

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

KARINE SILVA DE CARVALHO

**CONTRIBUIÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE
SOLOS CONTAMINADOS POR ARSÊNIO**

Belo Horizonte
2015

KARINE SILVA DE CARVALHO

**CONTRIBUIÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE
SOLOS CONTAMINADOS POR ARSÊNIO**

Monografia apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Especialista em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. César Lúcio Lopes de Faria Júnior

Belo Horizonte
2015

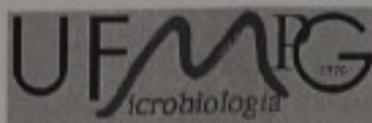
FICHA CATALOGRÁFICA

- 043 Carvalho, Karine Silva de.
Contribuição de fungos micorrízicos na biorremediação de solos contaminados por arsênio [manuscrito] / Karine Silva de Carvalho. – 2015.
47 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. César Lúcio Lopes de Faria Júnior.
Monografia apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Especialista em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Arsênico. 3. Biodegradação Ambiental. 4. Micorrizas. I. Faria Júnior, César Lúcio Lopes de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579

ATA DE DEFESA

UFMG



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

DECLARAÇÃO

DECLARO para os devidos fins que **Karine Silva de Carvalho** concluiu a Especialização em Microbiologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com carga horária de 360 horas no período de fevereiro de 2014 a fevereiro de 2015 e, sob a orientação do Dr. César Lúcio Lopes de Faria Júnior, defendeu a monografia intitulada "Contribuição de fungos micorrízicos na biorremediação de solos contaminados por arsênio".

Belo Horizonte, 19 de Janeiro de 2014.

Vera Lúcia dos Santos p¹

Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli
Coordenadora do Curso de Especialização em Microbiologia
ICB/UFMG

Curso de Pós-Graduação em Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus em primeiro lugar, por sempre estar do meu lado, por me dar força e coragem para superar todos os desafios durante essa caminhada.

Ao meu pai Ademar, à minha mãe Vandete e ao meu irmão Cássio, por serem exemplos de honestidade, e por me apoiarem em todas as decisões, me ensinarem quando tive dificuldades, e pelo incentivo de sempre com muito carinho e atenção.

Ao César Lúcio Lopes de Faria Júnior, pela orientação, por confiar em meu trabalho e pelos ensinamentos dados durante a elaboração deste trabalho.

Ao meu namorado Lucas, por estar sempre comigo em todos os momentos, sempre me ajudando, e dividindo comigo suas experiências, e compreender minha ausência.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pelo excelente curso de Especialização em Microbiologia, e a todos os professores que fizeram parte dessa formação ao transferir conhecimento em prol da minha capacitação.

À Vandete e Ademar, por serem a base da minha vida.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário”.

Albert Einstein

RESUMO

A grande atividade exploradora realizada por mineradoras provocam impactos ao meio ambiente e ao ser humano, de forma que ocorrem gradativas remoções de solo e a geração de rejeitos com altas concentrações de substâncias tóxicas, incluindo o arsênio. Através desta problemática buscam-se estratégias econômicas e sustentáveis que possam minimizar ou até mesmo resolver essas contaminações, assim a fitorremediação ganha destaque, por ser uma estratégia que utiliza plantas que conseguem degradar, acumular ou estabilizar as substâncias tóxicas em solos contaminados. Porém assim como outras estratégias, a fitorremediação também possui suas limitações, e a descoberta de que os fungos micorrízicos podem de forma significativa aumentar a eficácia dela, revoluciona os estudos para essa área. Esse trabalho objetivou analisar a contribuição dos fungos micorrízicos em atividade de biorremediação de solos contaminados por arsênio. Foi realizado um levantamento bibliográfico em diversos sites de pesquisa científica, com a leitura de artigos científicos, livros e teses. Conclui-se que há carências de estudos eficientes na área, e que é necessário pesquisas a fim de descobrir novas espécies de vegetais e fungos que sejam resistentes a altas concentrações do arsênio, e juntamente à isto descobrir metodologias para facilitar o manuseio, a preservação e análise genética desses fungos, superando as limitações existentes nas pesquisas.

Palavras-chave: impactos, microorganismos, mineração, micorrizas, técnicas

ABSTRACT

The explorer activity performed by mining companies cause impacts to the environment and to humans, in such way that occur gradual soil removal and the generation of tailings with high concentrations of toxic substances, including arsenic. Through this issue, economic and sustainable strategies are searched so that can minimize or solve these contaminations, thus the phytoremediation is emphasized, because it is a strategy that uses plants that can degrade, accumulate or stabilize the toxic substances in contaminated soils. However, like other strategies, the phytoremediation also has limitations, and the finding that the mycorrhizal fungi can significantly increase its effectiveness, researches in this area were revolutionized. This study aimed to analyze the contribution of mycorrhizal fungi in bioremediation activity of soils contaminated with arsenic. A bibliographical survey on scientific research sites, by reading scientific articles, books and theses was performed. The conclusion is that there are lacks of efficient studies in the area, and that requires research to discover new species of plants and fungi that are resistant to high concentrations of arsenic, and along with this find methodologies to facilitate handling, preservation and genetic analysis of these fungi, overcoming the limitations in research.

Keywords: impacts, micro-organisms, mining, mycorrhizae, technical

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais etapas do processo de ustulação de pirita e arsenopirita ocorrente em rejeitos tóxicos de mineradoras (LADEIRA et al., 2014).	16
Figura 2. Mecanismos atuantes na fitorremediação (ANDRADE, TAVARES & MAHLER, 2007).	19
Figura 3. Árvore filogenética representando as relações em Glomales (MORTON, 1990). ...	22
Figura 4. Fungos Micorrízicos em raiz de sorgo.	24
Figura 5. Fungos Micorrízicos em raiz de milho.	24
Figura 6. Esquema de fitoestabilização. (ANDRADE, TAVARES & MAHLER, 2007).	26
Figura 7. Esporos Maduros da espécie <i>Acaulospora colombiana</i>	29
Figura 8. Esporos da espécie <i>Acaulospora tuberculata</i>	30
Figura 9. Esporos da espécie <i>Acaulospora mellea</i>	31
Figura 10. Metodologia para produção de mudas.	34
Figura 11. Procedimento de coloração de raízes para observar a colonização micorrízica.	36
Figura 12. Esquema de avaliação da porcentagem de coloração de fragmentos de raízes.	37
Figura 13. Desenho esquemático da metodologia utilizada para criopreservação de esporos de FMAs. (OLIVEIRA & SOUZA, 2012).	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral:	12
2.2. Objetivos Específicos:	12
3. METODOLOGIA	13
4. REFERENCIAL TEÓRICO	14
4.1. A mineração como fator contribuinte no aumento da concentração de arsênio no solo	14
4.2. Fitorremediação do arsênio	18
4.3. Fungos micorrízicos e sua contribuição na fitorremediação de arsênio ...	20
4.4. Espécies importantes de Fungos Micorrízicos	28
4.5. Produção de mudas inoculadas	32
4.6. Metodologias de estudos com FMs	34
4.6.1. Contagem de Colonização Micorrízica	36
4.6.2. Preservação de Esporos	37
4.6.3. Extração de DNA	39
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

O Arsênio (As) é um metalóide naturalmente distribuído pela crosta terrestre, e possui variações de estados de oxidação, o qual sua toxicidade pode variar de acordo com a forma química em que se encontra. Porém ao ser encontrado em grandes concentrações no solo pode causar grandes impactos ao ambiente (PEREIRA et al., 2009). As atividades antrópicas são as maiores responsáveis pelo aumento de concentração do arsênio no ambiente, nesse contexto se insere a mineração, considerado o mais importante processo de disponibilização do As no solo, fato alarmante para o estado de Minas Gerais, visto que possui intensas atividades de mineradoras (CAMPOS et al., 2013).

O arsênio é um importante indicador em trabalhos de prospecção mineral, devido à associações naturais que possui com diversos tipos de mineralizações como o ouro, a prata, o chumbo e o zinco. Assim a extração destes metais geram rejeitos ricos em arsênio que podem comprometer os recursos hídricos, tornando-se depósitos de resíduos e conseqüentemente ocorrendo a contaminação de todo um ecossistema existente, além de provocar riscos ao ser humano, como o câncer (DE LIMA RODRIGUES & MALAFAIA, 2010).

Devido a esta problemática, cada vez mais surgem estudos de alternativas que possam solucionar a contaminação dos solos por arsênio através das atividades de mineração. De forma que sejam estratégias eficientes e de baixos custos, leva à grande procura pela fitorremediação, no qual utiliza-se plantas na recuperação de áreas degradadas, por conseguirem diminuir a disponibilidade deste e de outros elementos no solo em diferentes maneiras (MELO et al., 2009; PEREIRA et al., 2011). Além disso, é grande a busca pela utilização dos microorganismos que possam contribuir nessa atividade, ao promoverem relações simbióticas com as plantas, de forma que, proporcionem melhores resultados para a tolerância delas ao elemento. Assim destacam-se os fungos micorrízicos, que se associam às raízes e possuem importante papel na aquisição de nutrientes pelas plantas, além de serem utilizados como bioindicadores do ambiente e de possuir características que permitem auxiliar as plantas na extração dos elementos tóxicos (SCHNEIDER et al., 2012).

A utilização dos fungos micorrízicos em trabalhos de fitorremediação é considerada promissora, e há necessidade de estudos que possam compreender os mecanismos de interação destes fungos com as plantas à serem usadas e suas contribuições, de forma que se torne uma prática cada vez mais eficiente na recuperação de áreas contaminadas com o arsênio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Este trabalho tem o objetivo de apresentar uma análise da contribuição dos fungos micorrízicos na biorremediação de solos contaminados por arsênio.

2.2. Objetivos Específicos:

- Apresentar a forma de contaminação por arsênio no solo através da mineração;
- Relacionar a fitorremediação e a utilização de micorrizas;
- Identificar as principais espécies de fungos micorrízicos utilizadas e as metodologias envolvidas nesse estudo.

3. METODOLOGIA

No presente estudo foi utilizado o processo de levantamento bibliográfico do que já foi publicado sobre a utilização de fungos micorrízicos em estudos de biorremediação de solos contaminados com Arsênio.

Esse levantamento de dados foi realizado através de artigos científicos, livros, dissertações e teses disponíveis sobre o tema abordado em base de dados como Scielo, Pubmed, Google Acadêmico, Portal Periódicos CAPES e Lilacs., a fim de ampliar a discussão do tema.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. A mineração como fator contribuinte no aumento da concentração de arsênio no solo

A mineração é considerada uma indústria de base que promove o impulso à novas atividades econômicas. A exploração de minerais cresce gradativamente em relação ao aumento populacional, de forma que possa ser capaz de atender as necessidades da população como forma de matéria-prima, sendo um setor de grande importância na contribuição socioeconômica para o país. Esse âmbito promove o crescimento de empregos e modernização de infraestrutura em processos de urbanização, porém também se observa a exploração de recursos naturais e atividades que podem comprometer as condições ambientais (CNI, 2012).

Quando se utiliza a exploração pelas mineradoras promove-se uma série de impactos sobre a vegetação, a fauna, as águas superficiais e subterrâneas, o solo, entre as comunidades locais, entre outras problemáticas. (MMA, 2014). Para IBRAM (1992), são incontestáveis os efeitos negativos sobre o meio ambiente provocados pela mineração, seja de subsolo ou de superfície, onde ocorre a remoção das camadas de solo e utilização de áreas superficiais para disposição de rejeitos, respectivamente.

Como a retirada de minerais exige escavações abundantes, e resultam em o acúmulo de rejeitos, observa-se que estes possuem alto teor de substâncias poluentes (como os metais pesados), além de uma grande remoção de toda vegetação em camada superficial do solo expondo-o a processos erosivos (MECHI & SANCHES, 2010). Os rejeitos depositados no ambiente são decorrentes do processo de beneficiamento e deposição de material estéril ou inerte que não é aproveitável e é proveniente do decapeamento superficial (IBRAM, 1987), onde se encontram elementos tóxicos ao ser humano, como o arsênio.

Este metaloide é obtido como um subproduto em tratamentos de minérios de cobre, chumbo, cobalto, ouro e entre outros, e quando disposto no solo dependendo de sua forma e condições pode apresentar pouca ou alta mobilidade, fator que pode contribuir para a lixiviação do elemento aos cursos hídricos (CETESB, 2012) se tornando um problema de saúde pública, devido à essa substância ser considerada carcinogênica e provocar

distúrbios no ser humano que ocorre devido à contaminação do solo, poeira ou de água para o consumo (FIGUEIREDO, BORBA & ANGÉLICA, 2007).

A contaminação de água utilizada ao consumo ocorre devido a liberação do As em águas superficiais e subterrâneas, através da facilidade de dissolução deste componente, que está presente em rochas e mineralizações, como a arsenopirita, que contém minerais de arsênio e carbonatos, (BORBA & FIGUEIREDO, 2004) e são abundantes em locais utilizados pelas mineradoras.

É de fundamental importância o conhecimento da especiação química dos metais presentes no minério para observar o grau de risco que eles podem causar, assim, o arsênio de forma inorgânica pode ser considerado altamente tóxico e sua toxicidade depende de sua especiação (grau de oxidação das suas espécies), e o arsenito que é arsênio trivalente, torna-se 60 vezes mais tóxico que o arsenato que é uma forma oxidada pentavalente, dessa forma o teor de arsênio é um importante parâmetro para avaliar sua mobilidade, toxicidade e biodisponibilidade no ambiente (LADEIRA et al., 2014).

Em seu estudo Kwon, Lee & Jung (2012), observaram que áreas de mineração ricas em metais sustentavam solos de rochas altamente alteradas por processos geológicos, fator que possibilitou em concentrações elevadas de As no ambiente. Isso mostra a ineficiência de fiscalização ambiental, uma problemática mundial visto que, são muito recentes as políticas de prevenção e mitigação dos impactos ambientais promovidos pelas atividades da mineração (MECHI & SANCHES, 2010).

Os altos teores de arsênio no solo já foram observados em regiões brasileiras, destacando-se o estado de Minas Gerais. Esse estado é considerado o mais importante polo minerador do país, sendo responsável por aproximadamente 53% da produção brasileira de minerais metálicos e 29% em geral, possuindo mais de 300 minas em operação, tornando-se o maior produtor de minérios do país no ano de 2012 (IBRAM, 2014), com produção de mais de 20 minerais, entre estes se encontram os que dispersam o arsênio através das atividades em sua exploração, como o ouro. Muitos casos foram descritos no estado relacionados à exposição humana e do meio ambiente ao arsênio, e um dos mais importantes estudos do país destina-se à região do Quadrilátero Ferrífero (MG).

Essa região possui grande riqueza em minerais, e conseqüentemente sofre impactos devido à exploração de seus recursos através das atividades minerárias durante muitos

anos (ROESER & ROESER, 2010). Ela responde a uma grande produção do minério de ouro, e em seus sedimentos está disposto o As originado pela oxidação das rochas, principalmente pelas atividades antrópicas com a deposição dos rejeitos de mineração em drenagens. Alto teor de As foi encontrado em amostras de água subterrânea na região, principalmente em locais com a presença de sulfetos e carbonatos nas rochas, coletadas em pontos das cidades de Ouro Preto e Mariana (BORBA, FIGUEIREDO & CAVALCANTI, 2004).

Neste cenário os riscos estimados para receptores humanos de efeitos cancerígenos ou não cancerígenos foram considerados inaceitáveis, e detectaram-se maiores riscos às crianças moradoras de Ouro Preto expostas por ingestão e contato dérmico com solo e água subterrânea (GONÇALVES E LENA, 2013).

A mineração do ouro agrega esse grande problema de contaminação devido ao fato de que o processamento desse minério promove a transformação de sulfetos metálicos em óxidos metálicos, através da vasta transformação de FeAsS em diferentes formas dispostas nos rejeitos (LADEIRA et al., 2014) (Figura 1).

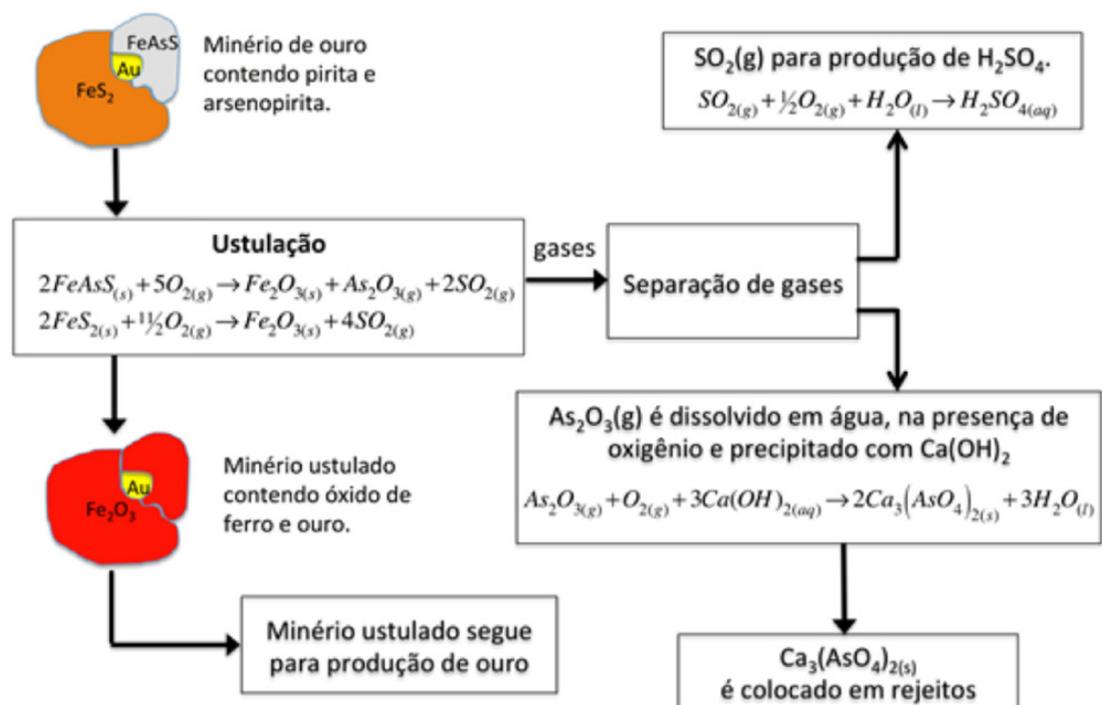


Figura 1. Principais etapas do processo de ustulação de pirita e arsenopirita ocorrente em rejeitos tóxicos de mineradoras (LADEIRA et al., 2014).

Também relacionado à mineração de ouro, outro local foi detectado com problemas de contaminação por arsênio: O município de Paracatu (MG). Nele localiza-se a mina Morro do Ouro que é considerada um dos maiores empreendimentos de mineração do Brasil, e vem durante décadas sofrendo vasta exploração devido à alta produtividade que proporciona. Seu alto risco ambiental é devido ao fato de a extração de ouro ocorrer em rochas ricas de arsenopirita (CETEM, 2012).

Em seu estudo Rezende (2013), analisou amostras de sedimentos de Paracatu que apresentaram concentração de As superior ao limite de nível 2 (17 mg kg⁻¹) determinado pelo CONAMA. Além disso, tornou-se alvo de polêmicas o fato de empresas de mineração presentes na área apresentar projetos de expansão da mina (KINROSS, 2006) que aumentam a longevidade de sua exploração.

Em seu estudo Clemente et al.(2013), observou mudanças espaciais verificando crescimento de uma mina em direção à áreas urbana, o que gerou consequências ambientais pelos rejeitos gerados e aos moradores do local. Ademais, os impactos que são causados pela mineração, também estão relacionados a uma competição de uso e ocupação de solo, que promove conflitos sócio-ambientais (como expansão desordenada e sem controle das localidades) pela escassez de metodologias de intervenção.

É necessário eficientes projetos de implementação de minas de forma que futuramente em seu fechamento seja minimizados os impactos ambientais (FARIAS, 2002), Além de maior fiscalização e implementação de leis ambientais das que já atuam, e de investimento em estudos de impactos e suas alternativas de correções.

4.2. Fitorremediação do arsênio

A recuperação de ambientes contaminados por elementos tóxicos como o arsênio necessita de um amplo estudo dos fatores biológicos sobre a área determinada. Assim é grande a procura por abordagens que sejam economicamente viáveis e que apresentem eficácia na descontaminação de solos, nesse contexto destaca-se a fitorremediação, que possuem maneiras específicas para a remoção, imobilização ou transformação de poluentes específicos (COUTINHO & BARBOSA, 2007).

A fitorremediação consiste na utilização de espécies vegetais para remediar solos degradados, aplicada de forma *in situ* (realizada no local) e que apresenta elevado potencial de utilização (LAMBERT, SOARES & SOUZA, 2012), ela tem o objetivo de manter a estabilidade química da área (CORRÊA, 2009) ao promover a degradação, acumulação ou a estabilização de substâncias tóxicas (ANDRADE, TAVARES & MAHLER, 2007). Nessa técnica os vegetais podem atuar na redução/ remoção dos contaminantes através de diferentes mecanismos em que se destacam a fitoextração, a fitoestabilização e a fitovolatização (TAVARES, 2009).

A fitoextração possibilita a remediação por meio de plantas que conseguem acumular altas concentrações de metais sem redução de crescimento (hiperacumuladoras), a fitoestabilização possui grande contribuição no tratamento de arsênio e baseia-se na adsorção, precipitação e redução da valência do contaminante, já a fitovolatização ocorre através da transpiração e ascensão do poluente pela planta, também muito observada na remediação de arsênio (ANDRADE, TAVARES & MAHLER, 2007). (Figura 1).

Faz-se necessário nessa técnica a utilização de plantas que possuam características de boa capacidade de absorção, um profundo sistema radicular, alta taxa de crescimento, de fácil colheita e que seja resistente ao arsênio (COUTINHO & BARBOSA, 2007), além desses fatores Oliveira et al. (2009), alertam para que sejam realizados estudos efetivos em selecionar as plantas a serem utilizadas nessa estratégia, visto que pode ocorrer riscos na utilização de plantas exóticas, que pode proporcionar problemáticas como o aparecimento de doenças não típicas da região escolhida para o tratamento.

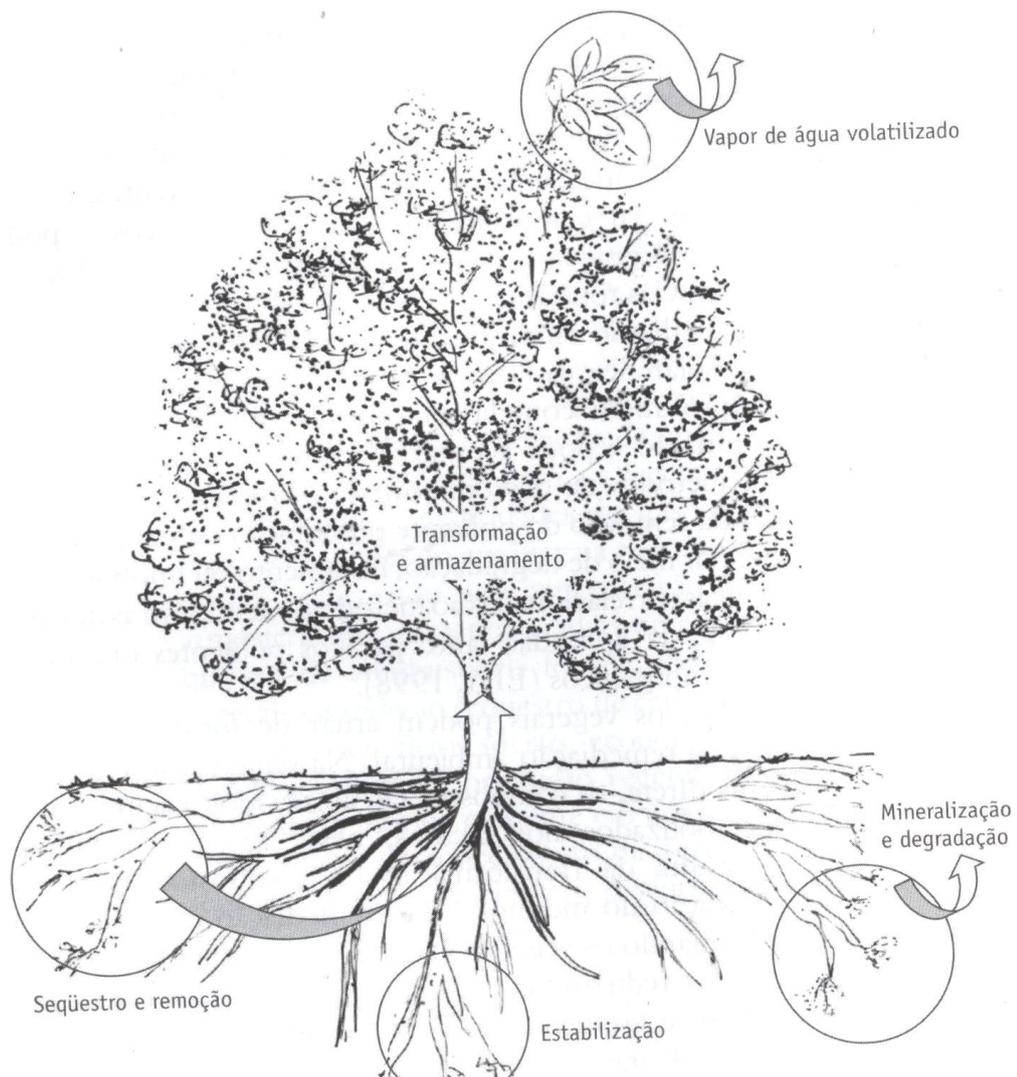


Figura 2. Mecanismos atuantes na fitorremediação (ANDRADE, TAVARES & MAHLER, 2007).

A revegetação em locais modificados por atividades antrópicas torna-se importante para a manutenção ambiental da diversidade de plantas, animais e também microbiana (SILVA et al., 2001), também proporciona a captura de dióxido de carbono do ar fixando em sua estrutura, além de possuir vantagem no reaproveitamento de seu material fitoextraído do solo para produção de biocombustível (OLIVEIRA et al., 2009). Santos et al. (2011) concluíram em seu trabalho que essa técnica possui limitações mas há grandes benefícios que a torna promissora, e por ser uma técnica de descontaminação *in situ* promove uma menor alteração no ambiente entre outros diversos benefícios.

Uma dessas limitações para a técnica direciona-se ao fato de o grau de teor acumulado do As no solo tornar-se tóxico às plantas, dificultando prática, porém elas variam em sua tolerância, a qual algumas espécies são eficientemente tolerantes e outras muito sensíveis,

onde a toxidez aparece por diferentes sintomas nas plantas (MELLO, 1983) já que as áreas impactadas são consideradas desfavoráveis para o crescimento vegetal por possuir deficiência de nutrientes para seu desenvolvimento (COLODETE, DOBBSS & RAMOS, 2014).

Além disso, necessita-se maior atenção e monitoramento para que as plantas que consigam extrair o poluente para seus tecidos não sejam incorporadas nas cadeias alimentar de outros seres vivos, o que pode ser um prejuízo ambiental, e o tempo para se observar resultados ainda é um desafio pois depende do ciclo vital das plantas, podendo apresentar-se longo (ANDRADE, TAVARES & MAHLER, 2007).

Várias espécies vegetais já são destaques em pesquisas realizadas e mostraram eficiência para sua utilização em atividades remediadoras do solo com arsênio. Um destes é o estudo de Freitas et al. (2012), que mostrou a eficiência da espécie conhecida como angico vermelho (*Anadenanthera peregrina*) na descontaminação de solos contaminados por arsênio através de atividades de mineração em um projeto de recuperação do Rio das Velhas em Minas Gerais, o qual a planta revelou tolerância e capacidade de sequestrar grandes quantidades de arsênio sem a necessidade de transportá-lo para a parte aérea.

Muitos estudos também comprovaram espécies de braquiária importantes, como a *Brachiaria decumbens*, que é tolerante ao As e não é hiperacumuladora do elemento o qual se observou grande quantidade do elemento armazenado nas suas raízes, portanto tendo poucas quantidades na parte aérea, tornando-se utilizável para técnicas de fitorremediação (ANTUNES, 2007). Espécies de samambaias também ganham grande destaque para utilização, como exemplo *Pteris biaurita*, que apresentou-se tolerante à elevados níveis do contaminante e capacidade de absorção de quantidades expressivas do metaloide (GONZAGA, SANTOS & MA, 2008).

Em outro estudo Gomes et al. (2012), examinaram a fitotoxidade de *Acacia mangium* ao arsênio e observaram a redução de taxa fotossintética e uso da água pela espécie e como consequência a redução de taxa de carbono. Porém teores elevados de As encontrados na raiz da planta indica uma eficiência em fitoestabilização para processo de recuperação de áreas contaminadas por este elemento, e se faz necessário encontrar formas que possam garantir seu crescimento e desenvolvimento nesses locais (CIPRIANI, 2011).

4.3. Fungos micorrízicos e sua contribuição na fitorremediação de arsênio

Os microorganismos encontram-se em interações complexas no ecossistema e apresentam diversos processos de adaptação a ambientes desfavoráveis possuindo papel importante na reciclagem dos elementos e nutrientes. A capacidade que apresentam de tolerância e acumulação de elementos são fatores contribuintes em processos de remoção de substâncias tóxicas do ambiente (IBRAM, 1992) auxiliando em estratégias de recuperação de áreas como na fitorremediação.

As plantas possuem a magnífica capacidade de estabelecer relações compatíveis com alguns grupos de fungos do solo, um fenômeno denominado como micorrizas, que denomina-se em simbiose de fungos com as raízes das plantas, e são agrupadas com base anatômica da raiz colonizada (FREITAS & BRERED, 2003), sendo considerados sistemas biológicos compartimentalizados muito influenciáveis pelo ambiente e entre outros fatores edáficos de cada componente, que influenciam sua formação, funcionalidade e ocorrência (FOLLI-PEREIRA et al., 2012).

Mais de 80% das espécies vegetais podem estabelecer interação micorrízica, o qual o incremento de nutrição fosfatada é um dos principais benefícios adquiridos pelas plantas através dessa interação, ocorre de forma que o fungo consegue absorver fotoassimilados da planta, assim os benefícios para a planta ocorrem através da perda de uma quantidade de açúcar para o fungo e este estabelece modificações que favoreçam o crescimento da planta como aumento da área superficial e de eficiência em absorção de água e sais minerais (LACAZ, MINAMI & PURCHIO, 1970).

Além da nutrição que proporciona às plantas, esses fungos contribuem na estruturação das comunidades vegetais, e são compostos por hifas intra e extra-radulares que possuem grande importância no fornecimento e absorção de minerais do solo para planta, também podem ser arbusculares (Fungos Micorrízicos Arbusculares – FMAs), estruturas que permite a troca de sinais e compostos entre a planta e o fungo, possuem vesículas ou células auxiliares e os esporos de reprodução (BERBARA, SOUZA & FONSECA, 2006). (Figura 3 e 4).

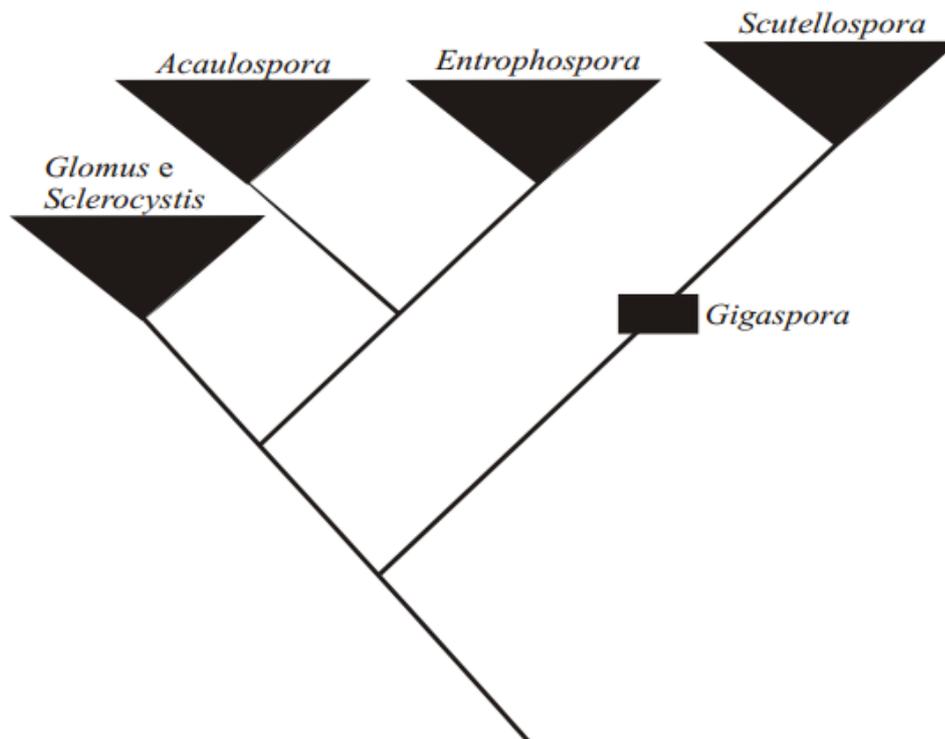
As micorrizas são agrupadas em ectomicorrizas, ectendomicorrizas e endomicorrizas baseadas na morfoanatomia das raízes que colonizam, as micorrizas arbusculares são classificadas em endomicorrizas, e caracterizam-se por ausência de manto externo, com alterações de morfologia visível e com penetração inter e intracelulares pelo fungo no córtex da raiz, e se diferenciam das demais em características próprias relatadas (Araújo & Hungria, 1994). (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais características de micorrizas arbusculares.

Tipo de micorriza	Principais características
Arbuscular ou vesículo-arbuscular	<ul style="list-style-type: none"> • Ocorre na maioria das plantas vasculares (\pm 300 mil espécies). • Zigomicetos da ordem <i>Glomales</i> (\pm 140 espécies). • Cosmopolita, mas tipo predominante nos trópicos. • Penetração inter e intracelular (arbúsculos). • Vesículas em certas espécies e esporos característicos. • Fungo asseptado e biotrófico obrigatório. • Sem evidência de especificidade hospedeira.

Adaptado de: Araújo & Hungria, 1994.

As micorrizas arbusculares são restritas das famílias de ordem Glomales descritas abaixo: (Figura 3).

**Figura 3.** Árvore filogenética representando as relações em Glomales (MORTON, 1990).

As hifas destes fungos são muito importantes para iniciar novas colonizações na geração de novos esporos, além de favorecerem a agregação do solo, diminuindo o processo de erosão (SIQUEIRA, LAMBAIS & STÜRMER, 2002), elas penetram as células corticais das raízes,

mas de forma que não causem danos, o que diferencia as micorrizas dos fungos patogênicos (SOUZA et al., 2006).

Os esporos são assexuados e são estruturas de resistência e disseminação que possuem grande diversidade estrutural (SIQUEIRA, LAMBAIS & STÜRMER, 2002) eles são produzidos de forma isolada e agregados em matriz de hifas desorganizadas ou altamente ordenados, normalmente são formados em uma parede contínua de hifas, porém também encontram-se formados dentro das raízes para desenvolvimento das vesículas em algumas espécies (INVAM, 2013).

Já são muito estudados os fatores de regulação do desenvolvimento das micorrizas, porém o esclarecimento destes ainda é muito escasso e estão longe de ser concluídos, mas sabe-se que os fungos produzem substâncias reguladoras de crescimento e seu efeito na planta também pode ser hormonal (KIRIACHEK, et al. 2009). Sabe-se que o processo de pré-infecção ocorre através do crescimento e uma hifa infectiva, a partir de um esporo germinado, de um segmento de raiz infectado ou de presença de hifa no solo, mas a interação entre as plantas e esses fungos ocorre antes mesmo de um contato físico, que é através de trocas permanentes de sinais moleculares determinadas em “cross-talking” (SIQUEIRA, 1996).

Porém as áreas de mineração onde se promove grande impacto ambiental, atinge consequentemente de forma negativa à essa simbiose que é considerada de grande importância na sustentabilidade dos ecossistemas. Estudos mostram que ocorre vasta redução do número de propágulos e de crescimento dos fungos micorrízicos em áreas de mineração e para a reabilitação objetivam focar na dependência das espécies dos FMs com várias espécies vegetais e a resposta disso nessas localidades (SIQUEIRA et al., 2010).

Além disso, a adição de efeitos tóxicos diretos nas plantas o excesso de metais é detrimental para as micorrizas, e esse sistema de solo-planta-fungo é considerado complexo devido à fatores bióticos e abióticos que estão envolvidos, onde o levantamento de áreas afetadas torna-se a melhor forma de compreender a relação desses fungos com os contaminantes, pois os estudos relacionados à isto em campo são escassos, onde a maioria ocorre em casas de vegetação com adição de contaminantes de formas diferentes do ambiente (SIQUEIRA, 1996).

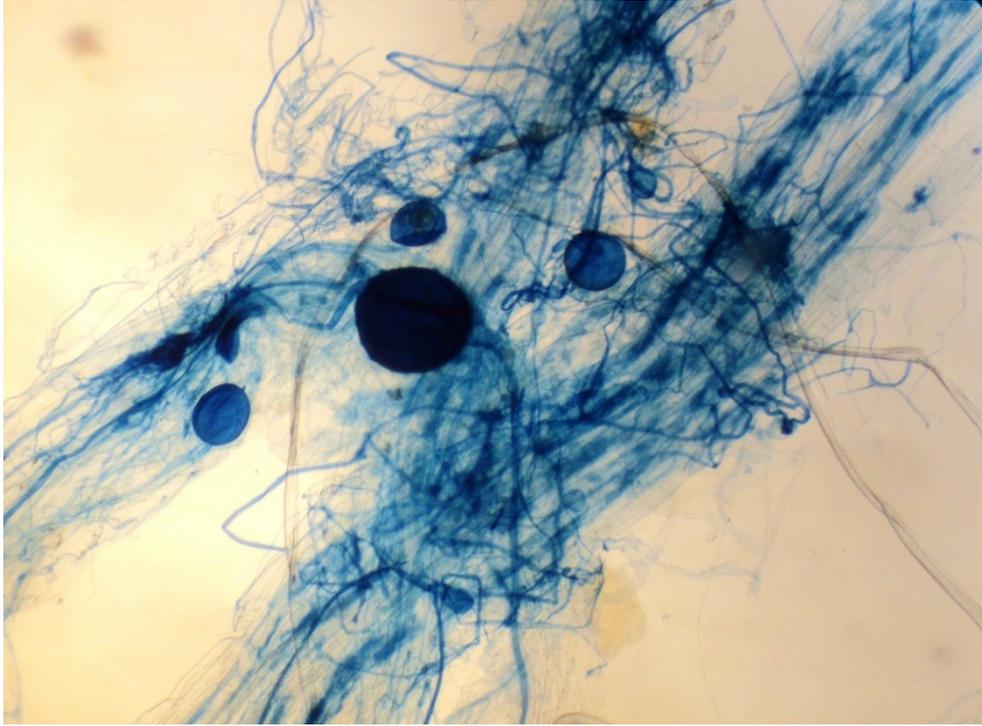


Figura 4. Fungos Micorrízicos em raiz de sorgo.

(Fonte: Arquivo Pessoal – Embrapa Milho e Sorgo- 2012).

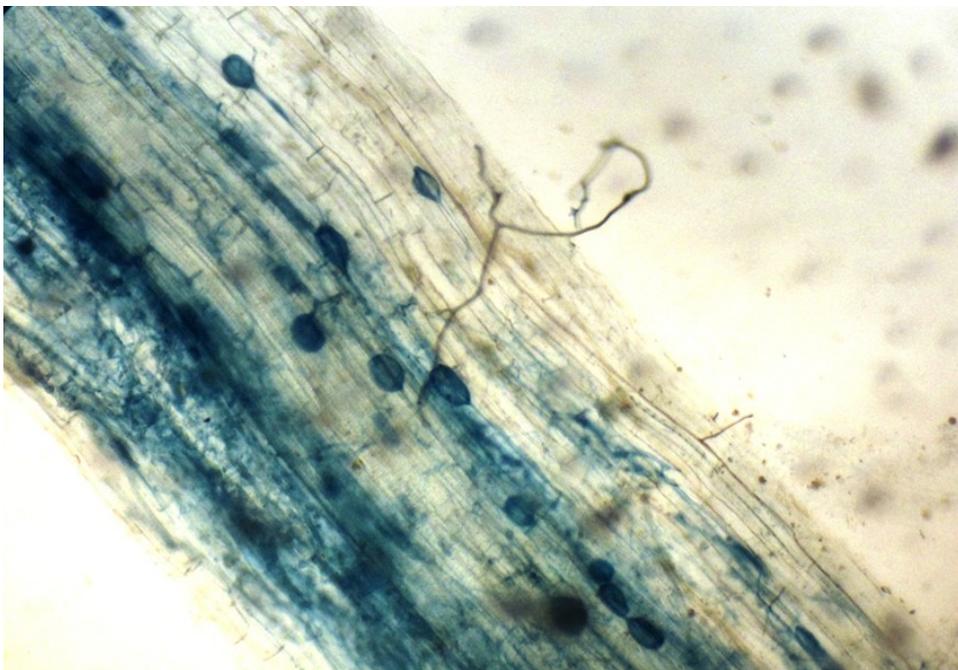


Figura 5. Fungos Micorrízicos em raiz de milho.

(Fonte: Arquivo Pessoal – Embrapa Milho e Sorgo- 2012).

Apesar disso, espécies de Fungos Micorrízicos (FM) possuem ocorrência generalizada mesmo em ambientes de alto grau de degradação, e é grande a busca de isolados que sejam

nativos do ambiente de forma que sejam adaptáveis, assim conseqüentemente as plantas possam se favorecer destes, através do fornecimento de absorção de nutrientes, promovendo o beneficiamento da estruturação e sucessão vegetal local, o que mostra a importância biorrecuperadora desses fungos (COLODETE, DOBBSS & RAMOS, 2014). Eles produzem compostos importantes como a Glomalina, que possui papel fundamental na estabilização da estrutura do solo, por ser proteínas de alta estabilidade que são produzidas pelas hifas (BERBARA, SOUZA & FONSECA, 2006).

São microorganismos importantes no auxílio de mecanismos de rizodegradação (conhecido também como fitoestimulação ou biodegradação), reduzindo a toxicidade de elementos poluidores assim facilitando a absorção deste pelas plantas (ANDRADE, TAVARES & MAHLER, 2007). (Figura 6).

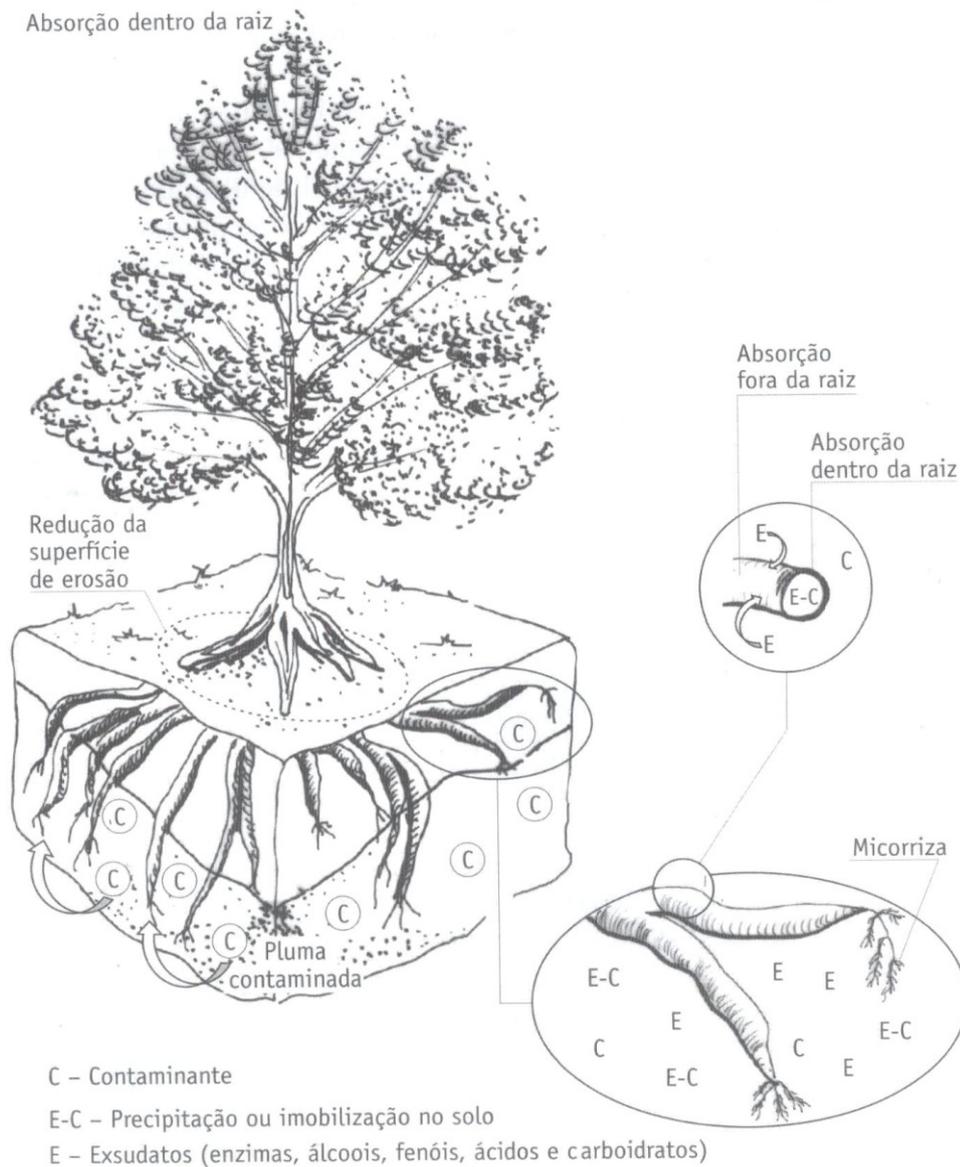


Figura 6. Esquema de fitoestabilização. (ANDRADE, TAVARES & MAHLER, 2007).

Estratégias de cultivos de diferentes tipos de vegetais relacionados às micorrizas para ação remediadora promoveram resultados satisfatórios para a utilização destas, como Carneiro et al. (2012) que observaram o cultivo de gramíneas e leguminosas forrageiras associadas à práticas de controle de erosão aumentou o nível de colonização e de propágulos infectivos de FM nas raízes em áreas degradadas.

Além disso, Silva, Siqueira & Soares (2006), observaram a contribuição dos FM no crescimento e na extração de metais pesados pela espécie vegetal braquiária em um solo contaminado, o qual observou-se que houve redução de teores dos metais na parte aérea da

planta, o que ameniza a toxidez dos metais além de favorecer o crescimento e a extração dos contaminantes do solo, sendo um fator importante no estudo para implementar as técnicas de remediação de solos com uso de plantas.

No que diz respeito às áreas contaminadas por arsênio, esses fungos podem reduzir a absorção e o acúmulo deste pelas plantas, aliviando sua fitotoxidez e permitindo o crescimento vegetal (CIPRIANI, 2011).

Em seus estudos Schneider et al, (2012), utilizaram espécies de samambaias em substratos com altos teores de arsênio, que apresentaram sintomas de fitotoxidez, porém a espécie vegetal *Thelypteris salzmannii* apresentou maior taxa de colonização micorrízica e esporulação de fungos viáveis mesmo nessas condições evidenciando a possibilidade de utilizá-la em processos de reabilitação de áreas contaminadas.

Assim como no estudo de Freitas et al. (2012) relacionado à espécie *Anadenanthera peregrina*, Gomes (2011), mostra a micorrização natural dessa espécie em solo contaminado com arsênio e seu mecanismo de tolerância natural ao elemento está intimamente relacionado à presença dessa simbiose, de forma que ela proporciona o aumento da nutrição de fósforo, acúmulo do As nas raízes ou nas hifas intra-radiculares do fungo e a translocação do As para a parte aérea da planta. Da mesma forma ocorre na espécie de planta *Brachiaria decumbens*, porém ela apresenta uma dependência diferente pelo FM, de forma que na ausência deste ela não consegue absorver o As em seu sistema radicular nem promover o transporte deste para seus tecidos.

4.4. Espécies importantes de Fungos Micorrízicos

O maior desafio para programas de reabilitação com a utilização de Fungos Micorrízicos relaciona-se à investigação quanto à tolerância ao arsênio que eles possuem, e conseqüentemente poder selecionar espécies que possam germinar esporos mesmo em altas concentrações do contaminante, visto que esta capacidade varia de espécie para espécie (GUERRERO, DUCHICELA & CUMBAL, 2006). Além disso, para Araújo & Hungria (1994), os estudos para utilização dos fungos em larga escala apresenta obstáculos, como expectativas irreais dos vários segmentos envolvidos na sua exploração, limitação da comercialização de inoculantes e ausência de resultados consistente e previsíveis aplicados em campo e análise custo-benefício.

Por outro lado, para Schneider (2011), é grande e generalizado o potencial de adaptação desses fungos a elevadas concentrações de arsênio, mas há espécies que se destacam em locais com maior teor como *Acaulospora sp*, *A colombiana* (Figura 7), *A. tuberculata* (Figura 8) e *Scutellospora sp#1*, e que apesar da contaminação por arsênio diminuir a quantidade de espécies de FMs eles aumentam quando há a presença de plantas. Siqueira et al.(2010) também cita isolados fúngicos selecionados das espécies *Glomus clarum*, *G.etunicatum* e *Entrophospora colombiana* para áreas de reflorestamento.

A espécie *Glomus clarum* mostra-se eficiente quando inoculada em plantas de *Leucaena leucocephala*, o que tornou-a com mais atividade enzimática, mostrando defesa antioxidante, o que mostra que a espécie de fungo foi eficiente em proteger o sistema oxidativo da planta mesmo submetido a altas doses de arsênio (Schneider, 2011).

Em seu trabalho Rangel (2011), observa que o teor de As nas raízes apresentou elevado quando inoculados com as espécies *Aucalospora sp*, *G.etunicatum* e *A. morrowieae*, ocorrendo redução na translocação do contaminante das raízes para a parte aérea do vegetal.

Caproni et al. (2003), observaram a diversidade de espécies de FMAs em área de mineração que passa por processo de revegetação, e entre as espécies recuperadas, *Glomus macrocarpum* e *Acaulospora mellea* (Figura 9) apresentaram maior ocorrência, podendo constatar a importância de tais espécies para estudos.

Glomus macrocarpum também foi destaque em trabalho de Marinho et al.(2004), apresentando altos valores de IAF (Índice de abundancia e frequência) e NPI (Número de propágulos infectivos), resultando em boa capacidade de adaptação da espécie em processos

de recuperação, por possuir amplo domínio da espécie em diferentes estágios de sucessão como espécie pioneira.



Figura 7. Esporos Maduros da espécie *Acaulospora colombiana*.

Possuem forma globosa a subglobosa, cor laranja-castanho para laranja marrom-escuro, parede dos esporos de duas camadas, uma interna que origina o esporo e outra externa contínua com a parede do gargalo do projenitor, a presença de uma cicatriz circular ou ovóide que faz conexão entre esporos e “Sporiferious Saccule” (INVAM, 2014).

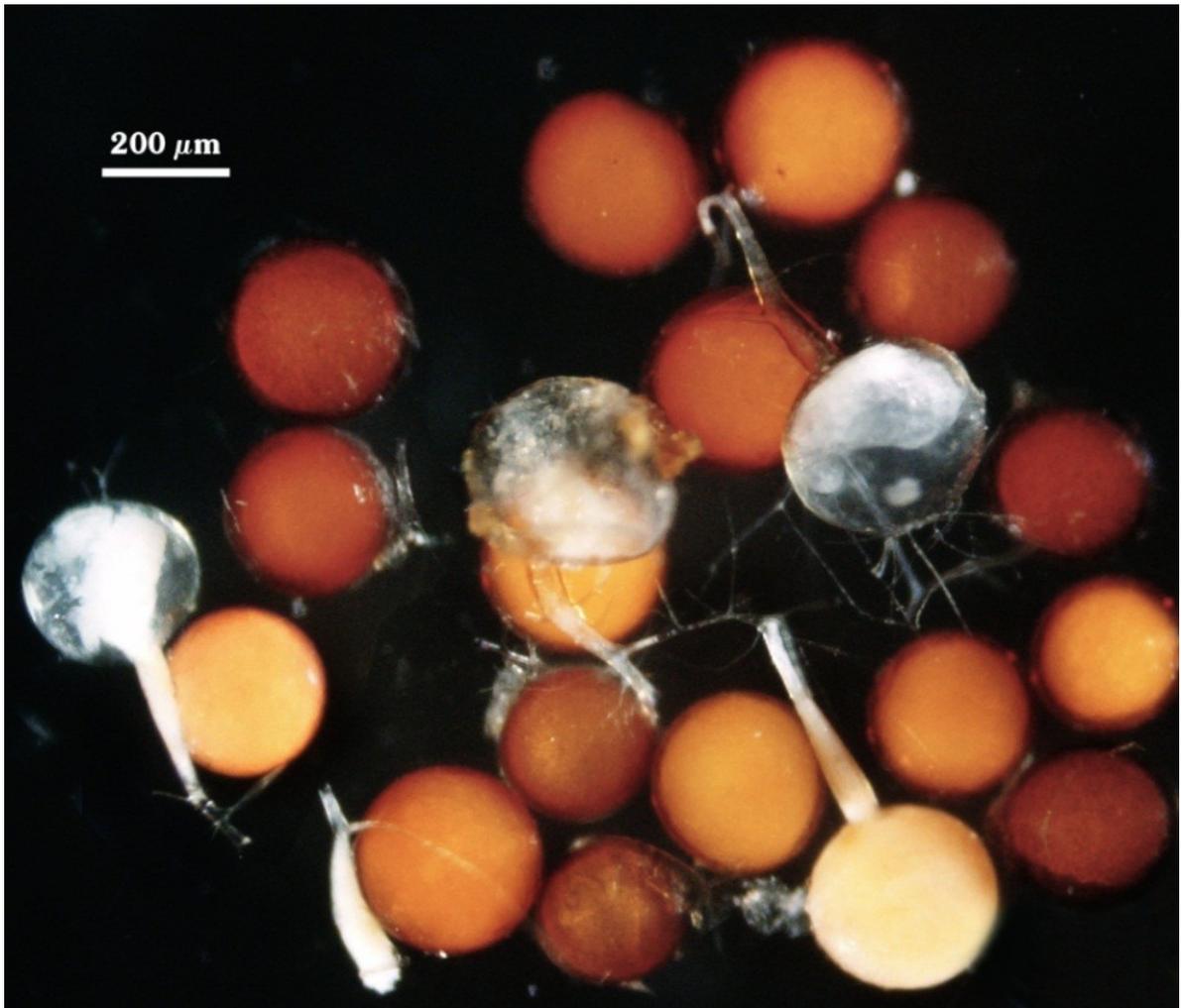


Figura 8. Esporos da espécie *Acaulospora tuberculata*.

Possuem cor vermelho-alaranjado para vermelho marrom escuro, com tamanho de distribuição de 120-280 μm , possuem parede em três camadas onde a camada exterior contínua com a parede do gargalo do progentir sporífero e os dois últimos são sintetizados com o desenvolvimento de esporos. Esta espécie mostra-se extremamente difícil de esporulação em cultura (INVAM, 2014).

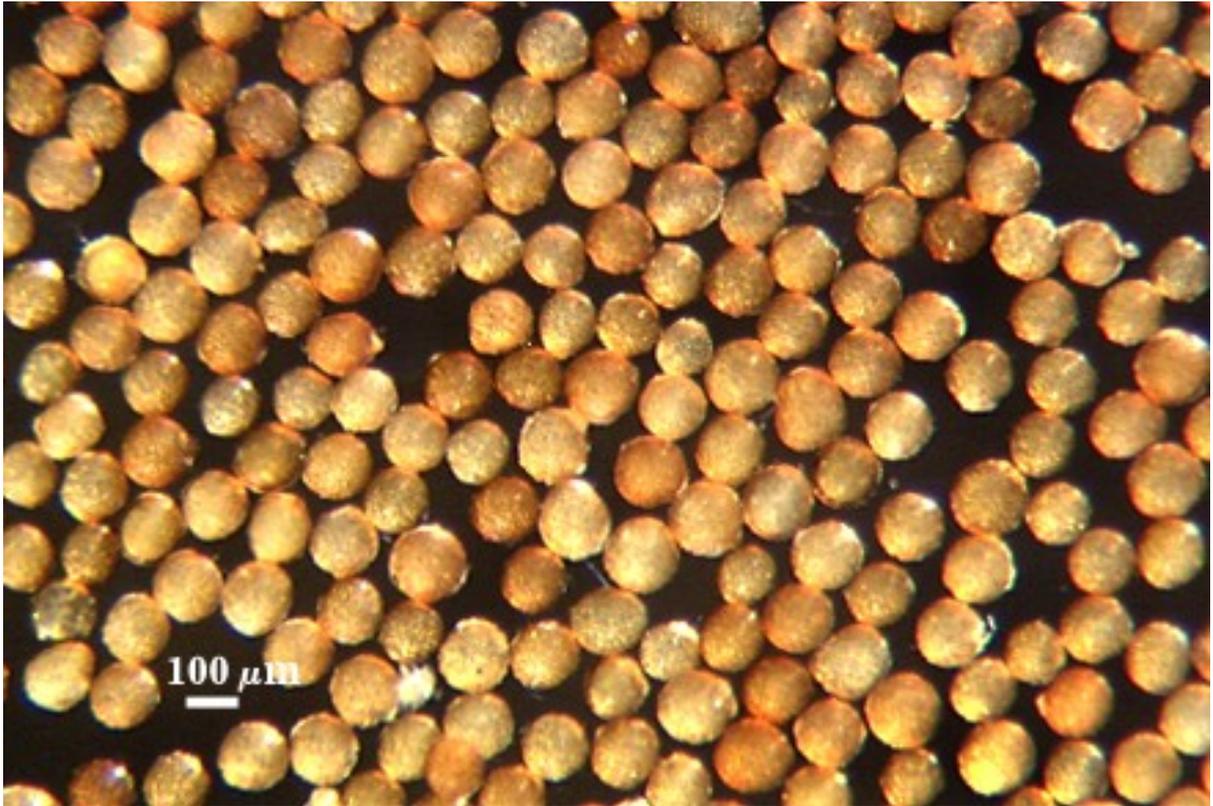


Figura 9. Esporos da espécie *Acaulospora mellea*

Possuem cor pálida de laranja-marrom, de formas principalmente globosa e subglobosa, ocasionalmente irregular, com tamanho de distribuição 90-140 μm , onde seus esporos são raramente encontrados ligados à sáculos mesmo em potes cedo de colheitas de cultura (INVAM,2014).

4.5. Produção de mudas inoculadas

As perturbações que ocorrem no solo devido às atividades mineradoras podem reduzir o potencial de infectividade dos FMs, assim uma estratégia a ser utilizada é a implantação de mudas já micorrizadas. Estas estão cada vez mais sendo estudadas e adotadas, visto que se faz necessário incorporar o fungo juntamente com a estratégia de fitorremediação para que seu potencial de infectividade (que está baixo nessas áreas) aumente e promova uma efetiva manutenção da diversidade vegetal, animal e microbiana do local, utilizando-se as plantas eficientes para o processo de remediação do arsênio micorrizadas com as espécies escolhidas que sejam também eficientes, ajudando nos processos iniciais da recuperação da área (SILVA, et al. 2001).

Para Schiavo & Martins (2003), em processos de reflorestamento é necessário a utilização de mudas produzidas com alta qualidade morfofisiológica, e um bom método de produção destas, onde a utilização de blocos prensados notou-se eficientes para o crescimento de mudas e também resíduos como bagaço podem ser utilizados como substratos na produção.

Porém um desafio para inoculação das mudas é relacionado ao fato de que os Fungos micorrízicos não se permitem multiplicar em meio artificial como ocorre com outras espécies de fungos, o que indisponibiliza em muitos casos a comercialização de inóculos viáveis. É possível obter sucesso quando as plantas em estágio de formação de mudas em recipientes recebem o inóculo durante o transplante para sacos plásticos pretos (CHU, 2005).

Segundo Souza et al. (2006), os inoculantes naturais possuem grandes desvantagens devido ao desconhecimento da eficiência dos fungos introduzidos dessa forma, aumentando a busca por metodologia de formação de inoculantes mais eficientes, e como exemplo disso os inoculantes encapsulados, onde ocorre o cultivo dos fungos por meio líquido ou sólido com inclusão do micélio em um gel, mas ainda apesar de ser uma técnica promissora exige-se mais estudos de forma a solucionar suas restrições. Outro fator a ser discutido na produção do inóculo, é a necessidade de que o substrato possua características físico-químicas próximas às do ambiente a ser utilizado, de forma que obtenha-se maior adaptação destes fungos às condições desfavoráveis dos ambientes degradados (SIQUEIRA, 1996).

Um avanço nos estudos para estimulação na formação das micorrizas foi a descoberta do isoflavonoide formononetina, uma substância que atua na indução da formação de apressórios, aumentando a densidade de pontos para a entrada do fungo na raiz das plantas e

consequentemente da colonização (SILVA-JÚNIOR & SIQUEIRA, 1997). O efeito pode variar de acordo com o isolado fúngico, e pode ser maior em isolados de baixa atividade, onde através de sua utilização pode facilitar na revegetação em solos contaminados (NOVAIS & SIQUEIRA, 2009), visto que, proporciona de modo indireto uma nutrição mineral balanceada aliviando estresses pelo contaminante (SIQUEIRA et al. 1999).

Outros fatores a serem estabelecidos são o período de plantio de mudas inoculadas na área contaminada, onde trabalhos observaram que período seco propicia a esporulação de maior número de espécies de FMAs do que períodos chuvosos, mostrando também que a produção de esporos é influenciada pelo tempo da revegetação e de reposição de solo orgânico quando em áreas de mineração (CAPRONI et al. 2003).

4.6. Metodologias de estudos com FMs

Uma metodologia muito adotada para produção de mudas é de acordo com Brundrett, Melville & Peterson (1994).

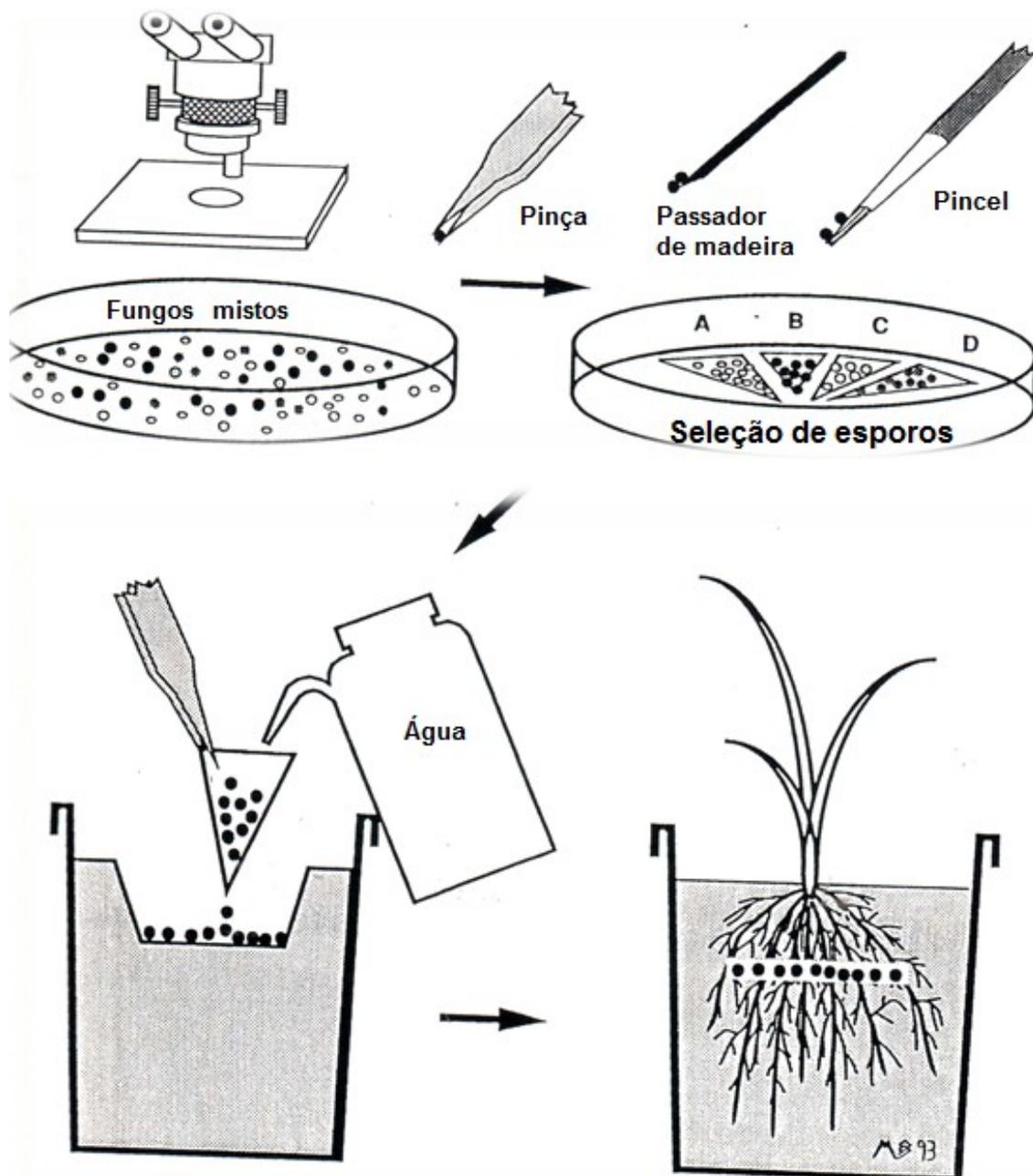


Figura 10. Metodologia para produção de mudas.

Esporos são peneirados do solo e selecionados por microscopia, podendo ser apanhados com diferentes materiais e dispostos em filtros de papel. Seleciona-se um tipo de esporo que são lavados em potes com areia em vapor, onde uma planta hospedeira será cultivada. (Adaptado de BRUNDRETT, MELVILLE & PETERSON, 1994).

Porém segundo esses autores, essa estratégia conhecida como **Cultura em vaso de esporos** mesmo adquirindo isolados puros, há desvantagens, como a utilização de muitos esporos a serem selecionados, podendo ser inviáveis e o acúmulo de inóculo ocorrer de forma lenta.

Mas existem outras estratégias que também possuem suas vantagens e que são muito utilizadas como as **Culturas armadilhas de solo**, que possui altas taxas de sucesso com rápida acumulação de inóculo, porém há redução da diversidade de fungos, o qual não se conhece se há mais competitividade e adaptabilidade dos fungos. Seu procedimento ocorre através de preparo de substrato, que consiste em mistura esterilizada de solo, areia, calcário e fosfato de rocha, e neste adiciona-se um solo-inóculo ou raízes coletadas de uma área de interesse, após isto semeia-se uma espécie vegetal em vasos com água filtrada e a medida que as plantas crescem ali, os propágulos de FMAs colonizam as raízes e se multiplicam (NOVAIS, 2009).

Em contrapartida, Leal (2005) mostrou que o emprego dessa estratégia em seu estudo permitiu a recuperação de 24 espécies diferentes de FMAs em diferentes sistemas de uso da terra, o que mostra uma boa taxa de diversidade.

Outra técnica é de **Raízes inoculadas** que também possui altas taxas de sucesso quanto à acumulação de inóculo, há predominância para os isolados do gênero *Glomus*, mas apresenta baixa diversidade de fungos e há problemas quanto à necessidade das vesículas serem presentes nas raízes ou não, e a técnica de **Transplante de Mudanças** que produz isolados ativos de fungos, considerada de baixo a moderada taxa de sucesso por possuir limitadas diversidade de fungos nas culturas resultantes (BRUNDRETT, MELVILLE & PETERSON, 1994).

4.6.1. Contagem de Colonização Micorrízica

Para observar se a estratégia utilizada de produção de mudas inoculadas e no preparo de inóculos viáveis possui bons resultados quanto à quantificação de colonização por micorrizas, realiza-se a coloração de raízes para avaliar a porcentagem da colonização em seus fragmentos. Este procedimento é realizado em duas etapas:

Primeiro as raízes das plantas a serem avaliadas são submetidas a um processo de coloração, determinado por Phillips & Hayman (1970) o qual se submete as raízes em solução clareadora de hidróxido de potássio (KOH) a 10%, aquecimento em banho-maria em temperatura de 90°C, repouso em solução de ácido clorídrico (HCL) a 2% e coloração por azul de tripan blue a 0,05% em lactoglicerol, onde as concentrações das soluções podem variar de acordo com o tipo de tecido radicular estudado (PENNSTATE, 2014). (Figura 8).

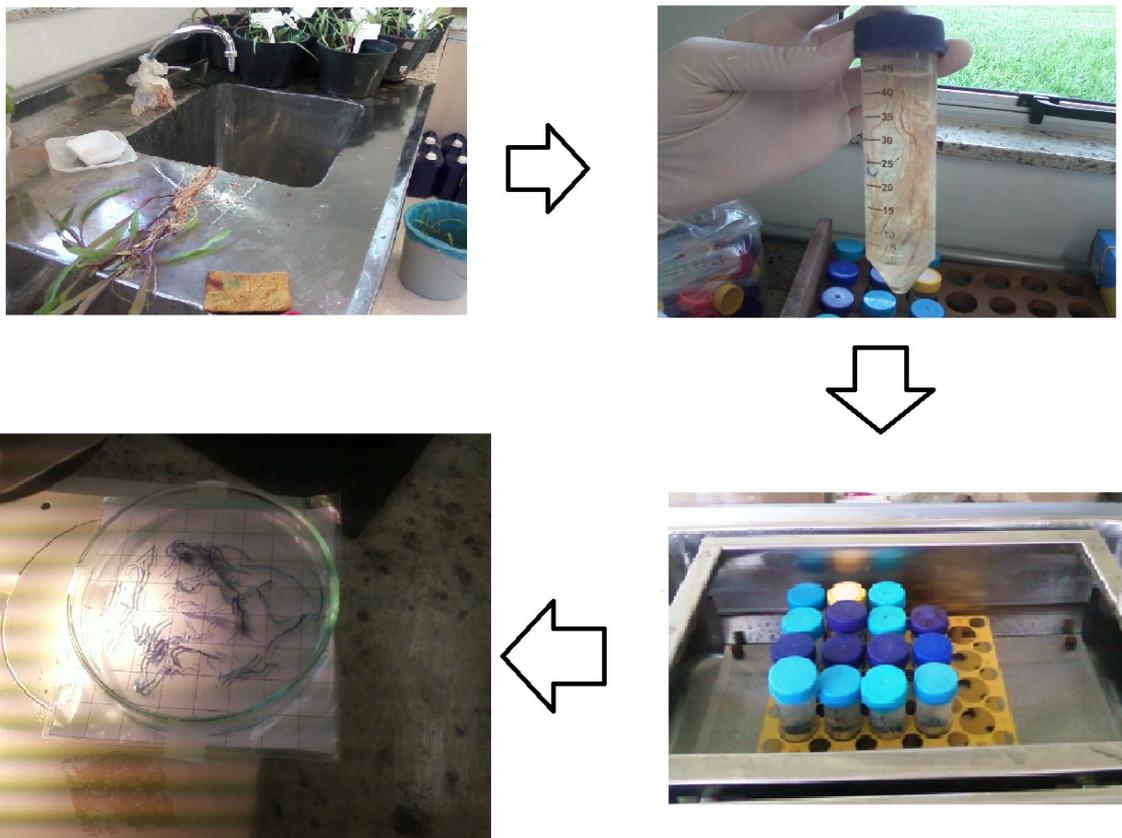


Figura 11. Procedimento de coloração de raízes para observar a colonização micorrízica.

(Fonte: Arquivo Pessoal – Embrapa Milho e Sorgo- 2012).

Após este procedimento realiza-se a percentagem de colonização micorrízica (PCM) dos segmentos de raízes através de método de intersecção de quadrantes por Giovannetti & Mosse, 1980 (Figura 9).

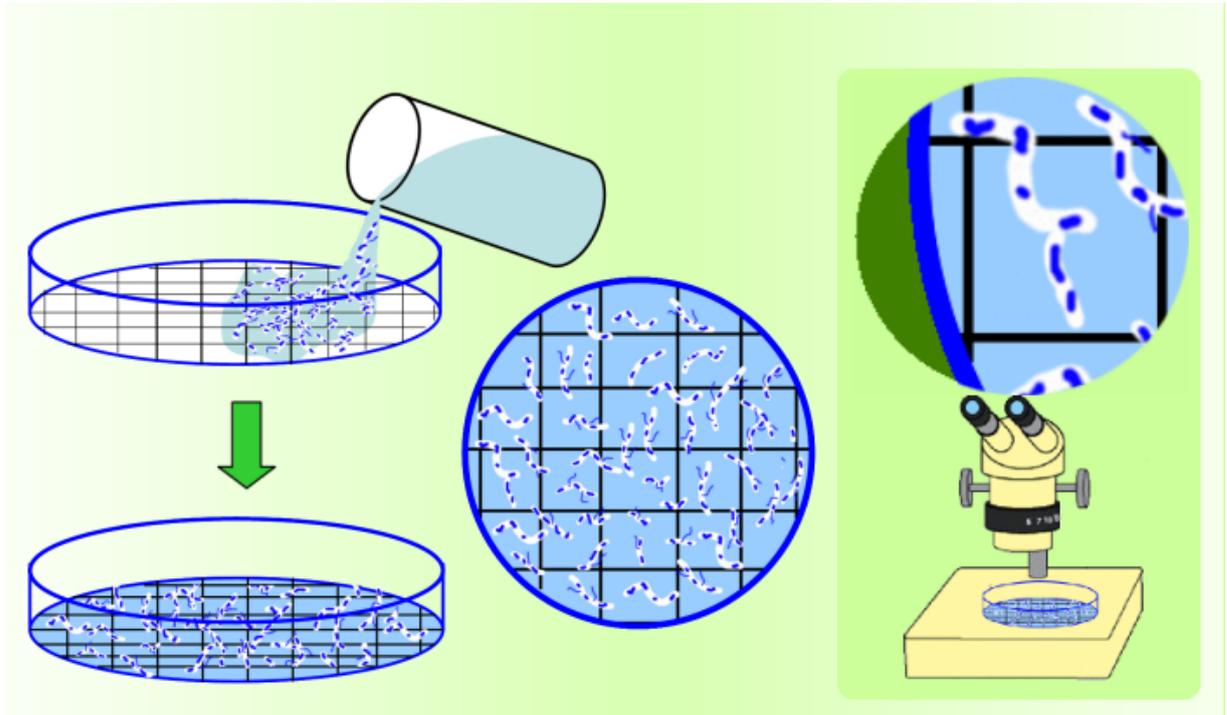


Figura 12. Esquema de avaliação da porcentagem de coloração de fragmentos de raízes. As raízes coradas são dispostas sobre placa de petri e observadas em lupa, a contagem é feita através da observação de intersecção entre os fragmentos de raízes e as linhas horizontais, observa-se 100 pontos de intersecção, se no ponto de intersecção houver presença do fungo conta-se como positivo, e caso contrário conta-se como negativo, no fim, o valor da porcentagem de colonização será representada pela quantidade de pontos positivos (NOVAIS, 2009).

4.6.2. Preservação de Esporos

Devido à limitação do uso generalizado com os FMAs, pelo fato destes serem de caráter biotrófico obrigatório, faz-se necessário a utilização de estratégias que possibilitem a preservação das espécies, pois sua multiplicação necessita do uso de raízes metabolicamente ativas (SOUZA et al., 1996), e persiste-se a necessidade de aperfeiçoar protocolos já existentes de estocagem e preservação, e de criar novos, afim de promover maior proteção à estes microorganismos (AGUIAR et al., 2012).

Uma das técnicas de preservação denomina-se criopreservação, a qual em alguns casos teve grandes avanços para utilização em larga escala, porém alguns materiais ainda mostram

sensibilidade ao congelamento, e juntamente com estudos biofísicos e bioquímicos busca investigar os mecanismos e as causas de injúrias induzidos pelas técnicas (SANTOS, 2000).

Em seu trabalho Oliveira & Souza (2012), testou técnicas de criopreservação de solo-inóculo com propágulos de três espécies de Fungos Micorrízicos Arbusculares a fim de destacar métodos que garantam a viabilidade dos fungos por longos períodos, adotando-se cinco tratamentos:

1. Congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$;
2. Armazenamento direto em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$;
3. Armazenamento direto em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
4. Armazenamento em geladeira;
5. Controle - armazenamento em temperatura ambiente;

Além disso, foi avaliado o efeito da criopreservação na taxa de germinação dos esporos, através de metodologias de extração, limpeza e seleção, desinfestação, plaqueamento e incubação destes (Figura 10).



Figura 13. Desenho esquemático da metodologia utilizada para criopreservação de esporos de FMAs. (OLIVEIRA & SOUZA, 2012).

Segundo esse autor, a eficácia dos métodos de preservação dos esporos para longos períodos varia de acordo com cada espécie a ser estudada, por elas apresentarem diferenças de percentual de germinação quando submetidas a cada método, necessitando-se assim de mais estudos quanto aos métodos de criopreservação.

4.6.3. Extração de DNA

O uso das técnicas moleculares possibilita a identificação taxonômica dos FMAs, evitando as dificuldades promovidas pela taxonomia tradicional, assim podendo superar desafios de isolamento e identificação de espécies importantes (SOUZA & MALOSSO, 2006), visto que muitos autores se contradizem quanto às descrições das espécies, através da diferença de percepções, como em variações de tonalidades de esporos isolados, tamanho e diâmetros, que se deve ao fato de diferenças entre formas de cultivos ou idade das culturas, e através desses impasses busca-se a extração de DNA dos esporos com quantidade e pureza suficientes para amplificação por PCR, que dependendo do gênero estudado necessita que seja extraído de múltiplos esporos, que ocorre por razão da diferença entre os números de núcleos e cópias de um gene-alvo no genoma da espécie. (NOVAIS, SOUZA & SIQUEIRA, 2010).

Para Córdoba, Mendonça & Araújo (2002), a utilização de estratégias moleculares como a PCR-RFLP do rDNA, juntamente com as convencionais morfológicas pode fornecer importantes informações para descobertas de diversidade análise e comparação dos FMAs nos seus diferentes estágios de estabilização, assim com o avanço no uso de técnicas moleculares permite-se o isolamento de genes codificando endomicorrizas ou proteínas moduladas durante a simbiose de forma facilitada (SIQUEIRA, 1996).

Os procedimentos de extração de DNA genômico de fungos em raízes de plantas objetivam uma extração rápida e utilizando uma pequena quantidade de material fúngico ou de tecido radicular, buscando rendimento de DNA aproximadamente de 2 μ g para 0,2g de tecido radicular pulverizado em nitrogênio líquido, e quando este for ressuspendido em 100 μ L de TE, a concentração final do DNA extraído será próxima de 50 ng/ μ L (SAGHAI-MARROF, 1984). Outras estratégias moleculares comumente usadas são ressaltadas por Siqueira (1996):

- A análise de produtos proteicos por eletroforese bidimensional; construção de bancos de cDNA de raízes micorrizadas e não micorrizas; seleção de clones com sondas heterólogas marcadas; seleção de clones por hibridização diferencial; síntese de bancos de cDNA subtrativos ou de sondas subtrativas.

Técnicas as quais a identificação e clonagem de genes modulados durante a simbiose pode ser a maneira mais viável de progredir em estudos da fisiologia de FMAs (SIQUEIRA,1996).

5. CONCLUSÃO

A partir desse estudo, é possível concluir que há um número significativo de contaminações de solos por arsênio através da mineração, principalmente no estado de Minas Gerais que possui grande potencial econômico nesse ramo, e a utilização dos fungos micorrízicos associados à fitorremediação contribui para a redução do potencial tóxico desse elemento no ambiente, porém é necessário mais estudos para descobrir novas espécies de vegetais e fungos que sejam resistentes à altas concentrações do As, e juntamente à isto descobrir metodologias para facilitar o manuseio, a preservação e análise genética desses fungos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, T. D. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; TELES, C. H. A.; MARTINS, G. R.; BEZERRA JÚNIOR, R. Q.; COSTA, E. C. Princípios básicos da criomicrobiologia: Enfoque nos tipos de microorganismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.2, p.80-93, 2012.
- ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, F. Fitorremediação: o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental. São Paulo - **Oficina de Textos**, 2007.
- ANTUNES, A. S. Pontencial da braquiária (*Brachiaria decumbens Stapf*) na fitorremediação de solos contaminados por arsênio. **Tese (Mestrado) – Lavras: UFLA**, 2007.
- ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Microorganismos de importância agrícola. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão: Centro Nacional de Pesquisa de Soja. - Brasília: EMBRAPA-SPI 236p. - **(EMBRAPA-CNPaf. Documentos. 44)**, 1994.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F.A.; FONSECA, H. M. A. C. III-Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito além da nutrição. **SBCS, Nutrição Mineral de Plantas**, 432p. 2006.
- BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; CAVALCANTE, J. A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). **REM: R. Esc. Minas, Ouro Preto**, **57(1): 45-51**, 2004.
- BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R. A Influência das condições geoquímicas na oxidação da arsenopirita e na mobilidade do arsênio em ambientes superficiais tropicais. **Revista Brasileira de Geociências**, v.34, 2004.
- BRUNDRETT, M.; MELVILLE, L.; PETERSON, L. Practical methods in Mycorrhiza research. **Mycologist Publications**, 1994.
- CAMPOS, M. L.; GUILHERME, L. R. G.; ANTUNES, A. S.; BORGES, K. S. C. Teor de arsênio e adsorção competitiva arsênio/fosfato e arsênio/sulfato em solos de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 6, p. 985-991, 2013.
- CARNEIRO, R. F. V.; CARDOZO JÚNIOR, F. M.; PEREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SILVA, G. A. Fungos micorrízicos arbusculares como Indicadores da recuperação de áreas degradadas no Nordeste do Brasil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 648-657, 2012.
- CETEM. Mina de ouro em Paracatu (MG) gera controvérsia por fazer mineração de ouro associada ao arsênio. **Revista Brasil Mineral**, 2012.
- CETESB. Arsênio. **Ficha de Informação Toxicológica**, 2012.
- CHU, E. Y. Sistemas de Produção da Pimenteira. Embrapa Amazônia Oriental Sistemas de Produção, **01 ISSN 1809-4325 Versão Eletrônica**, 2005.

CIPRIANI, H. N. Respostas morfológicas de plantas de *Acacia magium* Willd. E *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., inoculadas com rizóbio e micorriza arbuscular, sob efeito de arsênio. **Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa**, 2011.

CLEMENTE, C. M. S.; LEITE, M. E.; PEREIRA, D. M. Estudo comparado da área de mineração do município Itabira/MG nos anos 1985,1997 e 2007. **Revista Eletrônica de Geografia**, v.5, n.13, p. 84-100, 2013.

CNI. Mineração e economia verde / Confederação Nacional da Indústria. Instituto Brasileiro de Mineração. 69 p. **Cadernos setoriais Rio+20** – Brasília, 2012.

COLODETE, C. M.; DOBBSS, L. B.; RAMOS, A. C. Aplicação das micorrizas arbusculares na recuperação de áreas impactadas. **Publicado pela ESFA [on line] <<http://www.naturezaonline.com.br>>**, 2014.

CÓRDOBA, A. S.; MENDONÇA, M. M.; ARAÚJO, E. F. Avaliação da diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares em três estádios de estabilização de dunas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 26, p. 931-937, 2002.

CORRÊA, R. S. Recuperação de áreas degradadas pela mineração no Cerrado: **Manual para revegetação**. 2 ed.rev., ampl. e atual. Brasília: Universa, 2009.

COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. **Silva Lusitana**, v. 15, n. 1, p. 103-117, 2007.

DE LIMA RODRIGUES, A. S.; MALAFAIA, G. A importância dos estudos sobre a contaminação por arsênio na saúde pública. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 5, n. 2, 2010.

FARIAS, C. E. G. Mineração e Meio Ambiente no Brasil. **Relatório Preparado para o CGEE PNUD – Contrato 2002/001604**, 2002.

FIGUEIREDO, B. R.; BORBA, R.P.; ANGELICA, R.S. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. **Environmental geochemistry and health**, v. 29, n. 2, 2007.

FOLLI-PEREIRA, M. S.; HADDAD-MEIRA, L. S.; BAZZOLLI, D. M. S.; KASUYA, M. C. M. Micorriza Arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 36, p. 1663-1679, 2012.

FREITAS, L. B.; BERED, F. Genética e Evolução Vegetal. Porto Alegre: **Editora da UFRGS**, 2003.

FREITAS, N. D.; KARAM, D.; BUCEK, E. ; SCOTTI, M. R. Tolerance of *Anadenanthera peregrina* to *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus grandis* essential oil as condition for mixed plantation. **Brazilian Archives of Biology and Technology (Impresso)**, v. 55, p. 417-424, 2012.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500, 1980.

GOMES, M. P. Contribuição dos fungos micorrízicos na tolerância de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg E. *Brachiaria decumbens* Stapf. ao arsênio. **Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais**, 2011.

GOMES, R. J.; CIPRIANI, H. N.; DIAS, L. E.; COSTA, M. D.; MORAIS, L. E.; MARTINS, S. C. V.; AMEZQUITA, S. P. M. Avaliação da Fitotoxicidade de Arsênio em Variáveis Fisiológicas de *Acacia mangiun* (Willd) Inoculadas com Fungos Micorrizicos Arbusculares. **FERTBIO**, 2012.

GONÇALVES, J. A. C.; LENA, J. C. Avaliação de risco à saúde humana por contaminação natural de arsênio nas águas subterrâneas e nos solos da área urbana de Ouro Preto (MG). **Revista do Instituto de Geociências – USP**, v. 13, n. 2, p. 114-148, 2013.

GONZAGA, M.I.S.; SANTOS, J.A.G.; MA, L.Q. Extração de arsênio do solo por samambais do gênero *Pteris*(¹) **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 3, p. 291-300, 2008.

GUERRERO, S. E. N.; DUCHICELA, J.; CUMBAL, L. Evaluación de la tolerancia a arsénico de las esporas de cuatro especies de hongos arbusculares. **Tese (Doutorado) – Escuela Politécnica del Ejército**. Sangolquí, 2006.

IBRAM - INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. Comissão Técnica de Meio Ambiente. **Grupo de Trabalho de Redação**. Mineração e Meio Ambiente. Brasília, 1992.

IBRAM- INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. Comissão Técnica de Meio Ambiente. Mineração e Meio Ambiente: Impactos previsíveis e formas de controle. 2 ed. **rev. Belo Horizonte**, 1987.

IBRAM- INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. Informações sobre a Economia Mineral do Estado de Minas Gerais. **Disponível em < <http://www.ibram.org.br/>>**, 2014.

INVAM: International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi, 2013. Disponível em: **<<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae>>**. Acesso em: 02 de Setembro de 2014.

KINROSS. Projeto de expansão. **Disponível em http://www.kinross.com.br/projeto_expansao.php?id_category=5**, 2006.

KIRIACHEK, S. G.; AZEVEDO, L. C. B.; PERES, L. E. P. P.; LAMBAIS, M. R. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares(1). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1-16, 2009.

KWON, J. C.; LEE, J.; JUNG, M. C. Arsenic contamination in agricultural soils surrounding mining sites in relation to geology and mineralization types. **Applied Geochemistry**, v. 27, n. 5, 2012.

LACAZ, C. S.; MINAMI, P. S.; PURCHIO, A. O grande mundo dos fungos. **São Paulo, Editora Polígono**, 248p, 1970.

LADEIRA, A. C. Q.; PANIAGO, E. B.; DUARTE, H. A.; CALDEIRA, C. L. Especificação Química e sua Importância nos Processos de Extração Mineral e de Remediação Ambiental. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. N. 8, p. 18-23, 2014.

LAMBERT, L. F. M.; SOARES, R. P. S.; SOUZA, S. C. O uso da fitorremediação para recuperação de solos contaminados por petróleo. **III Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**. Goiânia/GO, 2012.

LEAL, P. L. Fungos Micorrízicos Arbusculares isolados em culturas armadilhas de solos sob diferentes sistemas de uso na Amazônia. **Tese (Mestrado) – Lavras: UFLA**, 67p, 2005.

MARINHO, N. F.; CAPRONI, A. L.; FRANCO, A. A.; BERBARA, R. L. L. Respostas de *Acacia mangium* Willd e *Sclerolobium paniculatum* Vogel a fungos micorrízicos arbusculares nativos provenientes de áreas degradadas pela mineração de bauxita na Amazônia. **Acta Botanica Brasilica**. 18(1): 141-149, 2004.

MECHI, A.; SANCHES, D. L. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos avançados** 24, (68), 2010.

MELO, R. F. D.; DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. D.; OLIVEIRA, J. A. D. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 2, p. 455-465, 2009.

MELLO, F. A. F.; ARZOLLA, M. O. C. B. S. S.; SILVEIRA, R. I.; NETTO, A. C.; KIEHL, J. C. Fertilidade do solo. São Paulo: **Nobel**, 1983.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. Mineração. **Disponível em:** <<http://www.mma.gov.br/governanca-ambiental/item/8323-minera%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: 13 de junho de 2014.

MORTON, J. B. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. **Mycologia** 82: 192-207, 1990

NOVAIS, C. B.; SIQUEIRA, J. O. Aplicação de formononetina na colonização e esporulação de fungos micorrízicos em braquiária. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.44, n.5, p.496-502, 2009.

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

NOVAIS, C. B. Cultivo Armadilha. **Disponível em:** <http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fma_metodos_cultivo_armadilha.html>, 2009. Acesso em: 01 de outubro de 2014.

OLIVEIRA, D. L.; ROCHA, C.; MOREIRA, P. S.; MOREIRA, S. O. L. Plantas nativas do cerrado: uma alternativa para fitorremediação. **Estudos**, v. 36, n. 11/12, p. 1141-1159, 2009.

OLIVEIRA, P. R.; SOUZA, F. A. Criopreservação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares. **Artigo em anais de congressos**. **Disponível em:** <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/930363>>, 2012. Acesso em 01 de outubro de 2014.

PENNSYLVANIA. Protocolo de coloração para raízes colonizadas com micorriza arbuscular. **College of Agricultural Sciences**, 2014. Disponível em: <<http://plantscience.psu.edu/research/labs/roots/methods/metodologia-de-pesquisa/protocol-de-coloracao-para-raizes-colonizadas-com-micorriza-arbuscular>>. Acesso em: 05 de outubro de 2014.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; PIRES, M. F.; PASQUAL, M. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. **Planta daninha**, v. 29, n. 2, p. 259-267, 2011.

PEREIRA, S. D. F. P.; OLIVEIRA, G. R. F.; OLIVEIRA, J. D. S.; SILVA, J. D. S.; SOUSA JUNIOR, P. M. D. Determinação espectrofotométrica do arsênio em solo da cidade de Santana-AP usando o método do dietilditiocarbamato de prata (SDDC) modificado. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 953-960, 2009.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p.158-161, 1970.

RANGEL, W. M. Simbioses de Fungos Micorrízicos Arbusculares e de rizóbio com leguminosas em solo contaminado com arsênio. **Tese (Mestrado) – Lavras: UFLA**, 2011.

REZENDE, P. S. Estudo Ambiental no município de Paracatu, MG: Quantificação, Especificação e Transporte de elementos tóxicos. **Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais**. Departamento de Química, 2013.

ROESER, H. M. P.; ROESER, P. A. O Quadrilátero Ferrífero – MG, BRASIL: Aspectos sobre sua História, seus Recursos Minerais e Problemas Ambientais Relacionados. **GEONOMOS 18(1): 33 - 37**, 2010.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e Perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12(Edição Especial):70-84, 2000.

SAGHAI-MARROF, M. A.; SOLEMAN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribossomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **PANS**, v.81, p. 8014-8018, 1984.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; PACHECO, C. S. V.; FERREIRA, A. N.; FRANCO, M. Fitorremediação: Avaliação do potencial de recuperação em solos contaminados com metais pesados. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, vol.7, N.12, 2011.

SCHIAVO, J. A.; MARTINS, M.A. Produção de mudas de acácia colonizadas com micorrizas e rizóbio em diferentes recipientes (1). **Pesquisa agropecuária brasileira v. 38, n. 2, p. 173-178**, 2003.

SCHNEIDER, J. Ocorrência e ação fitoprotetora de Fungos Micorrízicos Arbusculares em solos contaminados com arsênio. **Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras**, 2011.

SCHNEIDER, J.; OLIVEIRA, L. M.; GUILHERME, L. R. G. Espécies tropicais de pteridófitas em associação com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com arsênio. **Química Nova**, Vol. 35, No. 4, 709-714, 2012.

SILVA, G. A.; MAIA, L. C.; SILVA, F. S. B.; LIMA, P. C. F. Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundos de área de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 135-143, 2001.

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

SILVA-JÚNIOR, J. P.; SIQUEIRA, J. O. Aplicação de Formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 9(1):33-39, 1997.

SIQUEIRA, J. O. Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas. **Lavras: Universidade Federal de Lavras/DCS e DCF**, 1996.

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, M. R.; STÜRMER, S. L. Fungos Micorrízicos Arbusculares – Características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 25, 2002.

SIQUEIRA, J. O.; PEREIRA M. A. M.; SIMÃO, J. B. P.; MOREIRA, F. M. S. Efeito da formononetina (7 Hidroxi, 4'metoxi Isoflavona) na colonização micorrízica e crescimento do milho em solo contendo excesso de metais pesados (1). **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, 23:561-567, 1999.

SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil. **Lavras: UFPA**, 2010.

SOUZA, C. V.; SILVA, R. A.; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Estudos sobre Fungos Micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n.3, p.612-618, 2006.

SOUZA, E. S.; BURITY, H. A.; SANTO, A. C. E.; DA SILVA, M. L. R. B. Alternativa de produção de inóculo de Fungos Micorrízicos Arbusculares em aeroponia¹. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 153-158, 1996.

SOUZA, E. V. L.; MALOSSO, E. Avaliação de três métodos de extração de DNA de fungos micorrízicos arbusculares (FMA). **Disponível em:** <[http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2006/CONIC_PIBIC_2006%20\(E\)/conic/n_pibic/20/261.pdf](http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2006/CONIC_PIBIC_2006%20(E)/conic/n_pibic/20/261.pdf)>, 2006. Acesso em: 01 de outubro de 2014.

TAVARES, S. R. L. Fitorremediação em solo e água contaminadas por metais pesados provenientes da disposição de resíduos perigosos. **Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2009.