007; Cardoso et al., 2010; Lima, 2010; Kiers et al., 2011; Brito, 2013). Os FMAs podem aumentar essa absorção através da maior exploração do volume de solo pelas hifas fúngicas que se desenvolvem além do sistema radicular (Smith e Read, 2008), ou por meio de mecanismos fisiológicos e químicos (Moreira e Siqueira, 2006).

**Tabela 5.** Conteúdos de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) na parte aérea de *Mimosa caesalpiniiifolia*, para os tratamentos sem e com micorriza, em função da concentração de óleo diesel aos 90 dias.

Concentração %	Tratamento Microbiológico	N	P	K	Ca	Mg
		mg/vaso <sup>-1</sup>				
0	Sem micorriza	55,11b	2,98b	27,41b	36,51b	8,99b
	Com micorriza	153,41a	10,80a	74,34a	91,57a	21,59a
0,5	Sem micorriza	27,39*b	1,54*b	13,69*b	19,24*b	3,63*b
	Com micorriza	45,23*a	2,44*a	18,67*a	27,62*a	5,58*a
1	Sem micorriza	19,91*a	1,09*a	9,47*a	13,88*a	2,36*a
	Com micorriza	25,52*a	1,55*a	12,16*a	19,04*a	2,95*a
2	Sem micorriza	9,93*b	0,64*b	5,20*a	7,90*a	1,28*a
	Com micorriza	18,34*a	1,14*a	8,41*a	12,76*a	2,08*a
3	Sem micorriza	5,27*a	0,30*a	2,33*a	4,56*a	0,55*a
	Com micorriza	8,23*a	0,54*a	3,08*a	6,25*a	0,82*a
CV (%)	-	128,62	130,69	123,25	109,71	134,07

Coefficiente de Variação (CV). Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, para cada concentração, não diferem entre si, pelo teste t, em 5% de probabilidade. Médias, nas colunas, para cada concentração, com asterisco (\*) diferem do controle em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Corroborando os resultados do estudo feito por Gonçalves et al. (2013), os conteúdos apresentados na tabela 5 foram proporcionais à quantidade de massa seca da parte aérea (Tabela 2), ou seja, quanto maiores os valores da matéria seca, maiores conteúdos nutricionais foram encontrados.

Somente através da análise dos conteúdos nutricionais (Tabela 5) é que ficou evidenciado o efeito prejudicial do óleo diesel na aquisição de nutrientes pelas plantas, visto que os conteúdos de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio nas plantas reduziram significativamente a partir da primeira concentração de óleo diesel, e, a partir da concentração de 1% de contaminante, em geral, a inoculação das plantas com o FMA não influenciou os conteúdos nutricionais da parte aérea.

## 5.5 População microbiana total no solo

Os resultados da quantificação de micro-organismos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para o tempo inicial (solo sem planta) e final (solo com planta) encontram-se na Tabela 6. No geral, a densidade populacional de bactérias apresentou-se na base 10 com os expoentes 6 e 7, enquanto que as colônias fúngicas variaram entre os expoentes 4 e 5. Esse resultado corrobora com Brandão (1992) e Araújo e Hungria (1994), que apontam para as densidades populacionais de fungos como sendo inferiores às das bactérias no solo.

Observou-se que no tempo final o solo controle com planta apresentou aumento significativo no número de UFC de fungos e de bactérias quando comparado com o tempo inicial (sem planta). Para os fungos houve incremento significativo de 82% nos solos com plantas sem inoculação, e de 83% nos solos com plantas inoculadas. No caso das bactérias, houve incremento significativo de 80% apenas nos solos com plantas inoculadas. Também foi observado que o solo controle foi influenciado pela inoculação das plantas, apresentando aumento de 80% de fungos e 68% de bactérias comparado com os solos contendo plantas sem inoculação.

No tempo final, para o tratamento controle, o número de UFC de fungos totais nos solos com plantas sem inoculação foi superior, em média, 5,7 vezes ao número de UFC no tempo inicial. Nos solos com plantas inoculadas, os números de UFC de fungos e bactérias totais foram, respectivamente, 5,8 e 5,0 vezes superior ao número de UFC no tempo inicial. Possivelmente as raízes estimularam alterações nos atributos físicos, químicos e biológicos do solo, intensificando as populações microbianas (Cunningham et al., 1996). Além disso, a adição dos FMAs pode ter beneficiado as interações na rizosfera.

**Tabela 6.** Quantificação de micro-organismos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC), no tempo inicial (solos sem planta e sem tratamentos microbiológicos) e final (solo com planta e com tratamento microbiológico), em função da concentração de óleo diesel.

Concentração (%)	UFC/g solo		Tratamento Microbiológico	UFC/g solo	
	Tempo Inicial			Tempo Final	
	Fungo	Bactéria		Fungo	Bactéria
0	6,18E+04 Bb	3,07E+06 Aa	Sem micorriza	3,50E+05 Ba	6,30E+06 Ba
	3,05E+05 Ab	2,52E+06 Ab	Com micorriza	1,78E+06 Aa	1,27E+07 Aa
0,5	4,77E+05 *Aa	4,03E+06 Aa	Sem micorriza	1,81E+05 *Ab	1,40E+06 *Ab
	4,33E+05 *Aa	3,71E+06 Aa	Com micorriza	1,30E+05 *Ab	1,26E+06 *Ab
1	5,13E+05 *Aa	5,09E+06 *Aa	Sem micorriza	2,45E+05 *Bb	2,42E+06 *Bb
	4,73E+05 *Aa	4,28E+06 *Aa	Com micorriza	1,37E+05 *Ab	1,08E+06 *Ab
2	3,64E+05 *Ba	5,79E+06 *Ba	Sem micorriza	1,62E+05 *Ab	2,78E+06 *Ab
	4,63E+05 *Aa	3,68E+06 Aa	Com micorriza	2,13E+05 *Ab	2,10E+06 *Ab
3	3,45E+05 *Ba	4,44E+06 *Aa	Sem micorriza	1,43E+05 *Ab	2,02E+06 *Ab
	4,09E+05 Aa	3,47E+06 Aa	Com micorriza	1,22E+05 *Ab	1,19E+06 *Ab
CV (%)	35,16	26,74	-	141,69	109,29

Coefficiente de Variação (CV). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas (comparação da presença/ausência de FMA) nas colunas e minúsculas (comparação do tempo inicial e final) nas linhas, para cada concentração, não diferem entre si, pelo teste t, em 5% de probabilidade. Médias, nas colunas, para cada concentração, com asterisco (\*) diferem de seu respectivo controle em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

O poluente ocasionou reduções significativas no tempo final nas UFC fúngicas de até 62% no solo com plantas sem inoculação e de até 71% no solo com plantas inoculadas quando comparadas aos valores apresentados no tempo inicial. Nas UFC de bactérias houve reduções de até 65% no solo com plantas sem inoculação e de até 74% no solo com plantas inoculadas, mostrando que o contaminante é um fator limitante para o crescimento dos micro-organismos totais do solo. Solos contaminados com óleo tendem a apresentar umidade e temperatura alteradas devido à incapacidade de reter água em quantidades suficientes (Merkl et al., 2005b) e à limitação do movimento de oxigênio no solo (Pezeshki et al., 2001), o que pode ter afetado o desenvolvimento da população microbiana total.

Embora não tenham sido analisados micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos no solo contaminado com óleo diesel, a redução nas UFC microbianas no solo contaminado demonstra que possivelmente no tempo inicial o óleo diesel tenha selecionado os micro-organismos, e, no tempo final, poucos dos que conseguiram sobreviver no solo contaminado foram capazes de utilizar o óleo diesel como fonte de carbono, provavelmente devido à sua composição química complexa, constituída de uma mistura de alcanos de cadeias simples e ramificadas, bem como de compostos cíclicos e aromáticos, na faixa de 9 a 28 átomos de carbono em sua cadeia, e, em menor proporção, por oxigênio, nitrogênio e enxofre (Adam e Duncan, 1999; Knothe, 2010; Bucker et al., 2011). Além disso, dependendo da necessidade, são inseridos aditivos anticorrosivos, antiespumantes, antioxidantes, desemulsificantes, desativadores de metais, melhoradores de lubricidade, melhoradores de escoamento, dissipadores de cargas estáticas, detergentes, dispersantes e melhoradores de cetano (Souza, 2008).

Em solos não contaminados as comunidades microbianas degradadoras representam menos de 1% da população total de micro-organismos. Contudo, quando o solo é contaminado por petroquímicos verifica-se um incremento de 10% da comunidade total desses microrganismos (Atlas, 1995). Esse fato demonstra que, apesar da redução na microbiota dos solos contaminados, pode ter ocorrido degradação dos hidrocarbonetos provenientes do óleo diesel, visto que a adição de óleo fomenta o número de micro-organismos adaptados ao

contaminante, beneficiando aqueles que conseguem biorremediar (Capelli et al., 2001).

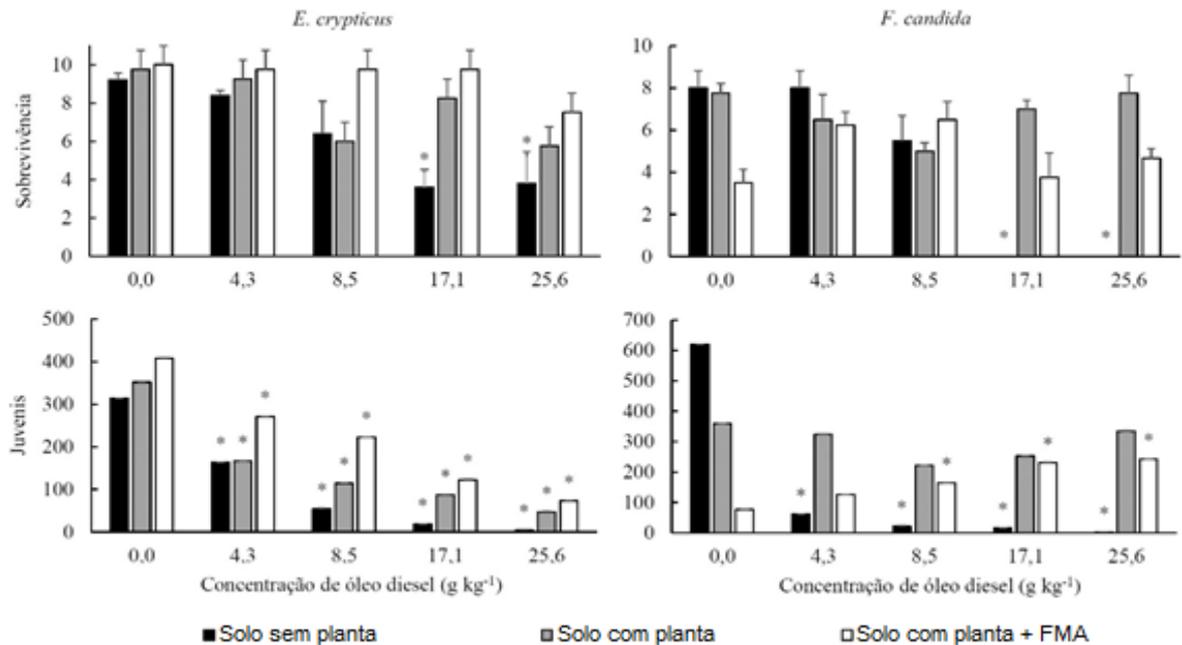
## 5.6 Ensaios Ecotoxicológicos

Os ensaios conduzidos no solo artificial tropical e o solo-controle sem plantas foram validados de acordo com os critérios estabelecidos pelas normas ABNT NBR ISO. A letalidade dos adultos de *E. crypticus* não ultrapassou 20%, o número médio de juvenis foi superior a 25 e o coeficiente de variação para a reprodução foi inferior a 50%. Para *F. candida* a letalidade dos adultos não ultrapassou 20%, o número médio de juvenis foi superior a 100 e o coeficiente de variação para a reprodução não ultrapassou 30%. Estes resultados garantem que as condições ambientais do ensaio e as características do solo natural não influenciaram nos resultados.

A contaminação do solo por óleo diesel mostrou-se tóxica para *E. crypticus* e *F. candida*, afetando sua sobrevivência e reprodução, mesmo na menor concentração avaliada. A sobrevivência de ambos os organismos apresentou uma redução significativa a partir da concentração  $17,1 \text{ g kg}^{-1}$ , chegando a zero para *F. candida* a partir desta concentração. Na reprodução, representada pelo número de juvenis, o contaminante demonstra um efeito negativo mais acentuado no qual ambos os organismos são afetados de forma drástica logo na primeira concentração avaliada (Figura 6). Com isso, a partir dos resultados deste ensaio, não é possível estimar com segurança a menor concentração de efeito observado (CEO), bem como a menor concentração de efeito não observado (CENO), que determina o efeito deletério na reprodução (número de juvenis) dos organismos-teste em relação ao controle, sendo para isso necessário realizar novos ensaios com concentrações menores que  $4,3 \text{ g kg}^{-1}$ .

Os resultados mostram que as contaminações por óleo diesel, mesmo em concentrações inferiores a 3%, causam efeitos drásticos nos organismos do solo, afetando a sobrevivência e a capacidade reprodutiva dos *E. crypticus* e *F. candida*. Apesar das avaliações do efeito do óleo diesel sobre estas espécies de organismos do solo serem irrisórias ou inexistentes, sabe-se que para colêmbolos

do gênero *Isotomidae* (Antoniolli et al., 2013) e o enquitreídeo *E. albidus* (Vaajasaari et al., 2002) os resultados são semelhantes.



**Figura 6.** Sobrevivência e número de juvenis de *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida* em solo contaminado por óleo diesel em diferentes concentrações, antes e após a introdução da espécie *Mimosa caesalpinifolia*. \*Difere do controle (concentração 0,0) segundo o teste Dunnett em 5%.

A sobrevivência dos organismos em solo contaminado com óleo diesel foi afetada de forma menos drástica que a reprodução. Assim como proposto por Geissen et al. (2008), isto demonstra que o número de juvenis é o parâmetro mais sensível na avaliação deste contaminante no solo, tanto de seu efeito tóxico quanto da eficiência de sua biorremediação. Outros contaminantes contendo hidrocarbonetos derivados do petróleo apresentam resultados semelhantes para outros anelídeos (*E. fetida* e *E. albidus*), que tiveram sua reprodução afetada em concentrações menores que para a sobrevivência (Vaajasaari et al., 2002; Dawson et al., 2007; Geissen et al., 2008).

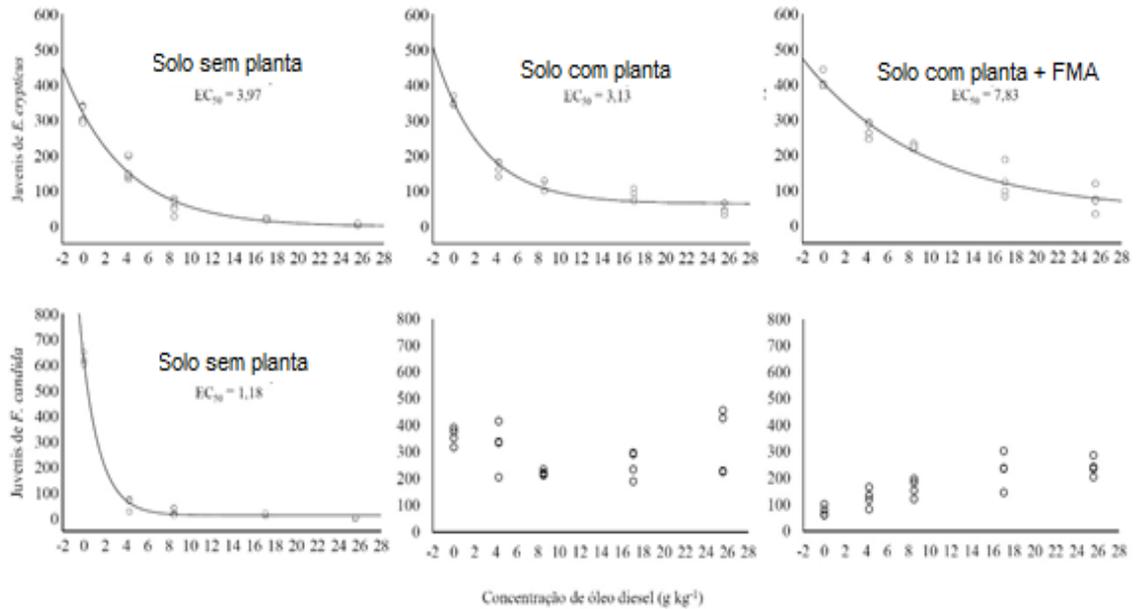
Nos solos com planta a sobrevivência dos organismos testados não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle (Figura 6), demonstrando que houve fitorremediação no solo. O aumento na sobrevivência de minhocas foi observado em situações similares de remediação de solos

contaminados por óleos derivados do petróleo (Saterbak et al., 2000; Hanna e Weaver, 2002), o que é uma importante indicação da remoção de hidrocarbonetos no solo (Maila et al., 2005).

A reprodução do *E. crypticus*, mesmo em solos com planta, reduziu significativamente a partir da primeira concentração do contaminante quando comparado ao controle. Para *F. candida* o número de juvenis não apresentou diferença significativa em relação ao controle no solo com planta sem inoculação. Porém, no solo com planta inoculada, o número de juvenis apresentou aumento significativo a partir da concentração 8,5 g kg<sup>-1</sup> quando comparado ao controle. Apesar da reprodução ter apresentado diferentes resultados entre os organismos utilizados, a toxidez mostrou-se reduzida em todas as concentrações avaliadas. Nesse sentido, a *Mimosa caesalpiniiifolia* com ou sem inoculação mostrou-se efetiva na função de fitorremediar o solo contaminado com óleo diesel, uma vez que a espécie foi capaz de amenizar os efeitos tóxicos do contaminante nas concentrações avaliadas.

A contribuição dos FMAs nos mecanismos de fitorremediação em solos contaminados por HPAs ainda é pouco compreendida (Gao et al., 2010), porém, apesar da impossibilidade desses micro-organismos obterem o carbono de forma independente, promovendo efeitos na planta (Kirk et al., 2005), nesse processo de fitorremediação a importância indireta dos FMAs é evidente. Dentre suas funções na simbiose estão o aumento da sobrevivência e estabelecimento da planta, através da redução dos danos de hidrocarbonetos provenientes do petróleo (Kirk et al., 2005; Tang et al., 2009; Hernández-Ortega et al., 2012).

A avaliação da fitorremediação através da concentração estimada que reduz a taxa de reprodução em 50% ao final do ensaio (EC<sub>50</sub>), mostra diferentes resultados para os organismos utilizados, embora os efeitos do óleo diesel tenham sido semelhantes. O valor de EC<sub>50</sub> para *E. crypticus* apresentou um aumento de quase o dobro em solo com plantas inoculadas quando comparado ao valor apresentado em solo sem planta. A espécie *F. candida* apresentou valor de EC<sub>50</sub> menor que *E. crypticus* para o solo sem planta, mas não foi possível estimar o valor para o solo com planta, devido à ausência de redução e a tendência de aumento no número de juvenis com o aumento da concentração, o que não é compatível com os modelos de regressão utilizados (Figura 7).



**Figura 7.** Valor de EC<sub>50</sub> para a reprodução *F. candida* e *E. crypticus* em solo contaminado por óleo diesel antes e após a fitorremediação com *M. caesalpinifolia*.

Nos solos contaminados sem plantas, a primeira concentração do óleo avaliada causou diminuição no número de juvenis para ambos os organismos e *F. candida* mostrou-se mais sensível a este contaminante, apresentando um valor de EC<sub>50</sub> aproximadamente três vezes menor. Após a introdução das plantas sem inoculação o número de juvenis de *E. crypticus* manteve responsivo à primeira concentração avaliada, mas uma resposta positiva foi obtida através do aumento no valor de EC<sub>50</sub> quando se utilizou plantas inoculadas. Já o número de juvenis de *F. candida* mostrou-se independente da concentração de óleo diesel aplicada no solo, inclusive aumentando quando a planta foi inoculada com FMA. Diferenças nas respostas destes organismos podem estar relacionadas às suas características, pois os anelídeos são mais frágeis de um ponto de vista anatômico, apresentando estruturas macias, flexíveis e frágeis frente a variações químicas e de umidade. Os colêmbolos são bem protegidos por uma cutícula espessa, o que confere uma maior resistência a condições severas (Hentati et al., 2013).

O uso da inoculação de plantas com FMA já é uma estratégia adotada na descontaminação de sítios afetados por compostos xenobióticos (Aguiar et al., 2012), que persistem no ambiente (Coutinho e Barbosa, 2007), tais como o petróleo e seus derivados (Lamego e Vidal, 2007; Andrade et al., 2010; Nie et al., 2011; Vieira et al., 2011; Aguiar et al., 2012; Colla et al., 2013; Naseri et al., 2014). Isto explica os melhores valores de  $EC_{50}$  para *E. crypticus* inoculado comparado ao não inoculado, sugerindo que em solos contaminados por óleo diesel, expressam maiores efeitos negativos nas plantas não inoculadas. Entretanto, a eficiência desta simbiose foi limitada pela dosagem utilizada, pois este contaminante afeta a colonização micorrízica, a germinação de esporos, a alongação de hifas, o crescimento do tubo germinativo na formação de arbúsculos e vesículas (Kirk et al., 2005; Tang et al., 2009; Driai et al., 2015).

Os efeitos do solo com plantas inoculadas sobre a reprodução de *F. candida* foram mais complexos e de difícil explicação. Isto é agravado pela complexidade de que se trata o contaminante, composto por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, variável de acordo com sua origem e legislação nacional (Driai et al., 2015). Poderia se atribuir a um aumento natural da oferta de alimento, como de fungos no solo, já que esta espécie possui hábito fungívoro (Fountain e Hopkin, 2005). Entretanto, no presente estudo observou-se diminuição da colonização micorrízica (Figura 5) e de UFC de fungos (Tabela 6) com o aumento da concentração. Ademais, o fermento biológico é adicionado de maneira suficiente para todos os tratamentos. Também não se pode atribuir a efeitos isolados do óleo diesel e da *M. caesalpiniiifolia*, pois estes são conhecidos e mostraram respostas diferentes (Figuras 6 e 7). Contudo, a informação mais relevante é que a resposta da reprodução deste organismo frente à fitorremediação foi positiva, comprovando sua eficiência.

Segundo Coutinho et al. (2015), os principais mecanismos de fitorremediação são: Fitoextração - ocorre a absorção do contaminante pelas raízes com posterior transferência para a parte aérea; Fitotransformação - o metabolismo da planta age na degradação dos contaminantes; Fitoestimulação - degrada os poluentes orgânicos por micro-organismos na rizosfera da planta; e Fitoestabilização - as plantas são utilizadas para limitar a biodisponibilidade do contaminante, reduzindo a mobilidade do poluente no solo. Contudo, embora

tenha sido comprovada a fitorremediação, os resultados obtidos não permitem indicar com detalhes como isto ocorreu.

Portanto, a leguminosa utilizada em conjunto com a inoculação com FMA pode ter favorecido micro-organismos decompositores de hidrocarbonetos em sua rizosfera. Mas, também há trabalhos que mostram que a atividade de anelídeo é capaz de remover hidrocarbonetos provenientes do óleo diesel em curto período (Fernández et al., 2011). Outra constatação encontrada é que este óleo foi detectado em raízes de gramíneas e leguminosas crescendo em solos contaminados (Pichtel e Liskanen, 2001). Portanto, novos trabalhos devem ser realizados para determinar com detalhes como se dá este processo de fitorremediação promovido pela *M. caesalpinifolia*, principalmente em condições mais próximas a contaminações reais e por um período maior, o que possivelmente geraria conhecimento para a melhoria de sua eficiência como espécie com potencial fitorremediador.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

A contaminação do solo causada por petróleo e seus derivados, que ocorre principalmente através de vazamentos pontuais dos tanques subterrâneos de armazenamento em postos de abastecimento, é refletida em inúmeros danos ambientais. A recuperação de locais contaminados com hidrocarbonetos pode ser facilitada utilizando-se plantas associadas a fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) a fim de criar um ecossistema mais equilibrado capaz de fornecer subsídios para potencializar o processo de fitorremediação em solo contaminado com óleo diesel.

Deste modo, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o potencial fitorremediador da espécie *Mimosa caesalpinifolia* Benth., utilizando como indicadores a sobrevivência e a reprodução de *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* em ensaios ecotoxicológicos, a diferentes concentrações de óleo diesel no solo e verificar se a associação com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Claroideoglossum etunicatum* pode influenciar nesse processo.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com delineamento em blocos casualizados (DBC), em arranjo fatorial 2 x 5, sendo 2 tratamentos microbiológicos (com e sem inoculação com o FMA) e 5 concentrações de óleo diesel (0%, 0,5%, 1%, 2% e 3%), com quatro repetições. Foram avaliados: índice Soil-Plant Analysis Development (SPAD); população microbiana total no solo; índices biométricos: altura, diâmetro do coleto, massa seca da parte aérea, massa

seca das raízes, número de folíolos, área foliar e características do desenvolvimento radicular (volume e comprimento); análise nutricional da parte aérea; avaliação da taxa de colonização micorrízica e ensaios ecotoxicológicos.

Os resultados mostraram que o solo contaminado com óleo diesel refletiu em redução no índice SPAD, inibição na colonização micorrízica, crescimento limitado da *M. caesalpiniiifolia*, além da redução das UFC de fungos e bactérias totais no solo, demonstrando seu elevado potencial de impacto. Apesar do baixo crescimento das plantas, a *M. caesalpiniiifolia* apresentou 100% de sobrevivência, independente do tratamento utilizado.

Os teores nutricionais demonstraram que independente da inoculação com o FMA *Claroideoglossum etunicatum*, a *Mimosa caesalpiniaefolia* acumulou boas quantidades de nitrogênio, cálcio, potássio, fósforo e magnésio, mesmo em solo contaminado com óleo diesel, porém, a análise dos conteúdos nutricionais revelou o efeito prejudicial do óleo diesel na aquisição de nutrientes pelas plantas.

Os ensaios ecotoxicológicos demonstraram que mesmo em um curto prazo, a leguminosa arbórea *Mimosa caesalpiniiifolia* promoveu a fitorremediação de solo contaminado por óleo diesel, principalmente quando inoculada com o FMA *Claroideoglossum etunicatum*. No entanto, embora tenha sido comprovada a fitorremediação, os resultados obtidos não permitem indicar com detalhes como isto ocorreu.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que:

- O aumento das concentrações de óleo diesel no solo resultou em efeitos negativos acentuados no crescimento e na colonização micorrízica das mudas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., apesar disso, a espécie mostrou capacidade de tolerância ao contaminante;
- A *Mimosa caesalpiniiifolia* pode ser indicada como espécie com potencial fitorremediador em solo contaminado com óleo diesel em pequenas concentrações, sobretudo quando inoculada com o FMA *Claroideoglossum etunicatum*;
- Sugere-se a condução de estudos complementares, através de um tempo maior de avaliação e estratégias de promoção do crescimento, para avaliar com maiores detalhes quais são os mecanismos de fitorremediação estimulados por essa espécie vegetal.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biorremediação constitui em uma alternativa para descontaminação de solos contaminados com óleo diesel decorrentes de acidentes durante o transporte do produto e vazamentos diários em postos de combustíveis, apresentando baixo custo e menor risco ambiental quando comparado às técnicas de descontaminação tradicionais (Tiburtius et al., 2004; Tellechea, 2015). A fitorremediação pode ser utilizada como uma estratégia posterior, visando à estabilidade do ecossistema, especialmente do que diz respeito ao ciclo do carbono (C) e do nitrogênio (N) (Siqueira et al., 2008), e com isso propiciando melhores condições para o reestabelecimento da biota do solo.

A contaminação com óleo diesel prejudicou o crescimento inicial das mudas de *M. caesalpinifolia*, embora isto não tenha afetado a sua principal função neste estudo que foi a de promover a fitorremediação, principalmente quando inoculada com fungos micorrízicos. A partir deste resultado, obtido com mudas de apenas três meses, são necessários novos estudos com maior tempo de avaliação. Além disso, o melhoramento genético da *M. caesalpinifolia* poderia ser uma estratégia na melhoria do desenvolvimento dessa espécie visando à descontaminação de solo. Nesse sentido, investigações dos mecanismos de fitorremediação dos HPAs no solo e a relação da atividade microbiana nesse processo seriam de grande valia.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT NBR 15537 (2014). *Ecotoxicologia terrestre - Toxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae)*. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas.
- ABNT NBR ISO 11267 (2011). *Qualidade do solo - Inibição da reprodução de Collembola (Folsomia candida) por poluentes do solo*. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas.
- ABNT NBR ISO 16387 (2012). *Qualidade do solo - Efeitos de poluentes em Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) - Determinação de efeitos sobre a reprodução e sobrevivência*. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas.
- Accioly, A. M. A., Siqueira, J. O. (2000). Contaminação química e biorremediação do solo. *Tópicos em Ciência do Solo*, 1: 299-352.
- Adam, G. e Duncan, H.J. (2002). Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*, 120:363-370.
- Adam, G., Duncan, H. (1999). Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health*, 21: 353–357.
- Aguiar Sobrinho, J. (1995). Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) uma espécie florestal de uso múltiplo. *Floresta e Ambiente*, Seropédica/RJ, 2(1): 125-125.
- Aguiar, C. R. C., Lopes, B. C., Barbosa, M. V. D. Balieiro, F. C., Gomes, M. M. (2012). Fitorremediação de Solos Contaminados por Petróleo. *Revista Trópica, Ciências Agrárias e Biológicas*, 6(1):3.
- Alarcón, A.; Davies jr., F.T.; Autenrieth, R.L.; Zuberer, D.A. (2008). Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Int. J. Phytorem*, 10: 251-263.
- Alkio, M.; Tabuchi, T.M.; Wang, X.; Colón-Carmona, A. (2005). Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany*, 56 (421): 2983-2994.

- Almeida, R. T., Vasconcelos, I., Ness, R. L. L. (1986). Infecção micorrízica vesículo-arbuscular e nodulação de leguminosas arbóreas do Ceara, Brasil. *Ciência Agrônômica*, 17(1):89-97.
- Almeida, R.T. de, Freire, V.F., Vasconcelos, I. (1987). Efeitos da interação *Glomus macrocarpum*, *Rhizobium* sp. e níveis crescentes de fosfatos de rocha sobre o desenvolvimento de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) e de leucena (*Leucena leucocephala* Lam. de Witt). *Ciência Agrônômica*, Fortaleza, 18 (1): 131-136.
- Amakiri, J. O.; Onofeghara, F. A. (1983). Effect of crude oil pollution on the growth of *Zea mays*, *Abelmoshus esculentus* and *Capsicum frutescens*. *Oil Petrochem Pollut.*, 1: 199-205.
- Andrade, J. A.; Augusto, F.; Jardim, J. C. S. F. (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, São Paulo, 35(3): 17-43.
- Andreote, F. D.; Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. (2009). Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, p.417- 432.
- Angelini, G. A. R.; Saggin Júnior, O. J.; Silva, E. M. R. (2013). Seleção de fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos para simbioses eficientes com *Acacia mangium* willd. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 34 (6) suplemento 1: 3529-3542.
- ANP (2013). *Nota à imprensa 2013 - Dezembro*. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=69174&m=s10&t1=&t2=s10&t3=&t4=&ar=0&ps=1&cachebust=1425848767673>>. Acesso em: 08 mar 2015.
- ANP (2015a). *Notas à Imprensa 2015 - Fevereiro*. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=74189&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1424526209445>>. Acesso em: 08 mar 2015.
- ANP (2015b). *Nota à imprensa 2015 - Março*. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=74356&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1425412263743>>. Acesso em: 08 mar 2015.
- Antoniolli, Z. I.; Redin, M.; Souza, E. L.; Pocojeski, E. (2013). Metais pesados, agrotóxicos e combustíveis: efeito na população de colêmbolos no solo. *Ciência Rural*, 43 (6): 992-998.
- Araújo, R. de S. L. (2012). *Fungo micorrízico arbuscular e biofertilizantes no crescimento e nutrição da sabiá (Mimosa caesalpiniaefolia Benth.)*. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 69p.
- Araújo; R. S.; Hungria, M. (1994). *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: EMBRAPA-CNPAP.
- Argenta, G.; Silva, P.R.F.; Bortolini, C.G.; Forsthofer, E.L.; Strieder, M.L. (2001). Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 13: 158-167.
- Atlas, R. M. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 35: 317-327.

- Augé, R.M. (2000). Stomatal behavior of arbuscular mycorrhizal plants. In: Kapulnik, Y.; Douds, D.D. *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Dordrecht, Kluwer, p. 201-237.
- Aworanti, O. A., Agarry, S. E., Ajani, A. O. (2012). A Laboratory study of the effect of temperature on densities and viscosities of binary and ternary blends of soybean oil, soy biosiesel and petroleum diesel oil. *Advances in chemical engineering and science*, 2: 444-452.
- Baker, A. J. M.; McGrath, S. P.; Sidoli, C. M. D.; Reeves, R. D. (1994). The possibility of *in situ* heavy metal descontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation e Recycling*, 11: 41-49.
- Baker, J. M. (1970). The effects of oils on plants. *Environmental Pollution*, 1: 27-44.
- Balbinot, E., Carneiro, J. G. de A., Baroso, D. G., Paes, H. M. F. (2010). Crescimento inicial de *Eucalyptus tereticornis* em plantios puro e consorciado com *Mimosa caesalpinifolia* e *Mimosa pilulifera*, em Campos dos Goytacazes - RJ. *Árvore*, Viçosa, MG, 34(1): 1-11.
- Balliana, A. G. (2015). *Avaliação morfofisiológica e potencial fitorremediador de Canavalia ensiformis (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel*. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.
- Bardeli-da-Silva, M. Y. (2006). *Efeitos do solo contaminado com óleo diesel na germinação, crescimento e morfoanatomia de Sebastiania commersoniana (Baill.) L. B. Sm. & Downs (Euphorbiaceae)*. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C. (1983). Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Advances in Agronomy*, 36:1-54.
- Barneby, R.C. (1991). *Sensitivae censitae: a description of the genus Mimosa Linnaeus (Mimosaceae) in the new world*. Bronx: The New York Botanical Garden, 835 p. (Memoirs of the New York Botanical Garden, 65).
- Benedetti, T.; Antonioli, Z.I.; Giracca, E.M.N.; Steffen, R.B. (2005). Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares na cultura do milho após uso de espécies de plantas de cobertura de solo. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 4: 44-51.
- Bento, R. A.; Orivaldo, J. S-J. ; Rosa, M. P.; Rosângela, S. ; Eliane, M. R. da S. ; Sílvio, R. de L. T. ; Frederico, H. T. G. de L. ; Luiz, F. M. ; Antonia, G. T. V. (2012). Selection of Leguminous Trees Associated with Symbiont Microorganisms for Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soil. *Water Air Soil Pollut*, 223: 5659–5671.
- Berbara, R. L. L.; Souza, F. A.; Fonseca, H. M. A. C. (2006). Fungos micorrízicos arbusculares: Muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.53-88.
- Blackmer, T.M.; Schepers, J.S. (1995). Use of chlorophyll meter to monitor nitrogen status and schedule fertigation for corn. *Journal of Production Agriculture* , 8: 56-60.

- Bona, C.; Silva, M. Y. B.; Resende, I. M.; Santos, G. O.; Souza, L. A.; Inckot, R. C. (2011). Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). *Acta Botânica Brasileira* (Impresso), 25: 277-285.
- Bonfim-Silva, E. M.; Silva, T. J. A. da; Guimarães, S.L.; Pereira, M.T.J.; Gonçalves, J.M. (2011). Leguminosa Híbrida Java submetida à calagem em Latossolo Vermelho do cerrado. *Enciclopédia biosfera*, 7: 1811-1820.
- Bowen, G. D. (1980). Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. In: MIKOLA, P. (Ed.). *Tropical mycorrhiza research*. Oxford: Clarendon, p. 165-190.
- Brahmaprakash, G. P.; Sahu, P. K. (2012). Biofertilizers for Sustainability. *Journal of the Indian Institute of Science*, 92: 1.
- Brandão, E. M. (1992). Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M.; Neves, M. C. P. *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 1-15.
- Braun, H.; Coelho, F. S.; Silva, M. C. de C.; Fontes, P. C. R.; Cecon, P. R.; Busato, C. (2013). Absorção, metabolismo e diagnóstico do estado de nitrogênio em plantas de batata. *Revista de Ciências Agrárias* (Belém), 56: 185-195.
- Braun, H.; Silva, M. C. de C.; Fontes, P. C. R.; Coelho, F. S.; Cecon, P. R. (2015). Top-dressing nitrogen management decision in potato using the UFV-80 color chart and SPAD readings. *African Journal of Agricultural Research*, 10: 3494-3501.
- Brito, G. C. B.; Souza, D. B.; Vasconcelos, F. C. W.; Braga, L. C. (2010). A importância da bioprospecção de microrganismos em área contaminadas com produtos derivados do petróleo. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, 3: 291-310.
- Brito, V. N. (2013). *Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada na produção de mudas de paricá*. Dissertação (Mestre em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Bücker, F.; Santestevan, N.A.; Roesch, L.F.; Jaccques, R.J.S.; Peralba, M.C.; Camargo, F.A.O.; Bento, F.M. (2011). Impact of Biodiesel on Biodeterioration of Stored Brazilian Diesel Oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65: 172-178.
- Burity, H. A.; Lyra, M. C. C. P. de; Souza, E. S. de; Mergulhão, A. C. E. S.; Silva, M. L. R. B. da. (2000). Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de Sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35 (4): 801-807.
- Burken, J. G. (2003). Uptake and metabolism of organic compounds: Green-liver model. In: *Phytoremediation. Control and Transport of Contaminants*; McCutcheon, S. C., Schnoor, J. L., Eds.; John Wiley: Hoboken, NJ, p. 59-84.
- Caldeira, M.V.W.; Silva, E.M.R.; Franco, A.A.; Watzlawick, L.F. (2003). Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de três leguminosas

- arbóreas. *Revista Acadêmica (Ciências Agrárias e Ambientais)*, Curitiba, 1(1): 27-32.
- Capelli, S.M., Sánchez, B.S.R. de. (2001). Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated wast from crude oil extraction by indigenous bactéria. *International Biodeterioration e Biodegradation*, 47: 233-238.
- Cardoso, E. J. B. N.; Cardoso, I. M.; Nogueira, M. A.; Maluche-Baretta, C. R. D.; Paula, A. L. M. (2010). Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. *In: Siqueira, J. O.; Souza, F. A.; Cardoso, E. J. N.; Tsai, S. M. Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil*. 1. ed. Lavras, MG: UFLA, p.153-214.
- Carvalho, P. E. R. (2006). *Espécies arbóreas brasileiras*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Florestas, 2: 627p.
- Carvalho, P.E.R. (2007). Circular Técnica 135, *Sabiá - Mimosa caesalpinifolia*. Colombo: Embrapa Florestas, 10p.
- Castro, E.M.; Pinto, J.E.B.P.; Alvarenga, A.A.; Lima Júnior, E.C.; Bertolucci, S.K.V.; Silva Filho, J.L.; Vieira, C.V. (2003). Crescimento e anatomia foliar em plantas jovens de *Mikania Glomerata* Sprengel (Guaco) submetidas a diferentes fotoperíodos. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, 27(6): 111-120.
- Cavalcante, J.R.; Conforto, E.C. (2002). Desempenho de cinco clones jovens de seringueira na região do Planalto Ocidental Paulista. *Bragantia*, 61(3): 237-245.
- CETESB (2013). *Texto explicativo relação de áreas de áreas contaminadas e reabilitadas no estado de São Paulo*. São Paulo, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 14 p.
- Chagas Junior, A.; Oliveira, L. A. de; Oliveira, A. N. de; Willerding, A. L. (2010). Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Scientiarum*, Maringá, 32(2): 359-366.
- Chhibber, V. K., Joshi, C. H. C., Saxena, S. K. (2012). Sal (Shorea Robusta), an Environmentfriendly and Ecofriendly Alternative Vegetable Oil Fuel in Comparison to the Diesel Oil. *Advances in Pure and Applied Chemistry*, 1: 36-39.
- Cipriani, H. N. (2011). *Respostas morfofisiológicas de plantas de Acacia magium Willd. e Mimosa caesalpiniaefolia Benth., inoculadas com rizóbio e micorriza arbuscular, sob efeito de arsênio*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais – MG.
- CNT (2012). *Os impactos da má qualidade do óleo diesel brasileiro*. Brasília: Confederação Nacional do Transporte, 24p.
- Colla, T.S.; Andreatza, R.; Bücken, F; Souza, M.M. de.; Tramontini, L.; Prado, G.R.; Frazzon, A.P.G.; Camargo, F.A. DE O.; Bento, F.M. (2013). Bioremediation assessment of diesel–biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environ Sci Pollut Res*, 21: 2592–2602.
- Colodete C. M.; Dobbss L. B.; Ramos, A. C. (2014). Aplicação das Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas impactadas. *Natureza on line*, 12(1): 31-37.

- Colozzi Filho, A.; Nogueira, M.A. (2007). Micorrizas arbusculares em plantas tropicais: café, mandioca e cana-de-Açúcar. *In: Silveira, A.P.D.; Freitas, S. S. Microbiologia do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agrônomo, p. 39-56.
- Coutinho, H. D.; Barbosa, A. R. (2007). Fitorremediação: considerações gerais e características de utilização. *Silva Lusitana*, 15 (1): 103-117.
- Coutinho, P. W. R., Cadorin, D. A., Noreto, L. M., Gonçalves Jr., A. C. (2015). Alternativas de Remediação e Descontaminação de Solos: Biorremediação e Fitorremediação. *Nucleus*, 12 (1): 59-68.
- Cunha, M. E. (2008). *Caracterização de biodiesel produzido com misturas binárias de sebo bovino, óleo de frango e óleo de soja*. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 72p.
- Cunningham, S. D.; Anderson, T. A.; Schwab, A. P.; HSU, F. C. (1996). Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, 56: 55-114.
- Dal Forno, R. G. (2006). *Avaliação da poluição do solo por derivados de petróleo e sua remediação*. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 61p.
- Dawson, J. J. C.; Godsiffe, E. J.; Thompson, I. P.; Ralebiso-Senior, T. K.; Killham, K. S.; Paton, G. I. (2007). Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 39: 164-177.
- De Jong, E. (1980). The effect of a crude oil spill on cereals. *Environmental Pollution*, 22: 187-196.
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49: 2106-2116.
- Demirbas, A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50 (1): 14-34.
- Diniz, P. F. de A.; Oliveira, L. E. M. de; Gomes, M. P.; Castro, E. M. de; Mesquita, A. C.; Bonome, L. T. da S.; Silva, L. da. (2010). Crescimento, parâmetros biofísicos e aspectos anatômicos de plantas jovens de seringueira inoculadas com fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum*. *Acta Bot. Bras.*, 24(1): 65-72.
- Driai, S., Verdin, A., Laruelle, F., Beddiar, A., Sahraoui, A. L-H. (2015). Is the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* able to fulfil its life cycle in the presence of diesel pollution?. *International Biodeterioration & Biodegradation* 105: 58-65.
- Entry, J.A.; Rygielwicz, P.T.; Watrud, L.S.; Donnelly, P.K. (2002). Influence of adverse soil conditions on the formation and function of Arbuscular mycorrhizas. *Adv. Environ. Res.*, 7:123-138.
- Fernandes, M.S. (2006). *Nutrição Mineral de Plantas*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa, MG. 432p.
- Fernández, M. D.; Pro, J.; Alonso, C.; Aragonese, P.; Tarazona, J. C. (2011). Terrestrial microcosms in a feasibility study on the remediation of diesel-contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 2133-2140.

- Ferreira, D. F. (2011). *Sisvar*. Versão 5.3 (Build 77): DEX – Ufla. Pacote estatístico.
- Figueirôa, J. M. de; Pareyn, F. G. C.; Drumond, M.; Araújo, E. de L. Madeireiras. (2005). In: Sampaio, E. V. S. B.; Pareyn, F. G. C.; Figueirôa, J. M. de; Santos Júnior, A. G. (Eds.). *Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial*. Recife: Associação Plantas do Nordeste, p. 101– 133.
- Flores-Aylas, W. W.; Saggin-Júnior, O. J.; Siqueira, J. O.; Davide, A. C. (2003). Efeito do *Glomus etunicatum* em fósforo no crescimento inicial de espécies arbóreas em semeadura direta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38 (2): 257-266.
- Fountain, M. T.; Hopkin, S. P. (2005). *Folsomia candida* (Collembola): A “standard” soil arthropod. *Annu. Ver. Entomol.*, 50: 201-222.
- Franco, A.A., Faria, S.M. (1997). The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol. Bioch.* 29, 897-903.
- Freitas MSM; Martins MA; Carvalho AJC. (2006). Crescimento e composição da menta em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada. *Horticultura Brasileira*, 24: 11-16.
- Gao, Y.Z.; Cheng, Z.X.; Ling, W.T.; Huang, J. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots. *Bioresource Technology*, 101: 6895–6901.
- García-Garrido, J. M.; Ocampo, J. A. (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of experimental Botany*, 53(373): 1377-1386.
- Geissen, V.; Gomez-Rivera, P.; Lwanga, E. H.; Mendoza, R. B.; Narcías, A. T.; Marcías, E. B. (2008). Using earthworms to test the efficiency of remediation of oil polluted soil in tropical Mexico. *Ecotoxicol Environ Saf* , 71 (3): 638-42.
- Gerdemann, J.W.; Nicolson, T.H. (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Transactions of British Mycological Society*, 46: 235-244.
- Gerhardt, K. E., Huang, X. D., Glick, B. R., Greenberg, B. M. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci.*, 176: 20–30.
- Glass, D.J. (1999). Current market trends in phytoremediation. *Int.J.Phyto.*, 1(1): 1-8.
- Gogosz, A.M.; Bona, C.; Santos, G.O.; Botosso, P.C. (2010). Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), in petroleum contaminated soil and bioremediated soil. *Brazilian Journal of Biology*, 70 (4): 977-986.
- Göhre, V.; Paszkowski U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223: 1115-1122.
- Gonçalves, C. de A.; Fernandes, M. M.; Andrade, A. M. de. (1999). Celulose e carvão vegetal de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (sabiá). *Floresta e Ambiente*, Seropédica, 6 (1): 51-58.

- Gonçalves, E. O.; Paiva, H. N. de.; Neves, J. C. de L.; Gomes, J. M. (2013). Nutrição de mudas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. sob diferentes doses de N, P, K, Ca e Mg. *Ciência Florestal*, Santa Maria, 23 (2): 273- 286.
- Govindarajulu, M.; Pfeffer, P.E.; Jin, H.; Abubaker, J.; Douds, D.D.; Allen, J.W.; Bücking, H.; Lammers, P.J.; Shachar-Hill, Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435: 819-823.
- Grace, C.; Stribley, D.P. (1991). A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, Cambridge, 95 (10): 1160-1162.
- Gratão, P.L., Prasad, M.N.V., Cardoso, P.T., Lea, P.J., Azevedo, R.A. (2005). Phytoremediation: Green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 17 (1): 53-64.
- Hanna, S. H. S.; Weaver, R. W. (2002). Earthworm survival in oil contaminated soil. *Plant and Soil*, 240: 127-132.
- Hentati, O.; Lachhab, R.; Ayadi, M.; Ksibi, M. (2013). Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environ Monit Assess*, 185: 2989-2998.
- Hernández-Ortega, H.A.; Alarcón, A.; Ferrera-Cerrato, R.; Zavaleta-Mancera, H.A.; Araceli, H.; Lopez-Delgado, H.A. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate, *J. Environ. Manage.*, 95:319-324.
- Jackson, M.L. (1965). *Soil chemical analysis*. New Jersey: Prentice Hall. 498p.
- Jenkins, W. R. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, 28: 692.
- Jesus, E. C.; Schiavo, J. A.; Faria, S. M. (2005). Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. *Revista Árvore*, 29(4): 545-552.
- Johnsen, A.R.; Wick, L.Y.; Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Poll.*, 133:71- 84.
- Joner, E.J.; Leyval, C. (2001). Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza*, 10: 155–159.
- Joner, E.J.; Leyval, C. (2003). Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomie*, 23: 495-502.
- Kahneh, E., Ramezanpour, H., Ramezanpour, M.R. Haghparast, M. R.; Shirinfekr, A. (2006). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus supplement on leaf P, Zn, Cu and Fe concentrations of tea seedlings. *CASPIAN J. Env. Sci.*, 4 (1): 53-58.
- Kaimi, E.; Mukaidani, T.; Miyoshi, S.; Tamaki, M. (2006). Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. *Environmental and Experimental Botany*, Oxford, 55: 110-119.
- Kathi, S., Khan, A.B. (2011). Phytoremediation approaches to PAH contaminated soil. *Indian Journal of Science and Technology*, 4 (1).

- Kavamura, V. N., Esposito, E. (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*, 28 (1): 61-69.
- Kiers, E. T.; Duhamel, M.; Beesetty, Y.; Mensah, J.A.; Franken, O.; Verbruggen, E.; Fellbaum, C.R.; Kowalchuk, G. A.; Hart, M.M.; Bago, A.; Palmer, T. M.; West, S.A.; Vandenkoornhuys, P.; Jansa, J.; Buching, H. (2011). Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science*, 333: 808-882.
- Kirk, J. L., Moutoglou, P., Klironomos, J., Lee, H., Trevors, J. T. (2005). Toxicity of diesel fuel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and *in vitro* transformed carrot root cultures. *Plant and Soil* 270: 23–30
- Knothe, G. (2010). Biodiesel and Renewable Diesel: A Comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, 36: 364-373.
- Lamego, F. P.; Vidal, R. A. (2007). Fitorremediação: Plantas como agentes de despoluição?. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 17: 9-18.
- Leal, J. V.; Alves, E. U.; Bruno, R. L. A.; Pereira, W. E.; Alves, A. U.; Galindo, E. A.; Alves, A. U. (2008). Épocas de colheita e tratamentos pré-germinativos para superação da dormência de sementes de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. *Revista árvore*, Viçosa, MG, 32 (2): 203-210.
- Leme, D.M., Grummt, T., Heinze, R.; Sehr, A., Skerswetat, M., Marchi, M., Machado, M.C., Oliveira, D.P., Marin-Morales, M.A. (2011). Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 2148–2155.
- Leung, D.Y.C.; Koo, B.C.P.; Guo, Y. (2006). Degradation of biodiesel under different storage conditions. *Bioresource Technology*, 97: 250-256.
- Leyval, C., Jones, E.J., Del Val C., Haselwandter, K. (2002). Potencial of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. In: Gianinazzi, S.; Schüepp, H.; Barea, J.M.; Haselwandter, K. (Eds), *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkauer Verlag, Basel Boston Berlin,. p.175-186.
- Lima, I.C.A.R., Lira, M.A., Mello, A.C.L. (2008). Avaliação de sabiazeiro (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth) quanto a acúleos e preferência por bovinos. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 3 (3): 289-294.
- Lima, K. B. (2010). *Fungos micorrízicos arbusculares, bactérias diazotróficas e adubação fosfatada em mudas de mamoeiro*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Lima, K. B. (2014). *Microrganismos, gramíneas e nutrientes minerais na degradação de petróleo e óleo diesel no solo*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Linderman RG. (1994). Role of vsm fungi in biocontrol. In: Pfleger FL, Linderman RG, editors. *Mycorrhizae and plant health*. St Paul: APS.
- Linhurst, R. A., P. Bourdeau, R. C. Tardiff. (1995). Methods to assess the effects of chemicals on ecosystems In: *SCOPE 53. Methods to study chemical effects*.

- Scientific Committee on Problems of the Environment Report #53. M.S. Swaminathan Research Foundation, Chennai, India.
- Lorenzi, H. (2002). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 179p.
- Lozano-Garcia, B. L.; Parras-Alcantara, M. D. (2011). Effects of oil mill wastes on surface soil properties runoff and soil losses in traditional olive groves in southern Spain. *Catena*, 85: 187-193.
- Lynch, J. M., Wiseman, A., Leij, F. A. A. M. de. (2001). Ecotoxicology. *In: Encyclopedia of Biodiversity*. San Diego: Academic Press, p. 363-373.
- Macek, T., Mackova, M., Kas, J. (2000). Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol. Adv.*, 18: 23–34.
- Magalhães, D. P., Ferrão-Filho, A. S. (2008). Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3): 355-381.
- Maia, G. N. (2004). *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora.
- Maila, M. P.; Cloete, T. E. (2005). The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55: 1-8.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A. de. (1997). *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 319p.
- Malusá, E.; Sas-Paszt, L.; Ciesielska, J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, p.1-12.
- Maranho, L. T., Galvão, F., Preussler, K. H., Muñoz, G., Kuniyoshi, Y. S. (2006). Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endll., Podocarpaceae. *Acta Bot. Bras.*, 20 (3): 615-624.
- Marques, M., Aguiar, C. R. C., da Silva, J. J. L. S. (2011). Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* [online], 35 (1): 1-11.
- Martinez, T.N.; Johnson, N.C. (2010). Agricultural management influences propagule densities and functioning of arbuscular mycorrhizas in low- and high-input agroecosystems in arid environments. *Appl. Soil Ecol.*, 46:300-306.
- Marwood, T. M.; Knoke, K.; Yau, K.; Lee, H.; Trevors, J. T.; Suchorski-Tremblay, A.; Flemming, C. A.; Hodge, V.; Liu, D. L.; Seech, A. G. (1998). Comparison of toxicity detected by five bioassays during bioremediation of diesel fuel-spiked soils. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 13: 117- 126.
- Masakorala, K.; Yao, J.; Cai, M.; Chandankere, R.; Yuan, H.; Chen, H. (2013). Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Psuedomonas* sp. USTB-RU from petroleum contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 263: 493–500.

- Melloni, R.; Siqueira, J. O.; Moreira, F. M. S. (2003). Fungos micorrízicos arbusculares em solos de áreas de mineração de bauxita em reabilitação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 38: 267-276.
- Mendes, M. M. C.; Chaves, L. de F. de C.; Neto, T. P. P.; Silva, J. A. A. da; Figueiredo, M. do V. B. (2013). Crescimento e sobrevivência de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) inoculadas com micro-organismos simbiotes em condições de campo. *Ciência Florestal*, Santa Maria, 23(2): 309-320.
- Mendonça, A.V.R.; Carneiro, J. G. de A.; Guerra, D. B.; Coutinho, M. P.; Souza, J. S. (2008). Atributos edáficos de cavas de extração de argila após cultivos puros e consorciados de *Eucalyptus* spp. e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (Sabiá) e quantificação da poda de sabiá. *Revista Floresta*, 38: 431-443.
- Mergulhão, A.C.E.S.; Silva, M.L.R.B.; Burity, H.A.; Stamford, N.P. (2001). Influência da dupla inoculação rizóbio e fungos micorrizas-arbusculares em plantas de sabiá sob solos de diferentes texturas. *Ecossistema*, 26: 42-47.
- Merkel, N., Schlütze-Kraft, R., Infante, C. (2005b). Phytoremediation in the tropics: influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environ. Pollut.* 138: 86–91.
- Merkel, N., Schlütze-Kraft, R., Infante, C. (2005a). Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Poll.* 165: 195-209.
- Miranda, J.C.C. (2008). *Cerrado: Micorriza arbuscular, ocorrência e manejo*. Planaltina, Embrapa Cerrados, p.169.
- Molina-Barahona, L.; Veja-Loyo, L.; Guerrero, M.; Ramírez, S.; Romero, I.; Veja-Jarquín, C.; Albores, A. (2005). Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. *Environmental Toxicology*, 20 (1): 100-109.
- Moraes, A.C.; Gasparotto, L.; Moreira, A. (2010). Fungos micorrízicos arbusculares em seringueira em latossolo amarelo distrófico da Amazônia ocidental. *Revista Árvore*, Viçosa, 34 (3): 389-397.
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. (2006). *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Editora UFLA, 729p.
- Morsomme, P.; Boutry, M. (2000). The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biophys. Biochim. Acta.*, 1465:1-16.
- Munkvold, L.; Kjoller, R.; Vestberg, M.; Rosendahl, S.; Jakobsen, I. (2004). High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 164:357-364.
- Muratova AY, Dmitrieva TV, Panchenko LV, Turkovskaya OV (2008). Phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil. *Int J Phytoremediat*, 10: 486–502.
- Nagahashi, G.; Douds, D. J. (2007). Separated components of root exudate and cytosol stimulate different morphologically identifiable types of branching responses by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological research*, 3: 487-492.

- Nascimento, M. P. S. C. N.; Oliveira, M. E. A. O. (1999). Quebra de dormência de sementes de quatro leguminosas arbóreas. *Acta Botanica Brasilica*, 13 (2): 115-236.
- Naseri, M.; Barabadi, A., Barabady, J. (2014). Bioremediation treatment of hydrocarbon-contaminated Arctic soils: influencing parameters. *Environ Sci Pollut Res*.
- Nemec, S.; Vu, J. C. V. (1990). Effects of soil phosphorus and *Glomus intraradices* on growth, nonstructural carbohydrates, and photosynthetic activity of *Citrus aurantium*. *Plant and Soil*, Dordrecht, 128: 257- 263.
- Neves, R. B. S. M., Bueno, M., Cardoso, S. L., Vieira, P. A., Cardoso, V. L. (2012). Biorremediação de solo contaminado com biodiesel e glicerina – resultados preliminares da adaptação microbiana em solo e indícios de biorremediação dos contaminantes. *Anais do XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ*, Búzios, Rio de Janeiro: Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química.
- Newman, L. A., Reynolds, C. M. (2004). Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 15 (3): 225-230.
- Nie, M.; Wang, Y.; Yu, J.; Xiao, M., Jiang, L.; Fang, C.; Chen, J.; Li, B. (2011). Understanding plant-microbe interactions for phytoremediation of petroleum-polluted Soil. *PLoS ONE*, 6: 17961.
- Nocentini, M., Pinelli, D., Fava, F. (2000). Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. *Chemosphere*, 41: 115-1123.
- Nogueira, N. O.; Oliveira, O. M.; Martins, C. A. S.; Bernardes, C. O. (2012). Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. *Enciclopédia Biosfera*, 8(14): 2121-2131.
- Oliveira, J. J. F.; Alixandre, T. F. (2013). Parâmetros biométricos de mudas de sabiá micorrizadas sob níveis de fósforo em Latossolo Amarelo. *Pesq. flor. bras.*, Colombo, 33(74): 159-167.
- Oliveira, J. J. F.; Silva, B.B.; A.C. Araújo Neto. (2012). Crescimento inicial de mudas micorrizadas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) sob doses de fósforo. *Scientia Plena*, 8: 1.
- Olsson, P.A.; Thingstrup, I.; Jakobsen, I.; Baath, F. (1999). Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1879-1887.
- Passman, F.J.; Dobranic, J. (2005). Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: Morris, R.E. (Ed.), *Proceedings of the Ninth International Conference on the Stability and Handling of Liquid Fuels*. International Association for the Stability and Handling of Liquid Fuels, Washington DC. Sitges, Spain.
- Passos, M.A.; Tavares, K.M.P.; Alves, A.R. (2007). Germinação de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 2 (1): 51-56.
- Paula, A. M.de; Siqueira, J.O. de; Soares, C.R.F.S. (2007). Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 31:805-811.

- Pereira, A. C. C.; Rodrigues, A. C. D.; Santos, F. S. DOS; Guedes, J. N.; Amaral Sobrinho, N. M. B. (2012). Concentração de metais pesados em espécies arbóreas utilizadas para revegetação de área contaminada. *Revista Ciência Agronômica*, 43: 641-647.
- PETROBRAS (2012). *Manual Técnico Diesel S-10*. Manuseio, Armazenagem e Abastecimento. Petróleo Brasileiro S. A., 14p.
- Peuke, A.D., Rennenberg, H. (2005). Phytoremediation: Molecular biology, requirements for application, environmental protection, public attention and feasibility. *European Molecular Biology Organization*, 6 (6): 497-501.
- Pezeshki, S. R. (2001). Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, Paris, 46 (3): 299–312.
- Pichtel, J.; Liskanen, P. (2001). Degradation of diesel fuel in rhizosphere soil. *Environ. Eng. Sci.*, 18:145-157.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review Plant Biology*, 56: 15-39.
- Plaza, G.; Naleez-Jaweeki, G.; Ulfing, K.; Brigmon, R. L. (2005). The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*, 59: 289-296.
- Pontes, M. M C. M.; Neto, T. P. P.; Chaves, L. de F. de C.; Albuquerque, S. F. de; Oliveira, J. de P.; Figueiredo, M. do V. B. (2012). Dupla inoculação  $\beta$ -rizóbio e micorriza em sabiazeiro visando à recuperação de áreas degradadas. *Pesq. agropec. pernamb.*, Recife, 17: 37-45.
- Rabie, G.H. (2005). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African J. Biotechnol.*, 4: 332- 345.
- Ramos AC, Martins MA, Façanha RA. (2005). Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microcromossomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29: 207-213.
- Ramos-Zapata, J.A.; Zapata-Trujillo, R.; Ortiz-Diaz, J.J.; Guadarrama, P. (2011). Arbuscular mycorrhizas in a tropical coastal dune system in Yucatan Mexico. *Fungal Ecology*, 4: 256-26.
- Rea, P.A.; Kim, Y.; Sarafian, V.; Poole, R.J.; Davies, J.M.; Sanders, D. (1992). VAcuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends Biochem Sci.*, 17: 348-353.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S.L., Morton, J.B.; Walker, C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza*, 23: 515-31.
- Rezende, I. M. de. (2006). *Efeito do solo contaminado por óleo diesel na germinação e no desenvolvimento das plântulas de Schinus terebinthifolius Raddi (Anarcadiaceae)*. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- Ribeiro, A. C. (2009). *Potencial da Acacia holocericea e da Mimosa caesalpinifolia em fitorremediar solo tropical contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos*. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Programa de

- Pós-Graduação em Engenharia Civil. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, 200p.
- Rizzini, C. T. (1978). *Plantas do Brasil árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira*. 2. ed. São Paulo: E. Blücher, 296 p.
- Robbins, E. A., Robertson, M., Steube, G. (1993). False identification of BTEX compounds using EPA method 8020. *Hydrocarbon contaminated soils and groundwater*, 3: 93 – 110.
- Rock, S.A. (2003). Field Evaluations of Phytotechnologies. In: Mccutcheon, S.C. & Schnoor, J. L. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. New Jersey: John Wiley & Sons, 987p.
- Salt, D. E., Smith, R. D., Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Phys.*, 49: 643–668.
- Sanchez-Diaz, M.; Pardo, M.; Antolín, M.; Penã, J.; Aguirreolea, J. (1990). Effect of water stress on photosynthetic activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomussymbiosis*. *Plant Science*, 71 (2): 215-221.
- Saterbak, A.; Toy, R.; J.; Mcmain, B. J.; Williams, M. P.; Dorn, P. B. (2000). Ecotoxicological and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(11): 2643-2652.
- Schenk, N.C. (1982). *Methods and principles of mycorrhizae research*. St. Paul: The American Phytopathological Society, Introduction: p. IX-X.
- Schwob, I.; Ducher, M.; Sallanon, H.; Coudret, A. (1998). Growth and gas exchange responses of *Hevea brasiliensis* seedlings to inoculation with *Glomus mosseae*. *Trees* 12, 4: 236-240.
- Sieverding, E. (1991). *Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems*. Eschborn: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Federal Republic of Germany, 371p.
- Silva, E. P. DA, Camargo, J. C., Sordi, A.; Santos, A. M. R. (2003). Recursos energéticos, meio ambiente e desenvolvimento. *Multiciência*, Campinas, 1: 01-22.
- Silva, E. V. N. da. (2012). *Interrelação bactérias (MHB) e FMA: estratégia para estimular a eficiência simbiótica e micorrização de sabiá*. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife – PE.
- Silva, P.R.F.; Freitas, T.F.S. (2008). Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustíveis. *Ciência Rural*, 38 (3): 843-851.
- Siqueira, J. O.; Franco, A. (1988). *A Biotecnologia de solo: Fundamentos e perspectivas*. Brasília: MEC/ABEAS; Lavras: ESAL/FAEPE, 235p.
- Siqueira, J. O.; Soares, C. R. F. S.; Silva, C. A. (2008). Matéria orgânica em solos de áreas degradadas. In: Santos, G. A.; Camargo, F. A. O. (Ed.). *Fundamentos da matéria orgânica do solo – Ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2 ed. Porto Alegre: Metrópole.
- Siqueira, J.O., Moreira, F. M. de S., Grisi, B. M., Hungria, M., Araujo, R. S. (1994). *Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental*. Brasília: EMRAPA-SPI, p.7-81.

- Siqueira, J.O.; Lambais, M.R.; Stürmer, S.L. (2002). Fungos micorrízicos arbusculares: características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. *Biotechnol. Ci. Desenv.*, 25:12-21.
- Siqueira, J.O.; Pereira, M.A.M.; Simão, J.B.P.; Moreira, F.M.S. (1999). Efeito da formononetina (7 Hidroxi, 4' metoxi Isoflavona) na colonização micorrízica e crescimento do milho em solo contendo excesso de metais pesados. *R. Bras. Ci. Solo*, 23: 561-568.
- Sisino, C.L.S., Bulus, M. R. M., Rizzo, A. C., Moreira, J. C. (2006). Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia foetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. *Revista brasileira da sociedade de ecotoxicologia*, 1(2): 41-44.
- Smith, S.E.; Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. 3.ed. London, Academic Press, 785p.
- Smith, S.E.; Smith, F.A.; Jakobsen, I. (2004). Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth and total P uptake. *New Phytol.*, 162:511-524.
- Soares, C. R. F. S.; Carneiro, M. A. C. (2010). Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas degradadas. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. (Eds.). *Micorrizas: 30 anos de Pesquisa no Brasil*. Lavras: Editora UFLA, 716p.
- Souza, D. B., Brito, G. C. B., Vanconcelos, F. C. W., Braga, L. C. (2010). Estudo de micro-organismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. *Revista de estudos ambientais*, Blumenau, 12 (2): 38-46.
- Souza, S. C. R.; Andrade, S. A. L.; Souza, L. A.; Schiavinato, M. A. (2012). Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage. *Journal of Environmental Management*, 10: 299-307.
- Souza, T.B. (2008). *Revisão da equação de cálculo de índice de cetano para as características do diesel comercializado no Paraná*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia – PIPE, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 142p.
- Souza, V.C; Silva, R.A; Cardoso, G. D; Barreto, A. F. (2006). Estudos sobre fungos micorrízicos. *Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, 10 (3): 612–618.
- Stamford, N.P.; Ortega, A.D.; Temprano, F.; Santos, D.R. (1997). Effects of phosphorus fertilization and inoculation of Bradyrhizobium and mycorrhizal fungi on growth of *Mimosa caesalpiniaefolia* in an acid soil. *Soil Biology & Biochemistry*, Elmsford, 29 (5): 959-964.
- Stamford, N.P.; Silva, R.A. da. (2000). Efeito da calagem e inoculação de Sabiá em solo da mata úmida e do semi-árido de Pernambuco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 35 (5): 1037-1045.
- StatSoft Inc. (2004). *Electronic Statistics Textbook, STATISTICA 7.0*. Data Analysis Software System, version 7. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>. Acesso em: 20 dez 2015.

- Stürmer, S. L.; Cardoso, E. J. B. N.; de Souza, F. A.; Kasuya, M.C.M. (2009). "Além das raízes": o papel dos fungos micorrízicos. *Boletim Informativo da SBCS*, p. 30-32.
- Stürmer, S.L.; Siqueira, J.O. (2006). Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Brazilian Ecosystems. *In: Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O.; Brussaard, L. (Eds). Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems*. Londres, p.206-236.
- Sugai, M. A. A.; Collier, L. S.; Saggin-Júnior, O. J. (2011). Inoculação micorrízica no crescimento de mudas de angico em solo de cerrado. *Bragantia*, 70 (2): 416-423.
- Tang, J.; Xu, L.; Chen, X.; Hu, S. (2009). Interaction between C4 barnyard grass and C3 upland rice under elevated CO<sub>2</sub>: Impact of mycorrhizae. *Acta Oecol.*, 35:227-235.
- Tellechea, F. R. F. (2007). *Fungos micorrízicos, bactérias diazotróficas endofíticas e fósforo no crescimento e acúmulo de nutrientes em mudas de cana-de-açúcar*. Dissertação (Mestre em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Tellechea, F. R. F. (2015). *Torta de filtro de cana-de-açúcar e NPK na biorremediação em solos contaminados com óleo diesel*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Thapa, B., Kumar, A. K. C., Ghimire, M. A. (2012). Review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 164: 164-170.
- Thavasi R., Jayalakshmi S., Banat I.M. (2011). Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*, 102: 772–778.
- Tiburtius, E. R. L.; Zamora, P. P.; Leal, E. S. (2004). Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*.
- Tramontini, L. (2013). *Micorremediação de solo contaminado com a mistura diesel/biodiesel*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 125p.
- Vaajasaari, K.; Joutti, A.; Schultz, E.; Selonen, S.; Westerholm, H. (2002). Comparisons of terrestrial and aquatic bioassays for oil-contaminated soil toxicity. *Journal of Soil & Sediments*, 2(4): 194-202.
- Van Aken, B.; Correa, P.A.; Schnoor, J.L. (2010). Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: New trends and promises. *Environment Science Technology*. 44: 2767- 2776.
- Vieira, G. E. G.; Silveira, C. R. da; Cutrim, J.; Ribeiro, J. (2011). Avaliação dos principais aspectos da fitorremediação aplicados na redução da poluição do solo e da água. *Engenharia Ambiental*, Espírito Santo do Pinhal, 8: 182-192.

- Vogelmann, E.S., Reichert, J.M., Prevedello, J., Consensa, C.O.B., Oliveira, A.E., Awe, G.O., Mataix-Solera, J. (2013). Threshold water content beyond which hydrophobic soils become hydrophilic: The role of soil texture and organic matter content. *Geoderma*, 209-210: 177- 187.
- Vogelmann, E.S., Reichert, J.M., Reinert, D.J., Mentges, M.I., Vieira, D.A., Barros, C.A.P., Fasinmirin, J.T. (2010). Water repellency in soils of humid subtropical climate of Rio Grande do Sul, Brazil. *Soil & Tillage Research*, 110: 126-133.
- Volante, A., Lingua, G., Cesaro, P., Cresta, A., Puppo, M., Ariati, L., Berta, G. (2005). Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. *Mycorrhiza*, 16: 43-50.
- Wenzel, W.W. (2009). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil*, 321: 385–408.
- Wilson, J. J.; Hatcher, J. F.; Goudey, J. S. (2002). Ecotoxicological endpoints for contaminated site remediation. *Ann Ist Super Sanità*, 38(2):143-147.
- Yu, X.Z.; Wu, S.C.; F.Y. Wu, M.H. Wong. (2011). Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 186: 1206–1217.
- Zílio, E. L., Pinto, U. B. (2002). Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros. *Boletim Técnico da PETROBRAS*, Rio de Janeiro, 45: 21-25.