

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
INSTITUTO ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – MBT**

**MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE PETRÓLEO ISOLADOS
DE SOLOS RIZOSFÉRICOS DA PROVÍNCIA PETROLÍFERA DE
URUCU, COARI, AMAZONAS**

DANNIELLE CORDEIRO RIBEIRO DE LIMA

MANAUS

2010

DANNIELLE CORDEIRO RIBEIRO DE LIMA

**MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE PETRÓLEO ISOLADOS
DE SOLOS RIZOSFÉRICOS DA PROVÍNCIA PETROLÍFERA DE
URUCU, COARI, AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação da Universidade do Estado do
Amazonas, para obtenção do grau de Mestre
em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador : **Ph.D Luiz Antonio de oliveira**

MANAUS

2010

Ficha Catalográfica.

L732m Lima ,Dannielle Cordeiro Ribeiro de .

Microrganismos degradadores de petróleo isolados e solos rizosféricos da província petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas / Dannielle Cordeiro Ribeiro de Lima Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2010.
47 f.

Dissertação(Mestrado) Universidade do Estado Amazonas –Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia , 2010.

Orientador: Ph.D Luiz Antonio de Oliveira

1.Biodegradação.2. Ecologia microbiana.3. .Petróleo. I. Título.

A Deus,

À minha família, em especial ao meu esposo,

Jefferson de Lima Coelho e meus pais

Francisco Ribeiro e **Rose Mary Ribeiro,**

ao meu filho **Matheus** e ao meu irmão

André Ribeiro e a todos os meus

familiares e amigos,

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, pelo amor, carinho, cuidado e oportunidades ao longo da vida, pela saúde, fé, esperança e persistência que me dá para superar os obstáculos.

Aos meus pais, que me proporcionaram uma educação de qualidade para eu concretizar esse projeto de vida.

Ao meu querido esposo Jefferson que soube compreender a minha ausência, devido às horas de dedicação ao estudo e a pesquisa no laboratório e também ao nosso querido filho Matheus.

À Universidade do Estado do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e recursos Naturais, pela oportunidade e conhecimentos adquiridos ao longo do curso e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo apoio através da infraestrutura para a realização desse trabalho e a rede CTPETRO, pelo carinho e apoio no desenvolver desse projeto, em especial a minha colega Lorena.

Ao meu querido orientador e professor Dr. Luiz Antonio Oliveira, o meu carinho, respeito, admiração e eterna gratidão, pelo incentivo, apoio, ensinamentos, dedicação e compreensão ao longo do desenvolvimento de nossa pesquisa.

A todos os professores do curso Pós-Graduação em Biotecnologia e recursos Naturais e aos meus colegas de turma, em especial aos meus queridos amigos Patrick Gomes e Daniely Pinheiro pelo apoio e palavras amigas nos momentos difíceis.

Aos meus queridos orientadores da época de PIBIC, Dra. Ani Beatriz Matsuura e Dr. Takechi Matsuura.

Aos meus professores da Universidade Federal do Amazonas, em especial, a professora Johanny Araújo pelo incentivo nos estudos.

A todos meus amigos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a conclusão de mais essa etapa de minha vida em especial, aos amigos do Laboratório, Cinara, Karol, Angélica, Arlem, Rogério e Francisco.

Muitíssimo obrigada !!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
1. OBJETIVOS.....	2
1.1 Geral.....	2
1.2 Específicos.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Breve histórico.....	3
2.2 A indústria do petróleo.....	4
2.3 O Petróleo.....	4
2.4 Riscos Ambientais.....	6
2.5 Microrganismos degradadores do petróleo.....	9
2.6 Biorremediação.....	10
2.7 Características gerais do solo.....	11
2.8 Solos da Amazônia.....	12
2.9 Os microrganismos do solo e rizosfera.....	13
2.10 Província Petrolífera de Urucu.....	14
2.10.1 Algumas características das plantas de Urucu.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Características da área de estudo.....	17
3.2 Coleta das amostras de solo.....	17
3.3 Análise físico-química do solo.....	18
3.3.1 Análise Granulométrica.....	18
3.3.2 Análise Química.....	18
3.4 Enriquecimento das amostras.....	19
3.5 Isolamento e seleção de microrganismos.....	20
3.6 Avaliação do potencial de degradação do petróleo.....	20

3.7 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Análise físico-química do solo.....	23
4.2 Enriquecimento das amostras.....	25
4.3 Identificação Preliminar dos Isolados.....	34
4.4 Teste de biodegradabilidade do petróleo de Urucu.....	34
5.CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS.....	38
ANEXOS	46

LISTA DE TABELA

TABELA 1. Tratamentos utilizados no experimento.....	25
TABELA 2. Meio Mineral Bushnell Haas (Meio BH).....	25
TABELA 3. Textura média dos solos rizosféricos em épocas distintas de precipitação, na região de Urucu-Coari-AM.....	29
TABELA 4. Teores de carbono, nitrogênio, relação C/N e matéria orgânica dos solos amostrados das rizosferas de plantas em épocas distintas de precipitação, na região de Urucu-Coari-AM.....	30
TABELA 5. Características químicas dos solos rizosféricos de plantas dos solos amostrados das rizosferas de plantas em épocas distintas de precipitação, na região de Urucu-Coari-AM.....	30
TABELA 6. População bacteriana nos períodos chuvoso e seco.....	35
TABELA 7. População de fungos filamentosos nos períodos chuvoso e seco.....	39
TABELA 8. População de leveduras no período chuvoso e seco.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Classificação dos hidrocarbonetos de petróleo.....	6
FIGURA 2. Acidente do petroleiro Prestige ocorrido em 2002.....	8
FIGURA 3. Deepwater Horizon antes da explosão (a); Explosão ocorrida no dia 20 de Abril de 2010 (b).....	9
FIGURA 4. Transformações físicas, químicas e biológicas do derrame do petróleo no mar.....	9
FIGURA 5. Tempo e fatores que agem na intemperização do óleo.....	10
FIGURA 6. Esquema do destino de contaminantes orgânicos no ambiente.....	11
FIGURA 7. Fases do solo e tipos de água contida no solo.....	17
FIGURA 8. Diagrama da Rizosfera (a); Componentes que dizem respeito à disponibilidade de nutrientes no sistema solo-rizosfera (b).....	18
FIGURA 9. Plantas ao redor do oleoduto da Província Petrolífera de Urucu.....	20
FIGURA 10. Base da Província Petrolífera de Urucu.....	22
FIGURA 11. Plantas ao redor do oleoduto (a,b); Coleta das amostras na Base da Província Petrolífera de Urucu (c).....	23
FIGURA 12. Placas de Petri contendo meio BH sólido e 0,1 mL de petróleo; (b) Petróleo sendo espalhado na placa.....	26
FIGURA 13. Oxidação e redução do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP)..	27
FIGURA 14. Esquema da avaliação do potencial de degradação de petróleo.....	28
FIGURA 15. Populações de bactérias coletadas no período chuvoso, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo a) <i>Vismia guianensis</i> ; b) <i>Mucuna pruriens</i> ; c) <i>Brachiaria decumbens</i> ; d) <i>Brachiaria humidicola</i>	33
FIGURA 16. Populações de bactérias coletadas no período seco, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo. a) <i>Vismia guianensis</i> ; b) <i>Mucuna pruriens</i> ; c) <i>Brachiaria decumbens</i> ; d) <i>Brachiaria humidicola</i>	34
FIGURA 17. Populações de fungos filamentosos coletadas no período chuvoso, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo a) <i>Vismia guianensis</i> ; b) <i>Mucuna pruriens</i> ; c) <i>Brachiaria decumbens</i> ; d) <i>Brachiaria humidicola</i>	36
FIGURA 18. Populações de fungos filamentosos coletadas no período seco, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo a) <i>Vismia guianensis</i> ; b) <i>Mucuna pruriens</i> ; c) <i>Brachiaria decumbens</i> ; d) <i>Brachiaria humidicola</i>	38
FIGURA 19. Populações de leveduras coletadas no período chuvoso, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo a) <i>Vismia guianensis</i> ; b) <i>Mucuna pruriens</i> ; c) <i>Brachiaria decumbens</i> ; d) <i>Brachiaria humidicola</i>	40
FIGURA 20. Populações de leveduras coletadas no período seco, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo a) <i>Vismia guianensis</i> ; b) <i>Mucuna pruriens</i> ; c) <i>Brachiaria decumbens</i> ; d) <i>Brachiaria humidicola</i>	42
FIGURA 21. Percentuais dos grupos de microrganismos obtidos no isolamento.	44
FIGURA 22. Percentuais do crescimento de microrganismos ao longo do tempo.....	44
FIGURA 23. Resultado do teste de degradação do petróleo de Urucu. I) Inóculo inicial, II) Crescimento após 24 horas, III) Crescimento após 48 horas, IV) Crescimento após 72 horas, V) Crescimento após 96 horas, VI) Crescimento após 120 horas. 1 a 8 (1.INPA-21 (+), 2. INPA-22 (-), 3.INPA-24 (+), 4.INPA-25 (+), 5. INPA-26 (+), 6.INPA-27(-), 7.INPA-28 (+) e 8.INPA-29 (+). A a D controles (A. abiótico, B. Biótico sem petróleo, C. Biótico sem DCPIP e D. Biótico sem petróleo e com glicose).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

BH	Meio Mineral Bushnell Haas
BOGPM	Base de Operações Geólogo Pedro de Moura
C	Carbono
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g	grama
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
mL	Mililitro
N	Nitrogênio
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFC	Unidades formadoras de colônias
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos)

RESUMO

MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE PETRÓLEO ISOLADOS DE SOLOS RIZOSFÉRICOS DA PROVÍNCIA PETROLÍFERA DE URUCU, COARI, AMAZONAS.

Universidade do Estado do Amazonas. Rua Carvalho Leal, N° 1777 CEP: 69055-001. Manaus – AM, RIBEIRO-LIMA, Dannielle, C. & OLIVEIRA, Luis A. dannielle.cordeiro@gmail.com.

Palavras chaves: biodegradação, ecologia microbiana, petróleo. Fonte financiadora: CNPq.

As atividades relacionadas à exploração do petróleo vêm trazendo grande preocupação devido aos riscos de derrames acidentais. Na Província Petrolífera de Urucu vem sendo realizadas atividades de exploração e produção de petróleo e gás natural. O petróleo de Urucu é transportado dos poços para a planta central através de um oleoduto construído em 1997. Ao longo do tempo o oleoduto pode apresentar desgaste, podendo ocorrer vazamentos e possíveis contaminações no ambiente. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a ocorrência de microrganismos com potencial de degradar o petróleo na rizosfera de plantas ao redor de oleodutos dentro da Base de Operações Geólogo Pedro de Moura. Foram realizadas quatro coletas de solos rizosféricos em duas épocas diferentes, sendo obtidas de plantas ao redor do oleoduto, duas espécies de gramíneas (*Brachiaria humidicola*, *Brachiaria decumbens*), uma leguminosa (*Mucuna pruriens*) e um lacre (*Vismia guianensis*). Entre as quatro espécies coletadas ao redor de oleodutos na BOGPM, a *B. decumbens* apresentou a maior ocorrência de microrganismos degradadores de petróleo. A maior concentração de UFC de bactérias, fungos filamentosos e leveduras ocorreram no período seco. No período chuvoso e tratamento enriquecido, a maior concentração de UFC de bactérias ocorreu em *B. humidicola* e de fungos filamentosos e leveduras em *M. pruriens*. No período seco e tratamento enriquecido, a maior concentração de UFC de bactérias ocorreu em *B. decumbens*, de fungos filamentosos em *M. pruriens* e leveduras em *B. decumbens*. A presença de microrganismos capazes de biodegradar o petróleo no teste com DCPIP indicaram que 61,32% possuem capacidade de degradação do petróleo em um prazo de 120 horas (5 dias), e num período maior que 120 horas, foi constatado que 83% dos microrganismos isolados possuem essa capacidade. Esses resultados permitiram mostrar que os microrganismos associados às rizosferas das espécies estudadas apresentam capacidade em usar o petróleo como fonte de carbono, indicando que apresentam potencial para degradarem o petróleo caso ocorra uma contaminação por esse produto na região amazônica.

ABSTRACT

PETROLEUM DEGRADING MICROORGANISMS ISOLATED FROM RHIZOSPHERE SOILS OF ANNATTO OIL PROVINCE, COARI, AMAZON. Universidade do Estado do Amazonas. Rua Carvalho Leal, No. 1777 CEP: 69055-001. Manaus - AM, RIBEIRO-LIMA, Dannielle, C. & OLIVEIRA, Luis A. dannielle.cordeiro@gmail.com. Key words: biodegradation, microbial ecology, oil. Financial support: CNPq

The activities related to petroleum exploration have brought great concern given the risks of accidental spills. Province Urucu Oil is being held exploration and production of oil and natural gas. The oil is transported from Urucu wells for the central plant via a pipeline built in 1997. Over time the pipeline can wear out, and there may be leaks and possible contamination in the environment. The aim of this study was to evaluate the occurrence of microorganisms with potential to degrade oil in the rhizosphere of plants around pipelines in Base Operations Geologist Pedro de Moura. Four samples were taken from rhizosphere soil at two different times are obtained from plants around the pipeline, two grass species (*Brachiaria humidicola* *Brachiaria decumbens*), a legume (*Mucuna pruriens*) and a seal (*Vismia guianensis*). Among the four species collected around pipelines in BOGPM, *B. decumbens* had the highest occurrence of oil degrading microorganisms. The highest concentration of CFU of bacteria, fungi and yeasts occurred in the dry season. In the rainy season and enriched treatment, the highest concentration of CFU of bacteria occurred in *B. humidicola* and filamentous fungi and yeasts in *M. pruriens*. In the dry period and enriched treatment, the highest concentration of CFU of bacteria occurred in *B. decumbens*, filamentous fungi in *M. pruriens* and yeast in *B. decumbens*. The presence of microorganisms capable of biodegrading the oil in DCPIP test indicated that 61.32% are capable of degradation of oil in a period of 120 hours (5 days), and in greater than 120 hours, it was found that 83% of microorganisms isolated have this capability. These results allowed to show that microorganisms associated with rhizosphere of species have the capacity to use oil as a carbon source, indicating which have the potential to degrade oil in the event of a contamination by this product at Amazon.

INTRODUÇÃO

Na Província Petrolífera de Urucu – Coari/AM vem sendo realizadas atividades de exploração e produção de petróleo e gás natural desde 1986 pela Petrobras S.A.. O petróleo de Urucu é transportado dos poços para a planta central (Polo Arara) através de oleodutos (linhas de surgências) construídos em 1997. Para facilitar os trabalhos de manutenção desses dutos, a Petrobras mantém uma faixa de ambos os lados desses dutos com uma vegetação rasteira, composta de gramíneas como duas espécies de braquiária (*Brachiaria humidicola*, *Brachiaria decumbens*), uma leguminosa de ocorrência esporádica (*Mucuna pruriens*) e o lacre (*Vismia guianensis*), sendo este, um componente de plantas invasoras pioneiras que ocorrem espontaneamente na região.

Ao longo do tempo, o oleoduto pode apresentar desgaste, podendo ocorrer vazamentos e contaminações no ambiente. No sistema radicular das plantas ocorre uma diversidade elevada de microrganismos, principalmente bactérias, que usam os exsudatos radiculares para crescerem e colonizarem as raízes. Esses microrganismos, classificados genericamente de “rizoféricos”, apresentam metabolismo capaz de usar diferentes fontes de carbono, podendo, inclusive, serem usados para a biorremediação de ambientes contaminados com petróleo. Plantas que mantêm altas populações de microrganismos degradadores de petróleo são desejáveis ao longo dessas linhas de surgências, como forma de prevenção para o caso de ocorrer futuros vazamentos.

Não há pesquisas voltadas para a identificação e quantificação da presença desses microrganismos nas rizosferas das quatro espécies, como forma de validar ou não a contribuição de suas rizosferas para possíveis tratamentos de derramamentos de petróleo ao longo do oleoduto. Desse modo, a presente pesquisa traz como objetivo, a proposta de determinar a existência de microrganismos do solo da rizosfera das quatro espécies de plantas ao redor do oleoduto com potencialidade de degradar o petróleo e saber em qual solo rizoférico coletado há maior ocorrência de microrganismos degradadores de petróleo em dois regimes climáticos (seco e chuvoso).

1 OBJETIVOS

1.1 GERAL

Avaliar a ocorrência de microrganismos com potencial de degradar o petróleo na rizosfera de plantas ao redor de oleodutos dentro da Base de Operações Geólogo Pedro de Moura (BOGPM), Coari, Amazonas.

1.2 ESPECÍFICOS

- Determinar em qual rizosfera de planta coletada ao redor de oleodutos na BOGPM há maior ocorrência de microrganismos degradadores de petróleo;
- Isolar e selecionar microrganismos dessas rizosferas de plantas com capacidade em degradar o petróleo;
- Avaliar a capacidade de degradação de petróleo pelos microrganismos selecionados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BREVE HISTÓRICO

Os primeiros registros históricos do uso do petróleo datam dos primórdios da civilização para fins bélicos, medicinais, de pavimentação de estradas e de impermeabilização. Em 1859 foi perfurado no oeste da Pensylvania - EUA, o primeiro poço com 20 m de profundidade, utilizando uma máquina perfuratriz para a procura do petróleo. Contudo, somente após a invenção dos motores de combustão à gasolina e a diesel que ocorreu a grande revolução do petróleo.

No século XIX, iniciou-se o interesse pela pesquisa do petróleo no Brasil, quando até então era usado quase que exclusivamente para iluminação. Desde o tempo do Império até a criação da PETROBRAS, em 1953, a pesquisa de óleo estava franqueada a qualquer grupo privado nacional ou estrangeiro. No século XX, o petróleo transformou-se rapidamente em recurso de importância essencial para o desenvolvimento econômico e a segurança do país (PACHECO, 2003).

O petróleo é a principal fonte de energia do planeta, seguida pelo carvão mineral e pelo gás natural. O consumo de energia no mundo cresce cerca de 2% ao ano e deverá dobrar em 30 anos se permanecerem as tendências atuais (NICOLLOTTI e EGLI, 1998; GOLDEMBERG, 2000). No Brasil, 47,2% da energia consumida no país em 2009 foi gerada por fontes renováveis principalmente hidrelétricas e combustíveis vegetais, já as fontes não renováveis como carvão, petróleo e gás representaram 52,8% no mesmo período. Entre as não renováveis, as de maior participação foram petróleo e seus derivados (37,8%), gás natural (37,8%), carvão mineral e seus derivados (4,8%) e urânio e seus derivados (1,4%) (JORNALVS, 2010).

O petróleo é uma matéria-prima fundamental à vida moderna, sendo o componente básico de mais de seis mil produtos. Dele se retira a matéria prima para a gasolina, borrachas, plásticos, o combustível de aviação, os lubrificantes, tecidos sintéticos, tintas e muitos outros produtos (HARAYAMA *et al.*, 1999; DUARTE, 2006).

Por ser uma das principais fontes de energia utilizada nas últimas décadas, as etapas submetidas no transporte, estocagem e distribuição do óleo cru e de seus derivados provocam diversos problemas ambientais devido aos riscos de derrames acidentais (CRAPEZ *et al.*, 2000).

2.2 A INDÚSTRIA DO PETRÓLEO

A história da indústria petrolífera do Brasil se confunde com a criação da Petrobras, em 1953, empresa que alavancou a exploração deste recurso natural que se tornaria um dos termômetros da política internacional. Desde seu surgimento descobriu-se petróleo em diversos estados brasileiros, mas foi na década de Setenta que se encontrou a mais importante província petrolífera: a Bacia de Campos, no estado do Rio de Janeiro (HISTÓRIA, 2002; CARVALHO, 2006).

Segundo a ANP, o Brasil ocupa hoje o 17º lugar no ranking de países com maiores reservas de petróleo e o 16º lugar no ranking dos maiores produtores de petróleo do mundo, com 84% da produção nacional de petróleo proveniente da Bacia de Campos. Os produtos finais do refino petróleo (termoplásticos, tensoativos, termoestáveis, elastômeros, solventes e fibras sintéticas) ligam à indústria petroquímica aos mais distintos setores produtores de consumo final (GUERRA, 1994; HISTÓRIA, 2002; PETROBRAS, 2009a).

O segmento de refino, que produz matéria-prima para a indústria petroquímica no Brasil é formado por 13 refinarias. São elas: Refinaria de Capuava – Recap (Mauá/SP), Refinaria do Planalto Paulista – Replan (Paulínia/SP), Refinaria Henrique Lage - Revap (São José dos Campos/SP), Refinaria Presidente Bernardes - Rbpc (Cubatão/SP), Refinaria Presidente Getúlio Vargas - Repar (Araucária/PR), Refinaria de Isaac Sabbá – Reman (Manaus/AM), Fábrica de Lubrificantes e Derivados do Nordeste – Lubnor (Fortaleza/CE), Refinaria Landulpho Alves – Rlam (São Francisco do Conde/BA), Refinaria Gabriel Passos – Regap (Betim/MG), Refinaria Duque de Caxias – Reduc (Duque de Caxias/RJ), Refinaria Alberto Pasqualini – Refap (Canoas/RS), Refinaria de Petróleo Ipiranga S.A. – Rpisa (Rio Grande/RS) e Refinaria de Petróleos de Manguinhos S.A. (Rio de Janeiro/RJ) (D'ÁVILA, 2002).

A Petroquímica faz parte da indústria química orgânica, estando sua identificação ligada aos hidrocarbonetos. Emprega como matérias-primas o gás natural, gases liquefeitos de petróleo, gases residuais de refinaria, naftas, querosene, parafinas, resíduos de refinação de petróleo e alguns tipos de petróleo cru (GUERRA, 1994; TORRES, 1997). Segundo D'Ávila (2000) a partir de processos sofisticados, as moléculas originais dos hidrocarbonetos, existentes no petróleo ou gás, são quebradas, recombinadas ou modificadas, dando origem a uma série de produtos, que, por sua vez, serão “a base química” de outras indústrias – calçadista, de tecidos, plásticos, pneus, tintas, alimentos, embalagens etc.

De acordo com Guerra (1994), o desenvolvimento da petroquímica no Brasil pode ser dividido em três fases distintas: a primeira fase ocorreu entre 1965 a 1972 quando foi implantado o pólo de São Paulo que tinha como motivação principal a substituição de importações. A segunda (1972/1978) associa-se à instalação do pólo de Camaçari e à crescente participação estatal na indústria através da Petroquisa e o empenho dos formuladores da política industrial em defender o controle nacional da indústria. A terceira fase (1972/1982) vincula-se à implantação do Pólo Sul, onde se observou uma maior preocupação com a absorção e o desenvolvimento tecnológico.

2.3 O PETRÓLEO

A origem do petróleo é explicada por diversas teorias, tais como a degradação termoquímica da matéria orgânica, a maturação dos leitos de carvão e rochas ígneas e metamórficas, por transformações mineralógicas, químicas e estruturais, essencialmente no estado sólido, em resposta a marcantes mudanças na temperatura, pressão, e a movimentos da crosta terrestre (PINHEIRO, 1996). Conforme a Teoria Organogênica, o petróleo teria se originado da decomposição de plantas e animais que se depositaram em amplas quantidades no fundo de mares e lagos, ou ainda em outras depressões de terrenos, tendo passado por um processo de compactação. Essa massa de detritos orgânicos teria sido submetida a altas pressões e temperaturas ao longo do tempo, acarretando reações químicas que a transformariam em óleo e gás (DYKE, 1997).

A matéria orgânica presente nas rochas geradoras passa por uma série de alterações térmicas (maturação) gerando o petróleo. Contudo, para que ocorra a formação do petróleo, é preciso que a matéria orgânica se deposite em ambientes com baixa quantidade de oxigênio, pois em ambiente com abundância de oxigênio, a biodegradação seria completa, levando a formação de gás carbônico e água (TISSOT e WELTER, 1984).

As rochas sedimentares, por serem porosas, quando possuem permeabilidade alta, formam o conjunto ideal para a ocorrência de reservatórios de petróleo explorável economicamente. O petróleo, por possuir uma densidade média de 0,8, inferior à das rochas que compõem o subsolo, tende a migrar para a superfície provocando os clássicos casos de exsudações (TISSOT e WELTER, 1984).

O petróleo é considerado uma fonte de energia não renovável, de origem fóssil e é a matéria prima da indústria petrolífera e petroquímica (TISSOT e WELTER, 1984). A geração de energia elétrica a partir de derivados de petróleo ocorre por meio da queima desses combustíveis em caldeiras, turbinas e motores de combustão interna.

As principais classes de hidrocarbonetos constituintes do petróleo são os alifáticos e os cíclicos. Os hidrocarbonetos alifáticos (cadeias carbônicas com pelo menos duas extremidades, sem nenhum ciclo ou anel) se dividem em: n-alcanos (são hidrocarbonetos de cadeia aberta e saturada que apresenta somente ligação simples entre os átomos de carbono) ou parafinas, alcanos ramificados ou isoprenóides (hidrocarbonetos de cadeia aberta que apresenta uma ligação dupla entre os átomos de carbono) e alcenos (hidrocarbonetos de cadeia aberta que apresenta uma ligação dupla entre os átomos de carbono). Os hidrocarbonetos cíclicos são divididos em ciclos alcanos ou naftenos (hidrocarbonetos de cadeia fechada e saturada) e aromáticos (hidrocarbonetos de cadeia fechada que apresentam na sua estrutura um anel com seis átomos de carbono com ligações duplas alternadas entre eles, esta unidade básica é chamada de benzeno). Os hidrocarbonetos que possuem dois ou mais anéis são denominados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPA (Figura 1).

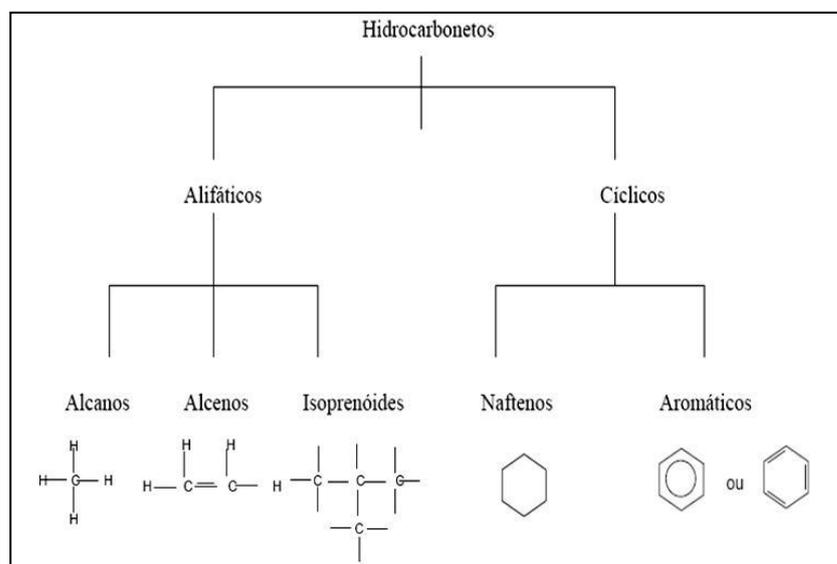


Figura 1. Classificação dos hidrocarbonetos de petróleo. Adaptado de Bento (2005).

A elevada proporção de carbono e hidrogênio existente no petróleo mostra que os hidrocarbonetos são seus principais constituintes, podendo chegar a mais de 90% de sua composição. Além dos hidrocarbonetos existem outros componentes em menor quantidade, tais como, enxofre, nitrogênio e oxigênio. Há ainda metais traço como vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio. Entretanto, a predominância de hidrocarbonetos no petróleo e sua composição variam de acordo com a sua procedência (ZÍLIO e PINTO, 2002; VIEIRA, 2004; BENTO, 2005). A composição química do petróleo é classificada segundo a natureza

do resíduo da destilação, pois é praticamente impossível a determinação completa, uma vez que, com o aquecimento, as moléculas se modificam, cindem-se, alterando a sua composição original (LEINZ e AMARAL, 2001).

Segundo Leinz e Amaral (2001), a viscosidade do petróleo depende da composição primária do hidrocarboneto predominante (cuja natureza varia muito), por exemplo, quanto mais antigo e mais profundo for o petróleo, de um modo geral, mais fluido ele se apresenta. Explica-se este fato pelo quebramento das moléculas, a princípio grandes, dando moléculas menores, graças ao calor natural da crosta terrestre, que aumenta o grau geotérmico da região.

O petróleo, no seu estado bruto, tem insignificantes aplicações, servindo quase que somente como óleo combustível. Já os seus derivados, gerados pelo refino, consistem em produtos de grande interesse comercial. O refino do petróleo consiste na separação em frações pelo processo de destilação, com o intuito final de obter derivados (MARIANO, 2001; AMORIM, 2007). Os principais produtos obtidos a partir do petróleo são os solventes, óleos combustíveis, gasolina, diesel, gasolina de aviação, lubrificantes, asfalto, plástico, entre outros.

2.4 RISCOS AMBIENTAIS NAS ATIVIDADES COM PETRÓLEO

O petróleo, por ser um produto de grande importância mundial, gerou uma extensiva exploração petrolífera associada à atividade antrópica, levando ao acúmulo de hidrocarbonetos a níveis indesejáveis no ambiente. Os riscos ambientais ocorrem desde o processo de extração, transporte, refino, até o consumo, com a produção de gases poluentes (derivados da queima de combustíveis fósseis). Isso devido aos graves acidentes envolvendo navios petroleiros, rupturas de oleodutos, operações negligentes de carga e descarga nos terminais, lavagem de tanques de petróleo com água do mar, entre outros (RODRIGUES, 2002).

Desde o acidente do petroleiro Exxon Valdez em 1989, cujo vazamento de óleo foi de aproximadamente 40 milhões de litros, destruindo parte da fauna do Alasca, o mundo passou a perceber a necessidade de proteção do meio ambiente. Nesse sentido, foi realizada uma série de conferências internacionais para estabelecer diretrizes à proteção do meio ambiente como a RIO-92, no Rio de Janeiro, instituindo a Agenda 21, e no Japão em 1997, estabelecendo o Protocolo de Quioto.

Em 2002 ocorreu um grande acidente envolvendo o petróleo, o navio petroleiro Prestige afundou no litoral da Galícia, noroeste da Espanha após ter um rombo no casco liberando 77 mil toneladas de óleo, produzindo uma imensa maré negra, que afetou uma ampla zona compreendida entre o norte de Portugal e as Landas ou Vendée em França, tendo especial incidência na Galícia (Figura 2).



Figura 2. Acidente do petroleiro Prestige ocorrido em 2002. Fonte: Google Imagem (2009).

No Brasil, o caso mais recente e de grande repercussão no país ocorreu na Baía da Guanabara, Rio de Janeiro, no ano de 2000, com o vazamento de 1,3 milhões de litros de óleo combustível, causado por rompimento de duto da Refinaria Duque de Caxias - Reduc (VIEIRA, 2004).

Atualmente um dos acidentes que tomou proporções enormes foi o ocorrido dia 20 de Abril deste ano no Golfo do México após a explosão da plataforma de perfuração marítima Deepwater Horizon, operada pela Transocean, contratada pela companhia petrolífera British Petroleum (BP), matando 11 dos 126 trabalhadores presentes na unidade – esta afundou dois dias depois e o vazamento de cinco mil barris de óleo por dia desde então se espalhou, atingindo os estados da Louisiana, Flórida, Alabama e Mississipi. As primeiras providências tomadas para minimizar o dano ambiental causado no local foram à remoção mecânica e físico-química e a contenção do material oleoso do ambiente marítimo (Figura 3).

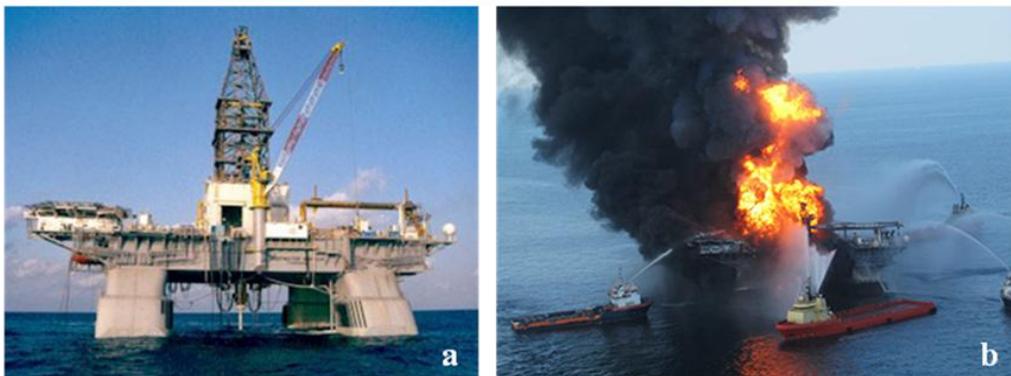


Figura 3. Deepwater Horizon antes da explosão (a); Explosão ocorrida no dia 20 de Abril de 2010 (b). Fonte: Google Imagem (2010).

Quando ocorre o derramamento de óleo no mar, forma-se uma película na superfície que sofre uma série de transformações físicas, químicas e biológicas, que podem contribuir para alterar as suas propriedades, o seu comportamento e a sua toxicidade (Figura 4). Dentre as transformações estão envolvidos o espalhamento, a evaporação, a emulsificação, a dissolução, a fotooxidação e a biodegradação (BOHEM *et al.*, 1982; GARRET *et al.*, 1998).

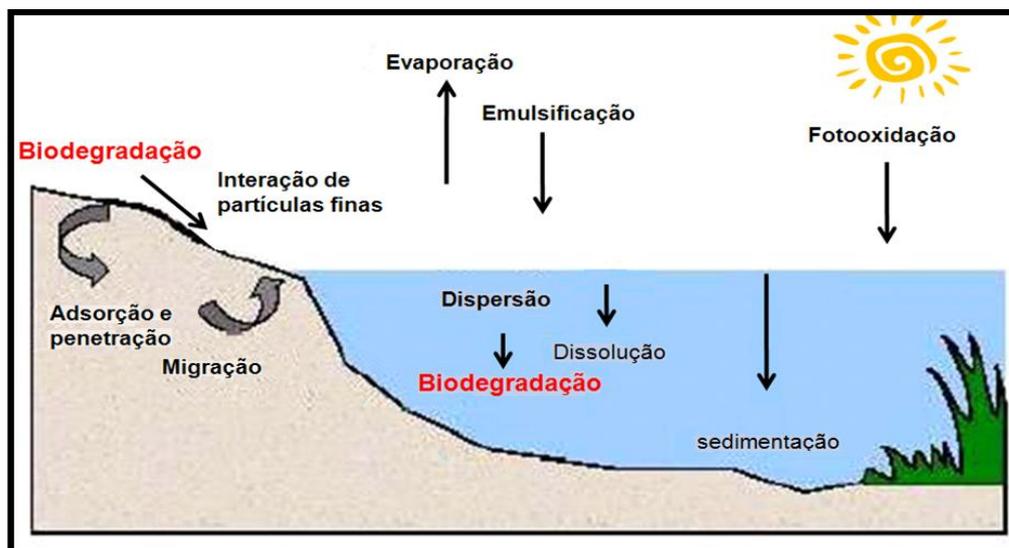


Figura 4. Transformações físicas, químicas e biológicas do derrame do petróleo no mar. Fonte: Google Imagem (2010).

Todos os processos de intemperização dependem das condições climáticas e do tipo de petróleo. O tempo e fatores que atuam na intemperização do óleo são demonstrados esquematicamente na Figura 5. O espalhamento é o processo físico que ocorre na interface água-ar e é caracterizado pela formação de um filme superficial. A evaporação é a transferência dos hidrocarbonetos da forma líquida para a gasosa. A solubilização ou dissolução ocorre com maior intensidade nas primeiras horas após o derramamento e tende a ser mais efetiva para compostos com menor peso molecular, pois são mais solúveis do que as frações mais pesadas. A emulsificação é caracterizada pela agregação e pelo aumento de peso e volume de partículas, formando o chamado “mousse de chocolate”. A sedimentação do óleo pode ocorrer pela adsorção ao material em suspensão, e com isso induz o aumento da densidade específica, através da evaporação e dissolução. Enquanto que a biodegradação consiste na degradação do petróleo por ação de microrganismos (BENTO, 2005).

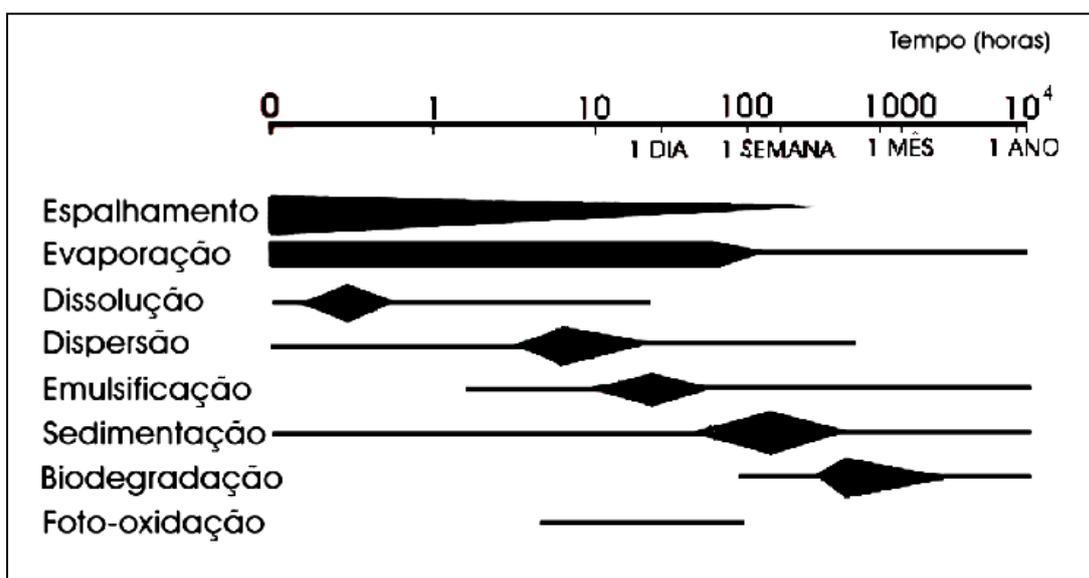


Figura 5. Tempo e fatores que agem na intemperização do óleo. (Bento, 2005, apud Clark, 1989).

No solo, a disseminação de petróleo, normalmente é ocasionada por rompimento de dutos ou problemas na manutenção de poços. Produtos de petróleo podem ser retidos pelas partículas do solo, tanto por infiltração e retenção nos poros como por adsorção à superfície das partículas.

As propriedades químicas e físicas da parte sólida do solo, incluindo o estado de hidratação, textura e matéria orgânica, controlam o grau de penetração e adsorção dos hidrocarbonetos. Conhecer características do solo é fundamental para se definir o tipo e a extensão da contaminação ambiental, assim como determinar estratégias de redução destes impactos (ANDRADE, 2004).

De acordo com Lemos *et al.* (2008), a diferença chave da biodegradação de petróleo em ecossistemas aquáticos e terrestres, após um derramamento de petróleo, relaciona-se com a movimentação e distribuição de óleo, bem como com a presença de partículas no seio da suspensão. Cada uma afeta a natureza química e física do óleo e, por conseguinte, a sua susceptibilidade à degradação microbiana. O derramamento de óleo no solo caracteriza-se por movimentos verticais, e não pela propagação horizontal com a mancha de petróleo.

A figura 6 mostra o destino de contaminantes orgânicos no ambiente, as entradas desses contaminantes não ficam confinadas apenas no compartimento ambiental de exposição (atmosfera, superfície, ou subsuperfície, no meio aquoso ou solo/sedimento), podendo seguir ou percolar para outros compartimentos, ficando então sujeitos a diversas

reações, podendo incluir volatilização, biodegradação, transferência para organismos, ligações entre as partículas do solo e percolação para o lençol freático (BERGER, 2005; CHAGAS-SPINELLI, 2007).

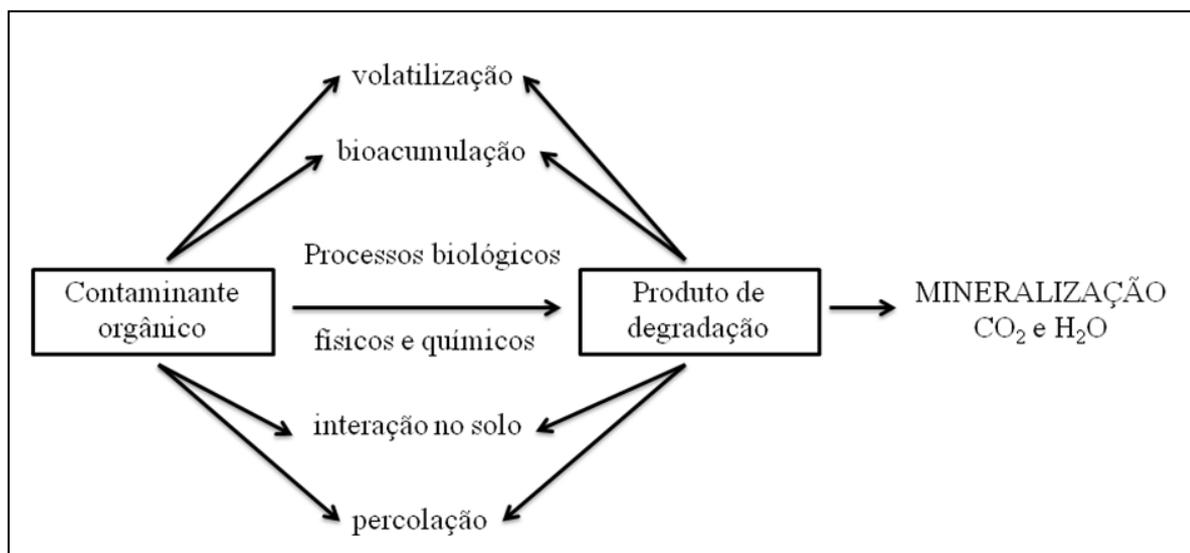


Figura 6. Esquema do destino de contaminantes orgânicos no ambiente. Adaptado de Semple *et al.* (2001).

Apesar dos esforços pela criação de uma base normativa, na prática, atividades como a petrolífera apresentam riscos. No Brasil, já existem algumas leis que visam orientar as atuações da indústria e também impor sanções àquelas que as descumpram. Temos, por exemplo, a Lei Federal no 9.966/2000, que aborda a prevenção e combate aos acidentes ambientais, a resolução CONAMA no 293/2001 que estabelece os princípios a serem obedecidos na movimentação de óleo, entre outros (WEBER, 2005).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – USEPA (2004), uma avaliação de risco é necessária para se analisar as informações sobre as concentrações de substâncias tóxicas em um local para uma estimativa científica detalhada do risco às pessoas que poderão ser expostas a estas substâncias em um determinado local. As avaliações de risco são solicitadas para determinar se os níveis de conteúdos tóxicos nos locais onde ocorre a contaminação possuem risco inaceitável e determinam as estratégias para a mitigação da contaminação do local que poderão assegurar a proteção total da saúde humana e do ambiente.

2.5 MICRORGANISMOS DEGRADADORES DO PETRÓLEO

A biodegradação consiste em um processo onde microrganismos possuem a capacidade de degradar poluentes, transformando estes contaminantes em biomassa e subprodutos (CHAGAS-SPINELLI, 2007)

Nos processos de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos por bactérias e fungos, as condições aeróbias são necessárias para as reações de oxidação. As biotransformações oxidativas de hidrocarbonetos envolvem normalmente as enzimas chamadas oxigenases, as quais catalisam a inserção de um (monooxigenases) ou dois átomos de oxigênio (dioxigenases) em um ponto específico da molécula (BUT e LAMB, 1981; SANTO, 2002;).

A identificação de microrganismos capazes de consumir petróleo, isto é, de usá-lo como fonte de carbono para a geração de biomassa, foram descritos pela primeira vez na literatura em 1946, por Claude E. Zobell (1905-1989), um microbiólogo marinho norte-americano. Zobell verificou que mais de 100 espécies bacterianas representando 30

gêneros diferentes eram capazes de degradar o petróleo (CRAPEZ *et al.*, 2002; NUNES, 2006).

Atlas (1986) refere que mais de 70 gêneros microbianos são capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono. A degradação do petróleo, segundo Hamme *et al.* (2003), depende da natureza química e estado físico dos compostos existentes, além das condições ambientais: temperatura, nutrientes, salinidade, pressão.

Microrganismos degradadores de petróleo têm sido encontrados em diversos habitats como na areia da praia (SANTO, 2002), em solos (CHAGAS-SPINELLI; MENEGHETTI, 2007), solos contaminados por petróleo (MILLIOLI e SANTOS, 2003), em margem de Lagoa (SOUZA *et al.*, 2005), na água do mar (SOUZA e TRIGÜIS, 2005) entre outros. De acordo com Cerniglia (1993) a maioria das bactérias do gênero *Pseudomonas* apresenta importante papel na degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Komagata *et al.* (1964) examinaram cerca de 500 espécies de leveduras quanto à habilidade de utilizar hidrocarbonetos e constatou que 56 espécies possuíam capacidade em degradar, sendo que a maioria delas pertencia ao gênero *Candida*.

Segundo Morgan e Watkinson (1994), os hidrocarbonetos podem ser metabolizados por muitos gêneros de bactérias, fungos filamentosos e leveduras e até mesmo por algas unicelulares. Essa habilidade de degradar hidrocarbonetos como substrato já foi observado em uma grande variedade de gêneros de bactérias (*Pseudomonas*, *Proteus*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Nocardia*) e fungos (*Penicillium*, *Cunninghamella*, *Aspergillus*, *Syncephalastrum*, *Geotrichum*). As bactérias constituem os microrganismos mais estudados, dentre os quais as *Pseudomonas* foram as primeiras a serem postas em evidência em função da sua capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP).

Embora exista uma grande diversidade de microrganismos com potencial de degradar hidrocarbonetos, a biodegradação de um contaminante complexo leva à formação de consórcios microbianos (culturas mistas) que são capazes de catalisar uma variedade de reações. As interações ocorrem em cometabolismo, onde o subproduto de cada etapa é fonte de carbono para a outra, contribuindo assim, no aumento de equipamentos enzimáticos distintos, necessários para a metabolização completa do poluente (CRAPEZ, *et al.*, 2002; SANTO, 2002; LEMOS *et al.*, 2008).

2.6 BIORREMEDIAÇÃO

Diversas técnicas físicas, químicas e biológicas vêm sendo desenvolvidas para remover o petróleo ou reduzir seus efeitos sobre o ecossistema; a biorremediação é uma delas (MILLIOLI e SANTOS, 2003).

Biorremediação é uma tecnologia ecologicamente aceitável que utiliza organismos vivos, principalmente microrganismos, para minimizar ou remover poluentes, tais como petróleo e produtos petrolíferos no ambiente (AUTRY e ELLIS, 1992; BAIRD, 2002; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004). Conforme Santos *et al.* (2007) o tratamento biológico, ao contrário dos processos físicos e químicos, é considerado um método seguro, eficiente e normalmente de menor custo a ser aplicado na remediação de solos contaminados por compostos orgânicos. O uso da biorremediação minimiza o impacto das substâncias recalcitrantes no ambiente, criando condições favoráveis ao crescimento e atividade bacterianas (CRAPEZ *et al.*, 2002).

Gaylarde *et al.* (2005) descrevem biorremediação como: “processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, são utilizados tecnologicamente para remover ou reduzir poluentes no ambiente”. Ela usa a habilidade dos microrganismos ativos e competitivos de biotransformar, remover, degradar ou tornar inócuos os contaminantes orgânicos. Contudo, em substratos imiscíveis em água, a biorremediação é limitada, devido à dificuldade de seu uso pelos microrganismos (PARASZKIEWICZ *et al.*, 2002; DAMS, 2007;).

A biorremediação inclui estratégias como: a utilização de microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de agentes estimulantes como

nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação); e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (BENTO *et al.*, 2003). A vantagem desses processos é a mineralização do poluente, obtendo como produto final CO₂ e água pela via aeróbica, assim como a formação de biomassa (CUNHA, 1996; MARIANO, 2006).

Os processos de biorremediação podem atuar em condições tanto aeróbicas como anaeróbicas. Os tratamentos aeróbicos são processos oxidativos na medida em que os microrganismos (bactérias e fungos) servem-se dos resíduos como fonte de energia. Comumente as degradações mais rápidas e completas são obtidas com microrganismos aeróbios, ainda que, existam muitos compostos orgânicos que podem ser degradados por microrganismos anaeróbios, como o perclorado hexaclorobenzeno - HCB (BAIRD, 2002).

Os tratamentos de biorremediação podem ser feitos *in situ*, ou seja, no próprio local de contaminação ou *ex-situ*, que requer a transferência do solo para outro local onde o tratamento seja realizado (PALA, 2002). O sucesso da biorremediação quer seja *in situ* ou *ex situ*, está inteiramente ligado a uma compreensão abrangente das condições locais e a uma avaliação cuidadosa da aplicabilidade de uma determinada tecnologia (SANTOS *et al.*, 2007). A biorremediação pode ser empregada em acidentes com derramamento de petróleo, tratamento de resíduos, remoção e/ou recuperação de metais pesados, degradação de compostos químicos, entre outros.

As raízes das plantas podem estimular a microbiota do solo, a qual pode contribuir para o aumento da eficiência do processo de remediação. Walton e Anderson (1990) sugeriram que a rizosfera (volume de uma fina camada de solo que recebe influência das raízes) pode facilitar a degradação microbiana de compostos perigosos no solo. Na rizosfera essa degradação pode ocorrer pela transferência adicional de oxigênio do sistema de raízes ao solo, causando uma melhora da mineralização dos compostos orgânicos e estimulação da modificação co-metabólica de substâncias químicas (ANDERSON *et al.*, 1993).

De acordo com Baird (2002), para se obter efetividade no uso da técnica de biorremediação, devem ser cumpridas várias condições:

- Os resíduos devem ser suscetíveis à degradação biológica e estar presentes sob uma forma física acessível para os microrganismos.
- Os microrganismos apropriados devem estar disponíveis.
- As condições ambientais – tais como pH, temperatura e nível de oxigênio – devem ser adequadas.

De acordo com Mariano (2006) algumas condições hidrogeológicas devem ser analisadas antes da implementação da biorremediação como: a permeabilidade do solo e materiais de subsuperfície, o tipo de solo (devido ao grau de adsorção de contaminantes e nutrientes), a profundidade do nível d'água, a concentração de minerais (nutrientes básicos exigidos para o desenvolvimento microbiano), o potencial Redox (concentração de O₂), o pH (enzimas requerem um grau de protonação e este processo é controlado pelo pH) e a temperatura (baixa ou alta).

A biorremediação de substratos imiscíveis em água é limitada devido à dificuldade de seu uso pelos microrganismos. Alguns deles, porém, produzem compostos extracelulares anfipáticos (biossurfactantes), os quais apresentam propriedades emulsificantes, dispersantes e solubilizantes, podendo proporcionar a utilização de substratos hidrofóbicos pelos microrganismos devido ao aumento da interação superficial água/óleo, acelerando a degradação e promovendo a biorremediação (BANAT *et al.*, 2000; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

2.7 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO SOLO

Os solos são corpos naturais que compõem a cobertura pedológica que reveste as áreas emersas da Terra. Tem seu desenvolvimento em escalas de tempo da ordem de centenas a milhares de anos. Sua cobertura é constituída por uma camada de material alterado por inúmeras combinações de fatores (clima, organismos, tempo, relevo) e de processos (remoção, adição, transporte e transformação) que atuam sobre os materiais de

origem (rochas, sedimentos, depósitos orgânicos) e condicionam a variedade de solos encontrados (PEDRON *et al.*, 2004).

Os solos formam um sistema heterogêneo, composto por fases sólida, líquida e gasosa (SMILES, 1988). Segundo Rocha *et al.* (2004), na composição volumétrica porcentual de um solo que apresenta ótimas condições para o crescimento de plantas, verificam-se 50% de fase sólida (45% de origem mineral e 5% de orgânica), 25% de fase líquida e 25% de fase gasosa. A fase sólida é resultante da desagregação física das rochas. Consiste em uma mistura de compostos orgânicos e minerais cujas superfícies apresentam cargas permanentes ou pH-dependentes (ROCHA *et al.*, 2004; SILVA e BOHNEN, 2006). A fase líquida, isoladamente, caracteriza a umidade do solo, e é representada pela água ou solução do solo, contendo íons como H_2PO_4^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , H^+ , NH_4^+ , etc. e pode estar presente completa ou parcialmente no solo (ANDRADE, 2004; LEITE *et al.*, 2005). A fase gasosa caracteriza a porosidade de aeração do solo ou porosidade livre de água, a qual contém gases como CO_2 , O_2 , N_2 , NH_3 e vapor de água (ANDRADE, 2004).

A água contida no solo é caracterizada, conforme Leite *et al.* (2005), em cinco tipos (Figura 7): 1. Água de constituição – faz parte da estrutura molecular da partícula sólida; 2. Água adesiva ou adsorvida - aquela película de água que envolve e adere fortemente a partícula sólida; 3. Água livre - a que se encontra em uma determinada zona do terreno, enchendo todos os seus vazios; o seu estudo rege-se pelas leis da Hidráulica; 4. Água hidrocópica - que ainda se encontra em um solo ao ar livre; 5. Água capilar - é aquela que nos solos de grãos finos sobe pelos interstícios capilares deixados pelas partículas sólidas, além da superfície livre da água.

Conforme Ruellan (1988) o solo desempenha quatro papéis importantes como: 1) suporte para a geração de alimento; 2) suporte para a geração de materiais e energia, 3) exerce grande influencia sobre o comportamento das águas; 4) suporte das construções dos homens.

De acordo com Lavelle (2000), o solo é composto por domínios funcionais, tais como: rizosfera, termitosfera, drilosfera, entre outros. A rizosfera consiste no volume de solo influenciado pelas raízes das plantas; a termitosfera é o ambiente influenciado por cupins; a drilosfera, o ambiente influenciado por minhocas. Esses domínios são formados por ações de reguladores: plantas, fauna do solo, condições edafoclimáticas, entre outras (ZILLI *et al.*, 2003).

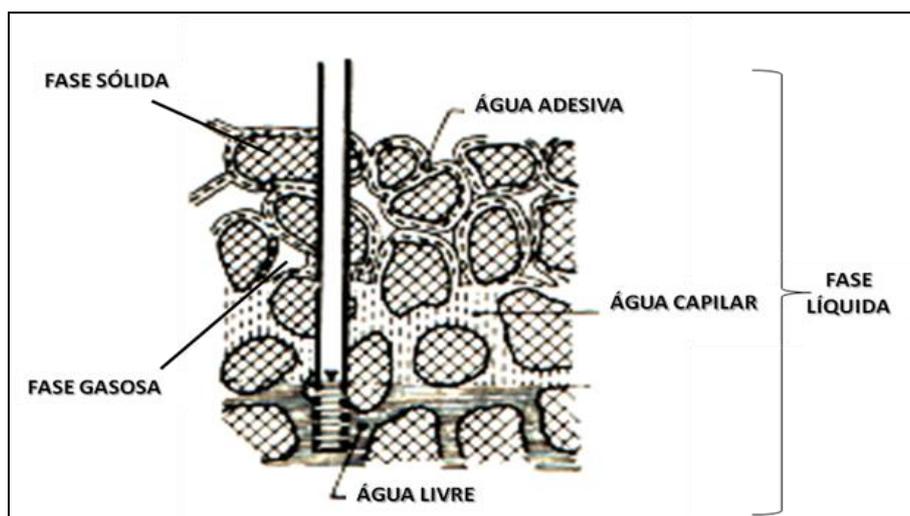


Figura 7. Fases do solo e tipos de água contida no solo. Adaptado de Leite *et al.* (2005).

2.8 SOLOS DA AMAZÔNIA

Na Amazônia, a grande diversidade geológica presente, aliada ao seu relevo específico, resultou na formação das mais variadas classes de solo, sob a influência das

altas temperaturas e precipitações, características do clima tropical úmido (CHIG *et al.*, 2008).

De acordo com Vieira e Santos (1987), predominam na Amazônia os Latossolos Amarelos e os Argissolos, que são solos altamente intemperizados, com características físicas adequadas ao uso agrícola, mas com fortes limitações nutricionais.

Os latossolos ou solos de terra-firme, geralmente são pobres e a disponibilidade de nutrientes para as plantas depende grande parte da reciclagem da matéria orgânica e da ação dos organismos. Os argissolos possuem pouca porosidade, estrutura tipo blocos, sendo muito duros quando secos e muito pegajosos quando úmidos (RESENDE *et al.*, 1997). Os principais obstáculos de fertilidade dos solos da Amazônia são a acidez elevada, baixa capacidade de troca de cátions, deficiência de N, P K, S, Ca, Mg, B, Cu, Zn e também a alta capacidade desses solos em fixar o P aplicado como fertilizante (SANCHEZ e COCHRANE, 1980).

2.9 OS MICRORGANISMOS DO SOLO E RIZOSFERA

O solo estabelece um excelente habitat microbiano onde se desenvolve uma ampla e diversificada comunidade de organismos representada principalmente por bactérias, actinomicetos, fungos, protozoários e algas, além das partículas de vírus e animais invertebrados micro e macroscópicos (SIQUEIRA, 1988).

A atividade microbiana é o resultado de numerosos processos microbiológicos e bioquímicos distintos, sendo de natureza diversa e efeitos benéficos ou maléficos sobre o crescimento das plantas (SIQUEIRA, 1988). Os seres vivos que habitam o solo trocam continuamente substâncias com o meio e ao morrerem, liberam o material que os constituía com a lise da parede celular (MELLO, 1988).

A comunidade microbiana é muito maior na rizosfera do que no solo não rizosférico. Segundo Chin-hua e Palada (2006), a rizosfera é o volume de uma fina camada de solo que recebe influência das raízes, onde importantes processos fisiológicas ocorrem nesta zona como a absorção de nutrientes minerais e atividade microbiana realçada por exsudado da raiz (Figura 8).

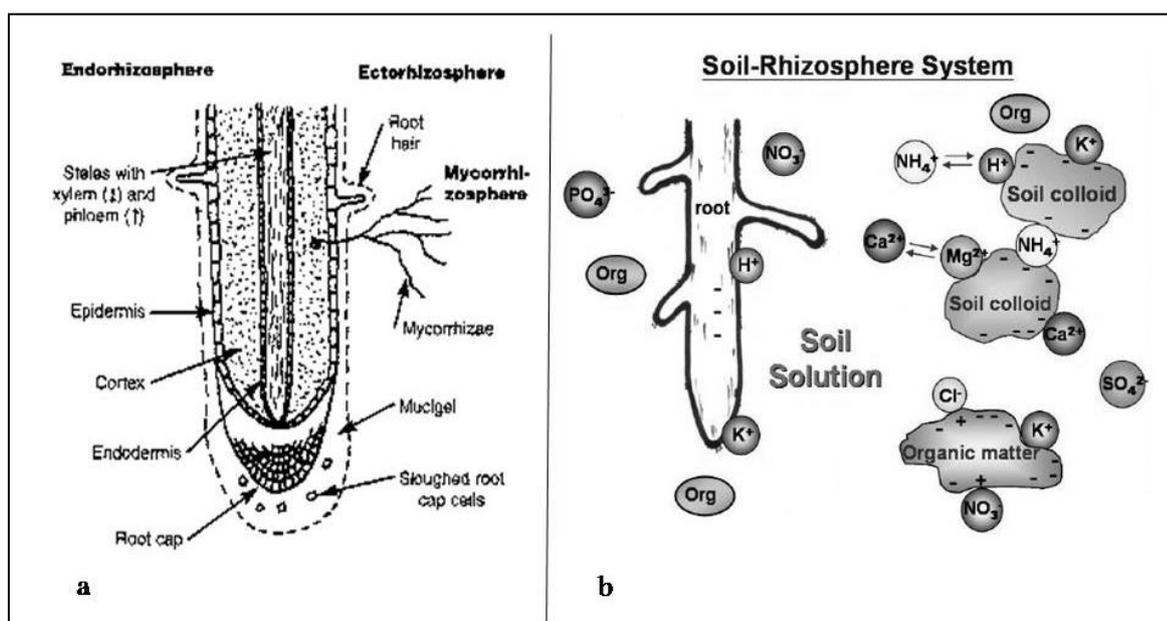


Figura 8. Diagrama da Rizosfera (a); Componentes que dizem respeito à disponibilidade de nutrientes no sistema solo-rizosfera (b). Adaptado de Vital Earth (2009); AVRDC, Ma, 2006 apud Chin-hua e Palada (2006).

De acordo com Anderson *et al.* (1993), o número de microrganismos nos solos rizosféricos é normalmente de 5 a 10 vezes maior que naqueles não-rizosféricos, mas pode chegar a mais de 100. O que garante à rizosfera as suas características é a presença, em grande quantidade, de exsudatos e outros materiais originados nas raízes, que, pela sua natureza orgânica, servem de fonte de energia e de nutrientes para os microrganismos do solo.

Os microrganismos utilizam como nutrientes, os exsudatos e lisados radiculares, o mucigel e as células vegetais que se descamam. O meristema apical origina as raízes, e elas são o componente básico da rizosfera. O meristema produz a coifa, que protege e coopera na penetração da raiz no solo, tendo células vivas e ricas em amido (CARDOSO e FREITAS, 1988).

Conforme Cardoso e Freitas (1988), na rizosfera as bactérias gram-negativas e não esporuladas predominam sobre as gram-positivas e esporuladas respectivamente. Além disso, a baixa tensão de O₂ originada pela intensa atividade respiratória das raízes e dos microrganismos aeróbios estimula as bactérias anaeróbias.

Estudos sobre a diversidade microbiana da rizosfera (GRAYSTON *et al.* 1998; PEREIRA, 2000; MARSCHNER *et al.*, 2001; MIETHLING *et al.*, 2003) têm demonstrado qual a influência das plantas na estrutura das comunidades de microrganismos dos solos. Os microrganismos estão inteiramente envolvidos nos ciclos dos nutrientes no solo e, associada à quantificação de bactérias e fungos totais, a avaliação de determinados grupos microbianos oferece indicação de como os processos bioquímicos estão ocorrendo (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Outros estudos têm sugerido que a rizosfera de plantas pode ser particularmente importante na promoção biológica para degradação de hidrocarbonetos do petróleo, xenobióticos, pentaclorofenol, dentre tantos outros (CROWLEY *et al.*, 1996; PIRES *et al.*, 2005; DAMS, 2007; NAKATANI *et al.*, 2008). Isso porque a rizosfera possui uma grande biomassa microbiana e uma maior atividade como resultado de substratos de carbono favorecido pela rizodeposição. As raízes das plantas podem estimular a microbiota do solo, a qual pode cooperar para o aumento da eficiência do processo de remediação (NAKATANI *et al.*, 2008).

2.10 PROVÍNCIA PETROLÍFERA DE URUCU

No município de Coari-AM, às margens do Rio Urucu, distante cerca de 650 km em linha reta de Manaus, desde 1986 a Província Petrolífera de Urucu vem realizando atividades de exploração e produção de petróleo e gás natural pela Petrobras S.A. na base de operações, que leva o nome do Geólogo Pedro de Moura (PETROBRAS, 2009b).

A produção média de petróleo em Urucu é cerca de 50 mil barris por dia, enquanto a de gás natural é de 10,36 mil metros cúbicos por dia. Esse volume faz do Amazonas um importante produtor nacional. Produzindo anualmente mais de 2 bilhões de litros de petróleo, a arrecadação de tributos oriundos da produção em Urucu faz de Coari o maior recebedor de royalties de campos terrestres do Brasil (PETROBRAS, 2009b).

O petróleo de Urucu é transportado dos poços para a planta central (Polo Arara) através de linhas de surgências (oleodutos) construídas em 1997. Para facilitar os trabalhos de manutenção desses dutos, a Petrobras mantém uma faixa de ambos os lados desses dutos com uma vegetação rasteira (Figura 9), composta de gramíneas como duas espécies de braquiária (*Brachiaria humidicola*, *Brachiaria decumbens*), uma leguminosa de ocorrência esporádica (*Mucuna pruriens*) e o lacre (*Vismia guianensis*), sendo este, um componente de plantas invasoras pioneiras que ocorrem espontaneamente na região.

Estudos revelam que a biodegradação de alguns poluentes orgânicos tem sido favorecida na presença de raízes e exsudatos (MAFIA *et al.*, 2007; NAKATANI *et al.*, 2008). Isso porque na rizosfera há uma grande biomassa microbiana e uma maior atividade como resultado de substratos de carbono favorecido pela rizodeposição. Por ser um nicho ainda pouco estudado, a rizosfera tem sido explorada como um recurso natural de microrganismos de importância agrícola e ambiental.



Figura 9. Plantas ao redor do oleoduto da Província Petrolífera de Urucu.
Foto: Luiz Antonio.

Apesar da importância de atividades bacterianas na biorremediação de solos e/ou águas contaminadas por petróleo e seus derivados ser reconhecida há muito tempo, até o presente, no entanto, não há informações sobre a natureza e diversidade dos microrganismos da rizosfera das plantas ao redor do oleoduto de Urucu. Como acidentes são passíveis de ocorrer em oleodutos, nosso objetivo é coletar amostras de solo da rizosfera de plantas (espécies plantadas e espécie invasora, o lacre) ao redor de oleodutos de Urucu (Coari), para identificar a comunidade microbiana que possui potencial em degradar o petróleo visando seu uso futuro em biorremediação.

2.10.1. ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DAS PLANTAS DE URUCU

a) O quicuío-da-Amazônia (*Brachiaria humidicola*)

A *Brachiaria humidicola* é uma espécie natural da África Equatorial; pertencente à família Poaceae, é amplamente utilizada para pastagens nos trópicos, cresce na Amazônia e apresenta como características, alta capacidade de adaptação a vários tipos de solos, especialmente os de baixa fertilidade e com alto nível de umidade. As folhas apresentam cores verde-pálidas e fortemente denticuladas nas margens. São resistentes ao pastejo e apresentam boa tolerância ao encharcamento, podendo ser plantadas em várzeas. Produz pouca semente (até 50 kg/ha). Seu principal atributo são os fortes estolões produzidos com a alta habilidade de enraizamento, promovendo rápida cobertura do solo (BOLDRINI *et al.*, 2006; VILELA, 2009).

b) O capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*)

A *Brachiaria decumbens* é originária da Região dos Grandes Lagos em Uganda (África) pertencente à família Poaceae, sendo importantes forrageiras. A *B. decumbens* uma espécie vigorosa e perene, resistente à seca, adaptando-se bem em regiões tropicais úmidas. É pouco tolerante ao frio e cresce bem em diversos tipos de solo, porém, requer boa drenagem e condições de média fertilidade, vegetando bem em terrenos arenosos e argilosos (TOLEDO *et al.*, 1999; LORENZI e SOUZA, 2000; VILELA, 2009).

c) A mucuna preta (*Mucuna pruriens*)

A *Mucuna pruriens* é uma leguminosa anual, originária do Sudeste da Ásia, pertencente à família Fabaceae. É tolerante à seca, sombra, altas temperaturas e ligeiramente resistente ao encharcamento, sendo grande produtora de massa verde. Adapta-se aos mais diferentes tipos de solo, desde os arenosos até os argilosos, com média fertilidade e é grande produtora de matéria orgânica (VILELA, 2009).

d) O lacre (*Vismia guianensis*)

O lacre é uma planta arbórea, pertencente à família Clusiaceae, é encontrado na região amazônica e nos estados do Nordeste, sendo constituídos por pequenas árvores e arbustos e se encontram principalmente em florestas de várzeas e capoeiras. Possui uma seiva de goma resinosa, cor alaranjada, que é popularmente utilizada como remédio no tratamento de micoses superficiais da pele (SANTOS *et al.*, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERÍSTICAS DA ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na Província Petrolífera de Urucu, Coari (Figura 10) situada no município de Coari, no estado do Amazonas, às margens do Rio Urucu, distante cerca de 650 km em linha reta de Manaus. O clima é classificado como tropical úmido, de acordo com a classificação de Köppen. A umidade relativa do ar é bastante elevada em toda a região, em torno de 80%.



Figura 10. Base da Província Petrolífera de Urucu. Fonte: Google Earth (2008).

A tipologia florestal dominante é a Floresta Pluvial Tropical Densa de Terra Firme. Apresenta chuvas relativamente abundantes durante todo o ano (média de 2.250 mm), sendo que a precipitação no mês em que menos chove é sempre superior a 60 mm. A temperatura média anual da região é de aproximadamente 26°C (VIEIRA e SANTOS, 1987).

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO

Para o presente estudo foram realizadas quatro coletas na Província Petrolífera de Urucu (Figura 11), nos Campos de RUC e LUC. As coletas foram baseadas conforme o ciclo hidrológico da região, duas coletas em época chuvosa (29/01/2009 e 19/06/2009) e duas em

época de seca (24/09/2009 e 25/11/2009), sendo obtidas de plantas ao redor do oleoduto, duas espécies de gramíneas (*Brachiaria humidicola*, *Brachiaria decumbens*), uma leguminosa (*Mucuna pruriens*) e um lacre (*Vismia guianensis*). Após as coletas, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno em caixas de isopor com gelo seco à temperatura de 2-4° C (ANDERSON e INGRAM, 1993).



Figura 11. Plantas ao redor do oleoduto (a,b); Coleta das amostras na Base da Província Petrolífera de Urucu (c). Fotos: Dannielle Ribeiro e Francisco Wesen.

3.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SOLO

Os atributos físico-químicos dos solos foram realizados no Laboratório Temático de Análise de Plantas e Solo localizado na Coordenação de pesquisas em Ciências Agronômicas do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA)

3.3.1 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA

O método da pipeta foi utilizado para determinação dos percentuais de areia, silte e argila. Os procedimentos laboratoriais empregados na análise da granulometria estão descritos no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997).

3.3.2 ANÁLISE QUÍMICA

As análises químicas foram realizadas segundo metodologias descritas e recomendadas pela EMBRAPA (1997). Após serem secas ao ar e peneiradas, as amostras do solo foram analisadas para N, P, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn, Al, H⁺ + Al³⁺, pH e teor de matéria orgânica. O Nitrogênio foi determinado por digestão sulfúrica pelo método semi-micro Kjeldahl. O P foi extraído com solução extratora HCl 0,05 1N e H₂SO₄ 0,025 1N (Mehlich 1). O fósforo assimilável foi determinado por colorimetria com vanadato-molibdato de amônio; os elementos K, Ca, Mg, Zn, Fe, e Mn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. O Al foi determinado por titulometria e a acidez potencial H⁺+Al³⁺ foi medida por extração com solução tampão de acetato de cálcio 1N pH 7,0. O pH foi medido em água destilada (1:2,5) e o C foi determinado por oxidação via úmida com dicromato de potássio em ácido sulfúrico.

3.4 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS

Os ensaios de biodegradação do petróleo, com o intuito dimensionar a população de microrganismos das quatro espécies de solos rizosféricos da Província Petrolífera de Urucu onde há maior ocorrência de microrganismos degradadores de petróleo, foram determinados por meio do enriquecimento das amostras. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Genômica de Microrganismos localizado na Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas (CPCA) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

Para melhor análise os ensaios de enriquecimento foram divididos em tratamentos com triplicata, como apresentado na tabela 1. Cada amostra foi submetida a dois tratamentos diferentes: ausência de petróleo (testemunha) e adição de petróleo.

As amostras de solo rizosférico (5g) foram adicionadas em erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de Meio Mineral Bushnell Haas – BH (Tabela 2) modificado, contendo como fonte de carbono o petróleo de Urucu na concentração de 0,5 mL.

Os tratamentos foram colocados em mesa agitadora (125 rpm) à temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Nas primeiras horas (dia 0) foi realizada diluição seriada para estimar a produção das bactérias, fungos e leveduras que apresentaram crescimento na presença de petróleo. O mesmo procedimento era realizado a cada 7 dias.

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento.

TRATAMENTOS	SOLO RIZOSFÉRICO	MEIO MINERAL BH	PETRÓLEO
T1	<i>Vismia guianensis</i>	Presente	Ausente
T2	<i>Vismia guianensis</i>	Presente	Presente
T3	<i>Mucuna pruriens</i>	Presente	Ausente
T4	<i>Mucuna pruriens</i>	Presente	Presente
T5	<i>Brachiaria decumbens</i>	Presente	Ausente
T6	<i>Brachiaria decumbens</i>	Presente	Presente
T7	<i>Brachiaria humidicola</i>	Presente	Ausente
T8	<i>Brachiaria humidicola</i>	Presente	Presente

Tabela 2. Meio Mineral Bushnell Haas (Meio BH)

Componentes	Quantidade
KH_2PO_4	1,0g
K_2HPO_4	1,0 g
* NH_4NO_3	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
FeCl_3	0,05 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
H_2O destilada	1000 mL

*Substituído por 1,65g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Fonte: Atlas (1995)

Para a contagem microbiana, foi realizada diluição seriada, onde 1 mL da amostra foi adicionado em tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada estéril. As concentrações analisadas foram de 10^{-2} a 10^{-7} . A partir de cada diluição foi retirada uma alíquota de 0,5mL e esta foi colocadas em Placas de Petri contendo meio de cultura BH sólido (adicionando-se 15g de Agar por litro), usando petróleo como fonte de carbono (0,1mL por placa), com três

repetições para cada concentração. Esse processo foi feito com as testemunhas (cultura sem petróleo) e com os tratamentos enriquecidos (cultura com petróleo).

Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura ambiente de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 48 a 72 horas. A contagem das unidades formadoras de colônia por grama de solo (UFC/g solo) foi realizado com auxílio de um contador de colônias.

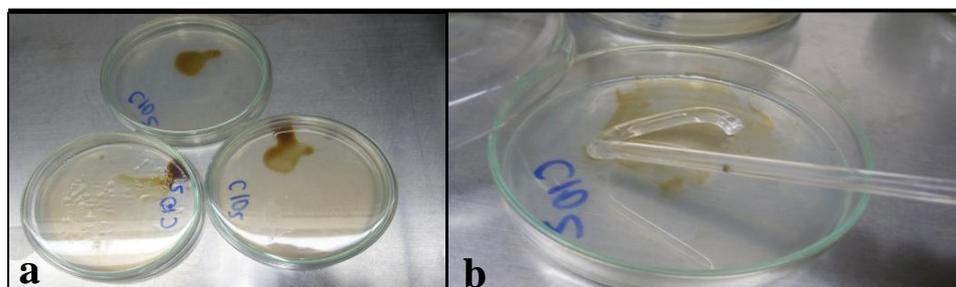


Figura 12. Placas de Petri contendo meio BH sólido e 0,1 mL de petróleo; (b) Petróleo sendo espalhado na placa. Fotos: Dannielle Ribeiro.

3.5 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

Após o crescimento e contagem das UFC, as diferentes colônias que cresceram isoladas foram repicadas em placas de Petri contendo Meio BH sólido, utilizando como fonte de carbono o petróleo (0,1mL por placa). Os microrganismos foram isolados e purificados pela técnica de estrias em placas. Cada colônia com aspecto morfológico diferenciado foi preservado em meio de cultura em tubo inclinado contendo Meio BH sólido, empregando glicose (10g/L) como fonte de carbono para testes posteriores.

A identificação preliminar dos microrganismos foi analisada através da microscopia óptica para a caracterização dos diferentes grupos microbianos. O tempo de crescimento dos microrganismos isolados foi determinado por meio da repicagem em placas de Petri contendo Meio BH sólido, utilizando como fonte de carbono o petróleo (0,1mL por placa).

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO

A avaliação da capacidade dos isolados em degradar petróleo foi realizada pela técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), segundo Hanson *et al.* (1993). Mariano *et al.* (2007) descrevem que o princípio deste teste é que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores (como oxigênio e nitrato). Ao incorporar um aceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido).

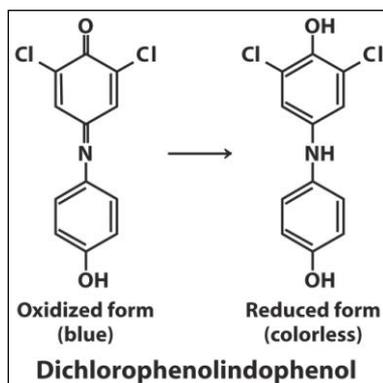


Figura 13. Oxidação e redução do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP). Fonte: Medina (2005).

Os microrganismos foram incubados em placa de Petri contendo o meio de cultura BH sólido e 0,1mL de petróleo, a 30°C por 24 a 72 horas. Após o crescimento, os microrganismos foram padronizados por meio de uma suspensão do inóculo, acrescentando-se 5mL de $MgSO_4$ (2g/L) em placa.

O ensaio foi realizado em placas de acrílico (Tipo ELISA) com 96 poços previamente tratados sob luz ultravioleta (UV) por 30 minutos, contendo 125 μ L de meio Mineral BH (sem fonte de carbono), 100 μ L do DCPIP, 5 μ L de petróleo de Urucu e 15 μ L de inóculo padronizado a 10^4 UFC/mL, sendo determinado o número de células em Câmara de Neubauer.

O experimento constou com quatro controles: A-Controle negativo (abiótico) contendo Meio Mineral BH (125 μ L), indicador DCPIP (100 μ L), petróleo de Urucu (5 μ L) e água destilada estéril (15 μ L); B- Controle biótico (sem petróleo) contendo Meio Mineral BH (125 μ L), indicador DCPIP (100 μ L) e 15 μ L de inóculo padronizado a 10^4 UFC/mL; C- Controle biótico (sem o indicador DCPIP) contendo 125 μ L de meio Mineral BH, 5 μ L de petróleo de Urucu e 15 μ L de inóculo padronizado a 10^4 UFC/mL; D – Controle positivo (biótico) com a substituição da fonte de carbono (petróleo por glicose) contendo 125 μ L de meio Mineral BH com glicose (125 μ L), indicador DCPIP (100 μ L) e 15 μ L de inóculo padronizado a 10^4 UFC/mL.

As placas de acrílico foram incubadas a 30°C e a cada 24 horas foi observado o desaparecimento da coloração azul do indicador DCPIP (forma oxidada) para a incolor (forma reduzida). A leitura positiva foi dada após estes tempos pela descoloração do DCPIP. Os experimentos foram realizados em triplicata.

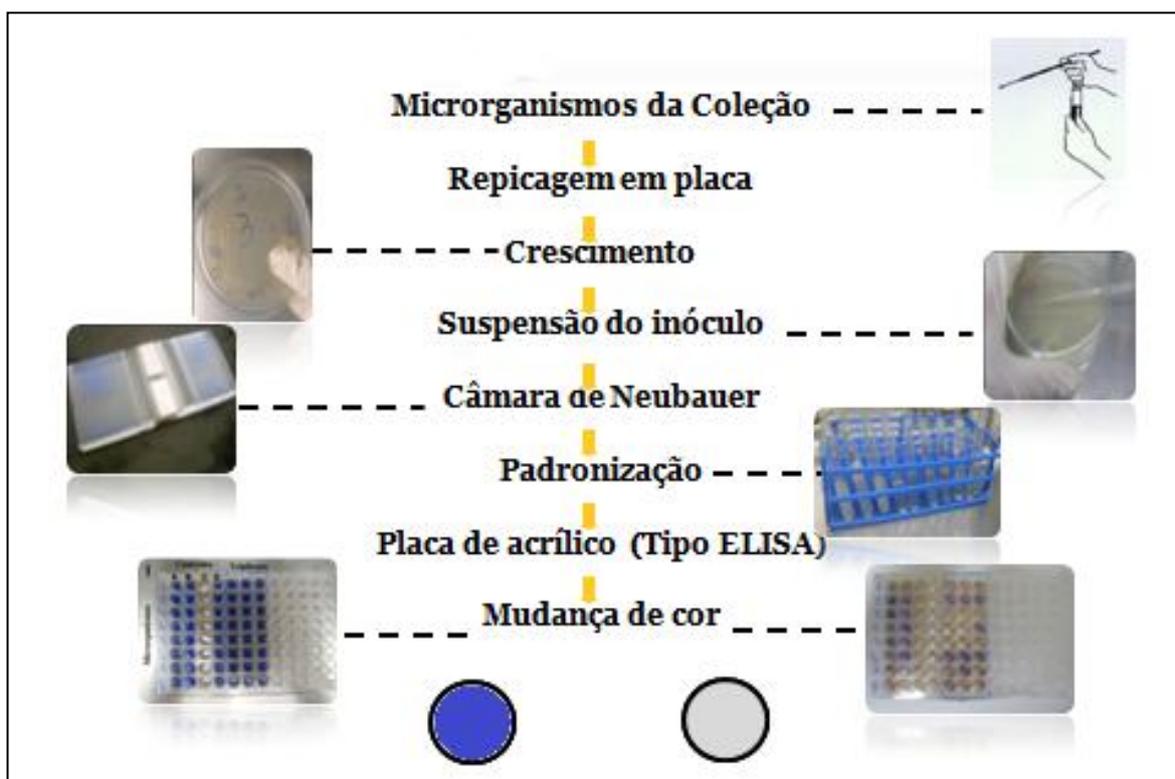


Figura 14. Esquema da avaliação do potencial de degradação de petróleo.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa utilizado para as análises estatísticas foi o Assistat 7.5 Beta, utilizando-se as comparações entre as médias das amostras para análise de variância. Os dados

foram submetidos à análise de variância com 5% de significância pelo Teste “F” e quando significativo, usou-se o teste de Tukey a 5%, para a comparação das médias dos tratamentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SOLO

Os resultados da granulometria do solo das quatro espécies de plantas em épocas distintas são apresentados na forma de valores médios de areia, silte e argila para cada solo rizosférico, sendo apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Textura média dos solos rizosféricos em épocas distintas de precipitação, na região de Urucu-Coari-AM.

Amostras	Época	Prof.	Argila	Silte	Areia
			----- % -----		
<i>Vismia guianensis</i>	chuva	0-20	28	38	34
	seca	0-20	26	35	39
<i>Mucuna pruriens</i>	chuva	0-20	21	15	64
	seca	0-20	24	10	66
<i>Brachiaria decumbens</i>	chuva	0-20	18	22	60
	seca	0-20	23	28	49
<i>Brachiaria humidicola</i>	chuva	0-20	27	31	42
	seca	0-20	30	15	55

Os resultados das análises granulométricas das amostras de solos rizosféricos coletadas em época chuvosa indicam que a textura predominante em *Vismia guianensis* é o silte e em *Mucuna pruriens*, *Brachiaria humidicola* e *Brachiaria decumbens* é o franco-arenoso. Na época seca a textura do solo predominante em todas as espécies é o franco-arenoso.

Os resultados da análise química são apresentados na forma de valores médios, conforme as tabelas 4 e 5. Nos solos rizosféricos de plantas, a quantidade de carbono orgânico e nitrogênio foram, na sua maioria, são considerados baixos. A relação C/N indica que há material orgânico bem decomposto.

Tabela 4. Teores de carbono, nitrogênio, relação C/N e matéria orgânica dos solos amostrados das rizosferas de plantas em épocas distintas de precipitação, na região de Urucu-Coari-AM.

Amostras	Época	Prof.	-----g/kg de solo-----			
			C	N	C/N	M.O
<i>Vismia guianensis</i>	chuva	0-20	3,38	1,07	3,15	4,06
	seca	0-20	3,30	0,95	3,47	5,68
<i>Mucuna pruriens</i>	chuva	0-20	0,95	0,45	2,11	1,57
	seca	0-20	0,78	0,34	2,29	1,35
<i>Brachiaria decumbens</i>	chuva	0-20	1,24	0,55	2,25	2,32
	seca	0-20	1,99	0,70	2,84	3,42
<i>Brachiaria humidicola</i>	chuva	0-20	1,37	0,64	2,14	2,35
	seca	0-20	3,64	0,21	17,3	5,26

Os resultados apresentados a seguir são referentes às amostras de solos de plantas coletadas em duas épocas distintas, na província Petrolífera de Urucu.

Tabela 5. Características químicas dos solos rizosféricos de plantas dos solos amostrados das rizosferas de plantas em épocas distintas de precipitação, na região de Urucu-Coari-AM.

Amostras	Época	Prof.	pH	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Al ⁺⁺⁺	K ⁺	P	Fe	Zn	Mn
			(H ₂ O)	-----cmolc/kg-----				-----mg/kg-----			
<i>Vismia guianensis</i>	chuva	0-20	4,4B	0,5M	0,18B	0,41M	0,11B	0,01B	92,8A	1B	2,36B
	seca	0-20	5,3B	2,3A	0,20B	0,13B	0,21M	10,2A	333A	1,3B	1,9B
<i>Mucuna pruriens</i>	chuva	0-20	6,8M	1,2M	0,11B	0B	0,15B	0,12B	103,4A	0,86B	3,84B
	seca	0-20	7,5M	4,2A	0,10B	0B	0,17B	109A	246A	1,9B	1,8B
<i>Brachiaria decumbens</i>	chuva	0-20	7,4M	0,5M	0,14B	0B	0,27M	0,3M	145,4A	1,48B	3,74B
	seca	0-20	6,5M	5,9A	0,21B	0B	0,20M	92A	188A	1,9B	2,6B
<i>Brachiaria humidicola</i>	chuva	0-20	4,7B	0,6M	0,13B	0,3M	0,22M	0,004B	101,6A	0,76B	2,48B
	seca	0-20	6,9M	5,2A	0,24B	0B	0,16B	12A	115A	1,8B	4,2B

A classificação dos valores segundo Cochrane *et al.* (1985): A = alto; B = baixo; M = médio; S = satisfatório

Através dos dados é possível perceber que os solos rizosféricos sofreram o processo de calagem (Tabela 5). Possivelmente devido aos efeitos sobre a neutralização da acidez do solo, ao aumento do pH (RAIJ *et al.*, 1977), à redução do alumínio e manganês tóxicos (MASCARENHAS *et al.*, 1982), ao aumento da absorção de nitrogênio, fósforo e potássio (QUAGGIO *et al.*, 1993), ou ainda pelo fato de fornecer cálcio e magnésio como nutrientes (MASCARENHAS *et al.*, 1976).

Os valores do pH dos solos variaram de 4,4 a 7,5, indicando neutralidade (Tabela 5). O pH no período chuvoso dos solos rizosféricos de *Mucuna pruriens* e *Brachiaria decumbens* apresentaram acidez mediana e *Vismia guianensis* e *Brachiaria humidicola* são

consideradas de baixo pH (COCHRANE *et al.*, 1985). O pH no período seco dos solos rizosféricos de *Mucuna pruriens* e *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* apresentaram acidez mediana (Cochrane *et al.*, 1985) e *Vismia guianensis* é considerada de baixo pH.

As concentrações de Al no período chuvoso foram considerados médio em *Vismia guianensis* e *Brachiaria humidicola* e baixo em *Mucuna pruriens* e *Brachiaria decumbens*. Já no período seco as concentrações de Al foram consideradas baixas em todas as amostras de solo. As concentrações superiores a 1,5 cmol/kg de solo, podem ser tóxicas para a maioria das plantas cultivadas.

Os teores de K no período chuvoso nos solos rizosféricos de *Vismia guianensis* e *Mucuna pruriens* foram considerados baixos (<0,15 cmolc. de K kg⁻¹ de solo), segundo Cochrane *et al.* (1985) e em *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* são considerados médio.

Os teores de K no período seco nos solos rizosféricos de *Mucuna pruriens* e *Brachiaria humidicola* foram considerados baixos (<0,15 cmolc. de K kg⁻¹ de solo), segundo Cochrane *et al.* (1985) e em *Vismia guianensis* e *Brachiaria decumbens* são considerados médio.

Os teores de P no solo no período seco foram superiores quando comparados ao período chuvoso. Quanto aos teores de micronutrientes encontrados nos solos rizosféricos nos dois períodos, observou-se alta variação para o Fe e pouca para o Zn e Mn. Os teores de Fe variaram de 92,8 a 145,4 mg kg⁻¹ de solo no período chuvoso e 115 a 333 mg kg⁻¹ de solo no período seco. Os teores de Zn Mn foram considerados baixos.

4.2 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS

As populações de bactérias presentes nas rizosferas das quatro espécies vegetais coletadas no período chuvoso cresceram até o 14^o dia de incubação (Figura 15), independente da adição de petróleo ou não como fonte de carbono. No entanto, a adição do petróleo resultou em maior crescimento nos tratamentos contendo solos rizosféricos de *Vismia* (Fig. 15 a), *Mucuna* (Fig. 15 b) e *B. humidicola* (Fig. 15 d), indicando que essas bactérias usaram tanto as fontes de carbono presentes no solo como o próprio petróleo para crescerem. Esse comportamento só foi diferente com a população de bactérias presente na rizosfera de *B. decumbens* (Fig. 15 c), que cresceu de forma significativamente semelhante, independente da adição ou não do petróleo durante o período de incubação.

É possível, nesse caso, que a maioria da população de bactérias presentes na rizosfera dessa gramínea esteja totalmente adaptada para consumir o petróleo colocado nas placas de petri, independentemente de estar ou não incubada previamente com esse componente orgânico. Já as populações presentes nas rizosferas das outras espécies, pelo menos em parte, ainda não estavam adaptadas ao petróleo. Ao serem adicionadas nas placas de petri contendo o petróleo como fonte de carbono, apenas aquela parte da população dos frascos testemunhas, capaz de usar o petróleo, cresceu no meio com sua adição, sendo portanto, menor do que as dos frascos incubados com esse componente orgânico, que foi usado pela parte da população adaptada, que por isso, apresentou maior população até o 14^o dia de incubação.

Ao se analisar as escalas de valores nos eixos y da Figura 15, percebe-se que a população de bactérias capazes de usar o petróleo foi bem menor na rizosfera do lacre (*Vismia guianensis*), que não chegou a atingir cerca de 2500.10⁵ UFC/g Solo, enquanto que as das outras espécies de plantas adicionadas previamente com petróleo ultrapassaram 3500.10⁵ UFC/g Solo e chegando, como no caso da *B. humidicola*, a 4000.10⁵ UFC/g Solo. A menor população de bactérias capazes de usar o petróleo no solo rizosférico da *Vismia* pode ser devido ao sistema radicular muito pouco desenvolvido pelas mudas coletadas no campo (menores do que 1 m de altura), com produções muito baixas de exsudatos radiculares capazes de manter altas populações de microrganismos rizosféricos.

Observou-se uma queda significativa das populações de bactérias capazes de quebrar o petróleo aos 21 dias de incubação, sugerindo que exauriram a maior parte das

fontes de carbono presentes nos solos, pressupondo-se assim, que o petróleo adicionado como contaminante tenha sido total ou quase totalmente convertido em CO₂ e água por essas bactérias nesse período.

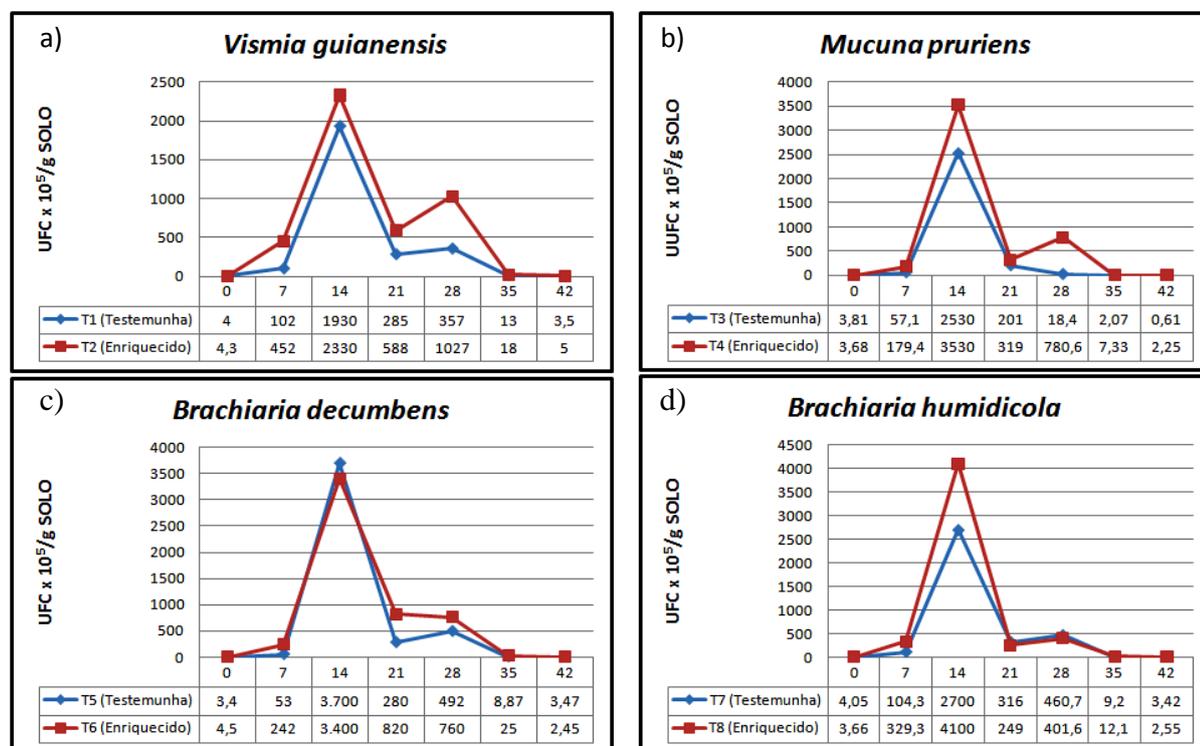


Figura 15. Populações de bactérias coletadas no período chuvoso, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo a) *Vismia guianensis*; b) *Mucuna pruriens*; c) *Brachiaria decumbens*; d) *Brachiaria humidicola*.

No 28º dia esse decaimento continuou em *Brachiaria decumbens* (c) e *Brachiaria humidicola* (d), porém em *Vismia guianensis* (a) e *Mucuna pruriens* (b) ocorreu um pequeno aumento, sugerindo que estavam usando as fontes de carbono presentes no solo (M.O. e petróleo) de forma diferenciada das demais. Esse processo de exaurimento das fontes de carbono presentes nos solos deve ter sido completado aos 35 dias de incubação, quando as populações presentes nas amostras de solos se estabilizaram com valores próximos ao zero.

Ao se analisar as populações rizosféricas de bactérias coletadas no período seco (Figura 16), observa-se que todas as quatro espécies de plantas apresentaram também, maiores crescimentos aos 14 dias de incubação, mas nesse caso, houve uma pequena mudança de comportamento em relação à coleta do período chuvoso. A pré-incubação com petróleo permitiu maiores populações de bactérias em todos os tratamentos quando comparados com suas testemunhas sem a adição prévia desse contaminante, sendo que as maiores diferenças foram observadas pelas populações das braquiárias (Figura 16 c, d). Esses resultados mostram que a adição do petróleo estimulou o crescimento bacteriano presente nas rizosferas dessas espécies.

Observou-se uma queda significativa das populações de bactérias capazes de quebrar o petróleo aos 21 dias de incubação, sugerindo que esgotaram a maior parte das fontes de carbono presentes nos solos, implicando-se assim, que o petróleo adicionado como contaminante tenha sido total ou quase totalmente convertido em CO₂ e água por essas bactérias nesse período. No 28º dia esse decaimento continuou em *Brachiaria decumbens* (c), porém em *Vismia guianensis* (a), *Mucuna pruriens* (b) e *Brachiaria humidicola* (d), ocorreu um pequeno aumento, sugerindo que estavam usando as fontes de carbono presentes no solo (M.O. e petróleo) de forma diferenciada das demais. Esse

processo de exaurimento das fontes de carbono presentes nos solos deve ter sido completado aos 35 dias de incubação, quando as populações presentes nas amostras de solos se estabilizaram com valores próximos ao zero.

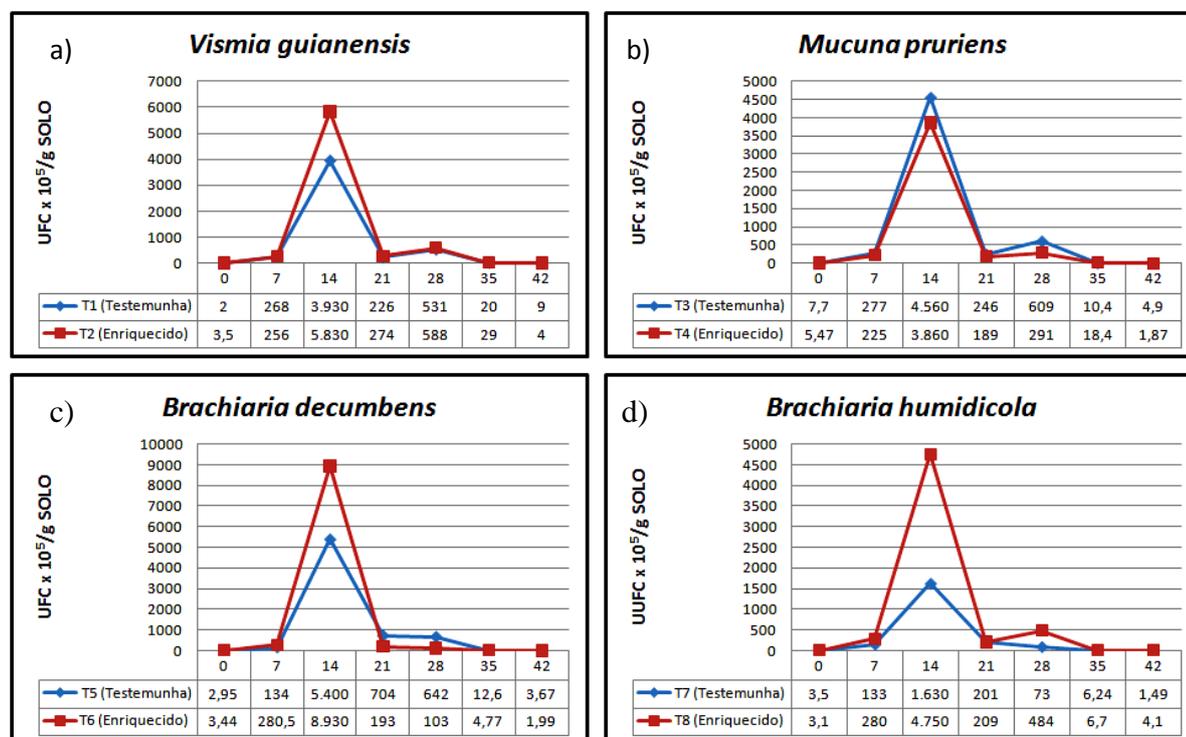


Figura 16. Populações de bactérias coletadas no período seco, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo. a) *Vismia guianensis*; b) *Mucuna pruriens*; c) *Brachiaria decumbens*; d) *Brachiaria humidicola*.

Ao se analisar o valor máximo de $\text{UFC} \cdot 10^5/\text{g Solo}$ de bactérias nos dois períodos (Tabela 6), observou-se que no período chuvoso a população de bactérias capazes de usar o petróleo foi bem maior na rizosfera de *B. humidicola*, ultrapassando $4000 \cdot 10^5 \text{ UFC/g Solo}$ e no período seco, foi a população presente na rizosfera de *B. decumbens* que quase atingiu $9000 \cdot 10^5 \text{ UFC/g Solo}$, ultrapassando as demais espécies de plantas nos dois períodos. Observou-se ainda, que os crescimentos das populações coletadas no período seco, na maioria das plantas (exceto no tratamento T7), foram maiores do que os observados da coleta no período chuvoso.

Tabela 6. População bacteriana nos períodos chuvoso e seco.

Tratamentos	Solo rizosférico	Petróleo	Período chuvoso	Período seco
-----UFC x 10 ⁵ /g Solo-----				
T1	<i>Vismia guianensis</i>	Ausente	1930 h	3930 f
T2	<i>Vismia guianensis</i>	Presente	2330 g	5830 b
T3	<i>Mucuna pruriens</i>	Ausente	2530 f	4560 e
T4	<i>Mucuna pruriens</i>	Presente	3530 c	3860 g
T5	<i>Brachiaria decumbens</i>	Ausente	3700 b	5400 c
T6	<i>Brachiaria decumbens</i>	Presente	3400 d	8930 a
T7	<i>Brachiaria humidicola</i>	Ausente	2700 e	1630 h
T8	<i>Brachiaria humidicola</i>	Presente	4100 a	4750 d

Letras diferentes nas colunas indicam médias diferentes pelo teste de Tukey (5%).

As populações de fungos filamentosos presentes nas rizosferas das quatro espécies vegetais coletadas no período chuvoso cresceram até o 14^o dia de incubação (Figura 17) no tratamento testemunha de *Vismia guianensis* (Fig. 17 a) e *Brachiaria decumbens* (Fig. 17 c) e, nos tratamentos enriquecidos de *Mucuna pruriens* (Fig. 17 b) e *Brachiaria humidicola* (Fig. 17 d). Já no tratamento com adição de petróleo de *Vismia guianensis* (Fig. 17 a) e *B. decumbens* (Fig. 17 c), as populações de fungos filamentosos cresceram até o 21^o dia de incubação.

A adição do petróleo resultou em maior crescimento fúngico nos tratamentos contendo solos rizosféricos de *Vismia* (Fig. 17 a) e *Mucuna* (Fig. 17 b), indicando que esses fungos filamentosos usaram tanto as fontes de carbono presentes no solo como o próprio petróleo para crescerem. Esse comportamento só foi diferente com a população de fungos filamentosos presentes na rizosfera de *B. humidicola* (Fig. 17 d), que cresceu de forma semelhante, independente da adição ou não do petróleo durante o período de incubação e, em *B. decumbens* (Fig. 17 c), onde a população de fungos filamentosos presente na rizosfera no tratamento sem a adição do petróleo resultou em maior crescimento do que no tratamento enriquecido. É possível que a maioria da população de fungos filamentosos na rizosfera de *B. humidicola* e de *B. decumbens* esteja totalmente adaptada para consumir o petróleo colocado nas placas de petri, independentemente de estar ou não incubada com esse componente orgânico. Já as populações presentes nas rizosferas das outras espécies, pelo menos em parte, ainda não estavam adaptadas ao petróleo. Ao serem adicionadas nas placas de petri contendo o petróleo como fonte de carbono, apenas aquela parte da população dos frascos testemunhas, capaz de usar o petróleo, cresceu no meio com sua adição, sendo portanto, menor do que as dos frascos incubados com esse componente orgânico, que foi usado pela parte da população adaptada.

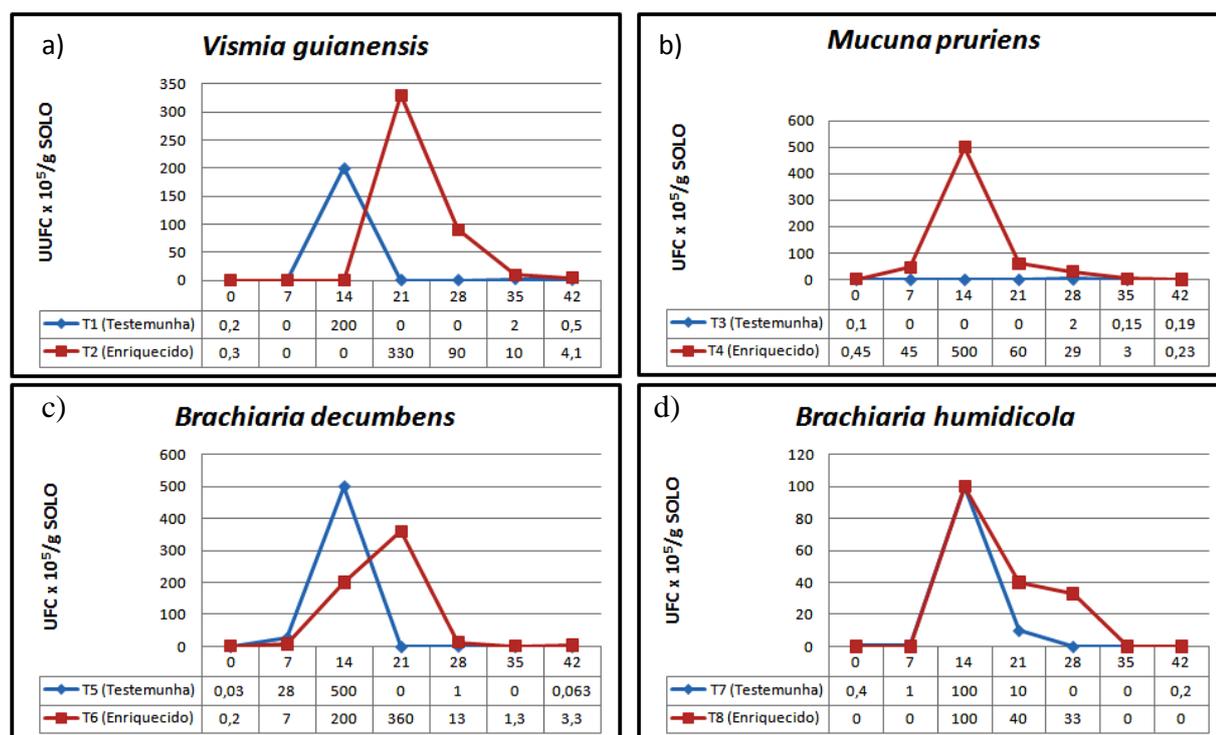


Figura 17. Populações de fungos filamentosos coletadas no período chuvoso, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo a) *Vismia guianensis*; b) *Mucuna pruriens*; c) *Brachiaria decumbens*; d) *Brachiaria humidicola*.

Ao se analisar as escalas de valores nos eixos y, percebe-se que a população de fungos filamentosos capazes de usar o petróleo foi bem menor na rizosfera de *B. humidicola* (Fig. 17 d), que chegou a atingir um máximo de $100 \cdot 10^5$ UFC/g Solo. Em seguida se encontram as populações observadas no solo rizosférico de *Vismia* (Fig. 17a), que atingiram

os máximos de 200.10^5 UFC/g Solo no tratamento testemunha e 330.10^5 UFC/g Solo no tratamento previamente enriquecido com o petróleo. No caso dos fungos da rizosfera de *M. pruriens* (Fig.17 b), observa-se uma população máxima aos 14 dias de incubação de 500.10^5 UFC/g Solo no tratamento previamente enriquecido com petróleo, mas uma que se manteve próxima ao zero no tratamento testemunha, fato esse único em todo o experimento.

No caso da população de fungos encontrados na rizosfera de *B. decumbens* (Fig. 17 c), houve uma inversão de valores, no qual o petróleo, ao ser adicionado previamente no solo antes da incubação, retardou o crescimento dos fungos e o seu máximo atingindo cerca de 360.10^5 UFC/g Solo aos 21 dias de incubação, sendo inferior ao máximo observado no tratamento testemunha, de aproximadamente 500.10^5 UFC/g Solo aos 14 dias de incubação. A menor população de fungos filamentosos capazes de usar o petróleo no solo rizosférico de *B. humidicola* possivelmente deve-se à baixa competição dos fungos filamentosos com os microrganismos (bactérias e leveduras). De acordo com Cunha e Leite (2000) o crescimento de uma população específica causa um desequilíbrio na comunidade por competição por espaços físicos, nutrientes e água, reduzindo para pequenas quantidades os microrganismos que tem o melhor desempenho na biodegradação.

Observou-se uma queda significativa das populações de fungos filamentosos capazes de quebrar o petróleo aos 21 dias de incubação em *M. pruriens* (Fig. 17 b) e *B. humidicola* (Fig. 17 d), sugerindo que exauriram as fontes de carbono presentes nos solos, pressupondo-se assim, que o petróleo adicionado como contaminante tenha sido total ou quase totalmente convertido em CO_2 e água por esses fungos filamentosos nesse período. Em *V. guianensis* (Fig. 17 a) e *B. decumbens* (Fig. 17 c) ocorreu uma queda significativa das populações de fungos filamentosos capazes de quebrar o petróleo somente no 28º dia. Além disso, observou-se que em *M. pruriens* (b) e *B. humidicola* (d) continuaram decaindo. No 35º dia esse decaimento continuou em *V. guianensis* (a) e *B. decumbens* (c); já em *M. pruriens* (b) e *B. humidicola* (d) esse processo de exaurimento das fontes de carbono presentes nos solos deve ter sido completado, quando as populações presentes nas amostras de solos se estabilizaram com valores próximos ao zero. O processo de exaurimento das fontes de carbono presentes nos solos ocorreu em *V. guianensis* (a) e *B. decumbens* (c) aos 42 dias de incubação, quando foram observados os valores próximos ao zero, indicando que as populações presentes nas amostras de solos se estabilizaram

Ao se analisar as populações rizosféricas de fungos filamentosos coletadas no período seco (Figura 18), observou-se que a maioria das espécies de plantas apresentou também, maiores crescimentos aos 14 dias de incubação, com exceção de *Brachiaria decumbens* no tratamento testemunha, que cresceu até o 21º dia de incubação. Pode-se observar que ocorreu uma pequena mudança de comportamento em relação à coleta do período chuvoso.

As populações de fungos filamentosos nos tratamentos com e sem petróleo permitiu maiores populações quando comparados com o período chuvoso, sendo que as maiores diferenças foram observadas pelas populações de fungos encontrados nas rizosferas de *Vismia guianensis*, *Mucuna pruriens* e *Brachiaria decumbens* (Figura 18 a, b, c). A pré-incubação com petróleo permitiu maiores populações de fungos filamentosos somente em *Mucuna pruriens* quando comparado com a sua respectiva testemunha (Figura 18 b). Esses resultados mostram que a adição do petróleo estimulou o crescimento fúngico presente na rizosfera dessa espécie.

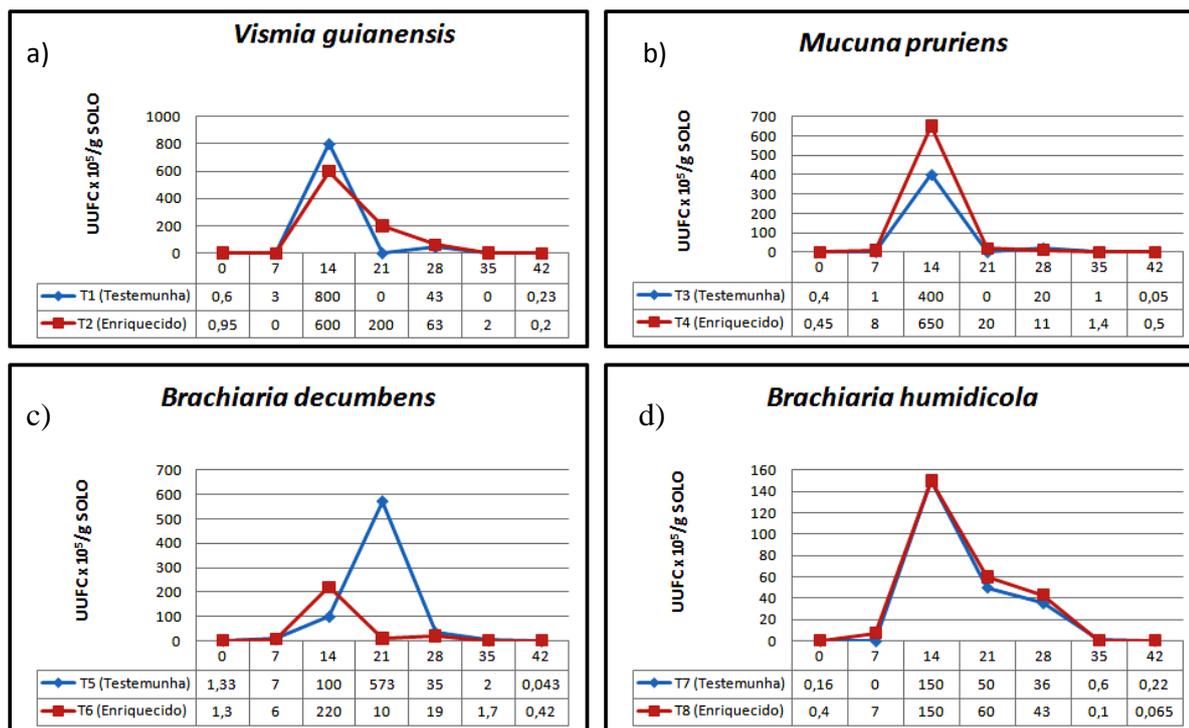


Figura 18. Populações de fungos filamentosos coletadas no período seco, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo a) *Vismia guianensis*; b) *Mucuna pruriens*; c) *Brachiaria decumbens*; d) *Brachiaria humidicola*.

Observou-se uma queda significativa das populações de fungos capazes de quebrar o petróleo aos 21 dias de incubação (exceto na amostra contendo solo rizosférico de *B. humidicola*), sugerindo que exauriram as fontes de carbono presentes nos solos, pressupondo-se assim, que o petróleo adicionado como contaminante tenha sido total ou quase totalmente convertido em CO₂ e água por esses fungos nesse período. Esse processo de exaurimento das fontes de carbono presentes nos solos deve ter sido completado aos 35 dias de incubação, quando as populações presentes nas amostras de solos se estabilizaram com valores próximos ao zero.

Tabela 7. População de fungos filamentosos nos períodos chuvoso e seco.

Tratamentos	Solo rizosférico	Petróleo	Período chuvoso	Período seco
-----UFC x 10 ⁵ /g Solo-----				
T1	<i>Vismia guianensis</i>	Ausente	200 d	800 a
T2	<i>Vismia guianensis</i>	presente	330 c	600 c
T3	<i>Mucuna pruriens</i>	Ausente	0,19 f	400 e
T4	<i>Mucuna pruriens</i>	presente	500 a	650 b
T5	<i>Brachiaria decumbens</i>	Ausente	500 a	573 d
T6	<i>Brachiaria decumbens</i>	presente	360 b	220 f
T7	<i>Brachiaria humidicola</i>	Ausente	100 e	150 g
T8	<i>Brachiaria humidicola</i>	presente	100 e	150 g

Letras diferentes indicam médias diferentes pelo teste de Tukey (5%).

Ao se analisar o valor máximo de UFC.10⁵/g Solo de fungos filamentosos capazes de usar o petróleo nos dois períodos (Tabela 7), observou-se que no período chuvoso a população de fungos filamentosos foi bem maior na rizosfera de *M. pruriens* e *B.*

decumbens, atingindo cerca de 500.10^5 UFC/g Solo e no período seco, na rizosfera de *Vismia guianensis*, com 800.10^5 UFC/g Solo. Observou-se ainda que, no período seco, as quatro plantas apresentaram uma população maior de fungos filamentosos do que no período chuvoso.

As populações de leveduras (fungos unicelulares) presentes nas rizosferas das quatro espécies vegetais coletadas no período chuvoso cresceram até o 14^o dia de incubação (Figura 19), independente da adição de petróleo ou não como fonte de carbono. No entanto, a adição do petróleo resultou em maior crescimento nos tratamentos contendo solos rizosféricos de *M. pruriens* (Fig. 19 b) e *B. decumbens* (Fig. 19 c), indicando que essas leveduras usaram tanto as fontes de carbono presentes no solo como o próprio petróleo para crescerem. Esse comportamento foi diferente com a população de leveduras presente na rizosfera de *V. guianensis* (Fig. 19 a) e na população de *B. humidicola* (Fig. 19 d), que cresceu de forma significativamente semelhante, independente da adição ou não do petróleo durante o período de incubação.

É possível, nesse caso, que a maioria da população de leveduras presentes na rizosfera dessa gramínea esteja totalmente adaptada para consumir o petróleo colocado nas placas de petri, independentemente de estar ou não incubada com esse componente orgânico. Já as populações presentes nas rizosferas das outras espécies, pelo menos em parte, ainda não estavam adaptadas ao petróleo. Ao serem adicionadas nas placas de petri contendo o petróleo como fonte de carbono, apenas aquela parte da população dos frascos testemunhas, capaz de usar o petróleo, cresceu no meio com sua adição, sendo portanto, menor do que as dos frascos incubados com esse componente orgânico, que foi usado pela parte da população adaptada, que por isso, apresentou maior população até o 14^o dia de incubação.

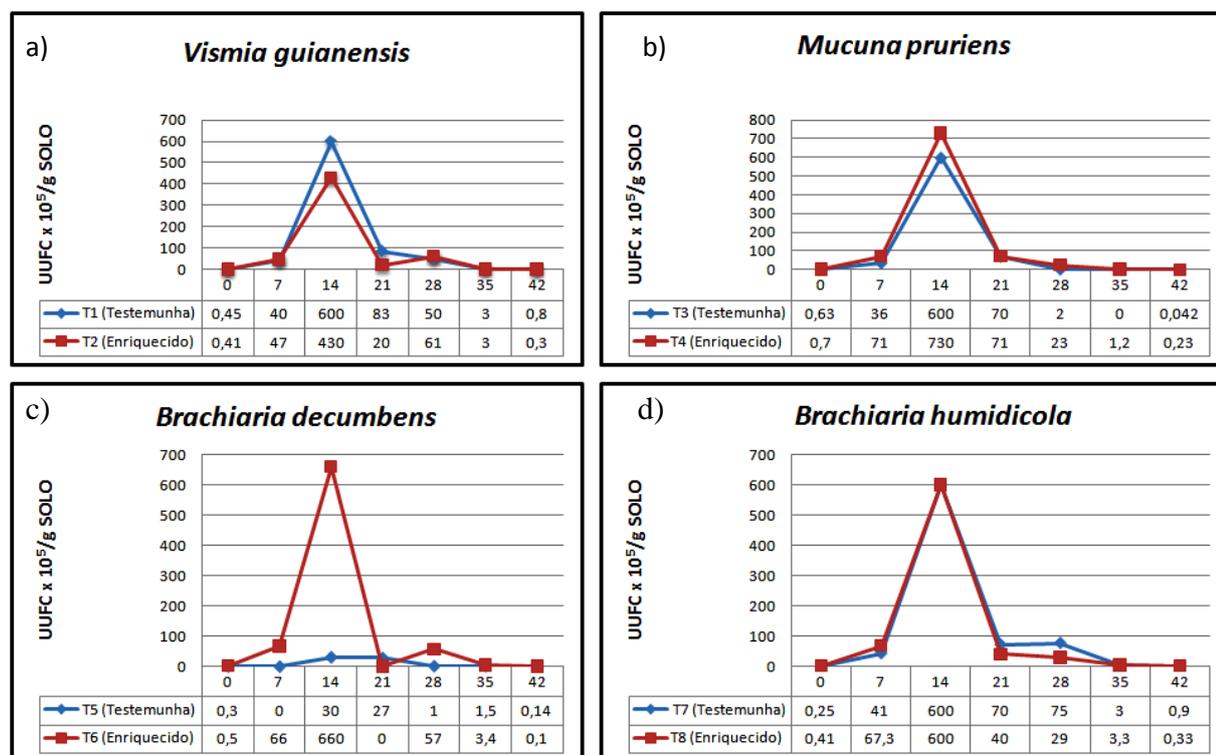


Figura 19. Populações de leveduras (fungos unicelulares) coletadas no período chuvoso, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo a) *Vismia guianensis*; b) *Mucuna pruriens*; c) *Brachiaria decumbens*; d) *Brachiaria humidicola*.

Ao se analisar as escalas de valores nos eixos y, percebe-se que a população de leveduras capazes de usar o petróleo foi levemente maior na rizosfera da mucuna (*Mucuna pruriens*), que ultrapassou 700.10^5 UFC/g Solo, seguida pela da *B. decumbens*, com

aproximadamente 650.10^5 UFC/g Solo e chegando, como no caso da *M. pruriens*, a 7300.10^5 UFC/g Solo. A menor população de leveduras capazes de usar o petróleo no solo rizosférico da *Vismia* pode ser devido ao sistema radicular muito pouco desenvolvido pelas mudas coletadas no campo (menores do que 1 m de altura), com produções muito baixas de exsudatos radiculares capazes de manter altas populações de microrganismos rizosféricos.

Observou-se uma queda significativa das populações de leveduras capazes de quebrar o petróleo aos 21 dias de incubação, sugerindo que exauriram as fontes de carbono presentes nos solos, pressupondo-se assim, que o petróleo adicionado como contaminante tenha sido total ou quase totalmente convertido em CO_2 e água por essas leveduras nesse período. No 28º dia esse decaimento continuou em *Mucuna pruriens* (b) e *Brachiaria humidicola* (d), porém em *Vismia guianensis* (a) e *Brachiaria decumbens* (c) ocorreu um pequeno aumento, sugerindo que estavam usando as fontes de carbono presentes no solo (M.O. e petróleo) de forma diferenciada das demais. Esse processo de exaurimento das fontes de carbono presentes nos solos deve ter sido completado aos 35 dias de incubação, quando as populações presentes nas amostras de solos se estabilizaram com valores próximos ao zero.

Ao se analisar as populações rizosféricas de leveduras coletadas no período seco (Figura 20), observa-se que todas as quatro espécies de plantas apresentaram também, maiores crescimentos aos 14 dias de incubação, mas nesse caso, houve uma pequena mudança de comportamento em relação à coleta do período chuvoso. A pré-incubação com petróleo permitiu maiores populações de leveduras em *V. guianensis* (Fig. 20 a), *M. pruriens* (Fig. 20 b) e *B. decumbens* (Fig. 20 c) quando comparados com suas testemunhas sem a adição prévia desse contaminante, sendo que a maior diferença foi observada pela população de *B. decumbens* (Fig. 20 c). Esses resultados mostram que a adição do petróleo estimulou o crescimento de leveduras presentes nas rizosferas dessas espécies.

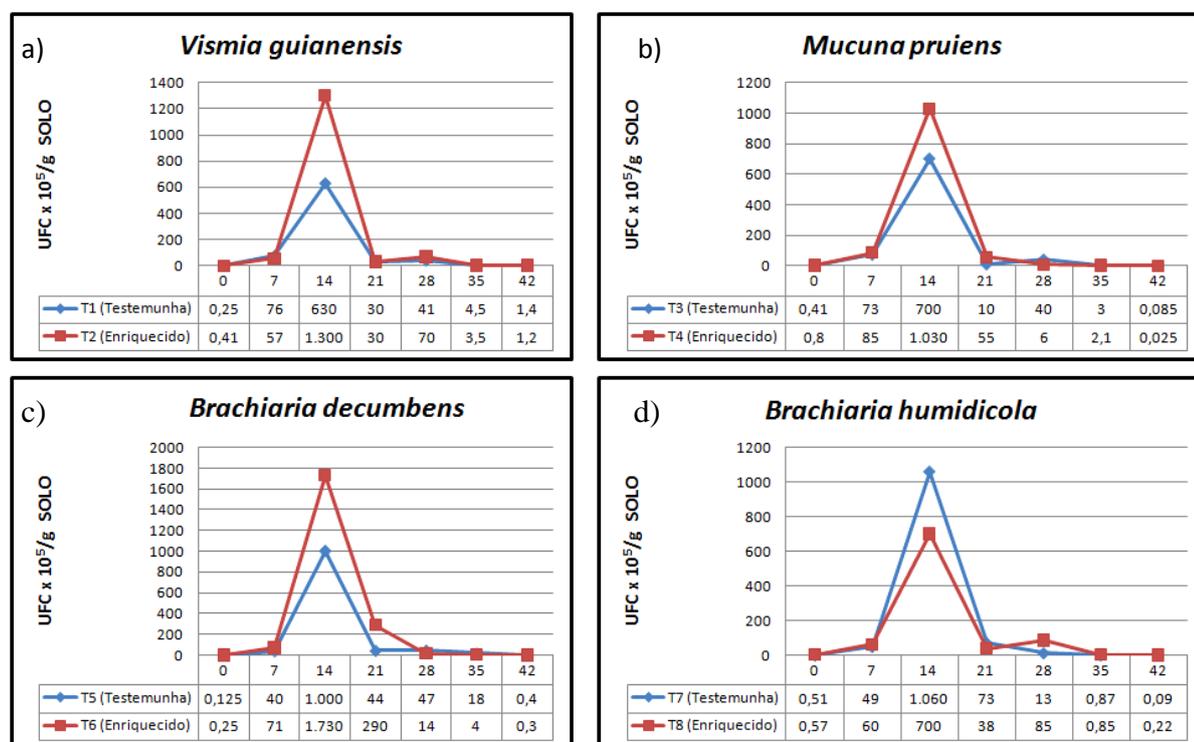


Figura 20. Populações de leveduras coletadas no período seco, em meio enriquecido previamente ou não com petróleo a) *Vismia guianensis*; b) *Mucuna pruriens*; c) *Brachiaria decumbens*; d) *Brachiaria humidicola*.

Ao se analisar as escalas de valores nos eixos y, percebe-se que a população de leveduras capazes de usar o petróleo foi bem menor na rizosfera de *B. humidicola*, que atingiu 700.10^5 UFC/g Solo, enquanto que as das outras espécies de plantas adicionadas previamente com petróleo ultrapassaram 1000.10^5 UFC/g Solo e chegando, como no caso da *B. decumbens*, a 1730.10^5 UFC/g Solo.

Observou-se uma queda significativa das populações de leveduras capazes de quebrar o petróleo aos 21 dias de incubação, sugerindo que esgotaram as fontes de carbono presentes nos solos, implicando-se assim, que o petróleo adicionado como contaminante tenha sido total ou quase totalmente convertido em CO_2 e água por essas bactérias nesse período. No 28º dia esse decaimento continuou em *Mucuna pruriens* (b) e *Brachiaria decumbens* (c), porém em *Vismia guianensis* (a) e *Brachiaria humidicola* (d), ocorreu um pequeno aumento, sugerindo que estavam usando as fontes de carbono presentes no solo (M.O. e petróleo) de forma diferenciada das demais. Esse processo de exaurimento das fontes de carbono presentes nos solos deve ter sido completado aos 35 dias de incubação, quando as populações presentes nas amostras de solos se estabilizaram com valores próximos ao zero.

Ao se analisar o valor máximo de UFC. 10^5 /g Solo de leveduras capazes de usar o petróleo nos dois períodos (Tabela 8), observou-se que no período chuvoso a população de leveduras foi bem maior na rizosfera de *Mucuna pruriens*, atingindo $7,3.10^7$ UFC/g Solo e no período seco, a rizosfera de *Brachiaria decumbens* ocorreu a maior população com $17,3.10^7$ UFC/g Solo. Observou-se ainda que, no período seco, as quatro plantas apresentaram uma população maior de leveduras do que no período chuvoso.

Tabela 8. População de leveduras no período chuvoso e seco.

Tratamentos	Solo rizosférico	Petróleo	Período chuvoso	Período seco
			-----UFC x 10^5 /g Solo-----	
T1	<i>Vismia guianensis</i>	Ausente	600 c	630 f
T2	<i>Vismia guianensis</i>	presente	430 d	1300 b
T3	<i>Mucuna pruriens</i>	Ausente	600 c	700 e
T4	<i>Mucuna pruriens</i>	presente	730 a	1030 d
T5	<i>Brachiaria decumbens</i>	Ausente	30 e	100 g
T6	<i>Brachiaria decumbens</i>	presente	660 b	1730 a
T7	<i>Brachiaria humidicola</i>	Ausente	600 c	1060 c
T8	<i>Brachiaria humidicola</i>	presente	600 c	700 e

Letras diferentes indicam médias diferentes pelo teste de Tukey (5%).

A população predominante nos solos analisados foi a de bactérias, o que está de acordo com o encontrado em diversos trabalhos que afirmam que as bactérias são os organismos mais abundantes na rizosfera de plantas (BOWEN e FOSTER, 1978; BECKER *et al.*, 1988; CHANWAY *et al.*, 1991).

Sales *et al.* (2008) realizaram um estudo para dimensionar a população de bactérias em solos não rizosféricos obtidos de poços e jazidas e clareiras na base de Urucu, município de Coari, Amazonas. Os solos também foram coletados tanto na época chuvosa, quanto seca. Os resultados indicaram que a maior densidade populacional de bactérias ocorreu no período chuvoso com cerca de 3.10^6 UFC/g⁻¹.

A habilidade de degradação do petróleo é apresentada por diversos microrganismos, principalmente bactérias e fungos filamentosos, embora a ubiquidade deles nos ecossistemas terrestres. Morgan e Watkinson (1994) afirmam que além das bactérias e fungos filamentosos, existem vários gêneros de leveduras e algas unicelulares que possuem capacidade de metabolizar hidrocarbonetos de petróleo. Dessa forma, o conhecimento da diversidade da comunidade rizosférica poderá ajudar nos processos de biorremediação de

maneira a estimular e acelerar a biodegradação dos ambientes que podem ser impactados com petróleo.

4.3 IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DOS ISOLADOS

Através da microscopia óptica verificou-se representantes de 3 diferentes grupos de microrganismos (fungos filamentosos, leveduras e bactérias). Dentre os 106 microrganismos isolados, 29,2% são bactérias Gram-negativas (31/106), 10,4% são bactérias Gram-positivas (11/106), 38,7% fungos filamentosos (41/106) e 21,7% são leveduras (23/106), como pode ser visto na figura 21. O tempo de crescimento dos microrganismos isolados foi determinado por meio da repicagem em placas de Petri, onde 38% deles cresceram em 24 horas, 21% em 48 horas, 29% em 72 horas e 12% em 96 horas de incubação), como pode ser visto na figura 22.

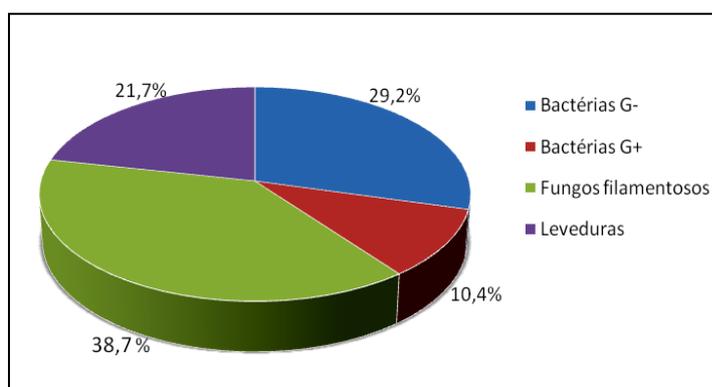


Figura 21. Percentuais dos grupos de microrganismos obtidos no isolamento.

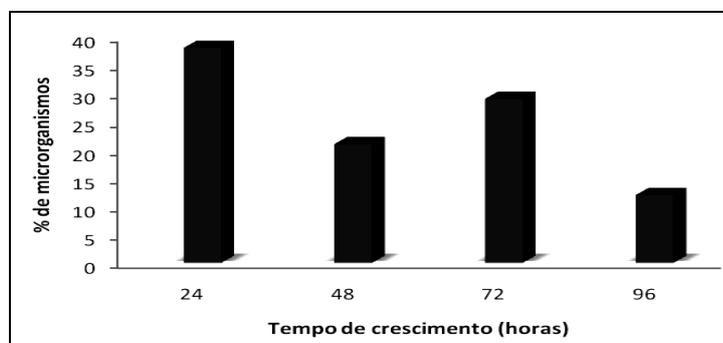


Figura 22. Percentuais do crescimento de microrganismos ao longo do tempo

4.4 TESTE DE BIODEGRADABILIDADE DO PETRÓLEO DE URUCU

Os resultados obtidos com o teste de biodegradabilidade usando o indicador DCPIP mostram que dos 106 microrganismos isolados dos solos rizosféricos de *Vismia guianensis*, *Mucuna pruriens*, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* coletados na Província Petrolífera de Urucu, 65 (61,32%) apresentaram potencial de degradação do petróleo após 5 dias (120 horas), sendo 25 bactérias, 27 fungos filamentosos e 13 leveduras. Este resultado pode ser visualizado pela descoloração (de azul para incolor) do DCPIP (Figura 23).

O DCPIP é um receptor de elétrons em reações químicas e a percepção do potencial (característica) de degradação foi dada de forma visual, isto é, sem a utilização de equipamentos o que revelou ser uma técnica fácil e rápida de *screening*.

Observou-se que com mais de 120 horas (duas semanas) de crescimento ocorre a descoloração de mais 23 microrganismos, que se somando com os 65 microrganismos que

degradam o petróleo em até 5 dias, temos um total de 88 microrganismos (83%) com potencial de degradação do petróleo. Deste modo, percebemos que os microrganismos que estão associados à rizosferas de plantas ao redor do oleoduto de Urucu possuem habilidade de degradar o petróleo, caso ocorra um derramamento desse poluente no solo.

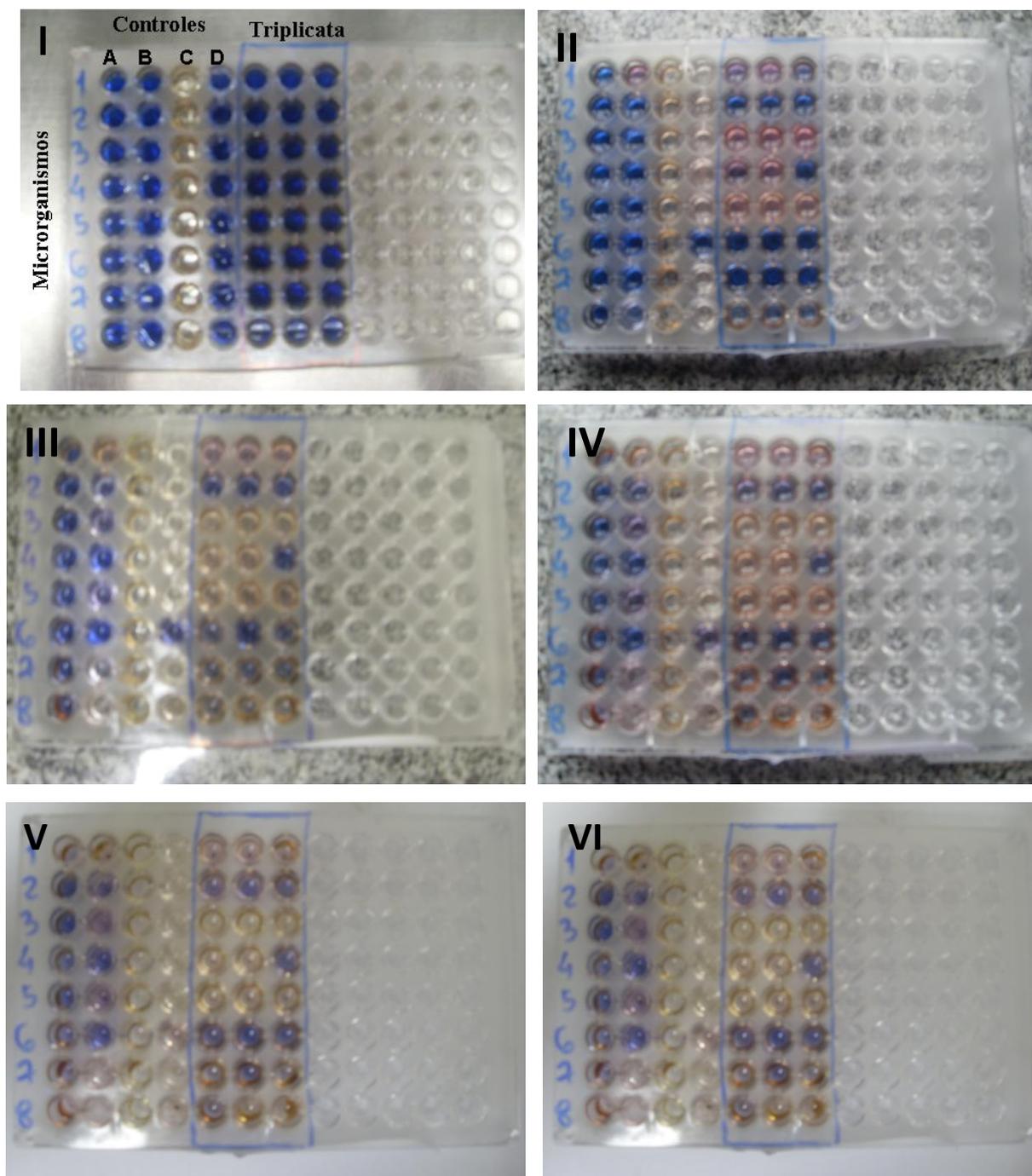


Figura 23. Resultado do teste de degradação do petróleo de Urucu. I) Inóculo inicial, II) Crescimento após 24 horas, III) Crescimento após 48 horas, IV) Crescimento após 72 horas, V) Crescimento após 96 horas, VI) Crescimento após 120 horas. 1 a 8 (1.INPA- 21 (+), 2. INPA-22 (-), 3.INPA-24 (+), 4.INPA-25 (+), 5. INPA-26 (+), 6.INPA-27(-), 7.INPA-28 (+) e 8.INPA-29 (+). A a D controles (A. abiótico, B. Biótico sem petróleo, C. Biótico sem DCPIP e D. Biótico sem petróleo e com glicose).

Komukay-Nakamura *et al.* (1996) estudaram a biodegradação de petróleo árabe leve por um consórcio bacteriano de *Acinetobacter sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas SP*, que degradou 40% da fração saturada e 21% da fração aromática em 10 dias. Assim, esse consórcio microbiano pode ser utilizado em solo na biorremediação desse poluente.

Souza *et al.* (2005) testaram a biodegradação de diferentes fontes de carbono (óleo diesel, gasolina, bunker e querosene) usando o indicador redox DCPIP por microrganismos coletados às margens da Lagoa da Barra, região Portuária de Suape – PE, sendo 40 bactérias, 23 leveduras e 23 fungos filamentosos. Quando o óleo Diesel foi utilizado como fonte de carbono, 5% das bactérias, 4% dos fungos filamentosos e 17% das leveduras descoloriram o meio de cultivo com até 24 horas. Quando utilizada a gasolina, 5% das bactérias, 4% dos fungos filamentosos e 22% das leveduras apresentaram resultado positivo com até 24 horas. Em relação ao petroderivado bunker 26% das bactérias, 13% dos fungos filamentosos e 4% das leveduras descoloriram o meio com até 24 horas. Quando utilizado o querosene 3% das bactérias, 23% dos fungos filamentosos e 16% das leveduras, ocasionaram a descoloração do meio com até 24 horas.

No trabalho de Piróllo (2006), o indicador redox DCPIP em meio de cultivo BH foi testado em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* LBI utilizando como fonte de carbono o óleo diesel, petróleo, querosene e borra de oleosa, os resultados positivos para o óleo diesel e o petróleo ocorreram após 23 horas, a descoloração do meio de cultivo com querosene após 68 horas e a descoloração parcial de borra oleosa após 3 dias.

Mariano *et al.* (2007) observaram que utilizando-se o indicador redox DCPIP para testar a biodegradação por microrganismos presentes na água subterrânea, a descoloração do meio de cultivo ocorreu em 3 dias (72 horas) para ambos os óleos diesel testados (comercial e intemperizado). Esse resultado mostra que os microrganismos apresentam capacidade de degradar o óleo diesel mesmo este estando intemperizado, ou seja, no local há uma microbiota adaptada para degradar hidrocarbonetos recalcitrantes, onde cada espécie tem uma função específica nas seqüências de reações enzimáticas responsáveis pela quebra de cadeias complexas de hidrocarbonetos.

Mari (2008) empregou o indicador redox DCPIP para testar a biodegradação de gasolina e óleo diesel por microrganismos de solos rizosféricos de floresta nativa de Urucu e de espécies frutíferas do Brasileirinho, a descoloração do meio de cultivo utilizando a gasolina ocorreu em 24 horas e a do óleo diesel em 48 horas.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no trabalho, conclui-se que:

- Entre as quatro espécies coletadas ao redor de oleodutos na BOGPM, *Brachiaria decumbens* apresentou a maior ocorrência de microrganismos degradadores de petróleo;
- A maior concentração de UFC de bactérias, fungos filamentosos e leveduras ocorreram no período seco;
- A maior concentração de UFC de bactérias no período chuvoso e tratamento enriquecido ocorreu em *Brachiaria humidicola*;
- A maior concentração de UFC de bactérias no período seco e tratamento enriquecido ocorreu em *Brachiaria decumbens*.
- A maior concentração de UFC de fungos filamentosos, no tratamento enriquecido ocorreu em *Mucuna pruriens* nos dois períodos (chuvoso e seco);
- A maior concentração de UFC de leveduras, no período chuvoso e tratamento enriquecido ocorreu em *Mucuna pruriens*;
- A maior concentração de UFC de leveduras, no período seco e tratamento enriquecido ocorreu em *Brachiaria decumbens*;
- Das amostras de solos rizosféricos de plantas ao redor de oleodutos em Urucu foram isolados 106 microrganismos, compreendendo 42 bactérias (31 Gram-negativas e 11 Gram-positivas), 23 leveduras e 41 fungos Filamentosos.
- A presença de microrganismos capazes de biodegradar o petróleo de Urucu no teste com o 2,6-diclorofenol-indofenol indicaram que 61,32% possuem capacidade de degradação do petróleo em um prazo de 120 horas (5 dias), e num período maior que 120 horas, foi constatado que 83% dos microrganismos isolados possuem essa capacidade.
- Os microrganismos que estão associados às rizosferas de plantas ao redor do oleoduto de Urucu possuem habilidade de degradar o petróleo, caso ocorra um derramamento desse poluente no solo.

6. REFERÊNCIAS

AMORIM, J. A. Obtenção de propriedades físico-químicas de misturas de hidrocarbonetos em baixa e alta pressão visando a caracterização e a modelagem. **Tese de doutorado** em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande no Norte, 165p., 2007.

ANDERSON, J.M.; INGRAM, J.S.I. Tropical soil biological and fertility: a handbook of methods. 2nd ed. Wallingford: **CAB International**, 221p., 1993.

ANDERSON, T.A.; GUTHRIE, E.A.; WALTON, B.T. Bioremediation in the rhizosphere: plant roots and associated microbes clean contaminated soil. **Environ. Sci. Technol.**, v.27, p. 2630-2636, 1993.

ANDRADE, M. M. Análises físicas de solo contaminado por petróleo. Universidade Estadual de Londrina. **Relatório de conclusão do Estágio Supervisionado** em Química, 2004.

ATLAS, R. M. Fate of Petroleum Pollutants in Arctic Ecosystems. **Water Science Technology**, v. 18(2), p. 59-67, 1986.

ATLAS, R. M. Petroleum Biodegradation and oil spill Bioremediation. **Marine Pollution Bull.** v.31, p. 178-182, 1995.

AUTRY, A.R.; ELLIS, G.M., Bioremediation: An effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Environmental Progress**, v. 11, n.4, p. 318-323. 1992.

BAIRD, C. Química Ambiental. Trad. RECIO, M.A.L. e CARRERA, L.C.M. 2.ed. Porto Alegre: **Bookman**, 622p, 2002.

BANAT, I.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.53, p. 495-508, 2000.

BECKER, J.O., ZAVALETA-MEJIA, E., COLBERT, S.F., SCHROTH, M.N., WEINHOLD, A.R., HANCOCK, J.G. & VAN GUNDY, S.D. Effect of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. **Phytopathology**, v.78, p.1466-1469, 1988.

BENTO, D. M. Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal do Rio Grande, Curso de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, 2005.

- BENTO, F.M.; CAMARGO F.A.O.; OKEKE, B.C. FRANKENBERGER-JR, W.T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p. 65-68, 2003.
- BOHEM, P. D.; FIEST, D. L.; MACKAY, D.; PATERSON, S. Physical chemical weathering of petroleum hydrocarbons from the Intox I blowout: chemical measurements and a weathering model. **Environmental Science & Technology**, v.16, p.498-505, 1982.
- BOLDRINI, K.R.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Cell fusion and cytomixis during microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **South African Journal of Botany**, v.72, p.478–481, 2006.
- BOWEN, G.D.; FOSTER, R.C. Dynamics of microbial colonization of plant roots. In BROUGHTON, W. J. & JOHN C. J. p. 14-31 (Eds.) **Symposium of Soil Microbiology and Plant Nutrition**, University of Malaya Press, Kuala Lumpur, 1978.
- BUT, V.S.; LAMB, C.J. Oxigenases and the metabolism of plant products. In: CONN, E. E. The biochemistry of plants: a comprehensive treatise. **USA academic Press**, v.7, p.627-665, 1981.
- CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. Microbiologia da rizosfera. In: MONIZ, A.C., FURLANI, A.M.C., FURLANI, P.R., FREITAS, S.S. (Eds.). A responsabilidade social da ciência do solo. Campinas: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 1988.
- CARVALHO, G. C. A indústria dos hidrocarbonetos No Brasil: o problema com o caso Gasoduto bolívia- brasil e a solução Com os combustíveis renováveis. **Pap. Polít.** Bogotá (Colombia), v. 11, n. 2, p.739-760, jul/dez 2006.
- CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v.4, p.331-338, 1993.
- CHAGAS-SPINELLI, A. C. O. Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrames de óleo diesel. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Geociências, 174p., 2007.
- CHANWAY, C. P. TURKINGTON, R.; HOLL, F. B. Ecological implications of specificity between plants and rhizosphere microorganisms. **Advances in Ecological Research**, v.21, p.121-169, 1991.
- CHIG, L. A.; COUTO, E. G.; NOVAES FILHO J. P.; RODRIGUES, L. C. M.; JOHNSON M. S.; WEBER O. L. S. Distribuição espacial da granulometria, cor e carbono orgânico do solo ao longo de um transecto em microbacias na Amazônia meridional. **Acta Amazonica**, v. 38(4), p. 715 – 722, 2008.
- CHIN-HUA, M. A.; PALADA, M. C. Fertility management of the soil-rhizosphere system for efficient fertilizer use in vegetable production. **International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer**, Use 16 – 20 October 2006.
- COCHRANE, T.T.; SÁNCHEZ, L.G.; AZEVEDO, L.G.; PORRAS, J.A.;C.L. GARVER, C.L.: **Land in Tropical America**. (3) p.7-29, 1985.
- CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.; PEREIRA, D.C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência hoje**. v.30/179, p.32-37, 2002.

CRAPEZ, M. A. C.; TOSTA, Z. T.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Acute and chronic impacts caused by aromatic hydrocarbons on bacterial communities at Boa Viagem and Forte do Rio Branco Beaches, Guanabara Bay, Brazil. **Environmental Pollution**, n. 108, p. 291-295, 2000.

CROWLEY, D.E.; BRENNEROVA, M. V.; IRWIN, C.; BRENNER, V.; FOCHT, D. D. Rhizosphere effects on biodegradation of 2,5-dichlorobenzoate by a bioluminescent strain of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) **Microbiology Ecology**. v. 20, p. 79-89, 1996.

CUNHA, C. D. Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 97p., 1996.

CUNHA, D. C.; LEITE, S. G. F. Gasoline Biodegradation in Different Soil Microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.31, n.1. São Paulo. jan/mar. 2000.

D'ÁVILA, S. G. A indústria Petroquímica brasileira. Com ciência. **Revista Eletrônica de jornalismo científico da SBPC**. Campinas, 2002. 6p. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/petroleo/pet21.shtml>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

DAMS, R. I. Rizoremediação de pentaclorofenol em um solo argiloso por *sphingomonas chlorophenolica* ATCC 39723. **Eng. Sanit. Ambient.** [online]. v. 12, n. 4, p. 426-432, 2007.

DUARTE, R. B. de A. Histórias de sucesso: indústria: petróleo e gás natural. Brasília: **SEBRAE**, 168p, 2006.

DYKE, K.V., Fundamentals of Petroleum, Fourth Edition. Austin, Texas: **Petroleum Extension Service**, 1997.

EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, ed.2 Rev. Atual - Rio de Janeiro: **Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**. Documentos 1, 212p, 1997.

GARRET, R. M.; PICKERING, I. J.; HAITH, C. E.; PRINCE, R. C. Photoxidation of crude oils. **Environmental Science & Technology**, v.32 p.3719-3723, 1998.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. DE L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.34, janeiro/junho 2005.

GOLDEMBERG, J. Pesquisa e desenvolvimento na área de energia. **São Paulo Perspec.** [online], v. 14, n. 3, p. 91-97. 2000.

GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 369-378, 1998.

GUERRA, O. Desafios Competitivos para a Petroquímica Brasileira. **Cad. CRH.**, Salvador, n.21. p.48-67, jul./dez, 1994.

HAMME J.D.V.; SINGH A.; WARD O.P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 67, p. 503-549, 2003.

HANSON, K. G., DESAI, J. D., DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, Kew, v.7, n.10, p. 745-748, 1993.

HARAYAMA, S.; KISHIRA, H.; KASAI, Y.; SHUTSUBO, K. Petroleum Biodegradation in Marine Environments. **J. Molec. Microbiol. Biotechnol**, v.1(1), p. 63-70. 1999.

HISTÓRIA. História do petróleo no Brasil. 2002. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/framereport.htm>> Acesso em: 21 de jan. 2009.

JORNALVS. Quase metade da energia consumida no Brasil é renovável. Disponível em: <<http://www.jornalvs.com.br/site/noticias/meioambiente,canal-8,ed-4,ct-602,cd-279908.htm>> Acesso em: 7 de set de 2010.

KOMAGATA, K.; NAKASE, T.; KATSUYA, N. Assimilation of hydrocarbons by yeasts – I Preliminary screening. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v.10, p.313-321, 1964.

KOMUKAY-NAKAMURA, S.; SUGIURA, K.; YAMAUCHI-NOMATA, L.; TOKI, H.; VENKATESWARAN, K.; YAMAMOTO, S.; TANAKA, H.; HARAYAMA, S. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. **Journall of Fermentation and Bioengineering**, v.82, n.6, p.570-574, 1996.

LAVELLE, P. Ecological challenges for soil science. **Soil Science**, Washington, v.165, n.1, p. 73-86, 2000.

LEINZ, V.; AMARAL, S.E. Geologia Geral. 14. ed. rev: São Paulo: **Companhia Editora Nacional**, p. 217-219, 2001.

LEITE, F. L.; ZEIMATH, E. C.; HERRMANN Jr, P.S.P. Análise de Minerais do Solo por Espectroscopia de Força Atômica. **Comunicado Técnico** - Embrapa, São Carlos, SP, Outubro, 2005.

LEMOES, J. L. S.; BARROS, C. A.; OLIVEIRA, S. D.; REICHE, A. P. Fungos Filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Rio de Janeiro: **CETEM/MCT**, 58p (Série Tecnologia Ambiental, 46), 2008.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. Plantas Ornamentais do Brasil; arbustivas herbáceas e trepadeiras. 3 ed., **Nova Odessa**, Instituto Plantarum, São Paulo, 2000.

MARI, A. O. Microrganismos degradadores de gasolina e óleo diesel isolados de solos do Amazonas. Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais. Defesa Dezembro de 2008.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; DO TEIXEIRA, D. A.; ZAUZA, E. A. V. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: Efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.4, p.589-597, 2007.

MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Orientador: Daniel Marcos Bonotto, Rio Claro, 162p., 2006.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Eng. Sanit. Ambient.** [online] v. 12, n. 3, p. 296-304, 2007.

MARIANO, J. B. Impactos Ambientais do Refino de Petróleo. **Dissertação de Mestrado** em Ciências em Planejamento, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 216 p., 2001.

MARSCHNER, P.; YANG, C.H.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1437-1445, 2001.

MASCARENHAS, H.A.A.; BRAGA, N.R.; BATAGLIA, O.C.; BULISANI, E.A.; FEITOSA, C.T.; HIROCE, R. Efeito do corretivo sobre soja cultivada em solo de cerrado contendo Al e Mn. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., Brasília, 1981. *Anais...* Londrina: EMBRAPA-CNPSo, p.567-573, 1982.

MASCARENHAS, H.A.A.; GALLO, J.R.; RAIJ, B. van; IGUE, T.; BATAGLIA, O.C. Efeitos da calagem nas características químicas do solo e na nutrição de soja em Latossolo Roxo distrófico. *Bragantia*, Campinas, v.35, p.273-278, 1976.

MEDINA, M. Fosforilación Fotosintética. 2005. Disponível em: http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia >. Acesso em: 14 mar. 2010.

MELLO, W. J. Enzimas no solo. In: MONIZ, A.C., FURLANI, A.M.C., FURLANI, P.R., FREITAS, S.S. (Eds.). A responsabilidade social da ciência do solo. **Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 1988.

MENEGHETTI, L. R. R. Bioremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, 113p., 2007.

MIETHLING, R.; AHRENDTS, K.; TEBBE, C.C. Structural differences in the rhizosphere communities of legumes are not equally reflected in community-level physiological profiles. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1405-1410, 2003.

MILLIOLI, V. S.; SANTOS, L. C. Avaliação da potencialidade do uso de biossurfactante na biorremediação de solo contaminado por óleo cru. CT 2003-068-00 – **Contribuição Técnica XI Seminário de Iniciação Científica de Ouro Preto-MG**, p.3-16, 2003.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v.27, p.165–175, 2004.

MORGAN, P.; WATKINSON, R.J. Biodegradation of components of petroleum. IN: Ratledge, C. *Biochemistry of Microbial Degradation*. LONDON: **Kluwe Academic**, 509P., 1994.

NAKATANI, A. S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; LAMBAIS, M. R. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de "Landfarming" de resíduos petroquímicos. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** [online], v. 32, n. 4, p. 1501-1512, 2008.

NICOLOTTI, G.; EGLI, S. Soil contamination by crude oil: impact on the mycorrhizosphere and on the revegetation potential of forest trees. **Environmental Pollution, Kidlington**, v. 99, n. 1, p. 37-43, 1998.

NITSCHKE, M.; PASTORE G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NUNES, G. E. Diversidade e estrutura de comunidades de Bactéria e Archaea em solo de mangues contaminado com hidrocarbonetos do petróleo. **Dissertação (Mestrado)**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 88p.. 2006.

PACHECO, C. A. G. A aplicação e o impacto dos royalties do petróleo no desenvolvimento econômico dos municípios confrontantes da bacia de campos. **Monografia de bacharelado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Economia, 2003.

PALA, D.M. Estudo da biorremediação de solo impactado por óleo cru Orientadores: Geraldo Lippel Sant'Anna Jr. e Denize Dias de Carvalho Freire. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ. 114p. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**, 2002.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; PDLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, n. 92, p. 287-294, 2002.

PEARSON, R.W. *Soil acidity and liming in the humid tropics*. Cornell, International Agriculture, 66p. (Bulletin, 30) 1975.

PEDRON, F. A.; DALMOLIN, R.S.D.; AZEVEDO, A. C.; KAMINSKI, J. Solos urbanos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1647-1653, set-out, 2004.

PEREIRA, E.G. Diversidade de rizóbio isolados em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia. 93 p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

PETROBRAS. Bacia de Campos - A maior reserva de petróleo do Brasil. Disponível em: <http://www2.petrobras.com.br/Petrobras/portugues/plataforma/pla_bacia_campos.htm> Acesso em: 21 de jan 2009 (a).

PETROBRAS. Província petrolífera de Urucu. Disponível em: <<http://www2.petrobras.com.br/minisite/urucu/>> Acesso em: 5 fev. 2009 (b).

PINHEIRO Paulo César da Costa. O Gás Natural e sua Utilização em Equipamentos Térmicos. In: II Seminário de Gerenciamento Energético da Indústria Química e Petroquímica, Guarulhos, SP, **Anais em disquete**. São Paulo: **ABIQUIM**, Associação Brasileira da Indústria Química e de Produtos Derivados, Palestra 9, 11p. 12-13 Junho 1996.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; CECON, P. R.; SANTOS, J. B.; TÓTOLA, M. R.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; SILVA, C. S. W. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** [online], v. 29, n. 4, p. 627-634, 2005.

PIRÔLLO, M. P. S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2006.

QUAGGIO, J.A.; RAIJ, B. van; GALLO, P.B.; MASCARENHAS, H.A.A. Respostas da soja à aplicação de calcário e gesso e lixiviação de íons no perfil do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.28, n.3, p.375-383, 1993.

RAIJ, B. van; CAMARGO, A.P.; MASCARENHAS, H.A.A.; HIROCE, R.; FEITOSA, C.T.; NERY, C.; LAUN, C.R.P. Efeito de níveis de calagem na produção de soja em solo de cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.1, p.28-31, 1977.

RESENDE, M.; CURI, N.; REZENDE, S. B. de; CORRÊA, G.F. Pedologia: Base para distinção de ambientes. 2ª Ed. Viçosa: **Neput**, 367p., 1997.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. Introdução à química ambiental. Porto Alegre: **Bookman**, 2004.

RODRIGUES, D. F. Caracterização polifásica da biodiversidade de isolados degradadores de poluentes xenóbios da Baixa Santista. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2002.

RUELLAN, A. Pedologia e desenvolvimento: a ciência do solo a serviço do desenvolvimento. In: MONIZ, A.C., FURLANI, A.M.C., FURLANI, P.R., FREITAS, S.S. (Eds.). A responsabilidade social da ciência do solo. Campinas: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 1988.

SALES, T. M.; SILVA, G. B.; LUSTOSA, D. C.; BATISTA, T. C. Diversidade de bactérias de solo em clareiras e floresta nativa provenientes de áreas de terra firme alteradas pela exploração de Petróleo. **VI Seminário de Iniciação Científica da UFRA** e XII Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA Amazônia Oriental/ 2008.

SANCHEZ, P.A.; COCHRANE, T.T. Soils constraints in relation to major farming systems of tropical America. **International Rice Research Institute**, Los Banos. p.106-139, 1980.

SANTO, L.S.E. Biodegradabilidade de óleo diesel por microrganismos nativos da areia da praia de Suape-PE e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente. **Dissertação (Mestrado)**, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, 2002.

SANTOS A. L.; GRAEBNER, I.B. MARQUES, D.D. Atividade antimicrobiana dos extratos e frações da *Vismia guianensis*. Clusiaceae. (Aubl.) Pers. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)** 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

SANTOS, R.M; LEITE, S.G.F.; SOBRAL, L.G.S.; RIZZO, A.C.L. Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas – ecala piloto. **4º PDPETRO**, Campinas, SP 6.2.0321-1– 1, p.21-24 de Outubro de 2007.

SEMPLE, K. T.; REID, B. J.; FERMOR, T. R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environmental Pollution**, v.112: 269-283, 2001.

SILVA, L. S.; BOHNEN, H. Relações entre nutrientes na fase sólida e solução de um latossolo durante o primeiro ano nos sistemas plantio direto e convencional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1164-1171, jul-ago, 2006.

SILVEIRA, R. B.; MELLONI, R.; MELLONI, E. G. P. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, em Itajubá/MG. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 48-55, jan / mar . 2006.

SIQUEIRA J. O. Microrganismos do solo e seus processos: irrelevantes para a produção agrícola?. In: MONIZ, A.C., FURLANI, A.M.C., FURLANI, P.R., FREITAS, S.S. (Eds.). A responsabilidade social da ciência do solo. **Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 1988.

SMILES, D. E. Aspects of the physical environment of soils organisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 6, n. 3, p. 204-215, 1988.

SOUZA, C. S. MIRANDA, R.C.M.; SENA, K.X.F.R. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: **Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás**, 2 a 5 de outubro de 2005.

SOUZA, E. S.; TRIGUIS, J. A. Degradação do petróleo em derrames no mar – intemperismo x biorremediação. In: **Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás**, Salvador, 2 a 5 de outubro de 2005.

TISSOT, B.P.; WELTE D.H. Petroleum Formation and Occurrence. **Springer-Verlag**, New York, 1984.

TOLEDO, R.E.B.; ALVES, P.L.C.A; VELLE,C.F.; ALVARENGA, S.F. Manejo de *Brachiaria decumbens* e seu reflexo no desenvolvimento de *Eucalyptus grandis*. **SCIENTIA FORESTALIS** n. 55, p. 129-141, jun. 1999.

TORRES, E. Mc M. A evolução da indústria petroquímica brasileira. **Quím. Nova**, v. 20, n. spe, p.49-54, 1997.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Risk Assessment** (2004). Disponível em: <<http://www.epa.gov>> Acesso em: 20 de jan 2009.

VIEIRA, F. C. S. Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata* atlantica (Crustacea: Mysidacea) **Dissertação de Mestrado** em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 72p., 2004.

VIEIRA, L.S.; SANTOS, P.C.T. dos. Amazônia: seus solos e outros recursos naturais. São Paulo: **Ceres**, p. 420, 1987.

VILELA, H. Série Leguminosas Tropicais. Disponível em: <<http://www.agronomia.com.br/conteudo/artigos>> Acesso em: 20 de jan. 2009.

WALTON, B. T., ANDERSON, T.A. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste site. **Applied and Environmental Microbiology** v.56, n.4, p. 1012-1016, 1990.

WEBER, A. C. Evolução Petrolífera: Impactos no atual modelo brasileiro. **Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP**, 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás realizado em Salvador no período de 2 a 5 de outubro de 2005.

ZÍLIO, E. L.; PINTO, U. B. Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros. **Bol. Téc. PETROBRAS**, Rio de Janeiro, v.45 (1), p.21-25, jan./mar. 2002.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. COUTINHO, H.L.C; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003.

ANEXOS

POPULAÇÃO BACTERIANA NO PERÍODO CHUVOSO (UFC X 10⁵ / ML)

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
TRATAMENTOS	7.	8079100.0000	1154157.1429	***** **
RESIDUO	8.	4.0000	.5000	
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
TOTAL	15.	8079104.0000		
DESVIO PADRAO = 0.7071 ERRO PADRAO DA MEDIA = 0.5000 MEDIA GERAL = 3028.0000 COEFICIENTE DE VARIACAO = 0.02				

POPULAÇÃO BACTERIANA NO PERÍODO SECO (UFC X 10⁵ / ML)

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
TRATAMENTOS	7.	60394575.0000	8627796.4286	***** **
RESIDUO	8.	4.0000	.5000	
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
TOTAL	15.	60394579.0000		
DESVIO PADRAO = 0.7071 ERRO PADRAO DA MEDIA = 0.5000 MEDIA GERAL = 4861.7500 COEFICIENTE DE VARIACAO = 0.01				

POPULAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NO PERÍODO CHUVOSO (UFC X 10⁵ / ML)

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	7.	505293.8878	72184.8411	***** **
RESÍDUO	8.	3.5000	.4375	
TOTAL	15.	505297.3878		

DESVIO PADRÃO = 0.6614 ERRO PADRÃO DA MÉDIA = 0.4677
 MÉDIA GERAL = 261.7119 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 0.25

POPULAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NO PERÍODO SECO (UFC X 10⁵ / ML)

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	7.	870245.7500	124320.8214	***** **
RESÍDUO	8.	4.0000	.5000	
TOTAL	15.	870249.7500		

DESVIO PADRÃO = 0.7071 ERRO PADRÃO DA MÉDIA = 0.5000
 MÉDIA GERAL = 443.3750 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 0.16

POPULAÇÃO DE LEVEDURAS NO PERÍODO CHUVOSO (UFC X 10⁵ / ML)

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	7.	672975.0000	96139.2857	***** **
RESIDUO	8.	4.0000	.5000	
TOTAL	15.	672979.0000		
DESVIO PADRAO =		0.7071		ERRO PADRAO DA MEDIA = 0.5000
MEDIA GERAL =		531.7500		COEFICIENTE DE VARIACAO = 0.13

POPULAÇÃO DE LEVEDURAS NO PERÍODO SECO (UFC X 10⁵ / ML)

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	7.	3367975.0000	481139.2857	***** **
RESIDUO	8.	4.0000	.5000	
TOTAL	15.	3367979.0000		
DESVIO PADRAO =		0.7071		ERRO PADRAO DA MEDIA = 0.5000
MEDIA GERAL =		906.7500		COEFICIENTE DE VARIACAO = 0.08