

**MICROBIOTA RIZOSFÉRICA E MICORRIZA  
ARBUSCULAR EM SOLO DE  
“LANDFARMING” DE RESÍDUOS  
PETROQUÍMICOS**

**ANDRÉ SHIGUEYOSHI NAKATANI**

**2007**

**ANDRÉ SHIGUEYOSHI NAKATANI**

**MICROBIOTA RIZOSFÉRICA E MICORRIZA ARBUSCULAR  
EM SOLO DE “LANDFARMING” DE RESÍDUOS  
PETROQUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de "Mestre"

Orientador

Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Nakatani, André Shigueyoshi

Microbiota rizosférica e micorriza arbuscular em solo de “landfarming”  
de resíduos petroquímicos / André Shigueyshi Nakatani. -- Lavras : UFLA,  
2007.

74 p. : il.

Orientador: José Oswaldo Siqueira

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Rizosfera. 2. Petróleo. 3. Microrganismos degradadores. 4. Enzimas  
do solo. 5. Fungos micorrízicos. 6. DGGE. 7. Seqüenciamento do 16S  
rDNA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.46  
-632.4

**ANDRE SHIGUEYOSHI NAKATANI**

**MICROBIOTA RIZOSFÉRICA E MICORRIZA ARBUSCULAR  
EM SOLO DE “LANDFARMING” DE RESÍDUOS  
PETROQUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 5 de fevereiro de 2007

Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares UFLA

Profª. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira UFLA

Prof. Dr. Sidney Luiz Stürmer FURB

Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A toda minha família e aos amigos

**OFEREÇO.**

Aos meus pais, Shiguo e Yoshie Nakatani

Aos meus irmãos, Tony e Sandro

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Aos meus pais, Shigueo e Yoshie Nakatani e aos meus irmãos, Tony e Sandro que, mesmo de muito longe, sempre me deram força, me apoiaram e confiaram em mim.

A Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Biologia e ao Departamento de Ciência do Solo, pela oportunidade e apoio na realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor José Oswaldo Siqueira, pela orientação, confiança, disponibilidade durante todo o mestrado e na realização deste trabalho.

Ao Doutor Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares, pela co-orientação, amizade e participação fundamental em todas as etapas da realização desta dissertação.

A Professora Fátima Maria de Souza Moreira, pela disponibilidade e contribuição durante todo o mestrado.

Ao Professor Márcio Rodrigues Lambais, por ter possibilitado e ter dado todo apoio e suporte para a realização das análises moleculares na ESALQ/Piracicaba.

Ao Professor Sidney Luiz Stürmer, por ter participado da banca examinadora e pela identificação taxonômica dos FMAs.

Aos orientadores de iniciação científica, Dr. Arnaldo Colozzi Filho e Prof. Marco Antonio Nogueira, pelo incentivo, colaboração e estímulo para ingressar na área de Microbiologia do Solo.

Aos professores Rosane, Romildo, Eustáquio e Patrícia, pelas disciplinas e disponibilidade durante todo o mestrado.

Aos técnicos Manoel e Marlene, do Laboratório de Microbiologia do Solo, pela inestimável ajuda e amizade durante todo curso e realização deste trabalho.

Aos grandes amigos Kris, Giselle, Taís e Lucas, presentes em todos os momentos e que se tornaram praticamente minha segunda família.

Aos amigos Amanda, Meire, Gláucia, Zé Geraldo, Paulo, Plínio, Sandro, Ivoney, Felipe, Grá, Carol Valeriano, Milagros, Rairys, Sid, Liliana, Cândido, Lucélia, Adrianinha e Patrícia, pela amizade e pelos muitos momentos de descontração em Lavras.

Ao Rafael, Gisele Nunes, Carol, Soraia, Chiclete, Simão, Alessandra, Moraes, Robinson, Eduardo, Ricardo, Wlade e Daniel, que me ajudaram o tempo todo durante a realização dos trabalhos em Piracicaba.

A Letícia, Flávia, Andréa, Kiel e Xandão, grandes amigos de sempre de Londrina.

A todos os estagiários do Laboratório de Microbiologia do Solo que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização de uma etapa importante em minha vida.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO GERAL .....	i
GENERAL ABSTRACT .....	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO 2.....	38
RESUMO.....	38
SUMMARY .....	39
INTRODUÇÃO .....	40
MATERIAL E MÉTODOS .....	42
Caracterização da área e do solo de “landfarming” .....	42
Coleta de solo rizosférico e raiz.....	42
Avaliação de teores de HAPs no solo .....	43
Avaliação da densidade microbiana.....	44
Atividade heterotrófica do solo.....	44
Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares .....	44
Análise dos dados .....	45
Análise da estrutura da comunidade microbiana do solo.....	45
Seqüenciamento de DNA de colônias bacterianas.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
Teores de HAPs no solo.....	48
Densidade microbiana.....	49
Atividade heterotrófica do solo.....	52
Ocorrência de FMAs em solo e raiz .....	55
Estrutura da comunidade microbiana do solo .....	58
Seqüenciamento do DNA de colônias bacterianas .....	63
CONCLUSÕES .....	65
LITERATURA CITADA .....	66



## RESUMO GERAL

NAKATANI, André Shigueyoshi. **Microbiota rizosférica e micorriza arbuscular em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos**. 2007. 74p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

Na industrialização do petróleo é gerado um grande volume de diferentes resíduos tóxicos que causam impactos ambientais, necessitando de tratamento antes da sua disposição final no ambiente. Esses resíduos são geralmente tratados por “landfarming”. Mas essa técnica tem sucesso relativo, já que não remove completamente todos os compostos, especialmente os mais recalcitrantes e tóxicos. O emprego de plantas, acoplado ao “landfarming”, pode aumentar a eficiência da remediação. Esse benefício é atribuído ao efeito rizosférico que estimula a microbiota degradadora e os processos bioquímicos responsáveis pela dissipação do contaminante no solo. No entanto, as alterações que as plantas causam sobre os processos bioquímicos desses solos e sobre os microrganismos degradadores e simbioses, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), precisam ser melhor compreendidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a densidade, a atividade e a estrutura da comunidade heterotrófica, e a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de espécies vegetais espontâneas de ocorrência mais frequente (*Bidens pilosa*, *Cyperus* sp., *Eclipta alba* e *Eleusine indica*) em solo de “landfarming” de resíduo petroquímico. A densidade microbiana foi estimulada pelas plantas. Nos solos rizosféricos, foram observadas maiores contagens (em média 10 vezes maior) de bactérias totais e degradadoras de antraceno, em relação aos tratamentos sem as plantas. Já para a densidade de fungos totais e degradadores de antraceno, o efeito estimulante dessa magnitude foi observado apenas em certas espécies. O estímulo foi diferenciado entre as espécies sendo que *Bidens pilosa* e *Eleusine indica* foram as que apresentaram o maior estímulo à densidade microbiana. Os actinomicetos totais apresentaram altas contagens, independentemente da presença das plantas. Quando comparada às demais espécies, verificou-se baixa densidade microbiana na rizosfera da *Brachiaria decumbens*. A presença de plantas teve pouca influência sobre a atividade heterotrófica do solo avaliada por meio da hidrólise do diacetato de fluoresceína, enquanto a atividade da lipase foi ligeiramente maior nos solos com planta. A concentração de HAPs extraída do solo foi maior no solo com planta que

---

\* Comitê de Orientação: José Oswaldo Siqueira – UFLA (Orientador), Cláudio R.F.S. Soares – UFLA (Co-orientador).

naquele sem o crescimento destas. Observou-se a ocorrência de FMAs em todas as plantas estudadas, sendo a colonização elevada (maior que 40%), exceto em *Cyperus* sp.. A densidade de esporos foi favorecida pelas plantas, especialmente pela *B. decumbens*, que apresentou mais de 4.000 esporos 50 mL solo<sup>-1</sup>. Foram identificadas quatro espécies fúngicas: *Acaulospora morrowiae*, *Glomus intraradices*, *Paraglomus occultum* e *Archaeospora trappei*. Como este solo apresenta um longo histórico de uso em “landfarming” e elevada carga de HAPs de petróleo, este resultado indica que esses fungos são adaptados a altas concentrações desses compostos. A análise de DGGE revelou a existência de diferentes comunidades bacterianas nos diferentes tratamentos. Nos solos rizosféricos, foram encontrados menores números de amplicons e alteração nas populações dominantes. O sequenciamento parcial do 16S rDNA de isolados de bactérias que cresceram em meio com antraceno permitiu a identificação de seis gêneros: *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Fulvimonas*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas* e *Paracoccus*. Dos gêneros identificados, quatro são de actinomicetos, o que sugere a grande importância destes na degradação desses compostos no solo. Entre esses gêneros, apenas *Nocardioides* e *Cellulomonas* já foram relatados em solos brasileiros contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. O isolamento e a identificação dos microrganismos capazes de degradar os HAPs são importantes para estudos adicionais sobre a degradação destes poluentes no solo. Os resultados deste estudo indicam que a presença de plantas modifica as características microbiológicas do solo de “landfarming” de resíduo petroquímico, favorecendo a existência de populações microbianas mais adaptadas aos compostos tóxicos presente no solo.

## GENERAL ABSTRACT

NAKATANI, André Shigueyoshi. **Rhizospheric microorganisms and arbuscular mycorrhiza in soil from a petrochemical waste landfarming system.** 2007, 74p. Dissertation (Master degree in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

In the petroleum industrialization a great volume of different toxic residues is generated. Because of these waste environmental hazards they need to be adequately treated before final disposition in the environment. These wastes are usually treated by landfarming systems, but this technique has only relative success, since it doesn't completely remove all components especially those with high recalcitrancy and toxicity. It has been suggested that the use of plants coupled with landfarming can enhance the efficiency of the remediation process, as a result of the rhizospheric effects that stimulate degrader microorganisms and biochemical processes responsible for the dissipation of contaminants in soil. Plants effects on soil biochemical processes, microbial degraders and the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) need to be better studied. The aim of this study was to evaluate microbial density, activity and community structure, and occurrence of AMF in the rhizosphere of plants with frequent spontaneous occurrence (*Bidens pilosa*, *Cyperus* sp., *Eclipta alba* e *Eleusine indica*) in a landfarming soil for petrochemical waste treatment. Microbial density was stimulated by the presence of plants. In rhizospheric soils larger countings were observed (average 10 times larger) of total and anthracene degrader bacteria in relation to treatments without plants. Whereas density of total and anthracene degrader fungi plant stimulating effects were not generalized as found for bacteria. Plants effects were differentiated among species. *Bidens pilosa* and *Eleusine indica* were the most stimulatory ones. Soil actinomycetes exhibited high countings in all treatments independently of plants presence. When compared to other species, *Brachiaria decumbens* showed low microbial density in the rhizosphere. Plants had little influence on soil heterotrophic activity as evaluated by the fluorescein diacetate hydrolysis while the lipase activity was lightly higher in the soils with plants. The total polycyclic aromatic hydrocarbon concentration in soil was slightly higher in soil with plants. The occurrence of AMF was observed in all studied plants, being the colonization rates pretty high (greater than 40%), except in *Cyperus* sp.. The spore density was enhanced by plants, especially in *B. decumbens*, in which

---

\* Guidance Committee: José Oswaldo Siqueira - UFLA (Advisor), Cláudio R.F.S. Soares – UFLA (Co-advisor)

4.738 spores 50 mL soil<sup>-1</sup> were found. Four AMF species were identified in this soil: *Acaulospora morrowiae*, *Glomus intraradices*, *Paraglomus occultum* e *Archaeospora trappei*. Considering this soil has a long history of landfarming with a heavy load of petroleum wastes, these AMF are adapted to high concentrations of petroleum pollutants. The DGGE analysis revealed existence of different bacterial communities in different treatments. It was found lower numbers of amplicons in rhizospheric soils and alteration in the dominant populations in the rhizosphere soil. The 16S rDNA partial sequencing analysis of bacterial isolates that grew in medium with anthracene allowed the identification of six different genera: *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Fulvimonas*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas* e *Paracoccus*. Four the identified genera belong to the actinomycetes. This suggests a great importance of this group of bacteria in the degradation of those compounds in soil. Among these genera, only *Nocardioides* and *Cellulomonas*, were already reported to be found in soils contaminated with petroleum hydrocarbons in Brazil. The isolation and identification of microorganisms capable to degrade PAHs are important for additional studies concerning degradation of these pollutants in soil. The results of this study indicate that plants modifies microbiological characteristics of petroleum wast landfarming soil favoring microbial populations more adapted to toxic compounds present in soil.

## **CAPÍTULO 1**

### **1 INTRODUÇÃO**

Atualmente, os combustíveis de origem fóssil representam a principal fonte energética do mundo, propiciando o desenvolvimento industrial e o avanço tecnológico, gerando produtos que permitem uma melhor qualidade de vida da sociedade. Por isso, o setor petroquímico é um segmento fundamental para a economia mundial. No entanto, todo esse processo de desenvolvimento, juntamente com o crescimento demográfico, tem intensificado as atividades industriais, causando o agravamento da contaminação dos solos.

A industrialização do petróleo é uma atividade potencialmente poluidora do ambiente, pois, durante o processo de refino do óleo cru, são gerados grandes volumes de vários tipos de resíduos altamente nocivos. Se não forem adequadamente tratados, dispostos e monitorados, esses resíduos podem causar impactos negativos sobre os ecossistemas e seus componentes, como microrganismos, plantas e animais.

Os resíduos petroquímicos podem ser tratados ou remediados por uma série de técnicas físicas, químicas e biológicas. Como grande parte dos compostos orgânicos poluentes apresenta constituintes passíveis de biodegradação, técnicas de biorremediação têm grande potencial para esse tipo de contaminante. O “landfarming” é uma técnica de biorremediação que é bastante utilizada, com relativo sucesso no tratamento de resíduos de petróleo.

A microbiota heterotrófica do solo é responsável pela biodegradação desses contaminantes no solo, cuja capacidade remediadora pode ser maximizada pelo ajuste das condições físico-químicas (água, aeração e nutrientes), e da adição de microrganismos selecionados com alta capacidade degradativa. No entanto, o poder limitado dessa técnica em eliminar compostos

mais recalcitrantes presente nos resíduos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e a possibilidade de expansão da contaminação para outras áreas por erosão hídrica e eólica, tornam necessários a utilização e o desenvolvimento de técnicas alternativas para superar tais restrições.

O emprego de plantas tem apresentado sucesso em remediar áreas contaminadas, por eliminar com maior eficiência os constituintes mais persistentes e aumentar a capacidade dissipadora do sistema quando associada a outras técnicas de remediação, sendo uma alternativa econômica e de grande aceitação pública. A eliminação de contaminantes orgânicos pelas plantas deve-se ao efeito rizosférico que modifica as características físicas, químicas e biológicas do solo, estimulando a comunidade microbiana degradadora e os processos bioquímicos responsáveis pela biodegradação dos contaminantes.

A contribuição de plantas para a remediação de áreas contaminadas com compostos orgânicos varia em função da espécie vegetal, das condições climáticas, das propriedades do solo e das características do contaminante, afetando de modo diferenciado a microbiota e os processos bioquímicos responsáveis pela degradação dos resíduos. Como a degradação microbiana representa o principal mecanismo de dissipação de contaminantes orgânicos no solo, se torna importante estudar como as diferentes espécies de plantas influenciam as características microbiológicas do solo, incluindo os microrganismos degradadores e os simbioses como os fungos micorrízicos arbusculares que melhoram o desenvolvimento de plantas em condições ambientais estressantes.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a densidade, a estrutura da comunidade e a atividade microbiana, além da ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de diferentes espécies vegetais de crescimento espontâneo em solo de “landfarming” de resíduo petroquímico.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Indústria petroquímica e a poluição do solo**

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos com alto conteúdo de energia, formado por transformações biogeoquímicas de grandes deposições fósseis no fundo de bacias sedimentares (Van Hamme et al., 2003). Os principais componentes do petróleo são hidrocarbonetos saturados, aromáticos, pequenas quantidades de compostos oxigenados, sulfurados, nitrogenados e traços de constituintes metálicos. A composição exata dessa mistura varia significativamente em função de sua localização geográfica e das condições físico-químicas e biológicas que o originaram (Crapez et al., 2002).

Em seu estado bruto, o petróleo tem poucas aplicações, servindo praticamente apenas como óleo combustível. Para que seu potencial energético seja aproveitado ao máximo, o petróleo passa por um processo de refino que consiste numa série de etapas físicas e químicas de fracionamento para a obtenção de seus derivados, produtos de grande interesse comercial. Atualmente, além de ser a principal fonte energética do mundo, o petróleo é componente básico de mais de 6.000 produtos. Por dia, são produzidos mais de 81 milhões de barris de petróleo em todo o mundo (BP, 2006); no Brasil, a produção está em torno de 1,85 milhões de barris diariamente (Petrobrás, 2006).

O processo de industrialização do petróleo gera uma grande quantidade de poluentes (Van Hamme et al., 2003), cujos processos envolvidos consomem grandes quantidades de água e de energia, produzem grandes quantidades de despejos líquidos, liberam diversos gases nocivos para a atmosfera e produzem resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição adequada no ambiente. Por isso, o refino do petróleo é uma atividade com grande potencial de degradação

do ambiente, podendo afetar o ar, a água e o solo e, conseqüentemente, todos os seres vivos que habitam esses ambientes (Mariano, 2001).

A composição, a toxicidade e as características dos resíduos petroquímicos dependem do processo que os geram, assim como o tipo de petróleo processado e dos derivados produzidos. Entre estes resíduos gerados, tratados e dispostos, estão: a lama dos separadores de óleo e dos flotores a ar, os sedimentos do fundo de tanques de armazenamento do óleo cru e derivados, as borras oleosas, as argilas de tratamento, os lodos biológicos, as lamas de limpeza dos trocadores de calor e das torres de refrigeração, além de sólidos emulsionados em óleo. Entre os principais constituintes desses resíduos estão elementos químicos altamente tóxicos, tais como arsênio, cádmio, cromo, chumbo, bário, mercúrio, selênio e prata, compostos orgânicos, como os bifenis policlorados, hidrocarbonetos halogenados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e compostos inorgânicos, como amônia e ácido sulfídrico (Sims & Sims, 1999).

No Brasil, existem 13 refinarias de petróleo, sendo gerado um volume muito grande de resíduos que necessita de tratamento adequado antes da sua disposição final, de forma a minimizar os seus impactos ambientais. O simples descarte ou a incineração desses resíduos, sem nenhum tratamento prévio, têm sérias conseqüências e representam riscos para o ecossistema e saúde humana (Baheri & Meyasami, 2001).

O solo é, geralmente, o destino final, de maneira acidental ou não, de grande variedade de compostos resultado de diversas atividades antrópicas, incluindo os produtos do desenvolvimento industrial e tecnológico, com destaque para a indústria petroquímica. Embora o setor industrial gere benefícios sociais e econômicos, geralmente, provoca sérias conseqüências ambientais (Accioly & Siqueira, 2000). O petróleo e seus derivados ocupam lugar de destaque entre os compostos orgânicos contaminantes do solo, devido ao grande



volume de produção, à industrialização, à geração de resíduos poluentes, ao transporte e aos usos diversos desses produtos no cotidiano. Segundo Gruiz & Kriston (1995), em escala global, cerca de 6 milhões de toneladas de resíduos de óleo são lançados no meio ambiente, anualmente.

A disposição inadequada ou a contaminação do solo por resíduos oriundos da atividade da exploração, transformação e uso de petróleo podem causar impactos sobre a biota do solo, eliminar muitos organismos benéficos que são responsáveis por processos importantes para a manutenção da qualidade e sustentabilidade do solo, como a ciclagem de nutrientes. Estudos têm demonstrado os efeitos negativos da contaminação por compostos de petróleo sobre a microbiota do solo (Franco et al., 2004; Nayar et al., 2005). Também existe a possibilidade do agravamento dos danos ambientais, devido a processos erosivos ocasionados pela chuva e pelo vento, promovendo a dispersão desses poluentes para áreas vizinhas e cursos d'água (Joner et al., 2001). Outro agravante da contaminação do solo é a possibilidade de infiltração do contaminante através deste, alcançando as águas subterrâneas.

Entre os constituintes contaminantes mais comuns do petróleo, um grupo tem chamado atenção: os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). São, na maioria, compostos não-voláteis, com dois ou mais anéis aromáticos condensados, tendem a ser lipofílicos e são fortemente adsorvidos a superfícies hidrofóbicas. São conhecidos mais de 100 HAPs, cujas principais fontes são o processamento do petróleo e a combustão incompleta de combustíveis fósseis. Seu destino, na natureza, é motivo de grande preocupação devido à alta persistência no ambiente e às características tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas de alguns deles (Netto et al., 2000).

Esses compostos estão relacionados a problemas funcionais no fígado, rim, pulmão, pele, olhos e distúrbios gastrointestinais (Samanta et al., 2002). Nos EUA, os HAPs estão classificados em sétimo lugar na lista de prioridade de

substâncias de risco para controle (ATSDR, 2006) e no estado de São Paulo, a CETESB (2006) identificou 695 áreas contaminadas com esses compostos.

O naftaleno é o HAP mais simples, enquanto o coroneno é bem mais complexo, possuindo sete anéis aromáticos. O comportamento e a persistência dos HAPs no ambiente são determinados por sua estrutura e peso molecular, composição, solubilidade, pressão de vapor e coeficiente de partição octanol-água. A alta persistência destes compostos deve-se à formação de densas nuvens de  $\pi$ -elétrons em ambos os lados das estruturas dos anéis, tornando-os resistentes ao ataque nucleofílico. Estes compostos também tendem a permanecer adsorvidos no interior de partículas orgânicas, ficando indisponíveis à degradação (Johnsen et al., 2005). A estrutura molecular dos HAPs determina também o potencial tóxico desses compostos; aqueles de peso molecular semelhante, mas estruturalmente diferentes, apresentam efeitos carcinogênicos e mutagênicos distintos aos organismos vivos (Pradhan et al., 1998).

## **2.2 Tratamento dos contaminantes**

Áreas contaminadas por compostos tóxicos ou resíduos que apresentem carga tóxica antes da sua disposição final devem ser remediadas ou tratadas para minimizar os impactos sobre os ecossistemas. Muitas tecnologias estão disponíveis, visando remover contaminantes do ambiente ou torná-los menos perigosos. A escolha de qual técnica utilizar é fundamental para o sucesso da remediação de um local e depende do tipo de contaminante, das características da área, da legislação ambiental, do uso final desejado para a área, dos custos e do tempo, constituindo-se numa etapa difícil, diante das características particulares de cada situação (Khan et al., 2004).

Atualmente, os resíduos petroquímicos ou áreas impactadas por esses compostos são tratados por uma ampla gama de tecnologias, abrangendo processos físicos, químicos e biológicos. Os tratamentos de resíduos sólidos

habitualmente utilizados pelas refinarias de petróleo são: reciclagem, incineração, lavagem de solo a vapor, lavagem de solo com produtos químicos, co-processamento em cimenteiras, fabricação de combustíveis alternativos, incorporação em artefatos de cerâmica e de cimento, disposição em aterros industriais, encapsulamento, “landfarming”, biopilha, dessorção térmica e plasma (Sauerbronn, 2002).

Os resíduos sólidos não-recicláveis podem ser dispostos em aterros industriais que necessitam de constante controle e monitoramento, porém o caráter tóxico do contaminante não é eliminado. Algumas técnicas convencionais de remediação apenas removem o contaminante para outro local, não destruindo-o, proporcionando riscos adicionais em todo o processo de escavação, transporte e manuseio e também expondo o novo local de disposição a riscos. Por essas razões, não têm grande aceitação pública, além de serem processos caros e com alto custo de manutenção. Outras tecnologias que eliminam ou diminuem a toxicidade dos contaminantes, apesar de ser efetiva, apresentam desvantagens, como, por exemplo, durante o processo de incineração dos resíduos, são liberados gases extremamente tóxicos. Além disso, também são métodos caros, devido à sua complexidade tecnológica (Vidali, 2001).

Dentre as várias técnicas, a biorremediação vem sendo amplamente testada e aplicada, com grande potencial de uso, e está conquistando espaço no mercado de tecnologias ambientais, por ser baseada em processos naturais, pelo seu custo relativamente baixo, por exigir baixa tecnologia, tendo grande aceitação pública (Accioly & Siqueira, 2000). Frequentemente, as situações em que se aplicam a biorremediação envolvem ambientes heterogêneos e multifásicos, tais como solos nos quais o contaminante está associado a partículas do solo, dissolvido na fase líquida e na fase gasosa. Por causa dessas complexidades, a possibilidade de destruir o contaminante ou torná-lo menos tóxico, de forma eficiente, depende de uma abordagem interdisciplinar,

envolvendo a microbiologia, engenharia, ecologia, geologia, bioquímica e fisiologia vegetal para criar condições favoráveis a biodegradação (Boopathy, 2000). Métodos biológicos de remediação de borras oleosas e solos contaminados com orgânicos, como “landfarming”, biopilhas, compostagem, bioventilação e bioreatores, já são bem documentados na literatura (Van Hamme et al., 2003).

As técnicas de biorremediação são baseadas na degradação microbiana e em reações bioquímicas, aproveitando o potencial fisiológico dos microrganismos, que vão de simples remoção de átomos à completa mineralização do contaminante (Accioly & Siqueira, 2000). Os microrganismos necessitam de fontes de carbono para o crescimento celular e fontes de energia para sustentar funções metabólicas requeridas para o crescimento. A ampla gama de substratos e metabólitos presentes em solos impactados com hidrocarbonetos fornecem ambiente para o desenvolvimento de uma comunidade microbiana bastante complexa, existindo grande variedade de microrganismos heterotróficos que possuem a capacidade de utilizar esses compostos como fonte de carbono e energia para o seu desenvolvimento (Van Hamme et al., 2003). A biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo por esses microrganismos representa um dos mecanismos primários pelos quais estes compostos são eliminados do ambiente.

São conhecidos cerca de 60 gêneros de bactérias e pelo menos 80 gêneros de fungos que contêm espécies capazes de degradar hidrocarbonetos e, de acordo com Prince & Drake (1999), essa diversidade pode ser muito maior. Exemplos de gêneros microbianos com espécies capazes de degradar estes compostos são apresentados na Tabela 1. Os hidrocarbonetos saturados e os aromáticos de baixo peso molecular são mais suscetíveis à degradação microbiana enquanto os hidrocarbonetos mais complexos, contendo ramificações e maior número de anéis aromáticos, são degradados por um

número menor de microrganismos e com uma taxa de degradação mais lenta (Cury, 2002). As técnicas de biorremediação têm particular potencial para o tratamento de resíduos ou remediação de áreas impactadas por compostos derivados de petróleo, visto que a maioria desses compostos é passível de biodegradação (Van Hamme et al., 2003).

**TABELA 1.** Alguns gêneros microbianos que apresentam espécies isoladas do solo com capacidade de degradar hidrocarbonetos (Adaptado de Frick et al., 1999).

Gênero (bactéria)	Hidrocarboneto degradado
<i>Acidovorax</i>	Fenantreno, antraceno
<i>Alcaligenes</i>	Fenantreno, fluoreno, fluoranteno
<i>Arthrobacter</i>	n-alcanos, benzeno, naftaleno, fenantreno
<i>Mycobacterium</i>	Fenantreno, pireno, benzo(a)pireno
<i>Nocardia</i>	Fenantreno
<i>Pseudomonas</i>	Fenantreno, fluoranteno, fluoreno, benzo(a)pireno
<i>Rhodococcus</i>	Pireno, benzo(a)pireno
<i>Sphingomonas</i>	Fenantreno, fluoranteno, antraceno
<i>Streptomyces</i>	Naftaleno, fenantreno
Gênero (fungos)	
<i>Cunninghamella</i>	Benzo(a)pireno
<i>Fusarium</i>	n-alcanos, benzeno, naftaleno, fenantreno
<i>Penicillium</i>	n-alcanos, benzeno, naftaleno, fenantreno
<i>Phanerochaete</i>	Benzo(a)pireno

O “landfarming” é uma técnica biológica de remediação sobre a superfície do solo, muito utilizada para o tratamento de resíduos da indústria petroquímica, devido à fácil implantação, ao custo relativamente baixo e à eficiência relativa em remover os contaminantes presentes no solo (Sims & Sims, 1999). Esta técnica consiste na aplicação e na incorporação do contaminante, em forma líquida ou sólida, ao solo, por meio de arações ou gradagens, com o ajuste das condições físico-químicas do solo (umidade, aeração, nutrientes) para maximizar a atividade da microbiota heterotrófica, criando-se, assim, uma camada reativa (zona de tratamento) que atua como um

biorreator natural para a biodegradação desses poluentes (Moreira & Siqueira, 2006). Organismos selecionados com alta capacidade degradativa podem ser adicionados para incrementar a taxa de degradação do contaminante (bioaugmentação). Dependendo da taxa de degradação do composto, os resíduos petroquímicos podem ser aplicados no local em intervalos regulares, o que ajuda a reabastecer o suprimento de hidrocarbonetos e, o mais importante, manter a atividade biológica de microrganismos degradadores (Khan et al., 2004).

Existem critérios que devem ser observados para a escolha de uma área apropriada para a implantação do “landfarming” para minimizar os riscos ambientais, como a topografia do solo, a localização em relação aos cursos d’água, o tipo e a profundidade do solo (Moreira & Siqueira, 2006). O sucesso de um programa de “landfarming” depende das características do solo (textura, matéria orgânica, pH, CTC), do resíduo (relação C/N, constituintes químicos), das condições climáticas (temperatura, umidade), do custo econômico (instalação, operação e manutenção) compatível com outros métodos de remediação e da presença de microrganismos capazes de permanecer ativos aos níveis de resíduos aplicados, já que a biodegradação microbiana compõe a base do tratamento do solo por essa técnica (Accioly & Siqueira, 2000).

O tratamento de resíduos petroquímicos por “landfarming” tem relativo sucesso em dissipar os compostos de petróleo. O processo de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo no solo apresenta duas fases claramente distintas. O primeiro estágio é rápido e, nele, a taxa de degradação dos hidrocarbonetos é máxima, com grande atividade microbiana e envolve a fração mais lábil, principalmente os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de baixo peso molecular. O segundo estágio é mais lento, pois as frações remanescentes são de hidrocarbonetos estruturalmente mais complexos e recalcitrantes, sendo menos acessíveis ao ataque microbiano, tornando o processo mais demorado. À medida que o tempo de contato entre o poluente e o solo aumenta, a biodisponibilidade

decrece, processo esse chamado de “envelhecimento”, o qual é controlado por processos como a sorção, ciclos de umedecimento e secagem, aprisionamento dentro de microporos ou na matéria orgânica (Reid et al., 2000), o que diminui a transferência de massa para microrganismos degradadores e, conseqüentemente, a taxa de biotransformação do contaminante (Boopathy, 2000).

Marin et al. (2005), estudando o tratamento de borras oleosas de refinaria por “landfarming” em condições semi-áridas na Espanha, observaram eliminação de 80% dos hidrocarbonetos em 11 meses. Mais da metade dessa degradação ocorreu nos dois primeiros meses do tratamento.

A utilização do “landfarming” encontra algumas limitações. As áreas empregadas estão sujeitas aos fatores climáticos, como chuva, vento e variações de temperatura, ocasionando problemas de erosão hídrica e eólica, que podem contribuir para a dispersão do poluente para áreas vizinhas (USEPA, 2006). Essa técnica apresenta eficiência limitada na remoção de contaminantes mais persistentes encontrados nos resíduos petroquímicos. Estudos com a aplicação do “landfarming” têm mostrado que HAPs mais recalcitrantes, hidrofóbicos e mais fortemente ligados a partículas do solo permanecem ou são removidos mais lentamente (Huang et al., 2004).

Atagana (2004) observou que, ao final de 10 meses de “landfarming” de solo com creosoto, os HAPs de mais de 4 anéis não foram totalmente removidos. O acúmulo de compostos mais recalcitrantes e produtos intermediários de degradação desses resíduos podem impactar negativamente a microbiota e os processos biológicos do solo, além de manter os riscos que a exposição e o contato de humanos, animais e plantas possam ter com esses compostos extremamente tóxicos. Diante das limitações da utilização do “landfarming” e o desenvolvimento de técnicas de tratamento de resíduos orgânicos tóxicos mais eficientes, econômicas e com menos distúrbio ao ambiente e a capacidade limitada em remover compostos mais recalcitrantes tornam necessários estudos

que busquem otimizar a exploração dessa técnica ou reabilitar e revegetar áreas ou células que já foram ou estão em processo de desativação.

### **2.3 Microbiologia de solos contaminados com compostos orgânicos derivados de petróleo**

A microbiota do solo é responsável, direta ou indiretamente, por transformações fundamentais nos ciclos biogeoquímicos, reciclando a matéria orgânica, degradando xenobióticos, fixando nitrogênio atmosférico, além de estar associada à formação e manutenção da estabilidade de agregados, entre outras funções que são fundamentais para manutenção da funcionalidade e sustentabilidade do solo e, conseqüentemente, das comunidades vegetais e animais que nele vivem (Lambais et al., 2005). Dentre os vários fatores que afetam a densidade, a diversidade e a atividade dos microrganismos do solo, como pH, água, aeração, nutrientes (relação C/N, C/P, C/S), temperatura e interações ecológicas com organismos do solo, estão as atividades antropogênicas que alteram as propriedades químicas e físicas do solo, como a adição de compostos ou elementos tóxicos, e que podem ter efeitos prejudiciais à microbiota. Alterações na estrutura ou nas atividades de comunidades microbianas podem ter efeitos significativos sobre a estabilidade e o funcionamento dos ecossistemas (McGrady-Steed et al., 1997). Os microrganismos do solo têm a capacidade de responder rapidamente a mudanças no ambiente do solo, derivadas de alterações no manejo e, por isso, podem ser importante ferramenta em estudos de avaliação da qualidade de solos impactados (Moreira & Siqueira, 2006).

A diversidade estrutural e funcional da biota do solo é importante para sua qualidade. Em um solo saudável, onde existe redundância funcional, o ecossistema irá se recuperar de um estresse, mesmo que parte da comunidade microbiana seja eliminada. Quanto maiores a redundância funcional e a



diversidade, mais rápido o ecossistema pode retornar às condições iniciais, após ter sido exposto a estresse ou distúrbio, ou seja, maior a sua resiliência (Tótola & Chaer, 2002). Dessa forma, a habilidade de um ecossistema de suportar distúrbios extremos pode depender, em parte, da sua biodiversidade e de interações destas com os componentes antropogênicos, tornando importante monitorar a diversidade como um indicador de mudança em resposta aos usos do solo e alterações ambientais (Kennedy & Smith, 1995). Diante desse fato, existe um grande interesse em estudar e monitorar os microrganismos presentes em ambientes contaminados, visando conhecer a sua capacidade biorremediadora (Daane et al., 2001). Além disso, o conhecimento dos recursos genéticos da microbiota do solo pode contribuir para a descoberta de microrganismos de interesse biotecnológico (Lambais et al., 2005).

A contaminação do solo pode conduzir a um decréscimo na diversidade microbiana, em termos de abundância de espécies ou alteração na estrutura dessa comunidade, devido à extinção de espécies não adaptadas ao estresse imposto, mas pode também ocasionar o enriquecimento de espécies particulares mais adaptadas e esse estresse (Atlas, 1984 citado por Cury, 2002).

Existem vários métodos que podem ser utilizados para avaliar o tipo e a duração dos efeitos dos contaminantes sobre os microrganismos ou para monitorar o progresso de técnicas de biorremediação de áreas contaminadas. Exemplos de alguns trabalhos que contemplaram os parâmetros microbiológicos de solos contaminados com compostos derivados de petróleo e seus principais resultados são apresentados na Tabela 2. Esses trabalhos demonstram que os impactos da contaminação do solo por esses compostos e o tipo de tratamento adotado promovem alterações marcantes nos atributos microbiológicos do solo, que são variáveis de acordo com as características particulares de cada situação e que podem refletir no sucesso da técnica de remediação adotada.

**TABELA 2.** Efeito dos contaminantes orgânicos e de técnicas de biorremediação sobre a microbiota do solo.

Descrição	Contaminante	Resultado da biorremediação	Avaliação microbiológica e principais resultados	Referência
7 solos artificialmente contaminados avaliados em vários intervalos	Óleo cru 2% (m/m)	Degradação de mais de 80% do óleo, em todos os solos, em 50 dias	<b>DGGE:</b> alteração da estrutura da comunidade com surgimento de populações dominantes no decorrer da contaminação. <b>Sequenciamento:</b> 9 e 18 gêneros bacterianos identificados a partir do DGGE e de cultivo em placa, respectivamente; ocorrência dependente do tipo de solo e contaminação.	Hamamura et al., 2006
2 tratamentos biológicos de solos artificialmente contaminados	Óleo diesel 10g kg <sup>-1</sup>	Degradação de 87%, no tratamento com esterco, em 100 dias	<b>Atividade enzimática:</b> atividade da desidrogenase e lipase estimuladas por óleo diesel (OD) e adição de esterco. β-glicosidase inibida durante o experimento. <b>Respiração basal do solo:</b> Estimulada pelos tratamentos	Riffaldi et al., 2006
Solo de área contaminada por derramamento de óleo diesel	Óleo diesel até cerca de 30g kg <sup>-1</sup>	Degradação de 48% do óleo diesel, em 30 dias	<b>Contagem em placas:</b> contaminação estimulou as bactérias totais e degradadoras. <b>Respiração basal do solo:</b> estimulada pela contaminação. <b>Biolog:</b> alteração do padrão de utilização de substrato no solo contaminado <b>DGGE:</b> maior diversidade microbiana no solo contaminado.	Maila et al., 2005
Solo de área contaminada, submetido a vários tratamentos	Alifáticos e HAPs	Surfactante e revolvimento do solo favoreceram a dissipação dos hidrocarbonetos	<b>C-biomassa microbiana:</b> favorecida no solo contaminado pelo surfactante (S) e revolvimento (R). <b>Respiração do solo :</b> inibida no solo contaminado. Respiração induzida por ácido maléico e glutamina no solo contaminado. <b>Atividade enzimática:</b> desidrogenase e arilfosfatase favorecidas no solo contaminado pelo S e R.	Dawson et al., 2007
Solo de indústria de coque, tratado com plantas e rizóbio	HAPs 10g kg <sup>-1</sup>	Trevo-branco inoculado com rizóbio e azevém aumentaram a dissipação dos HAPs em 20%, em 180 dias	<b>C-biomassa microbiana:</b> estimulada pela presença de plantas (3x controle), sem influência do rizóbio. <b>NMP:</b> degradadores de HAPs favorecidos pelas plantas e inoculação com rizóbio	Johnson et al., 2005
Bioestimulação com vermiculita em solo de deserto artificialmente contaminado	Óleo cru a 5%, 10% e 20% (m/m)	Degradação de 91% do óleo cru a 20%, com vermiculita, em 90 dias	<b>Contagem em placa:</b> densidade bacteriana reduzida no início, seguido de aumento acentuado, fungos foram favorecidos pelo óleo e pela vermiculita (2x controle)	Embar et al., 2006

Os hidrocarbonetos tendem a se alojar nas regiões hidrofóbicas entre as monocamadas fosfolipídicas da membrana citoplasmática, o que pode comprometer toda a funcionalidade e a viabilidade celular, pois altera a estrutura, a fluidez, a permeabilidade, a conformação das proteínas e a atividade das enzimas embebidas nela, podendo resultar no rompimento dessa barreira física, na menor transdução de energia efetiva, afeta o controle interno de pH e perda de metabólitos essenciais (De Bont, 1998). Em resposta aos distúrbios causados por esses compostos, as células microbianas promovem adaptações para manter um arranjo ótimo ou restabelecer a estabilidade da bicamada fosfolipídica, para diminuir a inserção de hidrocarbonetos na membrana e, dessa forma, reduzir a toxicidade para a célula. Alguns mecanismos utilizados por microrganismos para evitar os efeitos tóxicos e tolerar os hidrocarbonetos podem envolver a alteração da hidrofobicidade da superfície da célula, proteção por componentes lipopolissacarídeos hidrofílicos em bactérias gram-negativas, alteração na composição de lipídeo da membrana, diminuição da fluidez da membrana por isomerização *cis/trans* de fosfolipídeos, bombas de efluxo ativo de hidrocarbonetos aromáticos e quimiotaxia. (Weber & De Bont, 1996).

Os métodos dependentes de cultivo, como as contagens de células em meios de cultura com diferentes graus de seletividade, são métodos baratos, rápidos e fornecem informações sobre o componente heterotrófico, viável e ativo da microbiota, e que podem ser mantidos em culturas para estudos adicionais. No entanto, apresentam limitações de que apenas cerca de 1% dos microrganismos são cultiváveis, existe influência do meio nutritivo utilizado e o crescimento em placa favorece as populações de crescimento rápido e com alta capacidade de produção de esporos, dessa forma subestimando a densidade e diversidade dos microrganismos presentes no solo (Kirk et al., 2004).

Muratova et al. (2003) estudaram o efeito da contaminação artificial do solo por HAPs sobre os microrganismos em casa de vegetação, observando

resultados variados. Houve decréscimo na densidade de microrganismos heterotróficos totais, denitrificadores, solubilizadores de fosfato, oxidante de sulfato e celulolíticos, mas aumento dos microrganismos amonificadores e actinomicetos. Esses autores verificaram, ainda, que a introdução de alfafa e caniço (*Phragmites australis*) estimulou a densidade de quase todos os grupos microbianos avaliados e da população de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, sendo o efeito rizosférico mais pronunciado no tratamento com alfafa. O estímulo das plantas sobre microrganismos de grupos fisiológicos distintos, que foram inibidos pelos HAPs, é importante, já que estes estão envolvidos na transformação de elementos biogênicos, como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, sendo fundamentais para a manutenção da funcionalidade do solo.

As enzimas do solo catalisam todas as reações bioquímicas e são importantes na destoxificação de xenobióticos. A atividade de lipases, de desidrogenases, de catalases e de ureases têm sido muito utilizada para avaliar o efeito de contaminantes e monitorar a biorremediação de solos com compostos de petróleo. Relações entre atividade enzimática e a dissipação de hidrocarbonetos no solo foram relatadas por Riffaldi et al. (2006), observando que a atividade de  $\beta$ -glucosidase teve relação positiva e atividades de desidrogenase e lipase tiveram relações negativas com a concentração de óleo diesel em solos da Itália artificialmente contaminados. Estes autores concluíram que a atividade da lipase pela sua rapidez e simplicidade analítica é um bom indicador para monitorar a degradação de hidrocarbonetos no solo.

Diversos parâmetros microbiológicos foram avaliados por Labud et al. (2007) em dois tipos de solos contaminados por gasolina, diesel e óleo cru sob condições controladas por seis meses. Os autores verificaram efeito inibitório desses compostos sobre o carbono da biomassa microbiana, sobre a atividade da urease, fosfatase e  $\beta$ -glucosidase. A inibição foi menor no solo argiloso,

mostrando a importância que as características do solo desempenham no efeito dos contaminantes sobre a microbiota. Os autores verificaram, ainda, que o maior conteúdo de matéria orgânica e argila protegem os microrganismos contra os efeitos negativos dos hidrocarbonetos e que o decréscimo na atividade de hidrolases envolvidas no ciclo do N, P e C pode afetar a degradação de compostos orgânicos. Apesar do efeito negativo sobre a biomassa, a respiração do solo foi estimulada pelos contaminantes, constatando-se que esses microrganismos que resistiram a toxicidade do hidrocarboneto foram capazes de degradar a nova fonte de carbono.

É cada vez mais freqüente a análise da comunidade microbiana por métodos moleculares independentes de cultivo, como a Reação em cadeia da polimerase-Eletroforese em gel com gradiente desnaturante ou PCR-DGGE. As técnicas que utilizam o rDNA para a análise de comunidades microbianas dependem da amplificação inicial de um fragmento específico desse gene, a partir de DNA extraído diretamente de amostras ambientais, realizada por meio da PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos. Estas técnicas têm a vantagem de detectar além de comunidades microbianas cultiváveis, aquelas não-cultiváveis. Trata-se de um método rápido, reprodutível e várias amostras podem ser avaliadas ao mesmo tempo (Kirk et al., 2004). Porém, os resultados podem ser influenciados pelo PCR e a extração de DNA; múltiplas bandas poderão representar uma mesma espécie e uma banda pode representar mais de um genótipo microbiano (Lambais et al., 2005). Apesar das limitações, o PCR-DGGE de fragmentos de rDNA é um método adequado para análises comparativas de duas ou mais situações (Muyzer et al., 1993) sendo uma ferramenta poderosa para estudar alterações em comunidades ambientais (Watanabe & Baker, 2000).

Joynt et al. (2006), estudando a comunidade microbiana de 24 amostras de solos sob diferentes níveis de contaminação por metais e hidrocarbonetos de

petróleo, verificaram que, para a mesma amostra, as análises de DGGE e PFLA (análise de ácidos graxos de fosfolipídeos) foram semelhantes e que esses perfis se agruparam de acordo com a intensidade da contaminação, indicando redução da riqueza e alteração da comunidade microbiana nos solos mais severamente contaminados. Os PFLA que representam as bactérias gram-positivas e gram-negativas foram mais abundantes em locais menos contaminados, enquanto os PFLA de origem fúngica foram mais abundantes em solos mais contaminados, indicando a importância que esses microrganismos possuem para a degradação dos contaminantes nesse local. Os autores verificaram também que apesar da contaminação, os solos apresentaram microbiota bastante diversa filogeneticamente, representada por bactérias de várias divisões pertencentes a  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -Proteobacteria e bactérias com alto e baixo conteúdo de G+C, demonstrando a existência de uma ampla diversidade de microrganismos tolerantes à contaminação e que precisam de estudos adicionais sobre sua habilidade degradativa.

Apesar de as ferramentas moleculares atuais estarem contribuindo imensamente para estudos de comunidade microbianas no ambiente, as técnicas tradicionais de enriquecimento e cultivo são também essenciais para o conhecimento das capacidades metabólicas e das características fenotípicas dos microrganismos. Torna-se então necessária uma abordagem por meio de vários enfoques (polifásica), para se chegar o mais próximo possível do quadro real de um ambiente (Muyzer & Smalla, 1998).

#### **2.4 Efeitos da presença de plantas na dissipação de contaminantes orgânicos**

O emprego de plantas e sua microbiota associada, com a finalidade de remover, conter ou tornar os compostos inofensivos ao ambiente é conhecido como fitorremediação (Cunningham et al., 1996). Esta técnica tem se mostrado eficiente em remediar áreas ou solos impactados com compostos de petróleo

(Gunther et al., 1996, Muratova et al., 2003, Kaimi et al., 2006). Além de ser uma técnica relativamente econômica, causa distúrbio mínimo ao ambiente, melhora a estrutura e fertilidade do solo, além de existir a possibilidade de revegetar áreas contaminadas, antes expostas à ação erosiva da água e do vento, evitando a contaminação de áreas próximas.

O emprego de plantas, associado a outras técnicas, pode aumentar a capacidade remediadora do sistema, acelerando o processo e aumentando a eficiência de remoção de compostos mais recalcitrantes, como os HAPs com mais de quatro anéis aromáticos. Huang et al. (2004) constataram a capacidade da gramínea *Festuca arundinacea* em aumentar a eficiência da técnica de “landfarming” de resíduos de creosoto em, aproximadamente, 50%. A combinação de técnicas de remediação para misturas complexas de contaminantes pode superar as limitações de cada técnica, quando aplicadas isoladamente, permitindo resultados mais eficazes e rápidos. A utilização de plantas para fins de remediação também melhora a eficiência na remoção de compostos de grande potencial tóxico e carcinogênico, como os HAPs de alto peso molecular. Pradhan et al. (1998) verificaram que a alfafa e “switch grass” (*Panicum virgatum*) reduziram em torno de 30% a concentração inicial de 50 mg kg<sup>-1</sup> dos HAPs carcinogênicos, enquanto, no controle sem planta, não foi observada nenhuma redução.

Muitos estudos com emprego de plantas para remediação têm utilizado gramíneas, devido à sua grande importância na dissipação dos compostos orgânicos próximo ao sistema radicular fasciculado, além de serem mais competitivas no estabelecimento em solos sob condições desfavoráveis (Aprill & Sims, 1990). Além destas, vários estudos também envolvem espécies de plantas fixadoras de N, as quais fornecem N para o sistema, já que solos contaminados com altos níveis de compostos orgânicos são frequentemente deficientes em N, o que pode comprometer a biodegradação do contaminante.

Por isso, a introdução de plantas que forneçam esse nutriente pode ser benéfica ao sistema (Cunningham et al., 1996). A vegetação que ocorre naturalmente em solos impactados também é uma fonte potencial de espécies para estudos de remediação, pois estas espécies apresentam tolerância ao contaminante, o que garante a sua sobrevivência. Essa seleção é baseada em critérios como a densidade e a frequência populacional, a facilidade de propagação, sistema radicular favorável e o fato de a espécie ser nativa ou exótica (Merkl et al., 2004), além de possuir crescimento rápido, boa produção de biomassa vegetal e capacidade de acelerar a degradação do contaminante. Escalante-Espinosa et al. (2005) verificaram que *Cyperus laxus*, uma espécie nativa de área contaminada com hidrocarbonetos no México, promoveu remoção de 90% dos contaminantes, quando inoculado com um consórcio de 13 microrganismos degradadores.

Apesar de vários estudos verificarem a maior dissipação de compostos de petróleo na rizosfera, alguns têm encontrado resultados contraditórios, com maiores concentrações de hidrocarbonetos em solo rizosférico. Este fato foi constatado por Olexa et al (2000) que, após 180 dias de experimento, observaram que, nos tratamentos com azevém, a concentração de pireno foi maior; durante esse período, a concentração de pireno extraível aumentou ligeiramente. Resultados semelhantes foram encontrados por Liste e Prutz (2006) em solo com hidrocarbonetos de petróleo, em que a maioria dos tratamentos com plantas apresentou maior quantidade de hidrocarbonetos extraível.

Os HAPs são compostos hidrofóbicos que têm afinidade pela fração orgânica do solo e a maior extractabilidade destes contaminantes em solos com plantas pode ser explicada pela liberação de ácidos orgânicos, fenóis e fosfolipídeos surfactantes na rizosfera, os quais modificam as propriedades de adsorção física e química dessa região (Read et al., 2003). Além disso, o estímulo a populações microbianas produtoras de biosurfactantes pode contribuir



para aumentar a solubilidade e a extractabilidade de compostos contaminantes adsorvidos à matriz do solo (Mulligan, 2005). O aumento na solubilidade dos compostos orgânicos em solos contaminados é muito importante, visto que um dos fatores limitantes ao sucesso de uma técnica de bioremediação é a questão da biodisponibilidade destes ao ataque microbiano (Boopathy, 2000).

## **2.5 Efeito da presença de plantas sobre os microrganismos e processos biorremediadores**

A presença de plantas em solos contaminados modifica as características químicas, físicas e biológicas do solo, conhecido como efeito rizosférico, estimulando a microbiana heterotrófica e degradadora, além dos processos bioquímicos responsáveis pela dissipação do contaminante (Cunningham et al., 1996). Isso pode levar a um aumento e à aceleração da dissipação de compostos orgânicos contaminantes no solo. O aumento da densidade e atividade microbiana e modificação da comunidade microbiana na rizosfera devem-se à produção de secreções e exsudatos orgânicos solúveis prontamente utilizáveis pelos organismos (Daane et al., 2001), como fenóis, ácidos orgânicos, álcoois e proteínas (Alkorta & Garbisu, 2001). Existem também moléculas liberadas pelas raízes que se assemelham quimicamente a alguns contaminantes, podendo ser usadas como co-substrato e estimulando microrganismos degradadores (Fletcher & Hedge, 1995). Na rizosfera, são produzidas também mucilagens que auxiliam na agregação e na estabilidade dos agregados, influenciando diretamente a microbiota (Moreira & Siqueira, 2006). A degradação de compostos orgânicos também pode ser causada pela ação direta de enzimas derivadas das raízes (lacases, desalogenases, nitroreduases, nitrilases e peroxidases) e por diversas ações indiretas, como melhor aeração e aumento da porosidade do solo, em função da distribuição das raízes (Susarla et al., 2002).

Os efeitos sobre os parâmetros microbiológicos decorrentes da presença de plantas em solos impactados com compostos orgânicos variam em função das espécies e das variedades vegetais (Siciliano et al., 2003), das condições ambientais e das propriedades do solo (Robson et al., 2003) e das características físico-químicas do contaminante (Binet et al., 2000a). Todos esses fatores provocam efeitos diferenciados sobre a comunidade microbiana rizosférica (densidade, atividade e diversidade) e, conseqüentemente, sobre sua capacidade degradativa.

A estrutura da comunidade microbiana rizosférica é formada por grupos com diferentes tipos de metabolismo e respostas adaptativas às variações das condições ambientais (Daane et al., 2001). A capacidade em degradar contaminantes é resultado das performances de numerosos grupos microbianos, por isso é importante conhecer a estrutura das comunidades microbianas autóctones e seu potencial degradativo, quando se pretende avaliar a estratégia e o resultado de uma técnica de biorremediação (Wünsche, 1995).

Kirk et al. (2005) estudaram, por meio de vários métodos, a forma como diferentes espécies de plantas (alfafa e azevém) influenciaram a microbiota de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. Os autores verificaram que a presença de plantas aumentou a densidade de bactérias totais e degradadoras; após sete semanas o padrão de utilização de fontes de carbono começou a alterar e a estrutura da comunidade microbiana foi distinta entre os tratamentos com e sem plantas, indicando uma modificação na comunidade bacteriana dos solos rizosféricos.

O efeito da contaminação artificial do solo com diesel e a presença de alfafa sobre os microrganismos do solo foi estudado por Kim et al. (2006). Após sete semanas estes autores verificaram que o diesel e alfafa favoreceram a atividade e alteraram a estrutura da comunidade microbiana nesse solo; o diesel reduziu a densidade de bactérias totais e degradadoras, mas a presença de

plantas teve efeito positivo sobre a contagem dos microrganismos. Os resultados desse trabalho mostraram que as características microbiológicas do solo foram modificadas de acordo com o tratamento utilizado. A estrutura da comunidade e as populações microbianas dominantes entre o solo não contaminado, solo contaminado com diesel e solo contaminado com diesel na presença de alfafa foram diferentes.

Estudos em áreas contaminadas por compostos orgânicos que visem avaliar a competência remediadora da diversidade microbiana presente são importantes. Com o advento de tecnologias moleculares modernas tem sido possível isolar e identificar microrganismos com alta capacidade em degradar compostos de petróleo (Brito et al., 2006). Jussila et al. (2006) estudaram a diversidade genética por meio do seqüenciamento parcial do 16S rDNA de bactérias cultiváveis na rizosfera de uma leguminosa forrageira (*Galega orientalis*) introduzida em solos de 20 anos de “landfarming” de resíduo de óleo de refinaria. Estes autores encontraram uma ampla diversidade filogenética bacteriana rizoférica no solo contaminado, com 11 gêneros distribuídos entre 5 linhagens principais do domínio Bacteria (gram-positivas com alto e baixo G+C,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Proteobacteria), com predominância das gram-positivas. No entanto, entre as bactérias degradadoras de tolueno, que representaram 20% dos 50 isolados tolerantes a hidrocarboneto estudados, as mais eficientes pertenciam a  $\gamma$ -Proteobacteria. A identificação de microrganismos degradadores é importante para estudos sobre técnicas de biorremediação de compostos orgânicos no solo, como a bioaumentação.

Os resultados de todos esses estudos mostram que a rizosfera é um ambiente diferenciado, apresentando atividade, densidade e diversidade microbiana bastante distintas de regiões fora da zona de influência da raiz e que deve ser melhor compreendido para que a partir desse conhecimento possam ser

desenvolvidas estratégias de sucesso na revegetação e recuperação de áreas impactadas por compostos derivados de petróleo.

Dentre os microrganismos da rizosfera, destacam-se aqueles que formam simbioses mutualistas com as raízes como os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Estes, além de favorecer o desenvolvimento das plantas hospedeiras, podem aumentar a tolerância de plantas a condições ambientais desfavoráveis (Siqueira et al., 1994). Por meio dessa simbiose, o fungo promove uma maior absorção de água e nutrientes, principalmente os de baixa mobilidade no solo, como o P, Cu e Zn, proporcionando um melhor balanço nutricional da planta, favorecendo, assim, o crescimento vegetal em situações de estresse (Gaspar et al., 2002). Como a micorrização constitui o estado natural da maioria das plantas, sendo as não-micorrízicas uma exceção, esta simbiose é de grande interesse na revegetação e recuperação de áreas contaminadas. Vários estudos têm demonstrado os benefícios dos FMAs para as plantas em áreas ou solos sob diversos tipos de impactos, como compostos orgânicos (Binet et al., 2000, Siqueira et al., 1991), radionuclídeos (Chen et al., 2005) e metais pesados (Klauber-Filho et al., 2005).

Apesar dos efeitos negativos que os compostos orgânicos podem ter sobre os FMAs, como resultado indireto da redução do crescimento das raízes das plantas (Verdin et al., 2006) ou pela diminuição da transferência de fotossintatos da planta para o fungo, além de efeitos tóxicos dos metabólitos intermediários da degradação de hidrocarbonetos aromáticos (Gaspar et al., 2002), espécies de FMAs tolerantes a esses compostos têm sido identificadas em solos afetados por contaminantes orgânicos (Cabello, 1997; Paula et al. 2006). Os FMAs podem contribuir para diminuir a toxicidade de contaminantes sobre as plantas e aumentar a sobrevivência destas (Binet et al. 2000) e também melhorar o desenvolvimento vegetal em solos contaminados (Cabello, 1999). A presença de FMAs nas raízes pode contribuir para aumentar a dissipação de

contaminantes orgânicos no solo (Liu et al., 2004; Volante et al., 2005) o que é atribuído a efeitos indiretos dos FMAs, como alteração na expressão de enzimas oxiredutases pelas plantas e microrganismos responsáveis pela degradação de HAPs (Criquet et al., 2000), estímulo a populações microbianas específicas na micorrizosfera (Joner et al., 2001) ou por absorção e acúmulo de hidrocarbonetos em hifas e esporos (Gaspar et al., 2002; Verdín et al., 2006).

A ocorrência de FMAs em áreas contaminadas é importante para a sobrevivência de muitas plantas em situações de competição natural, podendo promover efeitos positivos sobre a planta hospedeira, além de indicar certo grau de tolerância desses fungos aos compostos tóxicos dos contaminantes. Isso foi constatado por Cabello (1997) em áreas contaminadas com hidrocarbonetos na Argentina e na Alemanha. Esta autora constatou que as taxas de colonização radicular ficaram em torno de 60%, em plantas de ocorrência natural, em ambos os locais, com grande quantidade de vesículas nas raízes, indicando que as plantas estavam crescendo numa condição estressante. Foi encontrada alta densidade de propágulos infectivos nesses solos poluídos, sugerindo que o status micorrízico das plantas crescendo nesses solos é dependente do nível de propágulos de FMAs. O mesmo estudo também revelou a baixa diversidade de FMAs em solos contaminados com compostos de petróleo, tendo sido identificadas duas espécies em solo argentino (*Glomus aggregatum* e *Gigaspora* sp.) e apenas uma em solo alemão (*Glomus mosseae*). Em outro estudo, Cabello (2001) isolou e identificou *Glomus tortuosum* colonizando raízes de uma gramínea (*Cynodon dactylon*), em solos severamente poluídos com hidrocarbonetos na Argentina (18,5% de hidrocarbonetos alifáticos e HAPs).

Olexa et al. (2000) verificaram que, mesmo sob o impacto de agentes tóxicos, como hidrocarbonetos derivados de petróleo, os FMAs nativos do solo podem ser eficientes em colonizar as plantas. Os autores observaram que, apesar da adição de 500mg kg<sup>-1</sup> de pireno, os FMAs nativos do solo foram capazes de

colonizar a raízes de azevém, apresentando maiores valores nos tratamentos de baixa fertilidade, alcançando taxas de colonização em torno de 60% no solo arenoso e 80% em solo argiloso. Stahl & Williams (1986), ao estudarem o efeito da aplicação de água de processamento de óleo de xisto ao solo, cuja composição apresenta HAPs, também verificaram a ocorrência de FMAs nativos no solo após 4 anos de aplicação desse resíduo em várias proporções. Estes autores encontraram quatro espécies de FMAs: *Entrophospora infrequens*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus microrcarpum* e *Glomus mosseae*. A aplicação do resíduo reduziu a esporulação dos FMAs no solo, enquanto, nos controles, os valores ficaram em torno de 150 esporos 50g solo<sup>-1</sup>. Os solos com resíduos apresentaram metade da contagem de esporos; mesmo resultado foi observado para a infecção das raízes onde os solos sob aplicação do resíduo apresentaram taxas de colonização em gramíneas (*Oryzopsis hymenoides*) variando de 36% a 64% contra 90% do solo não contaminado. Segundo esses autores, os compostos presentes nesse resíduo, como fenóis, hidrocarbonetos n-heterocíclicos e HAPs, podem ser responsáveis pelos efeitos inibitórios sobre os FMAs.

No Brasil, existem poucos estudos de FMAs em solos com compostos orgânicos derivados de petróleo. Paula et al. (2006), analisando o solo de uma área de “landfarming” de resíduos petroquímicos da Bahia, encontraram baixos valores de propágulos de FMAs o que foi atribuído ao constante revolvimento do solo, o que dificulta o estabelecimento de vegetação. Apesar disso, os FMAs encontrados foram eficientes em colonizar plantas introduzidas com taxas de colonização em torno de 40% para sorgo, capim-elefante e mucuna-preta, 60% para braquiária brizanta, alfafa e kuzdu tropical e até 39% em espécies de crescimento espontâneo. Estes resultados indicam a possibilidade de estudos relacionados à eficiência e ao manejo de FMAs indígenas em estratégias de revegetação dessas áreas.

Espécies de FMAs tolerantes a poluentes orgânicos podem ser de grande relevância, diante da possibilidade de esses isolados serem eficientes em promover o crescimento vegetal em solos contaminados, de modo a contribuir para o estabelecimento da vegetação nesses solos. Cabello (1999) constatou que FMAs isolados de área poluída com derivado de petróleo (*Glomus geosporum* e *Glomus deserticola*) proporcionaram melhor resposta de crescimento e absorção de nutrientes para alfafa que FMAs de área não contaminada. Por essa razão, espécies de fungos micorrízicos tolerantes a hidrocarbonetos devem ser consideradas em programas de revegetação ou recuperação de áreas impactadas por esses compostos.

A utilização de plantas e a interação entre microrganismos degradadores e simbiontes podem ser as melhores estratégias para melhorar o crescimento e a sobrevivência de mudas em substratos contaminados com hidrocarbonetos, aumentando a capacidade remediadora das plantas (Huang et al., 2004) e fornecendo uma importante ferramenta biotecnológica para processos de biorremediação.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000, v. 1, p. 299-351.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C. Phytoremediation of organic contaminants in soils. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 79, n. 3, p. 273-276, Sept. 2001.
- APRILL, W.; SIMS, R. C. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 20, n. 1/2, p. 253-265, 1990.
- ATAGANA, H. I. Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 3, p. 510-520, 2004.
- ATSDR – **Agency for toxic substance and disease registry**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>>. Acesso em 21 dez. 2006.
- BAHERI, H.; MEYSAMI, P. Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil. **Journal Hazardous Materials B**, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 279-286, Jan. 2001.
- BINET, P. H.; PORTAL, J. M.; LEYVAL, C. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 227, n. 1/2, p. 207-213, 2000.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies, **Bioresource Technology**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 63-67, Aug. 2000.
- BP – **British Petroleum. Statistical Review of World Energy 2006**. Disponível em: <<http://www.bp.com>>. Acesso em: 23 dez. 2006.
- BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GÕNI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M. A. C.; WASSERMAN, J. C. A.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 157, n. 8, p. 752-762, Oct. 2006.



CABELLO, M. N. *Glomus tortuosum* (Glomales), an arbuscular-mycorrhizal fungus (AMF) isolated from hydrocarbon-polluted soils. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 73, n. 3/4, p. 513-520, 2001.

CABELLO, M. N. Effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated from hydrocarbon polluted soils. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 89-95, 1999.

CABELLO, M. N. Hydrocarbon pollution: its effects on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 233-236, Mar, 1997.

CETESB – **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**. Disponível em <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/relacao\\_areas.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp)>. Acesso em: 21 dez. 2006.

CHEN, B.; ZHU, Y. G.; ZHANG, X.; JAKOBSEN, I.; The influence of mycorrhiza on uranium and phosphorus uptake by barley plants from a field-contaminated soil. **Environmental Science & Pollution Research**, New York, v. 12, n. 6, p. 325-331, June 2005.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 179, p. 32-37, jan. 2002.

CRUQUET, S.; JONER, E.; LEGLIZE, P.; LEYVAL, C. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxyreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 22, n. 21, p. 1733-1737, Nov. 2000.

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, New York, v. 56, p. 55-114, 1996.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo**. 2002. 84 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

DAANE, L. L.; HARJONO, I.; ZYLSTRA, G. J.; HÄGGBLÖM, M. M. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2683-2691, June 2001.

DAWSON, J. J. C.; GODSIFFE, E. J.; THOMPSON, I. P.; RALEBITSO-SENIOR, T. K.; KILLHAM, K. S.; PATON, G. I. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 164-177, Jan. 2007.

DE BONT, J. A. M. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. **Trends Biotechnology**, New York, v. 16, p. 493-499, 1998.

EMBAR, K.; FORGACS, C.; SIVAN, A. The role of indigenous bacterial and fungal soil populations in the biodegradation of crude oil in a desert soil. **Biodegradation**, New York, v. 17, n. 4, p. 369-377, Aug. 2006.

ESCALANTE-ESPINOSA, E.; GALLEGOS-MARTÍNEZ, M. E.; FAVELATORRES, E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. **Chemosphere**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 405-413, Apr. 2005.

FLETCHER, J. S.; HEDGE, R. S. Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation. **Chemosphere**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 3000-3016, Aug. 1995.

FRANCO, I.; CONTIN, M.; BRAGATO, G.; DE NOBILI, M. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 121, n. 1/2, p. 17-30, July 2004.

FRICK, C. M.; GERMIDA, J. J.; FARRELL, R. E. **Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites.** Report prepared for the Petroleum Technology Alliance of Canada (PTAC) – Calgary, AB. 1999.

GASPAR, M. L.; CABELLO, M. N.; CAZAN, M. C.; POLLERO, R. J. Effect of phenanthrene and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots. **Mycorrhiza**, New York, v. 12, n. 2, p. 55-59, Apr. 2002.

GRUIZ, K.; KRISTON, E. In situ bioremediation of hydrocarbon in soil. **Journal of Soil Contamination**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 163-173, 1995.

GÜNTHER, T.; DORNBERGER, U.; FRITSCH, W. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 203-215, July 1996.

HAMAMURA, N.; OLSON, S. H.; WARD, D. M.; INSKEEP, W. P. Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 6316-6324, Sept. 2006.

HUANG, X. D.; EL-ALAWI, Y.; PENROSE, D. M.; GLICK, B. R.; GREENBERG, B. M. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 130, n. 3, p. 465-476, Aug. 2004.

JONER, E. J.; JOHANSEN, A.; LOIBNER, A. P.; DELA CRUZ, M. A.; SZOLAR, O. H. J.; PORTAL, J. M.; LEYVAL, C. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic hydrocarbons (PAH) in spiked soil. **Environmental Science Technology**, Washington, v. 35, n. 13, p. 2773-2777, July 2001.

JOHNSON, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 133, n. 1, p. 71-84, Jan. 2005.

JOHNSON, D. L.; ANDERSON, D. R.; MCGRATH, S. P. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 12, p. 2334-2336, Dec. 2005

JOYNT, J.; BISCHOFF, M.; TURCO, R.; KONOPKA, A.; NAKATSU, C. H. Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, n. 2, p. 209-219, Feb. 2006.

JUSSILA, M. M.; JURGENS, G.; LINDSTRÖM, K.; SUOMINEN, L. Genetic diversity of culturable bacteria in oil-contaminated rhizosphere of *Galega orientalis*. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 139, n. 2, p. 244-257, Jan. 2006.

KAIMI, E.; MUKAIDANI, T.; MIYOSHI, S.; TAMAKI, M. Ryegrass enhancement of biodegradation in soil-contaminated soil. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 1/2, p. 110-119, Jan. 2006.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, n. 1, p. 75-86, Mar. 1995

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, Londond, v. 71, n. 2, p. 95-122, June 2004.

KIM, J.; KANG, S. H.; MIN, K. A.; CHO, K. S.; LEE, I. S. Rhizosphere microbial activity during phytoremediation of diesel-contaminated soil. **Journal of Environmental Science and Health Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, Philadelphia, v. 41, n. 11, p. 2503-2516, Nov. 2006.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 169-188, Aug. 2004.

KIRK, J. L.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 133, n. 3, p. 455-465, Feb. 2005.

KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; SOARES, C. R. F. S.; SILVA, S. Ecologia, função e potencial de aplicações de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: TORRADO, P. V.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; DA SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J. B. N. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 85-144.

LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 66, p. 1863-1871, 2007.

LAMBAIS, M. R.; CURY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BÜLL, R. C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: TORRADO, P. V.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; DA SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J. B. N. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.

LISTE, H. H.; PRUTZ, I. Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 1411-1420, Apr. 2006.

LIU, S. L.; LUO, Y. M.; CAO, Z. H.; WU, L. H.; DING, K. Q.; CHRISTIE, P. Degradation of benzo(a)pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. **Environmental Geochemistry and Health**, Dordrecht, v. 26, n. 2/3, p. 285-293, June/Sept. 2004.

MCGRADY-STEED, J.; HARRIS, P. M.; MORIN, P. J. Biodiversity regulates ecosystem predictability. **Nature**, London, v. 390, n. 6656, p. 162-165, Nov. 1997.

MAILA, M. P.; RANDIMA, P.; SURRIDGE, K.; DRØNEN, K.; CLOETE, T. E. Evaluation of microbial diversity of different soil layers at a contaminated diesel site. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 39-44, Jan. 2005.

MARIANO, J. B. **Impactos ambientais do refino do petróleo**. 2001. 279 p. Tese (Mestrado em Ciências em Planejamento Energético) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MARIN, J. A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. **Environmental Research**, San Diego, 98, n. 2, p. 185-195, June 2005.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils in the tropics – Pre-selection of the plant species from eastern Venezuela. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Gotingen, v. 78, n. 3, p. 184-192, Dec. 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 133, n. 2, p. 183–198, Jan. 2005.

MURATOVA, A. Y.; TURKOVSKAYA, O. V.; HÜBNER, T.; KUSCHK, P. Studies of the efficacy of alfalfa and reed in the phytoremediation of hydrocarbon-polluted soil. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 39, n. 6, p. 599-605, 2003.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar. 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p. 127-141, Jan. 1998.

NAYAR, S.; GOH, B. P. L.; CHOU, L. M. Environmental impacts of diesel fuel on bacteria and phytoplankton in a tropical estuary assessed using *In Situ* mesocosms. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 14, n. 3, p. 397-412, Apr. 2005.

NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitrated derivatives (NHPAs) p. A review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 765-773, nov./dez. 2000.

OLEXA, T. J.; GENTRY, T. J.; HARTEL, P. G.; WOLF, D. C.; FUHRMANN, J. J.; REYNOLDS, C. M. Mycorrhizal colonization and microbial community structure in the rhizosphere of annual ryegrass grown in pyrene-amended soils. **International Journal of Phytoremediation**, Boca Raton, v. 2, n. 3, p. 213-231, 2000.

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

PETROBRAS – **Petróleo Brasileiro S/A**. Disponível em <[http://www2.petrobras.com.br/portugues/ads/ads\\_Petrobras.html](http://www2.petrobras.com.br/portugues/ads/ads_Petrobras.html)>. Acesso em: 23 dez. 2006.

PRADHAN, S. P.; CONRAD, J. R.; PATEREK, J. R.; SRIVASTAVA, V. J. Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. **Journal of Soil Contamination**, Boca Raton, v. 7, n. 4, p. 467-480, 1998.

PRINCE, R. C.; DRAKE, E. N. Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: ADRIANO, D. C.; BOLLAG, J. -M.; FRANKBERGER JR.; W. T.; SIMS, R. C. (Ed.). **Bioremediation of contaminated soils**. 1999. p. 89-110. (Agronomy, n. 37).

READ, D. B.; BENGOUGH, A. G.; GREGORY, P. J.; CRAWFORD, J. W.; ROBINSON, D.; SCRIMGEOUR, C. M.; YOUNG, I. M.; ZHANG, K.; ZHANG, X. Plant roots, release phospholipids surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, n. 2, p. 315-326, Feb. 2003.

REID, B. J.; JONES, K. C.; SEMPLE, K. T. Bioavailability of persistent organic pollutant in soils and sediments – a perspective on mechanisms, consequences and assessment. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 108, n. 1, p. 103-112, 2000.

RIFFALDI, R.; LEVI-MINZI, R.; CARDELLI, R.; PALUMBO, S.; SAVIOZZI, A. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 170, n. 1/4, p. 3-17, Feb. 2006.

ROBSON, D. B.; KNIGHT, J. D.; FARRELL, R. E.; GERMIDA, J. J. Ability of cold-tolerant plants to grow in hydrocarbon-contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, Boca Raton, v. 5, n. 2, p. 105-123, 2003.

SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**, London, v. 20, n. 6, p. 243-248, June 2002.

STAHL, P. T.; WILLIAMS, S. E. Oil shale process water affects activity of vesicular-arbuscular fungi and *Rhizobium* 4 years after application to soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 451-455, 1986.

SAUERBRONN, J. L. B. Gestão de resíduos sólidos na Petrobras. In: **Seminário de Resíduos de Resíduos Sólidos: Gestão, Tendências e Novas Tecnologias** - ADVB/SP, 2002. Disponível em <<http://www2.ciesp.org.br/bolsa/index2.htm>>. Acesso em: 01 nov. 2005.

SICILIANO, S. D.; GERMIDA, J. J.; BANKS, K.; GREER, C. W. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 483-489, June 2003.

SIMS, R.; SIMS, J. L. Landfarming of petroleum contaminated soils. In: ADRIANO, D. C.; BOLLAG, J. M.; FRANKBERGER JR., W. T.; SIMS, R. C. (Ed.). **Bioremediation of contaminated soils**. 1999. P. 767-781. (Agronomy, n. 37).

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. VA-mycorrhizae and mycorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 233-242, July 1991.

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

SUSARLA, S.; MEDINA, V. F.; McCUTCHEON, S. C. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 647-658, June 2002.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; DE BARROS, N. F.; DE MELLO, J. W.; DA COSTA, L. M. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v. 2, p. 195-276.

USEPA – **United States Environmental Protection Agency**, disponível em <<http://www.epa.gov/oust/cat/landfarm.htm>>. Acesso em 20 dez. 2006.

VAN HAMME, J. D. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 4, p. 503-549, Dec. 2003.

VERDIN, A.; LOUNÉS-HADJI SAHRAOUNI, A.; FONTAINE, J.; GRANDMOIGIN-FERJANI, A.; DURAND, R. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. **Mycorrhiza**, New York, v. 16, n. 6, p. 397-405, Sept. 2006.



VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, Triangle PK, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, July 2001.

VOLANTE, A.; LINGUA, G.; CESARO, P.; CRESTA, A.; PUPPO, M.; ARIATI, L.; BERTA, G. Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. **Mycorrhiza**, New York, v. 16, n. 1, p. 43-50, Dec. 2005.

WATANABE, K.; BAKER, P. W. Environmentally relevant microorganisms. **Journal of Bioscience & Bioengineering**, Osaka, v. 89, n. 1, p. 1-11, Jan. 2000.

WEBER, F. J.; DE BONT, J. A. M. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1286, n. 3, p. 225-245, Oct. 1996.

WÜNSCHE, L.; BRÜGGEMANN, L.; BABEL, W. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities p. An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 295-306, Aug. 1995.

## CAPÍTULO 2

### DENSIDADE, ATIVIDADE E ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA RIZOSFÉRICA E FUNGOS MICORRÍZICOS EM SOLO DE “LANDFARMING” DE RESÍDUOS PETROQUÍMICOS.

(Preparado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Ciência do Solo)

#### RESUMO

A presença de plantas estimula a microbiota, podendo contribuir para a remediação do solo. Assim avaliar a magnitude destes efeitos sobre os microrganismos heterotróficos do solo e simbioses radiculares como fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) é de grande interesse e pode ter relevância prática. No presente trabalho avaliaram-se a densidade, atividade e estrutura da comunidade microbiana e a ocorrência de FMAs na rizosfera de plantas de ocorrência espontânea em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos. As plantas estimularam a densidade microbiana total e degradadora, com contagens em torno de 10 vezes superiores ao encontrado no solo sem planta, destacando-se a *Bidens pilosa* e *Eclipta alba*. Entretanto estes efeitos estimulantes não foram verificados para a atividade heterotrófica do solo. A colonização micorrízica das raízes (em torno de 40%) e a densidades de esporos nos solos rizosféricos (entre 900 e 4800 esporos 50 mL solo<sup>-1</sup>) foi elevada, sendo máxima na *Brachiaria decumbens*. Foram identificadas quatro espécies de FMAs: *Acaulospora morrowiae*, *Glomus intraradices*, *Paraglomus occultum* e *Archaeospora trapei*. A análise de DGGE revelou que os solos rizosféricos apresentaram comunidade bacteriana diferente e com menor número de amplicons que solos sem plantas. Foram isolados e identificados seis gêneros de bactérias degradadoras de antraceno: *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Fulvimonas*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas* e *Paracoccus*, sendo quatro destes gêneros pertencentes aos actinomicetos. Os resultados deste estudo indicam que a presença de plantas modifica as características microbiológicas do solo de “landfarming” de resíduo petroquímico, favorecendo a existência de populações microbianas mais adaptadas aos compostos tóxicos presente no solo.

**Termos de indexação:** rizosfera, petróleo, microrganismos degradadores, enzimas do solo, micorrizas arbusculares, DGGE, seqüenciamento do 16S rDNA

## MICROBIAL DENSITY, ACTIVITY AND COMMUNITY STRUCTURE IN THE RHIZOSPHERE AND MYCORRHIZAL FUNGI IN A LANDFARMING SOIL OF PETROCHEMICAL WASTES

### SUMMARY

The presence of plants stimulates soil microbiota, and this may contribute to soil remediation. Thus to evaluate the magnitude of these effects on heterotrophic and root symbiotic microorganisms such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is of great interest and can have practical relevance. In the present study propagule density, microbial activity and community structure and the occurrence of AMF in the rhizosphere of plants with spontaneous occurrence in a "landfarming" soil of petrochemical wastes were evaluated. Microbial density was stimulated by the presence of plants. In rhizospheric soils larger countings were observed (average 10 times larger) of total and anthracene degrader microorganisms in relation to treatments without plants. *Bidens pilosa* and *Eleusine indica* were the most stimulatory plants. Plants had little influence on soil heterotrophic activity as evaluated by the fluorescein diacetate hydrolysis and the lipase activity. The occurrence of AMF was observed in all studied plants, being the colonization rates pretty high (greater than 40%), except in *Cyperus* sp.. The spore density was enhanced by plants, especially in *B. decumbens*, in which 4738 spores 50 mL soil<sup>-1</sup> were found. Four AMF species were identified in this soil: *Acaulospora morrowiae*, *Glomus intraradices*, *Paraglomus occultum* e *Archaeospora trappei*. The DGGE analysis revealed existence of different bacterial communities in different treatments. It was found lower numbers of amplicons in rhizospheric soils and alteration in the dominant populations in the rhizosphere soil. The 16S rDNA partial sequencing analysis of bacterial isolates grown in anthracene medium allowed the identification of six different genera: *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Fulvimonas*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas* e *Paracoccus*. Four the identified genera belong to the actinomycetes. The results of this study indicate that plants modifies microbiological characteristics of petroleum wast landfarming soil favoring microbial populations more adapted to toxic compounds present in soil.

**Keywords:** rhizosphere, petroleum wastes, degrader microorganisms, soil enzymes, arbuscular mycorrhiza, DGGE, 16S rDNA sequencing

## INTRODUÇÃO

O “landfarming” é uma técnica de biorremediação muito utilizada para o tratamento de resíduos da indústria petroquímica (Sims & Sims, 1999). No entanto, essa técnica não é eficiente em remover todos os contaminantes, especialmente os compostos mais recalcitrantes presentes nesses resíduos, necessitando de técnicas complementares para a sua total remoção (Atagana, 2004). Como muitos dos compostos recalcitrantes, como vários hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), são tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (Samanta et al., 2002), estes representam sérios riscos ao meio ambiente e à saúde pública.

Uma alternativa para aumentar a eficiência do “landfarming” é o emprego de plantas remediadoras, que podem facilitar a degradação destes contaminantes, contribuindo, assim, para aumentar a eficiência do tratamento de HAPs, pesticidas, solventes clorados e explosivos (Susarla et al., 2002), podendo contribuir para degradar certas frações mais resistentes e de elevado risco desses hidrocarbonetos (Pradhan et al., 1998). Esse efeito resulta em parte da presença de raízes que modificam as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, estimulando a comunidade microbiana degradadora (Cunningham et al., 1996) e os processos bioquímicos responsáveis pela degradação e dissipação dos contaminantes (Kirk et al., 2005). Apesar de não se empregar plantas em áreas de “landfarming” em operação, é comum a ocorrência de plantas espontâneas em células abandonadas ou em solos retirados de células biorremediadoras (Paula et al., 2006). A contribuição dessas plantas para a remediação varia em função das espécies e variedades vegetais (Siciliano et al., 2003), das condições ambientais e das propriedades do solo (Robson et al., 2003) e das características físico-químicas do contaminante (Binet et al., 2000a). O “landfarming” é empregado em várias indústrias, especialmente na indústria petroquímica, no entanto, existem poucos estudos sobre essa técnica no Brasil e, quando se

considera a possibilidade de acoplar o emprego de plantas ao “landfarming”, torna-se importante avaliar os efeitos destas sobre a microbiota e os processos relacionados à degradação.

Além do estímulo à comunidade heterotrófica do solo, a maioria das plantas forma associação simbiótica com fungos do solo, denominada micorriza. Existem evidências de que os fungos que formam as micorrizas arbusculares (FMAs) ocorrem em solos de áreas de “landfarming” para tratamentos de resíduos petroquímicos (Paula et al., 2006), apesar de compostos orgânicos derivados de petróleo poderem exercer efeitos inibitórios sobre estes fungos (Cabello, 1995). Essa simbiose pode ter efeito protetor sobre as plantas em solos contaminados (Binet et al., 2000b), melhorando o desenvolvimento de plantas e, assim, garantindo o estabelecimento de espécies vegetais nesses solos. Além destes benefícios, plantas micorrizadas também podem apresentar maior capacidade de remediação de hidrocarbonetos de petróleo no solo (Liu et al., 2004). Não há relatos sobre pesquisas com este enfoque no Brasil e, diante dos benefícios que as micorrizas proporcionam às plantas, principalmente em condições ambientais estressantes, torna-se importante avaliar a ocorrência de FMAs em solos de “landfarming” e em plantas estabelecidas nesses solos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a densidade, a estrutura da comunidade e a atividade microbiana, e a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera de diferentes espécies vegetais de crescimento, espontâneo em solo de “landfarming” de resíduo petroquímico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Caracterização da área e do solo de “landfarming”

O presente trabalho foi realizado em amostras de solo de células de “landfarming” para tratamento de rejeitos da indústria petroquímica na empresa Cetrel em Camaçari, BA, em uso a mais de 15 anos. Em janeiro e fevereiro de 2004, foram aplicadas 153 toneladas de borras oleosas de resíduos petroquímicos, em uma área de 3.000m<sup>2</sup>. Em abril de 2004, foram coletadas 8 amostras simples do solo das células, a uma profundidade de 0-20 cm, para compor uma amostra composta, e empregadas para o desenvolvimento de experimento em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. O solo pertence à classe textural arenosa (580, 310 e 110 g kg<sup>-1</sup>, de areia, silte e argila, respectivamente) e sua análise química é apresentada no Quadro 1.

Quadro 1. Características químicas do solo de célula de “landfarming” para tratamento de rejeitos da indústria petroquímica da empresa Cetrel em Camaçari, BA. Valores médios (Paula et al., 2006).

pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	CE <sub>e</sub>	P-rem
água	mg dm <sup>-3</sup>		-----cmolc dm <sup>-3</sup> -----				DS m <sup>-1</sup>		mg L <sup>-1</sup>			
6,8	80	53	217	7,5	0,8	0	1	9	9	10	9,4	41
V	m	ISNa	MO	N <sub>total</sub>	CO <sub>total</sub>	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S	
-----%-----		g kg <sup>-1</sup>		-----g kg <sup>-1</sup> -----		-----mg dm <sup>-3</sup> -----						
90	0	10	130	8	78	52	238	23	40	0,8	43	

H+Al = acidez potencial; SB = soma de bases trocáveis; t = CTC efetiva; T = CTC a pH 7,0; CE<sub>e</sub> = condutividade elétrica a 25°C; V = saturação por bases da CTC a pH 7,0; m = saturação por Al da CTC efetiva; ISNa = índice de saturação por Na.

### Coleta de solo rizosférico e raiz

O solo foi desagregado e peneirado em malha de 2 mm de diâmetro para uniformização e foi mantido em 45 vasos de 3 dm<sup>3</sup>. Esses vasos foram pré-

cultivados com espécies vegetais introduzidas e espontâneas, entre agosto e dezembro de 2004 (Paula et al., 2006), quando realizou-se a retirada de todas as plantas e a homogeneização deste solo. Permitiu-se o crescimento de plantas de ocorrência espontânea, no período de janeiro de 2005 a março de 2006, quando procedeu-se a coleta de solo, solo rizosférico e raízes para avaliação. Para isso plantas inteiras foram retiradas e o solo remanescente aderido às raízes foi considerado como solo rizosférico. As raízes foram colocadas dentro de sacos plásticos e agitadas manualmente, até a recuperação máxima do solo aderido a elas. Foram coletadas amostras de quatro espécies, de acordo com a ocorrência e frequência nos vasos: *Eleusine indica* (capim pé-de-galinha), *Bidens pilosa* (picão-preto), *Eclipta alba* (erva-de-botão), *Cyperus* sp (tiririca) e *Brachiaria decumbens* (braquiária), sendo esta última introduzida por semeadura, em agosto de 2004 (Paula et al., 2006). Como referência, coletou-se também solo não rizosférico (solo de vaso com planta, porém, fora da influência das raízes), formada por uma amostra composta retirada de todos os tratamentos, e um tratamento controle, constituindo-se de solo mantido em casa de vegetação por igual período, porém, sem planta. As amostras de solo e raízes foram coletadas de forma inteiramente casualizada, sendo as espécies de plantas consideradas tratamentos e os vasos as repetições, totalizando 7 tratamentos com 3 repetições.

#### **Avaliação de teores de HAPs no solo**

A análise de teores de HAPs semi-voláteis nos solos foi realizada na Cetrel, de acordo com o método EPA 8270D. A partir das análises de concentração de cada HAP no solo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), foi calculada a sua concentração molar ( $\text{mmol kg}^{-1}$ ) e, a partir desses valores, calculou-se a concentração molar total dos HAPs em cada tratamento.

### **Avaliação da densidade microbiana**

A contagem de células viáveis em placa do solo rizosférico foi realizada pelo método de diluições seriadas de suspensões de solo, utilizando-se os meios de cultivo conforme Kirk et al. (2005): meio TSA para crescimento de bactérias totais, ágar extrato de malte para fungos totais, ágar Bushnell-Hass para bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e meio seletivo para fungos degradadores de hidrocarbonetos. Para actinomicetos totais, utilizou-se ágar amido caseína, conforme Wellington & Toth (1994). Nos meios de cultivo para o crescimento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, foi utilizado, como única fonte de carbono, o antraceno a 0,5%, dissolvido em benzeno, modificado de Clemente et al. (2001), o qual foi uniformemente espalhado (2,5 mL por placa) sobre a superfície do meio. O benzeno foi deixado evaporar por 20 minutos, formando-se uma fina camada de antraceno sobre a superfície do meio. Para os meios de cultivo para microrganismos totais espalhou-se, superficialmente, o mesmo volume de benzeno, porém, sem antraceno. As placas foram incubadas a 28°C, em câmara escura e as contagens foram realizadas de 3 a 14 dias, de acordo com o microrganismo avaliado.

### **Atividade heterotrófica do solo**

A avaliação da atividade degradadora do solo foi realizada pela determinação da hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF), de acordo com Schnürer & Roswall (1982) e da atividade da lipase, conforme Margesin et al. (2002).

### **Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares**

A ocorrência de FMAs foi avaliada em amostras de 50 cm<sup>3</sup> de solo, por contagem de esporos, por meio de peneiramento úmido e centrifugação em solução de sacarose (Gerdemann & Nicolson, 1963), realizando-se a contagem



em microscópio estereoscópico com aumento de até 40 vezes. As raízes das diferentes plantas espontâneas foram coradas segundo Phillips & Haymann (1970) e avaliadas quanto à porcentagem de colonização micorrízica, de acordo com Giovannetti & Mosse (1980). Os esporos foram contados, separados por morfotipos e montados em lâminas com álcool polivinílico lactoglicerol (PVLG) e reagente de Melzer. A avaliação microscópica das características fenotípicas estruturais e identificação taxonômica, foi realizada no Departamento de Ciências Naturais da Universidade Regional de Blumenau, em Blumenau, SC, conforme Shenck & Pérez (1988) e descrição das espécies, conforme INVAM (2000).

#### **Análise dos dados**

As contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) foram transformadas para log<sub>10</sub>. Os dados de contagem, teor de HAPs, atividade enzimática e FMAs foram analisados pelo cálculo do erro padrão das médias e por meio do teste t de Student para correlação linear de Pearson.

#### **Análise da estrutura da comunidade microbiana do solo**

As análises de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Molecular da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP. A estrutura da comunidade bacteriana do solo rizosférico foi avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de fragmentos do 16S rDNA, seguida de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (Muyzer et al., 1993). Para cada tratamento, as repetições das amostras de solo foram misturadas para formar uma amostra composta. O DNA metagenômico de cada tratamento foi extraído a partir de 0,5 grama, de solo utilizando o BIO101 Fast DNA SPIN KIT para solo (Q-Biogene, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos do 16S rDNA foram amplificados por PCR,

utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os primers BA338fGC (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) e UN518r (ATTACCGCGGCTGCTGG) (ØVREÅS et al., 1997). A reação foi realizada em um volume de 25 µL contendo 1X Taq Platinum DNA polymerase buffer, 0,1 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs, 1,5 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,625 U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 1 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação do PCR foram 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final por 10 minutos a 72°C. Quantidades iguais de amplicons (300 ng) foram analisadas por meio de DGGE, em 8% (m/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m), contendo um gradiente de 15% a 55% de formamida e uréia (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi em 200V constantes e 60°C por 4 horas, utilizando-se o sistema “DCode” (BioRad, EUA), em tampão 0,5X TAE buffer. O DNA foi corado com “SYBR Green” (Amersham Biosciences, Brasil) e os géis analisados utilizando o densitômetro laser “FluorImager” e o programa “Diversity Database” (BioRad, EUA). Os perfis de bandas após DGGE foram analisados por agrupamentos hierárquicos, utilizando-se o programa Systat 11.0, com base em dados binários, pelo método de concordância simples (“simple matching”), com algoritmo de Ward e distância euclidiana como unidade de medida.

### **Seqüenciamento de DNA de colônias bacterianas**

Para o seqüenciamento, colônias de bactérias degradadoras de antraceno foram obtidas a partir do plaqueamento de diluições seriadas dos solos rizosféricos de *Bidens pilosa*, *Cyperus* sp. e *Eclipta alba*, as quais apresentaram maiores contagens de UFC de bactérias degradadoras de antraceno em placa. Para isso, as bactérias degradadoras de antraceno foram isoladas e repicadas várias vezes, em meio ágar Bushnell-Hass, com antraceno a 0,5% como única fonte de carbono, totalizando 10 isolados. Uma alçada das colônias bacterianas

foi transferida para tubos, suspensa em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e submetida à lise celular, em 95°C por 5 minutos. Para a PCR, foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  do lisado celular nas mesmas condições descritas acima com alteração dos primers para o 1541R (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) e 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) (Löffler et al., 2000). O produto amplificado foi purificado com acetato de amônio (7,5 mol L<sup>-1</sup>), etanol 98% e 70%. O PCR de seqüenciamento foi executado utilizando-se 200-500 ng do DNA purificado, 5 pmol do primer 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) (Marchesi et al., 1998), 1  $\mu\text{L}$  de “DYEmanic ET Terminator” (Amersham Biosciences, Brasil), 3  $\mu\text{L}$  de “sequencing buffer” (200 mM Tris-HCl pH 9,0, 5 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) e água ultrapura para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , em 25 ciclos de 20 seg a 95 °C, 15 segundos a 54°C e 1 minuto a 60°C. Os produtos do PCR de seqüenciamento foram purificados com acetato de sódio (3 mol L<sup>-1</sup>)/EDTA (0,5 mol L<sup>-1</sup>), etanol 98% e 70%. A eletroforese foi feita utilizando-se o “ABI 3100 automatic sequencer”, de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems, Brasil). Foram seqüenciadas três colônias de cada isolado. As seqüências obtidas foram comparadas utilizando-se Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) no website do National Center for Biotechnology Information (NCBI) para identificar seqüências relacionadas e determinar possíveis gêneros e espécies bacterianas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Teores de HAPs no solo

A análise dos teores HAPs de petróleo extraídos do solo mostra que a presença de planta no solo apresentou uma tendência de maiores valores em relação ao tratamento sem planta, com exceção do naftaleno (Quadro 2). O teor de naftaleno nos solos rizosféricos foi 42% inferior aos solos sem planta, enquanto que para os demais HAPs observou-se que os solos rizosféricos apresentaram, em média, teores 66% superiores aos solos de referência, com os teores variando entre 21% a 105% superiores, para dibenzo(a,h)antraceno e fenantreno, respectivamente.

Quadro 2. Teores de hidrocarbonetos semi-voláteis extraíveis em solos de tratamento sob a presença de planta e sem a influência de plantas. Valores são seguidos do erro padrão da média (com planta n = 5 e sem planta n = 2).

Hidrocarboneto	Com planta	Sem planta
	-----mg kg <sup>-1</sup> -----	
Naftaleno	0,6 ± 0,04	1,1 ± 0,4
Fluoreno	10,5 ± 1,8	6,5 ± 0,05
Antraceno	57,5 ± 10,6	30,2 ± 3,6
Fenantreno	263,1 ± 45,3	128,5 ± 5,3
Fluoranteno	317,1 ± 43,5	172,4 ± 4,8
Benzo(a)antraceno	68,5 ± 12,3	51 ± 4
Benzo(a)pireno	38,9 ± 5,1	22,9 ± 0,3
Indeno(1,2,3-cd)pireno	119,1 ± 11,1	74,9 ± 8,7
Dibenzo(a,h)antraceno	6,4 ± 0,9	5,3 ± 0,1

Apesar de estudos relatarem menores concentrações de HAPs em solo rizosférico (Binet et al. 2000b), resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo foram verificados por Liste e Prutz (2006). Estes autores constataram maior quantidade de hidrocarbonetos extraídos de solo rizosférico contaminado com hidrocarbonetos de petróleo na maioria das espécies de plantas avaliadas. Segundo eles, as plantas podem favorecer a extractabilidade química de

compostos não-extraíveis. Olexa et al. (2000) também verificaram, em um solo arenoso, que, após 180 dias com a presença de *Lolium multiflorum*, houve aumento na concentração de pireno extraível do solo, enquanto no tratamento sem planta isso não ocorreu.

A maior extractabilidade destes contaminantes de solos com plantas pode resultar da liberação de ácidos orgânicos, fenóis e fosfolipídeos surfactantes na rizosfera que modificam as propriedades de adsorção química e física dessa região (Read et al., 2003). Também, o estímulo a populações microbianas que tenham a capacidade de produzir biosurfactantes (Kuyukina et al. 2005) pode contribuir para aumentar a solubilidade/extractabilidade de compostos contaminantes adsorvidos à matriz do solo (Mulligan, 2005).

O aumento da solubilidade/extractabilidade dos HAPs no solo é um aspecto muito importante, visto que um dos fatores limitantes ao sucesso de uma técnica de bioremediação é a questão da biodisponibilidade dos contaminantes ao ataque microbiano (Boopathy, 2000).

### **Densidade microbiana**

Por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas, verificou-se que as plantas favoreceram a densidade da microbiota heterotrófica total e degradadora, em relação ao solo não-rizosférico e sem planta (Figura 1). Em geral, todos os grupos microbianos avaliados apresentaram maiores contagens nos solos rizosféricos, tendo as contagens de bactérias totais sido em média, 5,2 vezes maior nos vasos com plantas, as bactérias degradadoras 8,7 vezes, os fungos totais 3 vezes, os fungos degradadores 2,8 vezes e os actinomicetos 1,3 vez superior.

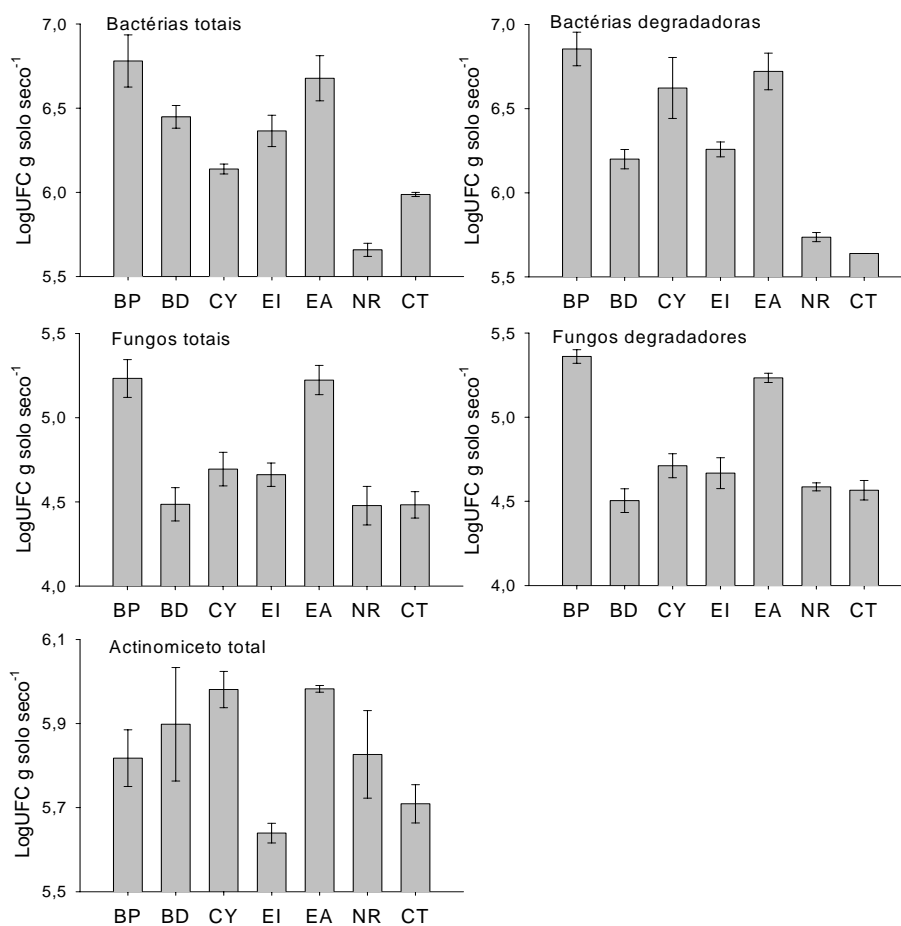


Figura 1. Contagem de células viáveis de microrganismos totais e degradadores de antraceno em solos rizosféricos de plantas de crescimento espontâneo em área de “landfarming” de resíduos petroquímicos. BP (*Bidens pilosa*), BD (*Brachiaria decumbens*), CY (*Cyperus* sp.), EI (*Eleusine indica*), EA (*Eclipta alba*), NR (solo não rizosférico) e CT (solo controle sem planta). Barras verticais indicam o erro padrão da média (n=3 repetições).

Entre as plantas, podemos destacar *Bidens pilosa* e *Eclipta alba* que, com exceção dos actinomicetos totais, apresentaram as maiores contagens dos microrganismos totais e degradadores, chegando a ter contagem de bactérias

degradadoras 15,2 ( $7,5 \times 10^6$  UFC g solo seco<sup>-1</sup>) e 11,4 ( $5,6 \times 10^6$ ) vezes maior que nos solos sem influencia de planta ( $4,9 \times 10^5$ ), respectivamente.

Maior densidade de grupos microbianos na rizosfera em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo em relação a solos sem planta tem sido relatada (Muratova et al., 2003a; Muratova et al., 2003b; Günther et al., 1996), estando os valores observados neste estudo dentro da faixa geralmente encontrada para solos nessa condição. Liste & Felgentreu (2006) observaram contagens microbianas até 11 vezes superiores na rizosfera em solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. Essa maior comunidade microbiana na zona de influência das raízes pode favorecer a maior degradação dos hidrocarbonetos presentes no resíduo (Corgié et al., 2003). Kaimi et al. (2006), além de encontrarem maior densidade de microrganismos na rizosfera, observaram concentrações 55% menores de hidrocarbonetos no final do experimento.

Os valores relativamente altos encontrados para a contagem de actinomicetos, com média geral de  $7,3 \times 10^5$  UFC g solo seco<sup>-1</sup>, foram semelhantes aos encontrados em solos de cerrado não contaminados (Pereira et al., 1999). No entanto, foram menores do que os observados, em solos contaminados com diesel na Finlândia, por Palmroth et al. (2005). Estes autores, como no presente estudo, também verificaram que a presença de pinheiro-silvestre (*Pinus sylvestris*) e álamo (*Populus deltoides*) não teve efeito marcante sobre a população de actinomicetos. Verificou-se correlação positiva significativa entre a contagem de actinomicetos e a contaminação do solo ( $y = 5,6 + 0,06x$ ;  $r = 0,73$ ,  $P \leq 0,05$ ), sugerindo um estímulo dos hidrocarbonetos de petróleo sobre esses microrganismos. A alta densidade desses microrganismos, inclusive nos solos sem planta, indica a sua ampla ocorrência nos solos, apresentando vasta diversidade catabólica e tolerância a condições estressantes (Pizzul et al., 2006). Em alguns locais contaminados com HAPs, esses

microrganismos representam o grupo dominante entre os degradadores (Johnsen et al., 2002).

A qualidade e a quantidade de exsudados radiculares e a morfologia radicular variam entre as espécies vegetais e isso tem grande influência nas propriedades microbiológicas da rizosfera (Landi et al., 2006). A capacidade diferenciada das plantas em estimular a microbiota rizosférica pode refletir na capacidade remediadora dessas espécies. Muratova et al. (2003a), estudando solo contaminado com HAPs, observaram que a rizosfera de alfafa apresentou maior contagem de microrganismos totais e degradadores e maior redução na concentração de HAPs no solo em relação à rizosfera de caniço (*Phragmites australis*).

Uma importante fonte potencial de plantas para fins de remediação é a vegetação que ocorre naturalmente em solos contaminados (Merkl et al., 2004), pois esta é tolerante e adaptada a essa condição estressante, com maior capacidade de estimular a microbiota rizosférica associada (Binet et al., 2000b). Isso pode explicar a baixa capacidade de *Brachiaria decumbens*, que foi introduzida por semeadura, em favorecer a densidade microbiana em sua rizosfera.

#### **Atividade heterotrófica do solo**

O índice de atividade biológica do solo, avaliado por meio da hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) (Figura 2), não foi influenciado pela presença de plantas, embora, no solo com *Eleusine indica* tenha havido tendência de maior valor em relação ao solo controle. O valor médio observado ( $35,7 \mu\text{g F g solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) situa-se entre os que são geralmente relatados na literatura para solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e HAPs, entre 6 e  $197 \mu\text{g F g solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Margesin et al., 2003a; Andreoni et al., 2004).



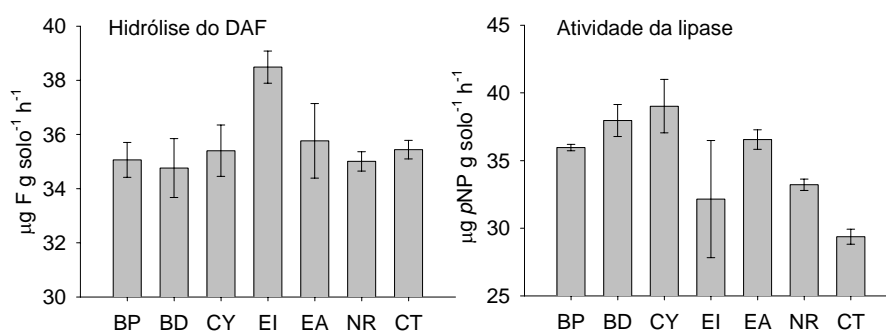


Figura 2. Atividade enzimática em solos rizosféricos de plantas de crescimento espontâneo em área de “landfarming” de resíduos petroquímicos. DAF (diacetato de fluoresceína), pNP (*para*-nitrofenol) e F (fluoresceína). BP (*Bidens pilosa*), BD (*Brachiaria decumbens*), CY (*Cyperus* sp.), EI (*Eleusine indica*), EA (*Eclipta alba*), NR (solo não rizosférico) e CT (solo controle sem planta). Barras verticais indicam o erro padrão da média (n=3 repetições).

Apesar de o DAF ser considerado um índice apropriado de atividade enzimática geral do solo, pois é hidrolisado por várias enzimas como proteases, lipases e esterases (Schnürer & Rosswall, 1982), fatores como a composição do contaminante, tempo de contaminação e a presença de compostos inibidores destas enzimas podem influenciar a atividade da hidrólise do DAF em solos contaminados (Margesin et al., 2003b). Segundo Gramss et al. (1999), as enzimas que hidrolisam o DAF podem ser degradadas por microrganismos do solo ou por enzimas proteolíticas de qualquer origem. Apesar desses resultados, estudos na literatura relatam maior atividade biológica na presença de plantas em solos contaminados (Kaimi et al., 2006; Günther et al., 1996).

Para a lipase, verificou-se maior atividade no solo com *Bidens pilosa*, *Brachiaria decumbens*, *Cyperus* sp e *Eclipta alba* (média de 37,4 µg pNP g solo<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), enquanto *Eleusine indica* apresentou valor semelhante ao do solo controle sem planta (Figura 2). Os valores encontrados indicam influência da presença de plantas, porém, essas diferenças são pouco acentuadas. A atividade média desta

enzima ficou abaixo dos valores observados, para solos contaminados com óleo diesel, por Riffaldi et al. (2006) (199 a 535  $\mu\text{g pNP g solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), porém, na faixa de valores relatados por Margesin & Schinner (2001).

Solos com histórico recente de contaminação apresentam maior atividade de lipase em relação solos cronicamente contaminado (Margesin et al. 2002). Isso pode explicar os baixos valores encontrados para a atividade da lipase neste estudo, já que os solos foram coletados de célula em uso há mais de 15 anos.

Verificou-se uma correlação positiva significativa entre a atividade da lipase com a população de bactérias degradadoras e com a população de actinomicetos totais (Figura 3A). Margesin et al. (1999) observaram que a atividade da lipase teve correlação positiva significativa com a população de degradadores de hidrocarbonetos. Outros estudos relatam a produção de lipases por bactérias (Arpigny & Jaeger, 1999; Margesin et al. 2003b). Em estudo realizado por Ko et al. (2005), cerca de 25% das bactérias e 65% dos actinomicetos isolados de 3 áreas não contaminadas eram produtores de lipases, sendo esses microrganismos de ocorrência freqüente nos solos e são importantes decompositores de óleos na matéria orgânica do solo.

Os resultados do presente estudo também evidenciaram relação positiva significativa entre a contaminação do solo com a atividade da lipase no solo (Figura 3B). Segundo Margesin et al. (1999), a lipase apresenta comportamento diferenciado de outras enzimas diante de uma condição de contaminação, pois sua atividade não é reduzida à medida que o tempo de contaminação aumenta ou a taxa de biodegradação diminui e, por isso, pode ser uma ferramenta útil para monitorar a biodegradação de óleos no solo.

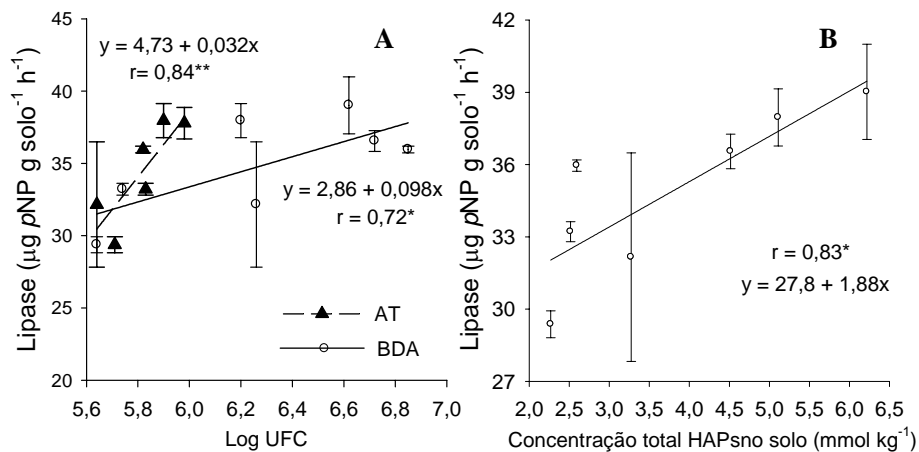


Figura 3. Análise de correlação de Pearson entre a atividade da lipase e contagem de bactérias degradadoras e actinomicetos totais (A), e entre a concentração molar total de hidrocarbonetos semivoláteis extraíveis e a atividade da lipase (B) em solos de área de “landfarming” de resíduos petroquímicos. BDA (Bactéria degradadora de antraceno), AT (actinomiceto total). Barras verticais indicam o erro padrão da média (n = 3 repetições). \*,\*\* correlação linear significativa pelo teste t de Student a 5% e 1%, respectivamente.

### Ocorrência de FMAs em solo e raiz

A colonização micorrízica de raízes das diferentes plantas teve média geral de 42%, variando entre 14% e 56%, para *Cyperus* sp e *Brachiaria decumbens*, respectivamente (Figura 4). Verificou-se uma alta densidade de esporos de FMAs no solo estudado. Os tratamentos com plantas variaram de 895 a 4.738 esporos  $50 \text{ mL solo}^{-1}$ , para *Eleusine indica* e *Brachiaria decumbens*, respectivamente, enquanto o solo controle apresentou esporulação de apenas 65 esporos  $50 \text{ mL solo}^{-1}$  (Figura 4). Observou-se a ocorrência de quatro espécies de FMAs nativos do solo: *Acaulospora morrowiae*, *Glomus intraradices*, *Paraglomus occultum* (Figura 5) e *Archaeospora trapei* em todos os tratamentos, sendo *A. morrowiae* a predominante.

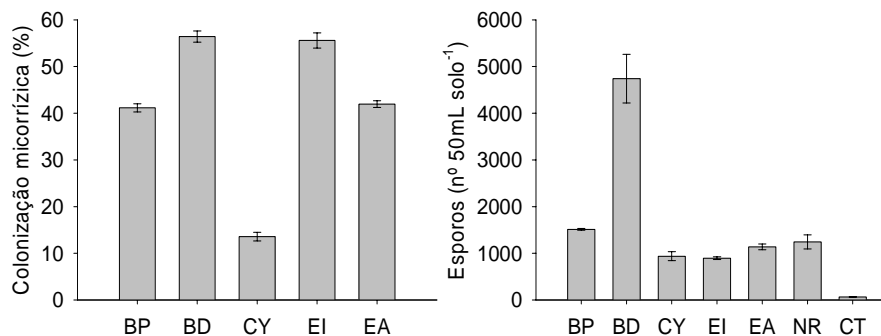


Figura 4. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares solos rizosféricos de plantas de crescimento espontâneo e solo rizosférico de área de “landfarming” de resíduos petroquímicos. BP (*Bidens pilosa*), BD (*Brachiaria decumbens*), CY (*Cyperus* sp.), EI (*Eleusine indica*), EA (*Eclipta alba*), NR (solo não rizosférico) e CT (solo controle sem planta). Barras verticais indicam o erro padrão da média (n=4 repetições para colonização e n=3 para esporos).

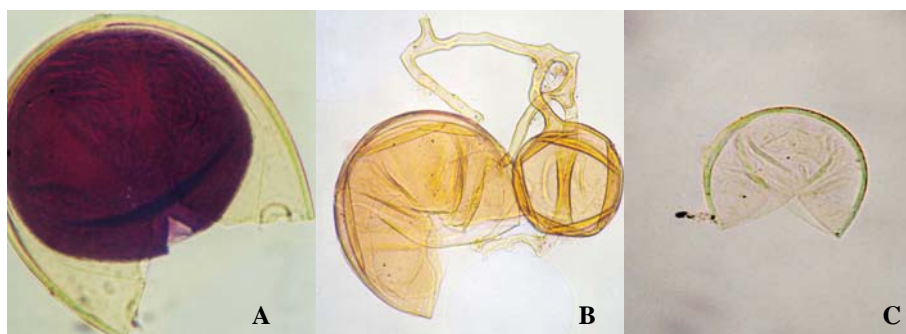


Figura 5. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificados em solo de área de “landfarming” de resíduo petroquímico: *Acaulospora morrowiae* (A), *Glomus intraradices* (B) e *Paraglomus occultum* (C).

As taxas de colonização micorrízica encontradas neste estudo são semelhantes aos relatados por Cabello (1997) que observou taxas de colonização em torno de 60% em plantas de ocorrência natural em dois solos contaminados com compostos orgânicos. Paula et al. (2006) observaram em solo contaminado com resíduos petroquímicos, que, apesar da baixa densidade de esporos de

FMA, identificados como *Glomus* sp., estes foram eficientes em colonizar espécies introduzidas (colonização radicular de 35% a 62%) e de crescimento espontâneo (colonização em torno de 30%). A baixa taxa de colonização micorrízica observada em *Cyperus* sp. (média de 14%) pode ser atribuída ao fato de que alguns membros da família Cyperaceae são pouco ou não são micotróficos (Moreira & Siqueira, 2006). A ocorrência de colonização micorrízica em plantas nessa condição de solo pode favorecer o estabelecimento e aumentar a tolerância dessa vegetação aos contaminantes. Isso pode ser atribuído, além da maior absorção de água e nutrientes, à menor adsorção do contaminante em raízes micorrizadas, o que diminui o efeito fitotóxico desses compostos (Binet et al., 2000a).

O constante revolvimento do solo em área de “landfarming” dificulta o estabelecimento de vegetação espontânea, reduzindo também a densidade de esporos (Paula et al., 2006). No entanto, no presente estudo, as plantas de crescimento espontâneo ou introduzida, como *B. decumbens*, possibilitaram uma alta esporulação dos FMAs nativos do solo com valores superiores a 4.000 esporos/50 mL solo, valores estes não comumente encontrados na literatura. Os FMAs são biotróficos obrigatórios e os mecanismos que regulam sua esporulação são ainda pouco conhecidos. Entretanto, há evidências de que compostos orgânicos em determinadas concentrações podem estimular a esporulação. Isto tem sido documentado para herbicidas (Trappe et al., 1984) e compostos aromáticos como os isoflavonóides (Davies Jr et al., 2005). Estudos sobre o efeito dos produtos da degradação dos constituintes aromáticos dos resíduos de petróleo sobre os microrganismos do solo são necessários, pois compostos aromáticos secundários podem estar envolvidos na interação entre plantas e microrganismos simbioses do solo (Nair et al., 1999).

Cabello (1997) encontrou apenas duas espécies nativas de FMAs (*Glomus aggregatum* e *Gigaspora* sp.) em solo da Argentina poluído com óleo

cru e apenas *Glomus mosseae* em solo da Alemanha poluído com HAPs. Espécies de FMAs isoladas de áreas contaminadas são importantes para estudos que visem melhorar o estabelecimento e desenvolvimento de plantas em áreas poluídas com hidrocarbonetos, visto que esses isolados apresentam certa tolerância a tais contaminantes (Cabello, 1999).

Os resultados do presente estudo enriquecem a lista de espécies de FMAs nativos isolados e identificados em áreas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo. Estudos adicionais sobre a ocorrência desses fungos nessas áreas, os limites de tolerância aos contaminantes, os efeitos sobre a planta (absorção de nutrientes, crescimento e sobrevivência) e o aumento da capacidade remediadora das plantas são necessários.

#### **Estrutura da comunidade microbiana do solo**

A estrutura da comunidade bacteriana do solo foi influenciada pela presença de plantas (Figura 6). Houve grande variação na distribuição das 75 bandas detectadas por DGGE (dados não apresentados); algumas foram detectadas em todos os solos, outras apenas nos tratamentos sem a influência de plantas e outras ainda ocorreram apenas em um dos tratamentos. A análise de agrupamento hierárquico, em função da presença ou ausência de bandas em cada tratamento, revelou que os padrões de bandas podem ser divididos em dois grupos (Figura 6): um grupo incluindo os solos não rizosférico (NR) e sem planta (CT) e o outro que abrange todos os solos sob a presença de plantas. Esse último grupo ainda pode ser dividido em dois subgrupos: um que abrange as quatro plantas de crescimento espontâneo e o outro subgrupo da *Brachiaria decumbens*, que foi introduzida por semeadura.

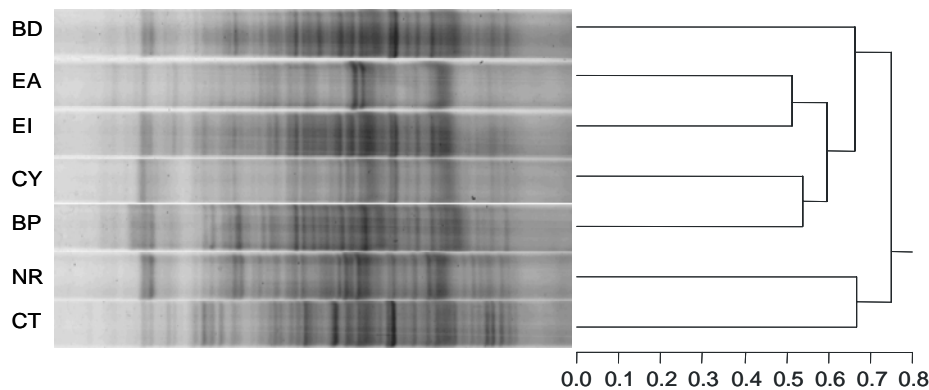


Figura 6. Perfis de bandas de DGGE de fragmentos do 16S rDNA de solos rizosféricos de plantas de crescimento espontâneo em área de “landfarming” de resíduos petroquímicos e dendrograma gerado a partir desses perfis. BP (*Bidens pilosa*), BD (*Brachiaria decumbens*), CY (*Cyperus* sp.), EI (*Eleusine indica*), EA (*Eclipta alba*), NR (solo não rizosférico) e CT (solo controle sem planta).

O solo sem plantas apresentou a maior riqueza de bandas com 45 amplicons do total de 75, enquanto a média dos tratamentos com plantas foi de 36 amplicons, tendo *Cyperus* sp. e *Eleusine indica* apresentado a menor riqueza de amplicons (34) (Figura 7). No Quadro 3 são apresentados os coeficientes de similaridade, em que os menores valores foram observadas entre os tratamentos com plantas e o controle sem planta, com similaridade de 54,4% para *B. pilosa*, 48,1% para *Cyperus* sp., 58,2% para *E. indica* e 57% para *E. alba*. Enquanto isso, observou-se menor similaridade da *Brachiaria decumbens* com o solo não rizosférico. O coeficiente de similaridade médio, considerando apenas os tratamentos com plantas, ficou em torno de 66%. Esses resultados indicam que a presença de plantas e a espécie vegetal têm influência na estrutura da comunidade bacteriana desses solos contaminados com resíduos petroquímicos.

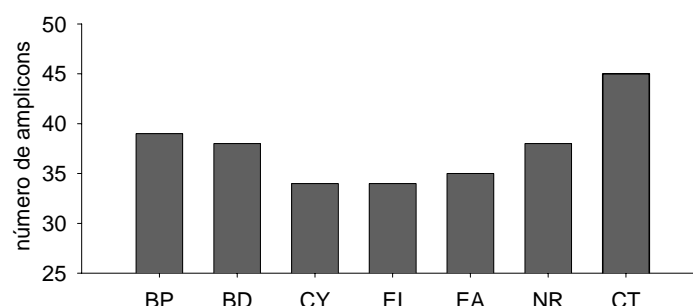


Figura 7. Riqueza de amplicons do perfil de DGGE de solo rizosférico de plantas de crescimento espontâneo em área de “landfarming” de resíduos petroquímicos. BP (*Bidens pilosa*), BD (*Brachiaria decumbens*), CY (*Cyperus* sp.), EI (*Eleusine indica*), EA (*Eclipta alba*), NR (solo não rizosférico) e CT (solo controle sem planta).

Quadro 3. Análise do coeficiente de similaridade (%) dos padrões de bandas de DGGE de fragmentos de 16S rDNA de solos rizosféricos de plantas de ocorrência espontânea em área de “landfarming” de resíduos petroquímicos.

	BP	BD	CY	EI	EA	NR
BD	55,7	100				
CY	70,9	62,0	100			
EI	70,9	67,1	72,2	100		
EA	67,1	60,8	63,3	73,4	100	
NR	55,7	51,9	64,6	59,5	60,8	100
CT	54,4	53,2	48,1	58,2	57,0	55,7

BP (*Bidens pilosa*), BD (*Brachiaria decumbens*), CY (*Cyperus* sp.), EI (*Eleusine indica*), EA (*Eclipta alba*), NR (solo não rizosférico) e CT (solo controle sem planta).

Não foi observado um padrão na distribuição dos amplicons de 16S rDNA de populações bacterianas. Padrões de bandas de DGGE em amostras ambientais com alta diversidade de comunidades microbianas são muito complexos (Boon et al., 2000). Estudos empregando essa técnica em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo têm revelado maiores quantidades de bandas em solos sem a influência de plantas (Kim et al., 2006;



Kirk et al., 2005). Embora estudos afirmem que a rizosfera é uma região que favorece a maior diversidade microbiana, seja em solo contaminado ou não (Stafford et al., 2005; Lõhmus et al., 2006), isso não ocorreu neste trabalho. A condição de 15 anos de aplicação de resíduos petroquímicos alterou a composição da microbiota desse solo, que foi selecionada e adaptada a essa situação estressante de aplicação contínua de resíduo ao longo dos anos, com microrganismos capazes de utilizar o substrato fornecido como fonte de carbono e energia, e que com o estabelecimento de plantas teve essa condição alterada, resultando em menor número de amplicons detectados. De acordo com Kim et al. (2006), a rizosfera pode inibir ou favorecer algumas das populações microbianas encontradas nos solos contaminados, em função das diferenças estruturais físico-químicas da rizosfera.

Se for considerado que a intensidade das bandas reflete o tamanho da população, pode-se inferir que algumas populações bacterianas são maiores nos solos sob a presença de plantas, em comparação ao solo controle sem planta e vice-versa (Figura 8). O efeito rizosférico pode favorecer o desenvolvimento de algumas espécies dominantes, enquanto o efeito da contaminação pelo resíduo petroquímico favorece outras espécies, promovendo, dessa forma, uma alteração das espécies dominantes na rizosfera de plantas em áreas contaminadas (Kim et al., 2006).

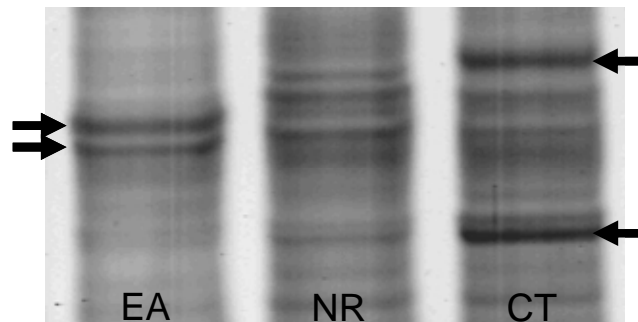


Figura 8. Perfil parcial de bandas de DGGE do 16S rDNA de solos rizosféricos de *Eclipta alba* (EA) e solo controle (CT) de “landfarming” de resíduos petroquímicos. As setas indicam diferenças na intensidade de bandas nos diferentes tratamentos.

O agrupamento hierárquico dos padrões de bandas em dois grupos principais distintos (Figura 6) e os baixos coeficientes de similaridade entre os solos rizosféricos e o controle sem planta (Quadro 3) comprovam a influência que a presença de plantas têm sobre a estrutura microbiana do solo, indicando que suas comunidades bacterianas são distintas. Resultado semelhante foi obtido por Kim et al. (2006), em solo contaminado com diesel, que não encontraram agrupamento dos perfis de DGGE do tratamento contaminado com plantas com o tratamento sem planta, e os coeficientes de similaridade ficaram em torno de apenas 39% entre esses tratamentos. No presente estudo, mesmo entre os solos rizosféricos, as comunidades bacterianas apresentaram alguma diferença, visto que a similaridade média entre esses solos foi de 66%.

Segundo Marschner et al. (2004), muitos fatores do solo, como o pH, o nível de fertilidade, o histórico de manejo e o tipo de solo, contribuem para moldar a composição e a predominância da microbiota rizosférica, mas os fatores da planta (espécie, variedade e idade) têm tanta importância quanto as propriedades e as características do solo. Essas alterações sobre a microbiota do

solo podem refletir no sucesso do emprego de plantas em programas de remediação de solos contaminados com orgânicos.

### **Seqüenciamento do DNA de colônias bacterianas**

A comparação das seqüências obtidas neste estudo com as depositadas no banco de dados do GenBank permitiu a identificação dos isolados de bactérias até gênero. Os 10 isolados de bactérias degradadoras de antraceno foram identificados como pertencentes aos gêneros *Streptomyces* sp. (98% de identidade, n° de acesso: DQ491194), *Nocardioides* sp. (98%, AB242748), *Fulvimonas* sp. (98%, EF072771), *Arthrobacter* sp. (93%, AF408952), *Cellulomonas* sp. (92%, AB166887) e *Paracoccus* sp. (91%, DQ985067).

Microrganismos com capacidade de crescer utilizando hidrocarbonetos como fonte de carbono ou que apresentam tolerância aos contaminantes têm sido seqüenciados diretamente de colônias puras ou pela excisão do amplicon do gel, de locais com diferentes históricos de contaminação em tipos variados de solos e sob as mais diversas condições e tipos de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo (Juck et al., 2000; Chaerun et al., 2004; Brito et al., 2006). Jussila et al. (2006) identificaram 50 bactérias de 11 gêneros de rizosfera de *Galega orientalis* contaminada com óleo cru e verificaram que 20% delas foram capazes de degradar *m*-tolueno. No Brasil, ainda são muito poucos os trabalhos dessa natureza.

Estudos em áreas contaminados com hidrocarbonetos de petróleo no Brasil têm revelado a ocorrência de *Alcanivorax*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cellulomonas*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Microbulbifer*, *Nocardia*, *Pandoraea*, *Planococcus*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas* (Sá, 2002; Evans et al., 2004; Bento et al., 1996; Cunha et al., 2000 e Brito et al., 2006). Brito et al. (2006), estudando sedimentos de praia e de mangue contaminados com petróleo, no Rio de Janeiro, obtiveram 64 isolados bacterianos pertencentes

a 12 gêneros, dos quais 32% foram capazes de degradar hidrocarbonetos. Dos 6 gêneros identificados neste estudo 4 são de actinomicetos (*Streptomyces*, *Nocardioides*, *Arthrobacter* e *Cellulomonas*). Dentre os microrganismos seqüenciados por Juck et al. (2000) de um solo contaminado com diesel, 64% pertenciam aos Actinomycetales.

A capacidade desse grupo de microrganismo em degradar hidrocarbonetos de petróleo já é conhecida (Chaerun et al., 2004; Brito et al., 2006; Jussila et al., 2006), indicando que ele tem estratégias flexíveis de sobrevivência que podem ser características valiosas para novas estratégias de biorremediação (Brito et al., 2006). Entre os gêneros de bactérias degradadoras identificadas neste estudo, apenas *Nocardioides* (Sá, 2002) e *Cellulomonas* (Brito et al, 2006) já foram relatados em solos brasileiros contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. O isolamento e a identificação de microrganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos são muito importantes para estudos adicionais sobre a biodegradação desses poluentes no solo.

Os resultados encontrados no presente estudo indicam a importância da manutenção da diversidade de plantas em solos contaminados, pois estas alteram as características microbiológicas do solo, em que cada espécie vegetal tem capacidades diferenciadas em estimular a densidade e a estrutura de populações microbianas com as mais variadas capacidades metabólicas. Isso pode ser benéfico para a degradação de contaminantes no solo.

## CONCLUSÕES

1. As plantas favoreceram a densidade microbiana no solo, porém, estes efeitos foram diferenciados para grupos microbianos e espécie vegetal. Enquanto bactérias e fungos totais e degradadores de antraceno foram mais favorecidos por *Bidens pilosa* e *Eclipta alba*, o estímulo das plantas sobre os actinomicetos totais foi menos acentuado.
2. A presença de planta favoreceu os FMAs. A colonização micorrízica e a densidade de esporos de FMAs nos solos diferiram entre as espécies vegetais, sendo maior na *Brachiaria decumbens*. Foram encontradas quatro espécies de fungos micorrízicos: *Acaulospora morrowiae*, *Glomus intraradices*, *Paraglomus occultum* e *Archaeospora trappei*.
3. Houve influência da presença de plantas sobre a estrutura da comunidade bacteriana do solo, porém, as plantas não tiveram efeitos evidentes sobre a atividade heterotrófica do solo. Os solos rizosféricos apresentaram populações bacterianas diferentes e menor riqueza de amplicons que os solos sem influência de raízes.
4. Foram identificados seis gêneros de bactérias degradadoras de antraceno na rizosfera: *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Fulvimonas*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas* e *Paracoccus*, sendo quatro dos gêneros identificados actinomicetos.

## LITERATURA CITADA

- ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M. A.; NOCERINO, G.; BERNASCORRI, S.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzymes activities of PAH polluted soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 401-412, Nov. 2004.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. Bacterial lipolytic enzymes p. classification and properties. **Biochemical Journal**, London, v. 343, n. 1, p. 177-183, Oct. 1999.
- ATAGANA, H. I. Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 3, p. 510-520, 2004.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel fuels. **International Biodeterioration & Biodegradadation**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 31-33, July 1996.
- BINET, P. H.; PORTAL, J. M.; LEYVAL, C. Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 14, p. 2011-2017, Dec. 2000a.
- BINET, P. H.; PORTAL, J. M.; LEYVAL, C. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 227, n. 1/2, p. 207-213, 2000b.
- BOON, N.; MARLÉ, C.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W. Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 742-747, 2000.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 63-67, Aug. 2000.
- BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GÕNI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M. A. C.; WASSERMAN, J. C. A.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 157, n. 8, p. 752-762, Oct. 2006.

CABELLO, M. N. Efecto de la contaminación con hidrocarburos sobre hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA). **Boletín Micológico**, Valparaíso, v. 10, n. 1/2, p. 77-83, 1995.

CABELLO, M. N. Effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated from hydrocarbon polluted soils. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 89-95, 1999.

CABELLO, M. N. Hydrocarbon pollution p. its effects on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 233-236, Mar. 1997.

CHAERUN, S. K.; TAZAKI, K.; ASADA, R.; KOGURE, K. Bioremediation of coastal areas 5 years after the *Nakhodka* oil spill in the Sea of Japan p. isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. **Environmental International**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 911-922, Sept. 2004.

CLEMENTE, A. R.; ANAZAWA, T. A.; DURRANT, L. R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 255-261, Oct./Dec. 2001.

CORGÍE, S. C.; JONER, E. J.; LEYVAL, C. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 257, n. 1, p. 143-150, Nov. 2003.

CUNHA, C. D.; Leite, S. G. F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 45-49, Jan./Mar. 2000.

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, New York, v. 56, p. 55-114, 1996.

DAVIES JR, F. T.; CALDERÓN, C. M.; HUAMAN, Z.; GÓMEZ, R. Influence of a flavonoid (formononetin) on mycorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Peru. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 318-329, Oct. 2005.

EVANS, F. F.; ROSADO, A. S.; SEBASTIÁN, G. V.; CASELLA, R.; MACHADO, P. L. O. A.; HOLMSTRÖM, C.; KJELLEBERG, VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 295-305, Aug. 2004.

GERDEMANN, J. B.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 46, p. 235-246, 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Cambridge, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GRAMSS, G.; VOIGT, K. D.; KIRSCH, B. Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. **Chemosphere**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 1481-1494, Mar. 1999.

GÜNTHER, T.; DORNBERGER, U.; FRITSCH, W.; Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 203-215, July 1996.

INVAM. **International culture collection of vesicular and arbuscular mycorrhizal fungi. Species Description**. Morgantown p. West Virginia Agriculture and Forestry Experimental Station, 2000. Disponível em p. <<http://invam.caf.wvu.edu>>. Acesso em: 2006.

JOHNSON, A. R.; WINDING, A.; KARLSON, U.; ROSLEV, P. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of <sup>13</sup>C-labeled cell lipids. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 6106-6113, Dec. 2002.

JUCK, D.; CHARLES, T.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 241-249, Sept. 2000.

JUSSILA, M. M.; JURGENS, G.; LINDSTRÖM, K.; SUOMINEN, L. Genetic diversity of culturable bacteria in oil-contaminated rhizosphere of *Galega orientalis*. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 139, n. 2, p. 244-257, Jan. 2006.



KAIMI, E.; MUKAIDANI, T.; MIYOSHI, S.; TAMAKI, M. Ryegrass enhancement of biodegradation in soil-contaminated soil. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 1/2, p. 110-119, Jan. 2006.

KIM, J.; KANG, S. H.; MIN, K. A.; CHO, K. S.; LEE, I. S. Rhizosphere microbial activity during phytoremediation of diesel-contaminated soil. **Journal of Environmental Science and Health Part A p. Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, Philadelphia, v. 41, n. 11, p. 2503-2516, Nov. 2006.

KIRK, J. L.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 455-465, Feb. 2005.

KO, W. H.; WANG, I. T.; ANN, P. J. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 597-599, Mar. 2005.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; MAKAROV, S. O.; LITVINENKO, L. V.; CUNNINGHAM, C. J.; PHILP, J. C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. **Environment International**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 155-161, Feb. 2005.

LANDI, L.; VALORI, F.; ASCHER, J.; RENELLA, G.; FALCHINI, L.; NANNIPIERI, P. Root exudate effects on the bacterial communities, CO<sub>2</sub> evolution, nitrogen transformations and ATP content of rhizosphere and bulk soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 509-516, Mar. 2006.

LISTE, H. H.; FELGENTREU, D. Crop growth, culturable bacteria, and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contaminated field soil. **Applied of Soil Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 1/2, p. 43-52, Jan. 2006.

LISTE, H. H.; PRUTZ, I. Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 1411-1420, Mar. 2006.

LIU, S. L.; LUO, Y. M.; CAO, Z. H.; WU, L. H.; DING, K. Q.; CHRISTIE, P. Degradation of benzo(a)pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. **Environmental Geochemistry and Health**, Dordrecht, v. 26, n. 2/3, p. 285-293, June/Sept. 2004.

LÖFFLER, F. E.; SUN, Q.; LI, J.; TIEDJE, J. M. 16S rDNA Gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulforomonas* and *Dehalococcoides* species. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1369-1374, Apr. 2000.

LÖHMUS, K.; TRUU, M.; TRUU, J.; OSTONEN, I.; KAAR, E.; VARES, A.; URI, V.; ALAMA, S.; KANAL, A.; Functional diversity of culturable bacterial communities in the rhizosphere in relation to fine-root and soil parameters in alder stands on forest, abandoned agricultural, and oil shale mining areas. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 283, n. 1/2, p. 1-10, May 2006.

MARCHESI, J. R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S. J.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 2, p. 795-799, Feb. 1998.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 7, p. 3127-3133, July 2001.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER; SCHINNER, F. Soil lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation. **Biotechnology Techniques**, Dordrecht, v. 13, n. 12, p. 859-863, Dec. 1999.

MARGESIN, R.; FELLER, G.; HÄMMERLE, M.; STEGNER, U.; SCHINNER, F. A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, n. 1, p. 27-33, Jan. 2002.

MARGESIN, R.; LABBÉ, D.; SCHINNER, F.; GREER, C. W.; WHYTE, L. G. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3085-3092, June 2003a.

MARGESIN, R.; GANDER, S.; ZACKE, G.; GOUNOT, A. M.; SCHINNER, F. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. **Extremophiles**, Tokyo, v. 7, n. 6, p. 451-458, Dec. 2003b.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C. H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 261, n. 1/2, p. 199-208, Apr. 2004.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils in the tropics – Pre-selection of the plant species from eastern Venezuela. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Gottingen, v. 78, n. 3, p. 184-192, Dec. 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 133, n. 2, p. 183–198, Jan. 2005.

MURATOVA, A. Y.; TURKOVSKAYA, O. V.; HÜBNER, T.; KUSCHK, P. Studies of the efficacy of alfalfa and reed in the phytoremediation of hydrocarbon-polluted soil. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 39, n. 6, p. 599-605, Nov./Dec. 2003a.

MURATOVA, A. Y.; HÜBNER, T.; NARULA, N.; WAND, H.; TURKOVSKAYA, O.; KUSCHK, P.; JAHN, R.; MERBACH, W. Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. **Microbiological Research**, Jena, v. 158, n. 2, p. 151-161, 2003b.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar. 1993.

NAIR, M. G.; BALASUBRAMANIAN, S.; KELLY, J. F.; SCHUTZKI, R. E.; WENZL, P.; CHAVEZ, A. L. Natural products as potential soil amendments for crop improvement. In p. SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. **Soil fertility, soil biology, and plant nutrition interrelationships**. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999. p. 405-419.

OLEXA, T. J.; GENTRY, T. J.; HARTEL, P. G.; WOLF, D. C.; FUHRMANN, J. J.; REYNOLDS, C. M. Mycorrhizal colonization and microbial community structure in the rhizosphere of annual ryegrass grown in pyrene-amended soils. **International Journal of Phytoremediation**, Boca Raton, v. 2, n. 3, p. 213-231, 2000.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, Sept. 1997.

PALMROTH, M. R. T.; MÜNSTER, U.; PICHTEL, J.; PUHAKKA, J. A. Metabolic responses of microbiota to diesel fuel addition in vegetated soil. **Biodegradation**, New York, v. 16, n. 1, p. 91-101, Feb. 2005.

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

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; Drozdowicz, A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 801-811, maio 1999.

PHILLIPS, J. M.; HAYMANN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transaction of the British Mycological Society**, London, v. 55, n. 1, p. 158-161, 1970.

PIZZUL, L.; CASTILLO, M. P.; STENSTRÖM, J. Characterization of selectec actinomycetes degrading polyaromatic hydrocarbons in liquid culture and spiked soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 22, n. 7, p. 745-752, July 2006.

PRADHAN, S. P.; CONRAD, J. R.; PATEREK, J. R.; SRIVASTAVA, V. J. Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. **Journal of Soil Contamination**, Boca Raton, v. 7, n. 4, p. 467-480, 1998.

READ, D. B.; BENGOUGH, A. G.; GREGORY, P. J.; CRAWFORD, J. W.; ROBINSON, D.; SCRIMGEOUR, C. M.; YOUNG, I. M.; ZHANG, K.; ZHANG, X. Plant roots, release phospholipids surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, n. 2, p. 315-326, Feb. 2003.

RIFFALDI, R.; LEVI-MINZI, R.; CARDELLI, R.; PALUMBO, S.; SAVIOZZI, A. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Water Air Soil Pollution**, Dordrecht, v. 170, n. 1/4, p. 3-17, Feb. 2006.

ROBSON, D. B.; KNIGHT, J. D.; FARRELL, R. E.; GERMIDA, J. J. Ability of cold-tolerant plants to grow in hydrocarbon-contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, Boca Raton, v. 5, n. 2, p. 105-123, 2003.

SÁ, M. C. C. **Tratamento biológico de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2002. 116 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons p. environmental pollution and bioremediation. **Trends Biotechnology**, London, v. 20, n. 6, p. 243-248, June 2002.

SCHENCK, N. C.; PEREZ, Y. **A manual of identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi**. 2. ed. Gainesville p. University of Florida, 1988. 241 p.

SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 6, p. 1256-1261, 1982.

SICILIANO, S. D.; GERMIDA, J. J.; BANKS, K.; GREER, C. W. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 483-489, Jan. 2003.

SIMS, R.; SIMS, J. L. Landfarming of petroleum contaminated soils. In: ADRIANO, D. C.; BOLLAG, J. M.; FRANKBERGER JR., W. T.; SIMS, R. C. (Ed.). **Bioremediation of Contaminated Soils**. 1999. p. 767-781. (Agronomy, n. 37).

STAFFORD, W. H. L.; BAKER, G. C.; BROWN, S. A.; BURTON, S. G.; COWAN, D. A. Bacterial diversity in the rhizosphere of Proteaceae species. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 11, p. 1755-1768, Nov. 2005.

SUSARLA, S.; MEDINA, V. F.; MCCUTCHEON, S. C. Phytoremediation p. An ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 647-658, June 2002.

TRAPPE, J. M.; MOLINA, R.; CASTELLANO, M. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 331-359, 1984.

WELLINGTON, E. M. H.; TOTH, I. K. Actinomycetes. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S.; BOTTOMLEY, P. S. (Ed.). **Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties**. Wisconsin: Soil Science Society of America. 1994. p. 199-144.