



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – MBT**



ALESSANDRA DE OLIVEIRA MARI

**MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE GASOLINA E ÓLEO DIESEL
ISOLADOS DE SOLOS DO AMAZONAS**

Manaus

2008

ALESSANDRA DE OLIVEIRA MARI

**MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE GASOLINA E ÓLEO DIESEL
ISOLADOS DE SOLOS DO AMAZONAS**

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade do Estado do Amazonas Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Dr. Luiz Antonio de Oliveira

Manaus

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO**ALESSANDRA DE OLIVEIRA MARI****MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE GASOLINA E ÓLEO DIESEL
ISOLADOS DE SOLOS DO AMAZONAS**

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais
Para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia
Universidade do Estado do Amazonas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais

Objetivo: Isolar e avaliar a capacidade da microbiota do solo de floresta nativa e rizosfera em degradar petróleo e derivados.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

BANDA EXAMINADORA

Dr. Luiz Antonio de Oliveira
Orientador

Membro da Banca

Membro da Banca

Manaus, _____ de Dezembro de 2008.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, meu Criador e responsável pelas vitórias da minha vida.

*Dedico também com amor, à minha querida mãe, **Alzena**, exemplo de determinação e força, pessoa responsável pela minha formação educacional, moral e profissional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, por ser meu sustento, e ter me dado forças para enfrentar os momentos mais difíceis durante a realização desse trabalho; por ser meu refúgio e solução.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas por possibilitar a realização desse trabalho.

À FAPEAM, pelo suporte financeiro através da bolsa de estudo e à PETROBRÁS pelo apoio financeiro para realizar minhas pesquisas.

Ao Dr. Luiz Antonio de Oliveira, meu querido orientador, pelo apoio e orientação dedicados a esse trabalho.

Aos membros da banca examinadora da minha Aula de Qualificação, Dr. Ademir Castro e Silva e Dra. Luciana Leomil, pelas valiosas correções e sugestões oferecidas.

Ao M.Sc. Francisco Wesen Moreira, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela ajuda na coleta das amostras de solo de Urucu e Brasileirinho.

Aos colegas de laboratório, Larissa Prado, Fabíola Rodrigues, Marcileide, Natália, e Arlem, pelas dicas, amizade e companheirismo. Em especial, à M.Sc. Alessandra Kariza Costa Lima do Nascimento pelo auxílio e colaboração na realização dos trabalhos, e principalmente pela verdadeira amizade que nasceu da nossa convivência diária, certamente este foi um dos melhores resultados obtidos! Obrigada amiga, pelos conselhos profissionais e pessoais e pelo seu exemplo de humildade, dedicação e responsabilidade.

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia do Solo do INPA, pela ajuda e apoio.

Aos funcionários, alunos e estagiários do Laboratório Temático de Solos e Plantas do INPA, sob responsabilidade da Dra. Tânia Pimentel, pela ajuda no desenvolvimento das análises físico-químicas das amostras de solo.

A todos os funcionários e professores do curso de Biotecnologia e Recursos Naturais da UEA, em especial às secretárias Iselma, Viviane e Conceição, pela ajuda e auxílio.

Aos colegas de curso Simone, Dolores, Ângela, Jucileuza e Israel pelos momentos de estudo e amizade.

À minha amada mãe Alzena, pelo amor, incentivo, apoio e dedicação oferecidos a mim.

Ao meu falecido pai Lanfranco, que em vida me ofereceu educação, amor e incentivo.

À minha querida irmã Adriana pelo apoio e ajuda nas horas de dificuldade, pelas suas orações e pelas valiosas dicas na montagem da minha aula de qualificação.

Ao meu querido namorado Thiago Rosas, pelo amor, apoio, incentivo, compreensão e paciência, durante a execução desse estudo.

À minha família pelo grande incentivo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução desse trabalho de mestrado.

“É preciso ter uma meta, e a nossa meta é muito grande. Quem se acostuma com coisa pequena não pode ir para o céu. O céu é para quem sonha grande, pensa grande, ama grande e tem a coragem de viver pequeno. Isso é o céu.”

Pe. Léo, SCJ

RESUMO

O setor industrial de petróleo é um dos que mais provocam impacto ambiental, por causa do seu volume ou pela recalcitrância dos constituintes. A remoção dos hidrocarbonetos presentes no solo contaminado é uma prática essencial por causa dos interesses ambientais. Existem vários métodos para minimizar os efeitos negativos da contaminação do solo. Uma estratégia para a eliminação do petróleo e seus derivados dos solos contaminados é através da biorremediação, que é a utilização de processo ou atividade biológica para transformar os contaminantes em substâncias inertes. Quatro amostras de solo rizosférico de floresta nativa foram coletadas na Base de Operação Geólogo Pedro de Moura, Urucu, Coari e quatro amostras da rizosfera de plantas frutíferas (cupuaçu, graviola, camu-camu e araçá-boi) da Comunidade do Brasileirinho, Manaus, no mês de maio de 2007, visando avaliar a presença e isolar culturas microbianas com potencialidade para degradar gasolina e óleo diesel. Todas as amostras de solos rizosféricos apresentaram microrganismos capazes de usar gasolina e óleo diesel como fonte de carbono. A adição de gasolina ou óleo diesel às amostras de solos rizosféricos de floresta nativa e de espécies frutíferas proporcionou aumentos substanciais nas populações de microrganismos. As amostras de solo rizosférico de floresta nativa de Urucu apresentaram crescimento semelhante tanto com a adição de gasolina quanto com a adição de óleo diesel. As amostras de solos rizosféricos de cupuaçu, camu-camu e araçá-boi apresentaram melhor crescimento com a adição de gasolina, com exceção do solo rizosférico de graviola que apresentou crescimento substancial com a adição de óleo diesel. Todas as amostras enriquecidas com gasolina e óleo diesel apresentaram crescimento microbiano significativo já nos primeiros 7 dias de enriquecimento. Todas as amostras enriquecidas ou não com 1% de gasolina ou óleo diesel apresentaram declínio populacional microbiano significativo aos 28 dias de incubação.

Palavras chaves: *Theobroma grandiflorum*, *Annona muricata*, *Myrciaria dubia*, *Eugenia stipitata*; biorremediação, biodegradação de petróleo; Amazônia.

ABSTRACT

Petroleum industries sector is one of the most that provoke environmental impact, due to their volume and recalcitrant compounds. The hydrocarbonates remotion from contaminated soil is an essential practice for environmental interests. There are various methods to minimize the negative effects of the soil contamination. A strategy for the petroleum elimination and its subproducts from contaminated soils is trough the bioremediation, which is the utilization of process or biological activities to transform contaminants in inert substances. Four rhizospheric soils from native forest were collected from the "Base de Operação Geólogo Pedro de Moura", Urucu, Coari, and four rhizospheric soils from fruit species (cupuassu, graviola, camu-camu and arassa-boi) from the Rural Community of Brasileirinho, Manaus, during may 2007, to evaluate the presence and isolation of microbial culture with potential for gasoline and oil diesel degradation. All soil rhizosphere samples presented microorganisms able to use gasoline and oil as carbon sources. The addition of gasoline or diesel oil to the soil samples of native forest and fruit species resulted on substantial increases of the microorganisms population. The soil rhizosphere samples from native forest of Urucu presented similar microorganisms growth population with gasoline and diesel oil addition. The soil rhizosphere from cupuassu, camu-camu and arassa-boi presented better growth with gasoline, except graviola rhizosphere soil presented a better growth microorganisms population with diesel oil. All samples enriched with gasoline and diesel presented significant microorganisms growth population already at 7 days. All the soil samples enriched or/not with 1% of gasoline or diesel oil presented significant decreases of microbial population at 28 days of incubation.

Key words: *Theobroma grandiflorum*, *Annona muricata*, *Myrciaria dubia*, *Eugenia stipitata*; bioremediation, petroleum biodegradation; Amazon.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Comunidade Rural do Brasileirinho e Base da Província Petrolífera de Urucu.....	39
FIGURA 2. Coleta de solo rizosférico de floresta nativa, Urucu.....	39
FIGURA 3. Coleta de rizosfera de plantas, Brasileirinho.....	39
FIGURA 4. Semeadura das diluições 10^6 , 10^7 e 10^8	43
FIGURA 5. Resultado do teste de biodegradação de gasolina.....	62
FIGURA 6. Resultado do teste de biodegradação de gasolina e óleo diesel.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Meio Mineral Bushnell Haas.....	40
TABELA 2. Amostras de solos rizosféricos de floresta nativa de Urucu, utilizadas em diferentes tratamentos de fonte de carbono.....	41
TABELA 3. Amostras de solos rizosféricos coletadas na comunidade do Brasileirinho, utilizadas em diferentes tratamentos de fonte de carbono.....	41
TABELA 4 Resultado da caracterização granulométrica dos solos rizosféricos de floresta nativa de Urucu e de espécies frutíferas da Comunidade do Brasileirinho.	45
TABELA 5 Resultado das análises físico-químicas dos solos rizosféricos de floresta nativa e de espécies frutíferas do Brasileirinho.....	46
TABELA 6. Avaliação do crescimento de bactérias de solos rizosféricos de Urucu com potencial para biodegradação de gasolina.....	47
TABELA 7. Avaliação do crescimento de bactérias de solos rizosféricos de Urucu com potencial para biodegradação de óleo diesel.....	50
TABELA 8. Avaliação do crescimento de bactérias de solos rizosféricos da comunidade do Brasileirinho com potencial para biodegradação de gasolina.....	52
TABELA 9. Avaliação do crescimento de bactérias de solos rizosféricos da comunidade do Brasileirinho com potencial para biodegradação de óleo diesel.....	55
TABELA 10. Isolados microbianos obtidos de solos rizosféricos de floresta nativa de Urucu e de espécies frutíferas do Brasileirinho.....	61
TABELA 11. Resultado do teste de biodegradação de gasolina e óleo diesel com o indicador redox-2,6-diclorofenol indofenol.....	63

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	10
INTRODUÇÃO.....	12
1 OBJETIVOS.....	14
1.1 Objetivo Geral	14
1.2 Objetivos Específicos.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 SOLO E RIZOSFERA.....	15
2.1.1 Matéria Orgânica do Solo	18
2.1.2 Microbiota do Solo	19
2.2 PETRÓLEO NO AMBIENTE	21
2.2.1 Gasolina.....	22
2.2.2 Óleo Diesel.....	254
2.2.3 Hidrocarbonetos Policíclico Aromáticos	265
2.2.4 Efeito do Derrame de Petróleo e seus derivados na Comunidade Microbiana.....	26
2.3 BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO E DERIVADOS.....	27
2.3.1 Microrganismos Capazes de Degradar Hidrocarbonetos.....	28
2.3.2 Efeito do Aporte de Nutrientes na Biodegradação	31
2.3.3 Fatores Ambientais que Influenciam a Biorremediação de Hidrocarbonetos de Petróleo	32
2.3.4 Biorremediação	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	38
3.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SOLO.....	39
3.3 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS DE SOLO E RIZOSFERA.....	40
3.4 CONTAGEM, ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS	41
3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE PETRODERIVADOS.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SOLO.....	45
4.2 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS	48
4.3 CONTAGEM, ISOLEMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS	64
4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE PETRODERIVADOS.....	65
5 CONCLUSÕES	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS.....	84

INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera surgiu na década de trinta e possibilitou a utilização de derivados de petróleo na composição de explosivos, matéria sintética para roupas, solventes, medicamentos utilizados durante a Segunda Guerra Mundial (1939 – 1945) e também nos dias atuais. Dos anos trinta até hoje, a indústria do petróleo cresceu progressivamente (CETESB, 2005).

O petróleo e seus derivados são a forma de energia primária mais utilizada no mundo. O setor petrolífero é responsável pela geração de cerca de 43% de toda energia utilizada mundialmente (Agência Internacional de Energia, 2003).

O setor industrial de petróleo é um dos que apresenta mais riscos ao meio ambiente, por causa do grande volume movimentado de petróleo e pela recalcitrância dos seus constituintes. O petróleo e seus derivados são as substâncias de destaque no processo de contaminação do meio ambiente (Souza e Silva *et al.*, 2005).

O petróleo e seus derivados, em função da complexidade da sua estrutura química, da sua baixíssima solubilidade em água e da forte tendência de sorção à fase sólida do solo, tornam-se recalcitrantes e permanecem por longos períodos no ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição de humanos e animais a esses compostos (Lima *et al.*, 1998).

A remoção dos hidrocarbonetos presentes no solo é uma prática essencial para mitigar os seus efeitos ao meio ambiente. Existem diferentes métodos aplicados para remover hidrocarbonetos do solo. Entretanto, a eficiência da remediação do solo depende de diversos fatores, tais como a profundidade da penetração do óleo no solo, o tipo de óleo, o tipo de solo poluído, a idade e o grau de contaminação (Amro, 2004).

Existem vários métodos para minimizar os efeitos negativos da contaminação do solo. Uma das técnicas para a eliminação do petróleo e seus derivados dos solos contaminados é através da biorremediação, que é a utilização de atividade biológica para transformar os contaminantes em substâncias inertes (Hollinger *et al.*, 1997). Essa biotecnologia vem sendo utilizada há vários anos em outros países e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (como incineração e lavagem do solo), sendo atualmente utilizada na remediação de diversas áreas contaminadas (Banforth & Singleton, 2005).

O objetivo principal da biorremediação é minimizar o impacto das substâncias recalcitrantes no ambiente, criando condições favoráveis ao crescimento e atividade bacteriana no solo (Crapez *et al.*, 2002).

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade da microbiota de solos rizosféricos de floresta nativa da Amazônia e de árvores frutíferas em degradar gasolina e óleo diesel.

1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar e isolar microrganismos degradadores de gasolina e óleo diesel.
- Avaliar a capacidade de degradação de gasolina e óleo diesel dos microrganismos selecionados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SOLO E RIZOSFERA

O solo pode ser definido como uma mistura de compostos minerais e orgânicos, que passa por constante transformação, devido às interações que ocorrem nele (Rizzo *et al.*, 2006).

A composição dos solos é variável, sendo normalmente dependente das características da sua formação. De modo geral, um solo constitui-se de 20-30% de ar, 20-30% de água, 45% de minerais e 5% de matéria orgânica em volume (Rizzo *et al.*, 2006).

O solo constitui um sistema muito dinâmico, onde fatores químicos, físicos e biológicos interagem continuamente, e representa um excelente habitat microbiano para uma diversificada comunidade de organismos, representada principalmente por bactérias, protozoários, fungos e vírus (Siqueira *et al.*, 1988).

O solo atua como um filtro e pode depurar e imobilizar a maioria das impurezas nele depositadas. Porém, tal capacidade é limitada, que ao ser extrapolada podem levar a alterações na qualidade do solo, pelo acúmulo de substâncias poluidoras (Soares *et al.*, 2005).

O solo tem a capacidade de transportar fluidos pelos seus poros e essa atividade está relacionada com sua permeabilidade. Se o solo apresentar baixa

capacidade de permeabilidade, certamente irá reter maior quantidade de impurezas (Soares *et al.*, 2005).

A estrutura do solo deriva da ação microbiana e confere a este, forma e graus ideais de permeabilidade, que é a propriedade que o solo apresenta de permitir o escoamento de fluidos através dele. Se o solo possuir alta permeabilidade, os fluidos poderão deslocar-se para regiões mais profundas do solo. Se a permeabilidade for baixa, os fluidos tenderão a se acumular na superfície. A biomassa microbiana também contribui para a fertilidade do solo, fornecendo nutrientes essenciais às plantas, além de realizar simbiose com as mesmas (Cury, 2002).

Todos os solos, em sua fase sólida, contêm partículas de diferentes tamanhos, o que determina sua granulometria e composição. Tais fatores podem influenciar na degradação de petróleo, pois de acordo com o tamanho das partículas a permeabilidade do solo pode ser maior ou menor. . O solo contaminado apresenta características que determinam o grau de prejuízo à vegetação e o grau de recuperação das plantas (Pezeshki *et al.*, 2000).

Os conceitos de qualidade do solo mais conhecidos são os que destacam o seu aspecto funcional. Qualidade do solo é a capacidade desse funcionar dentro dos limites do ecossistema, sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde de plantas e animais (Doran & Parkin, 1994). A biota do solo pode ser estudada ao nível de organismos (presença ou ausência de algumas espécies ou pela biomassa dessas espécies) ou em nível de comunidade (biomassa e atividade respiratória do solo) (Papendik *et al.*, 1992).

As modificações do solo, que ocorrem durante um processo de degradação, são detectadas pelos microrganismos, o que faz desses, bons indicadores biológicos. As atividades enzimáticas e a respiração no solo também servem como indicadores de qualidade (Campbell *et al.*, 1992). Portanto, o monitoramento da comunidade microbiana através dessas variáveis pode ser utilizado como indicativo de qualidade do solo, podendo ser útil na identificação de mudanças nas populações microbianas, originadas de modificações ambientais, tais como a poluição por petróleo e seus derivados (Campbell *et al.*, 1992).

A presença das raízes e as modificações físicas e químicas que elas exercem criam um ecossistema muito especializado, onde a população microbiana é altamente favorecida, atingindo populações até 100 vezes superiores ao do solo adjacente. Essa região que se inicia na superfície da raiz e estende-se em média na faixa de 1 a 3 mm solo adentro, podendo atingir 5 mm, foi definida como rizosfera (Siqueira *et al.*, 1988).

Esse segmento de raiz representa um microecossistema dinâmico e muito especializado, que propicia o crescimento abundante de uma população microbiana bastante diversificada. Os microrganismos do solo são favorecidos pelas raízes porque elas constituem uma superfície contínua para o crescimento, com constante fornecimento de substratos orgânicos e fatores essenciais para o crescimento e multiplicação (Siqueira *et al.*, 1988).

São disponibilizados na rizosfera, materiais de diversas naturezas, que variam de compostos orgânicos simples, solúveis em água, a insolúveis de grande complexidade (Siqueira *et al.*, 1988).

O efeito rizosférico não é específico, mas as raízes geralmente favorecem as bactérias gram-negativas (Siqueira *et al.*, 1988).

2.1.1 Matéria Orgânica do Solo

A matéria orgânica do solo é o produto da acumulação de resíduos de plantas e animais parcialmente decompostos e parcialmente resintetizados. Esses materiais, em ativo estado de decomposição, estão submetidos ao ataque contínuo de microrganismos. Em conseqüência, grande parte tem caráter transitório e é continuamente renovada pela adição de resíduos vegetais e animais. A matéria orgânica é composta de carbono, oxigênio, hidrogênio, complementada com outros elementos, como o nitrogênio, fósforo enxofre e micronutrientes. Devido à produção de energia e síntese protéica, carbono e nitrogênio são os elementos de maior destaque por serem responsáveis pelo equilíbrio entra as taxas de mineralização e imobilização (Vargas *et al.*, 1997).

A concentração de matéria orgânica em um solo pode variar de 0,5% (em massa) em solos desérticos até 95% (em massa) em solos turfosos, sendo que essa concentração normalmente decresce à medida que a profundidade do solo aumenta (Rizzo *et al.*, 2006).

A matéria orgânica é responsável pela sustentabilidade do solo. Desempenha papel importante na reciclagem de nutrientes, no tamponamento do solo contra alterações bruscas de pH, na edificação, na manutenção da estrutura e na adsorção e armazenamento da água (Vargas *et al.*, 1997).

A matéria orgânica do solo tem um papel importante na adsorção de compostos apolares e pouco polares como os HPAs (Gaboriau *et al.*, 2001). Portanto, quando o teor de matéria orgânica for alta no solo os hidrocarbonetos de petróleo se tornam menos disponíveis para os microrganismos, limitando o processo de biodegradação. A contaminação de sedimentos por hidrocarbonetos influencia a taxa de desenvolvimento bacteriano e atividades enzimáticas, os quais determinam as taxas de utilização dos hidrocarbonetos de petróleo (Silva *et al.*, 2002).

2.1.2 Microbiota do Solo

As bactérias do solo são, na maioria, heterotróficas, embora em algumas condições, haja predominância de bactérias autotróficas. Das milhares de bactérias existentes no solo, a maioria pertence à ordem Eubacteriales, que vive na superfície do solo, especialmente junto às partículas orgânicas e na rizosfera. Os gêneros comumente encontrados no solo são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Xanthomonas*, *Micrococcus*. As bactérias constituem o grupo que ocorre em maior número no solo. A densidade é máxima em solos úmidos, neutros e alcalinos com elevado teor de matéria orgânica (Vargas *et al.*, 1997).

O aumento da preocupação com os processos de degradação do solo é uma realidade atual, pois diversos produtos tóxicos vêm se acumulando no ambiente e podem permanecer por muitos anos, provocando a curto e longo prazo, prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente. Os microrganismos do solo desempenham um papel relevante no processo de descontaminação natural de ambientes afetados por tais substâncias (Mesquita *et al.*, 2007).

Os ambientes marinhos, de água doce e o solo são abundantemente povoados por bactérias, responsáveis pela remineralização do carbono orgânico, nitrogênio e outros nutrientes (Atlas & Bartha, 1973; Azam *et al.*, 1993, Azam, 1998).

Além da função de decomposição de matéria orgânica, os microrganismos também contribuem para a agregação e estruturação do solo por meio dos exsudatos gomosos bacterianos e das hifas dos fungos (Almeida, 1985).

A biomassa microbiana também contribui para a fertilidade do solo, fornecendo nutrientes essenciais às plantas. Poluentes de origem antrópica por vezes alteram a estrutura da microbiota e causam desequilíbrios ambientais que podem levar à extinção de espécies importantes para a manutenção do ecossistema (Cury, 2002).

2.2 PETRÓLEO NO AMBIENTE

O petróleo é um produto da decomposição de matéria orgânica armazenada em sedimentos, que migra através de aquíferos e fica aprisionado em reservatórios (Corrêa, 2003).

O petróleo bruto possui em sua composição, hidrocarbonetos, cujas frações leves formam os gases e, as frações pesadas, o óleo cru (Corrêa, 2003). Por isso define-se o petróleo como uma mistura complexa de compostos orgânicos que podem ser divididos em quatro frações: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos. No grupo dos compostos saturados temos: n-alcenos, alcenos ramificados (isoalcenos) e cicloalcenos. Os aromáticos contêm hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis tais como benzeno, tolueno e xilenos, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), os nafteno-aromáticos e os compostos de enxofre, como tiofenos, e dibenzotiofenos. As resinas e a fração asfaltenos são constituídos por moléculas polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio (Balba *et al.*, 1998). Tais compostos possuem características recalcitrantes e acumulam-se facilmente. Têm como características, alta viscosidade, baixa densidade e são pouco solúveis em água (Melo & Azevedo, 1997).

A contaminação do solo por petróleo e derivados tem causado preocupação pela presença de substâncias que apresentam risco à saúde humana, pois possuem características carcinogênicas e mutagênicas (Souza & Silva, 2005).

Os poluentes do petróleo e derivados podem concentrar-se no ar, nas águas superficiais e subterrâneas, no solo e em sedimentos. Propagam-se de maneira fácil, além de alterar as características naturais do local atingido e seus arredores (Melo, 2004).

Depois de entrar no ambiente, o petróleo sofre diversas alterações que mudam suas características originais, pela ação de fatores físicos (evaporação, dissolução, dispersão, oxidação fotoquímica, adsorção às partículas) e biológicos (biodegradação). Esses fatores físicos e biológicos dependem das características do derramamento e do ambiente atingido. Portanto, o grau do impacto ambiental depende de fatores como habitat atingido, tipo e quantidade de óleo derramado, espécies de organismos atingidos, clima, frequência e duração da exposição (Cury, 2002).

Quando o petróleo recobre a superfície do solo, restringe o movimento do oxigênio, resultando em condições anaeróbicas, além de aumentar a hidrofobia e rompimento da textura do solo. A granulometria e a textura do solo (areia, argila, silte) também influenciam no grau de degradação do petróleo, aumentando ou diminuindo a permeabilidade, quanto maior for a profundidade da contaminação, mais difícil será a retirada do contaminante. (Pezeshki *et al.*, 2000).

2.2.1 Gasolina

Dentre os combustíveis fósseis, a gasolina é uma mistura de hidrocarbonetos com número de carbonos na faixa de 4 a 12 átomos de carbono, e em menor

proporção por produtos oxigenados. Esse combustível é um líquido volátil e inflamável, a faixa de destilação da gasolina automotiva varia de 30 a 220 °C. A gasolina é insolúvel na água e não apresenta potencial de concentração na cadeia alimentar. O uso convencional da gasolina é para a propulsão mecânica de veículos, atuando como combustível no motor de automóveis. A gasolina comum é produzida em alta escala em refinarias, derivando diretamente do petróleo e sendo separada deste por destilação fracionada (Paixão, 2005).

Os componentes da gasolina, de acordo com os riscos ocasionados à saúde humana, se dividem em dois grupos diferentes de hidrocarbonetos: os monoaromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos – BTEX) que correspondem entre 10 e 59% (m/m) da composição e, os alifáticos (C₅ – C₁₂), que correspondem entre 41 e 62% (m/m) da composição da gasolina. Os compostos monoaromáticos são, geralmente, mais tóxicos que os alifáticos de mesmo número de carbono e são, também, mais móveis em água (Soares *et al.*, 2005).

Atualmente, as gasolinas que saem das refinarias dotadas de vários processos de refino, são constituídas de misturas criteriosamente balanceadas desses hidrocarbonetos, visando atender aos requisitos de desempenho nos motores. Vários processos podem ser usados para obter a gasolina a partir do petróleo: Os processos de refino sofreram uma contínua evolução simultaneamente com o progresso dos motores. Os principais processos usados para a produção de gasolina são: Destilação, recuperação de gasolina natural, craqueamento, hidrocraqueamento, reforma, alquilação ou alcoilação, polimerização, isomerização (Instituto Brasileiro de Petróleo, Gás e Biocombustíveis, 2008).

Os BTEX presentes na gasolina podem permanecer um tempo maior dentro dos poros do solo e sofrer tratamento via processo oxidativo, no caso de baixa permeabilidade do solo, enquanto que para solos com alta permeabilidade, a probabilidade dos compostos monoaromáticos atingirem as águas subterrâneas é maior, acarretando em um aumento no tamanho do meio contaminado (Soares *et al.*,2005).

2.2.2 Óleo diesel

O óleo diesel é um combustível derivado do petróleo de composição complexa constituído basicamente por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos e, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contém átomos de enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio. Esses compostos orgânicos são normalmente formados por moléculas constituídas de 8 a 40 átomos de carbono, sendo, portanto, mais pesados do que aqueles que compõem a gasolina. O óleo diesel é formulado através da mistura de diversas correntes como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado, provenientes das diversas etapas de processamento do petróleo bruto (Oliveira, 2001).

O diesel apresenta-se em forma de líquido amarelado viscoso, límpido, pouco volátil, cheiro forte e marcante e com nível de toxicidade mediano. O óleo diesel é utilizado principalmente como combustível de veículos envolvidos com o transporte de passageiros e de cargas mas também costuma ser utilizado para fins industriais (Oliveira, 2001)

2.2.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são substâncias químicas bastante estáveis (Mielke *et al.*, 2001) e classificados como compostos carcinogênicos e mutagênicos. De uma forma geral, tanto os HPAs quanto seus derivados estão associados ao aumento da incidência de câncer no homem (Netto *et al.*, 2000). Portanto, são substâncias consideradas de alto potencial de risco, merecendo a atenção de diversos trabalhos de pesquisa (Crapez *et al.*, 2002).

Os HPAs são gerados naturalmente e de forma contínua pela combustão incompleta de substâncias orgânicas, como resíduos vegetais, madeira, matéria orgânica, etc. Porém, a contaminação do solo é um típico efeito da atividade antropogênica, devido à produção industrial dos HPAs, diretamente relacionados aos processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e de seus derivados (Banforth & Singleton, 2005).

O solo recebe anualmente quantidades consideráveis de HPAs que, em função da complexidade da sua estrutura química, da sua baixíssima solubilidade em água e da forte tendência de sorção à fase sólida do solo, tornam-se recalcitrantes e permanecem por longos períodos no ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição de humanos e animais a esses compostos (Netto *et al.*, 2000).

Os HPAs são lipossolúveis na membrana celular e prontamente absorvidos no organismo dos humanos via inalação, exposição oral e dermal, com posterior

acúmulo no tecido adiposo (Netto *et al.*, 2000). O metabolismo dos HPAs gera compostos epóxidos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido à presença desses compostos (Chakradeo *et al.*, 1993).

2.2.4 Efeito do Derrame de Petróleo e seus derivados na Comunidade Microbiana

A presença de hidrocarbonetos no solo contaminado pode ocasionar aumento ou decréscimo seletivo do tamanho da população microbiana. Isso dependerá da composição química do óleo contaminante e das espécies de microrganismos presentes no ambiente (Melo & Azevedo, 1997).

Pode ocorrer o aumento da capacidade dos microrganismos de biodegradar petróleo e seus derivados, através da adaptação envolvendo enzimas específicas e mudanças genéticas, que levam a novas atividades metabólicas. Em certos casos, há o enriquecimento primário de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos e secundariamente por microrganismos capazes de utilizar os metabólitos produzidos pelos organismos primários (Melo & Azevedo, 1997).

Além do enriquecimento, ocorre o decréscimo de alguns microrganismos expostos aos componentes do petróleo. A ação pode ser bacteriostática ou bactericida, dependendo da concentração. Outros microrganismos ainda se comportam de forma neutra em resposta à adição de hidrocarbonetos. Nesse caso, não há alteração da população (Melo & Azevedo, 1997). A poluição do solo pode

conduzir a um decréscimo na diversidade microbiana em termos de abundância de espécies, devido à extinção de espécies não adaptadas ao estresse imposto; mas pode também ocasionar o enriquecimento de espécies particulares mais adaptadas a esse estresse (Atlas, 1984).

2.3 BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO E DERIVADOS

O petróleo possui moléculas recalcitrantes a biodegradação, porém estas podem ser atenuadas naturalmente por meio de processos abióticos como volatilização, lixiviação e fotodegradação. No caso dos HPAs, a biodegradação desses compostos é inversamente proporcional ao número de anéis aromáticos. Moléculas formadas por poucos anéis são facilmente degradadas por microrganismos capazes de utilizar compostos aromáticos como fonte de carbono. Já as moléculas de alto peso molecular, com vários anéis na sua estrutura, são resistentes ao ataque microbiano e persistem no meio ambiente (Melo & Azevedo, 1997).

A biodegradação apresenta-se como um método efetivo, já que o petróleo é usado como fonte de carbono através de processos microbianos, resultando na quebra das moléculas em compostos de massa molecular baixa (Zhang *et al.*, 2005).

Como o petróleo e seus derivados são constituídos principalmente por hidrocarbonetos, sua biodegradação completa resulta em dióxido de carbono e água (Melo & Azevedo, 1997). Porém, geralmente a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos para a conversão microbiana é baixa, limitando assim, a taxa de

biodegradação no meio aquoso. Por isso, o aumento da solubilização de compostos orgânicos que apresentam baixa solubilidade em água é um passo primordial para a biorremediação.

O conhecimento da capacidade de recuperação de ecossistemas impactados passa pelo estudo das suas características físico-químicas e biológicas, assim como de suas interações com os componentes antropogênicos (Cury, 2002).

A degradação dos HPAs no solo pode ser limitada pela incapacidade dos microrganismos em metabolizar de maneira eficiente esses compostos, seja pela falta de nutrientes à microbiota degradadora ou pela baixa biodisponibilidade dos HPAs aos microrganismos degradadores, devido à sorção à fase sólida mineral e orgânica do solo. Para superar essas dificuldades e realizar-se uma eficiente remoção dos contaminantes do ambiente, podem-se utilizar técnicas de biorremediação *in situ*, como atenuação natural, bioaumentação, bioestimulação, fitorremediação e “landfarming”, ou técnicas de biorremediação *ex situ*, como compostagem e biorreatores (Johnsen *et al.*, 2005).

2.3.1 Microrganismos Capazes de Degradar Hidrocarbonetos

Diversos gêneros microbianos apresentam a capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo. Estes gêneros podem ser encontrados em ambientes marinhos, de água doce e no solo. Microrganismos com essa capacidade podem metabolizar um número limitado de hidrocarbonetos isoladamente. Em geral, as bactérias e leveduras têm capacidade decrescente de degradação de acordo com o

aumento da cadeia de carbono (Melo & Azevedo, 1997). Com frequência, os n-alcenos com número de carbonos variando entre C₁₀ a C₂₆ são prontamente degradados, assim como os compostos monoaromáticos benzeno, tolueno e xileno (Atlas, 1995). Moléculas com estruturas mais complexas, contendo ramificações e anéis aromáticos, são degradadas por um número menor de microrganismos e com uma taxa de degradação menor, se comparadas com moléculas de estrutura mais simples (Cury, 2002).

Para que os microrganismos do solo utilizem esses compostos como fonte de C e energia para o seu crescimento, é necessário que possuam diversas enzimas que transformam as complexas moléculas dos HPAs em intermediários comuns das suas rotas catabólicas (Jacques *et al.*, 2007).

Diversas vias metabólicas de degradação dos HPAs já foram identificadas em diferentes microrganismos; porém, as mais estudadas são as do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos lignolíticos e pelos fungos não-lignolíticos. No metabolismo das bactérias, a oxigenação inicial dos HPAs é realizada por uma enzima intracelular (dioxigenase), que tem como função, o reconhecimento dos HPAs e adicionar a suas moléculas dois átomos de oxigênio, quebrando a estabilidade devido à ressonância do anel aromático. Após sucessivas oxidações, o último anel aromático é transformado em um dos intermediários centrais da via de degradação dos HPAs, que pode ser o catecol, o protocatecol ou o gentisato. Até aqui houve a atuação de enzimas chamadas periféricas, que têm a função de reconhecer as moléculas dos HPAs e convertê-las nesses intermediários centrais. A partir de então, atuam as enzimas de fissão, que converterão os

intermediários centrais em compostos que possam ser utilizados nas vias comuns de geração de carbono e energia das bactérias. As enzimas de fissão são divididas em dois grupos, de acordo com o local da clivagem no intermediário central: as enzimas intradiol abrem o anel aromático por via orto, originando o cis-muconato, que, por passos sucessivos, será convertido em succinato e acetil-coenzima; e as enzimas extradiol, que fazem a abertura do anel aromático por via meta, originando o semialdeído 2-hidroximucônico, que, por passos sucessivos, será transformado em ácido pirúvico e acetaldeído (Bamforth & Singleton, 2005).

Devido ao grande número de enzimas envolvidas na degradação desses compostos, a maioria dos microrganismos do solo não possui a capacidade de degradar os HPAs pela falta de tais enzimas, justificando a necessidade de se isolar e selecionar microrganismos degradadores, visando a sua utilização na biorremediação de solos contaminados (Alexander, 1999). Por isso, a presença de uma mistura de populações com capacidades enzimáticas variadas se faz necessária para uma completa degradação dos hidrocarbonetos de petróleo presentes no ambiente (Melo & Azevedo, 1997). Estes consórcios apresentam maior capacidade de utilização de um grande número de HPAs como fonte de C e, principalmente, podem mineralizar completamente esses compostos, devido à complementaridade metabólica entre os membros do consórcio (Jacques *et al.*, 2007).

Os gêneros mais importantes de bactérias em ambiente terrestre são: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*,

Burkholderia, *Microbacterium*, *Gordonia*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus* entre outros (Melo & Azevedo, 1997 Jacques *et al.*, 2007). O processo de biodegradação dos hidrocarbonetos com a participação de microrganismos depende do ecossistema e das condições ambientais (Melo & Azevedo, 1997).

2.3.2 Efeito do Aporte de Nutrientes na Biodegradação

Os compostos orgânicos presentes no petróleo, que podem ser utilizados como fonte de carbono para o crescimento de microrganismos. No entanto, há a necessidade da adição de nutrientes como nitrogênio e fósforo. Os micronutrientes também são necessários, tais como o enxofre, ferro, magnésio, cálcio e sódio (Melo & Azevedo, 1997).

Em ambientes diferentes, a quantidade desses nutrientes é variável e se adicionados podem estimular a biodegradação. Pela adição de fertilizantes no solo, ocorre o ajuste de C, N e P. Diversos trabalhos comprovam que a adição de N e P aumenta a biodegradação do petróleo e seus derivados (Melo & Azevedo, 1997).

Em ambientes naturais, o nutriente que normalmente limita o crescimento microbiano é o carbono, sendo que os nutrientes inorgânicos estão presentes em quantidades que normalmente excedem as demandas das comunidades microbianas (Alexander, 1999). No entanto, a presença de elevadas concentrações de HPAs no solo com potencial para serem utilizados como substrato para o

crescimento dos microrganismos pode fazer com que outros nutrientes, que não o C, tornem-se limitantes (Jacques *et al.*, 2007).

Outros nutrientes que poderiam influenciar a degradação dos HPAs no solo são o ferro e o enxofre, porque desempenham funções celulares que estão intimamente relacionadas ao metabolismo dos HPAs, como a participação na estrutura das enzimas que realizam a degradação desses compostos nas células microbianas (Jacques, 2005).

2.3.3 Fatores Ambientais que Influenciam a Biodegradação de Hidrocarbonetos de Petróleo

A biorremediação engloba várias tecnologias que se baseiam em processos microbianos de remoção ou redução, completa ou parcial, de poluentes ambientais. O estabelecimento de condições ambientais adequadas é fundamental para que o processo de biorremediação aconteça de forma eficaz (Rizzo *et al.*, 2006).

Diversos fatores ambientais podem influenciar no processo de biodegradação dos poluentes como aeração, nutrientes, umidade do solo, pH, temperatura, agitação, disponibilização dos contaminantes, condições do solo, tipo de solo (Jacques *et al.*, 2007).

Para que ocorra uma rápida degradação de hidrocarbonetos de petróleo, são necessárias boas condições aeróbicas, pois a degradação anaeróbica apresenta-se mais lenta. O oxigênio é utilizado como substrato nas reações catalisadas pela

enzima oxigenase, e ainda como acceptor final de elétrons na respiração aeróbica (Rizzo *et al.*, 2006).

A umidade é um dos fatores ambientais mais importantes no processo de biodegradação, pois uma alta atividade microbiana somente ocorrerá se houver adequada disponibilidade de água aos microrganismos. Durante o processo de biorremediação de solos contaminados o teor de umidade deve ser mantido entre 50-80% da capacidade de campo do solo para que taxas ótimas de degradação sejam obtidas. Ainda, o teor de água no solo tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio e, conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbios, que são os principais responsáveis pela degradação dos HPAs (Jacques *et al.*, 2007).

O pH do solo afeta diretamente a atividade dos microrganismos através dos efeitos dos íons H⁺ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, assim como, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos. Nas faixas de pH em torno da neutralidade a biodegradação tende a ser mais efetiva (Jacques *et al.*, 2007).

A atividade metabólica, o consumo de substrato pelos microrganismos e, por conseqüência, a biodegradação dos HPAs são diretamente afetados pela temperatura. Mesmo a biodegradação ocorrendo numa ampla faixa de temperatura, as maiores taxas acontecem entre 25 e 35°C, sendo que, em temperaturas acima ou abaixo dessas, há prejuízos para esse processo (Rizzo *et al.*, 2006).

Os microrganismos não têm facilidade de se dispersar e movimentar-se de um local contaminado a outro. Portanto, esse movimento restrito dos microrganismos pode afetar diretamente a biodegradação dos contaminantes, já que o substrato precisa estar disponível e acessível tanto para os microrganismos, quanto para suas enzimas (Rizzo *et al.*, 2006).

A baixa solubilidade destes contaminantes é outro fator que pode influenciar no crescimento microbiano e, como consequência, afeta a biodegradação. Geralmente, quanto maior for a solubilidade do contaminante em água, mais biodegradável será (Rizzo *et al.*, 2006).

O tipo de solo a ser tratado exerce papel importante na determinação da eficiência da biodegradação. A metabolização e a biodegradação de diversos poluentes possivelmente é limitada pela sorção dos compostos aos componentes do solo. A sorção aprisiona os contaminantes, removendo-os do estado dissolvido. Sendo assim, podem apresentar-se indisponíveis aos microrganismos e dessa forma não serão biodegradados. A sorção pode também minimizar os efeitos tóxicos dos contaminantes no solo, devido à sua baixa disponibilização (Rizzo *et al.*, 2006).

2.3.4 Biorremediação

Atualmente existem diversos métodos utilizados para reverter a poluição provocada por hidrocarbonetos de petróleo puros e dissolvidos no solo e seus derivados. Processos como extração de vapores do solo, bioventilação, extração

com solventes, incineração, torres de aeração, fitorremediação e biorremediação são usados para remediar o solo (Rosato, 1997).

O termo biorremediação engloba uma série de tecnologias e técnicas distintas para tratamento não só de solos, mas também de águas contaminadas (Trindade *et al.*, 2005).

A biorremediação de petróleo e derivados em solos é um conjunto de técnicas que se baseiam na habilidade dos microrganismos em degradar os diferentes constituintes do poluente (Oliveira, 2005).

O surgimento e desenvolvimento de técnicas que utilizam microrganismos livres e imobilizados para tratamento de áreas contaminadas com petróleo e derivados, constituem-se um importante meio alternativo de recuperação ecológica, especialmente por sua eficácia e menor custo (Melo & Craveiro, 2005).

Dependendo do tipo de contaminante, da área contaminada e dos recursos e tecnologias disponíveis, pode-se realizar a biorremediação por duas técnicas: *in situ*, ou seja, no local da contaminação, sem remoção do meio; ou *ex situ*, removendo-se o material contaminado para outro local. A remoção pode ser necessária quando há a possibilidade de os poluentes contaminarem pessoas e o ambiente próximo do solo a ser biorremediado ou, quando a presença de altas concentrações de contaminantes demanda a utilização de técnicas como compostagem, biorreatores, etc. (Jacques *et al.*, 2007).

O tratamento *in situ* é um dos meios de aplicação da biorremediação. Pode ser realizado pelo processo de bioestimulação, adição de microrganismos degradadores e fitorremediação (Souza e Silva *et al.*, 2005).

Uma das estratégias *in situ* é a biorremediação passiva ou intrínseca, também conhecida por atenuação natural. Nesta técnica, o contaminante permanece no local e, através de processos naturais como biodegradação, volatilização, diluição e sorção, ocorre a descontaminação do ambiente (Jacques *et al.*, 2007). Este método pode ser bastante lento, pois depende exclusivamente de processos naturais, levando assim ao uso conjunto de outras técnicas e o monitoramento contínuo do local por longos períodos de tempo, em vista da proteção da saúde do homem e do ambiente (Jacques *et al.*, 2007).

Outra técnica de biorremediação aplicada em ambientes degradados é a bioaumentação, que é a inoculação de um local contaminado com microrganismos com alto potencial de degradação dos contaminantes. Este método é muito utilizado quando o solo recebe um contaminante e não há populações microbianas capazes de degradar eficientemente este composto (Jacques, 2005).

A bioestimulação é uma técnica de biorremediação *in situ*, em que nutrientes orgânicos e inorgânicos podem ser adicionados ao solo visando a estimular a atividade dos microrganismos degradadores (Souza e Silva *et al.*, 2005).

Dentre as técnicas de biorremediação *ex situ*, a compostagem é bastante utilizada para o tratamento de HPAs, onde o solo é removido do local de origem e

colocado na forma de pilhas, num local que permita o controle da lixiviação e do escoamento superficial dos líquidos originados dessas pilhas. Neste solo, será desencadeado um processo em que os microrganismos aeróbios irão degradar os contaminantes orgânicos, transformando-os em material orgânico estabilizado, CO₂ e água (Jacques, 2007).

A utilização de biorreatores para a biorremediação de solos contaminados por HPAs, é aplicada principalmente quando esses encontram-se em altas concentrações. Nessa técnica, o solo contaminado é misturado com água, de modo a formar uma suspensão com 10 a 40% de sólidos, que é mecanicamente aerada através de rotações. A formação dessa suspensão no interior do biorreator possibilita o aumento da disponibilidade dos contaminantes aos microrganismos degradadores e a eliminação da heterogeneidade da distribuição dos contaminantes no solo (Macleod & Daugulis, 2005).

A biorremediação, processo biotecnológico de remediação tem sido intensamente pesquisada e recomendada pela comunidade científica atual como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, por ser uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento destes ambientes (Gaylarde *et al.*, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Quatro amostras de solo rizosférico de floresta nativa foram coletadas na Base de Operação Geólogo Pedro de Moura, Urucu, localizada próxima ao município de Coari no Amazonas, distante da capital, Manaus, cerca de 600 quilômetros. E quatro amostras da rizosfera de espécies frutíferas da Comunidade do Brasileirinho. A comunidade está situada na periferia do município de Manaus-AM, na estrada do Puraquequara, zona leste da cidade. (figura 1), no mês de maio de 2007, visando avaliar a presença de microrganismos e isolar culturas microbianas com potencialidade para degradar derivados de petróleo.

As amostras de solo rizosférico de floresta nativa foram coletadas em quatro regiões diferentes de floresta nativa, a 20 metros da margem da floresta e a uma profundidade de 5 a 10 cm (figura 2). As amostras de rizosfera do Brasileirinho foram retiradas de quatro espécies frutíferas de interesse econômico para a Amazônia: rizosfera de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), rizosfera de graviola (*Annona muricata*), rizosfera de camu-camu (*Myrciaria dubia*), rizosfera de araçá-boi (*Eugenia stipitata*) (figura 3). Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas sob refrigeração.

3.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SOLO

Todas as amostras de solo rizosférico foram submetidas à análise físico-química, realizada no Laboratório Temático de Solos e Plantas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Para a caracterização granulométrica foi utilizado o método da pipeta, baseado na desagregação mecânica da amostra, dispersão e avaliação da proporção relativa das partículas primárias por sedimentação em meio aquoso (anexo A). As análises químicas foram realizadas segundo metodologias descritas e recomendadas pela EMBRAPA (1997), de acordo com anexo B.

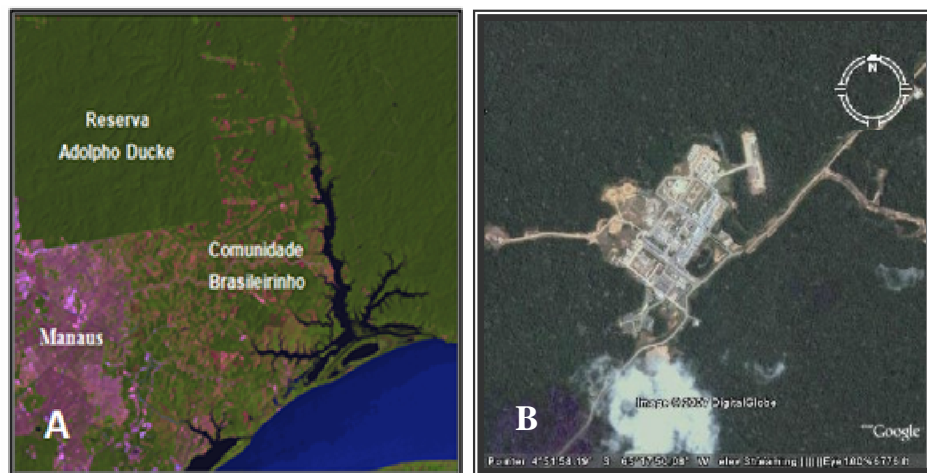


Figura 1: A: Comunidade rural do Brasileirinho, Manaus. B: Base da Província Petrolífera de Urucu. Fonte: Google Earth (2008).



Figura 2: Coleta de solo rizosférico de floresta nativa, Urucu. Foto: Francisco Wesen.



Figura 3: Coleta de rizosfera de plantas, Brasileirinho. Fonte: Francisco Wesen.

3.3 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS DE SOLO E RIZOSFERA

As amostras de solo rizosférico de plantas e de floresta (10g) foram inicialmente enriquecidas, em 95 mL de Meio Mineral Bushnell Haas – BH (Tabela 1), contendo um dos petroderivados (gasolina ou óleo diesel) como fonte de carbono na concentração de 0,95mL em relação ao volume de meio adicionado, em frascos erlenmeyer. Cada amostra foi submetida a três tratamentos diferentes: ausência de derivado de petróleo (testemunha), adição de gasolina e adição de óleo diesel (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1: Meio Mineral Bushnell Haas

Componentes	Quantidade
KH ₂ PO ₄	1,0g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
NH ₄ NO ₃	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
FeCl ₃	0,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
H ₂ O destilada	1000 mL

Fonte: Atlas (1995)

As amostras foram submetidas à agitação de 125 rpm à temperatura de 30°C ±1, durante 28 dias. A cada 7 dias realizou-se isolamento das bactérias que apresentaram crescimento na presença de gasolina e óleo diesel.

Tabela 2. Amostras de solos rizosféricos de floresta nativa de Urucu, utilizadas em diferentes tratamentos de fonte de carbono.

Solo	Tratamentos	Fontes de petróleo
SF1	1	Ausência
	2	Gasolina
	3	Óleo diesel
SF2	4	Ausência
	5	Gasolina
	6	Óleo diesel
SF3	7	Ausência
	8	Gasolina
	9	Óleo diesel
SF4	10	Ausência
	11	Gasolina
	12	Óleo diesel

Tabela 3. Amostras de solos rizosféricos coletadas na comunidade do Brasileirinho, utilizadas em diferentes tratamentos de fonte de carbono.

Solo/cultura	Tratamentos	Fontes de petróleo
SB1- rizosfera de cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i>)	1	Ausência
	2	Gasolina
	3	Óleo diesel
SB2- rizosfera de graviola (<i>Annona muricata</i>)	4	Ausência
	5	Gasolina
	6	Óleo diesel
SB3- rizosfera de camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	7	Ausência
	8	Gasolina
	9	Óleo diesel
SB4- rizosfera de araçá-boi (<i>Eugenia stipitata</i>)	10	Ausência
	11	Gasolina
	12	Óleo diesel

3.4 CONTAGEM, ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

Durante a incubação, a contagem de células viáveis (UFC/mL) foi realizada a cada sete dias, com a retirada de 1 mL de meio BH e diluído em água destilada

estéril em sete concentrações diferentes (10^2 a 10^8). Esse processo foi feito com as testemunhas (cultura sem fonte oleosa) e com os tratamentos enriquecidos (cultura com gasolina ou óleo diesel). Foram realizados plaqueamentos de 10 μ L de cada diluição em triplicatas (figura 4) em Meio BH sólido (tabela 2) adicionando-se a ele 15 g de Ágar Bacteriológico por litro. Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura ambiente de $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ por um período de 48 a 72 horas. Para os isolamentos foram usadas as diluições de 10^6 , 10^7 , e 10^8 , visando encontrar apenas os microrganismos capazes de usar as fontes de carbono adicionado ao meio para seus crescimentos (gasolina e óleo diesel). O isolamento foi realizado em Meio BH sólido. As fontes de carbono (gasolina ou óleo diesel) foram colocadas pela técnica de Pour Plate ou incorporação. Após certo esfriamento do meio, antes de sua solidificação, a gasolina e óleo diesel foram adicionados.

As culturas obtidas dos tratamentos testemunhas foram semeadas em meio de cultura contendo gasolina e óleo diesel, enquanto que os tratamentos foram distribuídos no meio mineral contendo os petroderivados utilizados no enriquecimento. As placas foram incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ até o crescimento de colônias de microrganismos.

As culturas que apresentaram crescimento foram isoladas e purificadas pela técnica de esgotamento por estrias em placas de Petri contendo Meio BH sólido, tendo glicose como fonte de carbono (10,0 g/L). Após o período de incubação a 35°C , as culturas purificadas foram mantidas sob 4°C para realização dos ensaios subseqüentes. Cada isolado purificado foi transferido para frasco-ampola estéril

contendo o meio sólido já citado e depositado na Coleção de Microrganismos da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas (CPCA) do INPA.

A morfologia dos isolados foi analisada através da microscopia óptica para a caracterização dos diferentes grupos microbianos, pela coloração de Gram.



Figura 4: Semeadura das diluições 10^6 , 10^7 , 10^8 .

3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE PETRODERIVADOS

A avaliação da capacidade dos isolados em degradar gasolina e óleo diesel foi realizada pela técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), segundo Hanson *et al* (1993). Modificou-se a metodologia original que utilizava placas multipocões tipo ELISA. O ensaio foi realizado em tubos de ensaio contendo 250 μ L de meio Mineral BH (sem fonte de carbono), 200 μ L do DCPIP, 10 μ L de petroderivados e 30 μ L de inóculo padronizado a 10^8 UFC/mL sendo determinado o número de microrganismos em Câmara de Neubauer. O controle negativo (abiótico)

continha Meio Mineral BH, indicador DCPIP e petroderivados. Observou-se a cada 24 horas, até desaparecimento da coloração azul do indicador DCPIP, ou seja, passou da forma reduzida para a forma oxidada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SOLO

Os resultados da caracterização granulométrica estão na tabela 4. Os solos rizosféricos de árvores frutíferas do Brasileirinho, após análise da granulometria, foram classificados como argilosos, enquanto os solos de floresta nativa de Urucu foram classificados como arenosos. De acordo com Cochrane *et al.* (1985) o solo arenoso é aquele que apresenta na sua composição mais de 35% de argila e o solo arenoso que apresenta na sua composição maior concentração de areia. Segundo Siqueira e Franco (1988), a textura do solo é considerada como fator importante para um melhor entendimento das variações existentes nas comunidades microbianas, devido à adesão das células à fração argila. E ainda afirmam que a textura pode proporcionar a formação de microambientes adequados ao desenvolvimento de microrganismos.

Siqueira e Franco (1988) relacionam a diversidade microbiana às vastas diferenças existentes na composição dos solos, juntamente com suas diferenças nas características físicas, resultando em grandes diferenças no tamanho da população microbiana, bem como nos tipos de microrganismos que constituem essa população.

Para Siqueira *et al* (1994), a atividade que os microrganismos desempenham no ambiente está relacionada com a fertilidade, estrutura, condições de sanidade e com a própria formação dos solos, através de processos de redução, oxidação, produção de enzimas e liberação de produtos metabólicos que provocam

modificações importantes nas propriedades do solo como pH e estrutura. De acordo com Pelczar (1981) os microrganismos do solo atuam como agentes bioquímicos no processo de mineralização do C, N, S, P e outros compostos orgânicos.

Tabela 4: Resultados da caracterização granulométrica dos solos rizosféricos de floresta nativa de Urucu e de espécies frutíferas da Comunidade do Brasileirinho.

Amostras	Areia total	Silte	Argila	Textura do solo
	2.00-5.00mm	0.05-0.002mm	< 0.002 mm	
SB1	303	87	610	Argiloso
SB2	182	98	720	
SB3	110	100	790	
SB4	113	107	780	
SF1	542	323	135	Arenoso
SF2	682	163	155	
SF3	389	346	265	
SF4	713	132	155	

SB1, SB2, SB3, SB4: Amostras de rizosfera de árvores frutíferas da Comunidade do Brasileirinho, Manaus.

SF1, SF2, SF3, SF4: Amostras de solos de floresta nativa de Urucu, Coari.

Nas análises físico-químicas das amostras de solo foram verificadas as seguintes variáveis: N, P, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn, Al, C e pH (tabela 5). Oliveira *at al*, (1997), os solos amazônicos apresentam boas propriedades físicas e suas características principais são baixa fertilidade natural, elevada acidez e alta saturação com alumínio. Essas características dificultam o bom desenvolvimento das plantas e sua associação com microrganismos. Oliveira (1994) afirma ainda que os teores de nutrientes como o Ca, Mg, P e K estão em concentrações bem inferiores às necessárias para o bom desenvolvimento das plantas.

Tabela 5: Resultados das análises físico-químicas dos solos rizosféricos de floresta nativa e de espécies frutíferas do Brasileirinho.

Amostras	Prof.(cm)	pH	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Al ⁺⁺⁺	K ⁺	P	Fe	Zn	Mn	C
		H ₂ Ocmolc.Kg.....			mg.Kg.....				g.Kg
SB1	0-5	4,0 B	0,78 M	0,16 B	1,9 A	0,10 B	9,4 A	263 A	1,5 S	3,0 B	33
SB2	0-5	4,0 B	0,25 B	0,13 B	2,8 A	0,13 B	7,4 A	301 A	1,2 B	1,7 B	46
SB3	0-5	4,0 B	1,08 M	0,48 M	1,8 A	0,29 M	10,9 A	176 A	18,0 S	8,0 S	60
SB4	0-5	4,0 B	0,49 M	0,22 M	2,6 A	0,19 M	9,0 A	88 A	2 S	3,4 B	60
SF1	5-10	4,0 B	0,11 B	0,33 M	1,8 A	0,23 M	4,3 M	328 A	1,4 B	11,0 S	43
SF2	5-10	4,0 B	0,06 B	0,08 B	2,9 A	0,14 B	2,5 B	205 A	0,4 B	0,9 B	19
SF3	5-10	4,0 B	0,36 B	0,33 M	4,2 A	0,16 M	1,8 B	471 A	0,4 B	2,4 B	30
SF4	5-10	4,0 B	0,04 B	0,10 B	2,7 A	0,13 B	3,3 B	207 A	0,6 B	0,4 B	17

SB1, SB2, SB3, SB4: Amostras de solos rizosféricos de arvores frutíferas, Comunidade do Brasileirinho, Manaus.
 SF1, SF2, SF3, SF4: Amostras de solos de floresta nativa de Urucu, Coari.

Propriedades Químicas do solo segundo Cochrane *et al.* (1985): A= alto, M= mediano, B= Baixo, S= satisfatório.

Os valores de pH de todas as amostras, tanto rizosféricas quanto de floresta nativa, foram baixos, concordando com a citação de Oliveira (1997). Siqueira e Franco (1988) relatam que o pH influencia diretamente a comunidade microbiana gerando um efeito seletivo sobre os microrganismos. De acordo com Hansen (1993) dentre os fatores ambientais que afetam a biorremediação de hidrocarbonetos no solo, o pH age diretamente na atividade de microrganismos pela ação dos íons H^+ , interferindo na permeabilidade celular e ação enzimática. E indiretamente pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos.

Comparando-se os teores de Ca entre os solos rizosféricos de árvores frutíferas e os solos de floresta nativa, os primeiros apresentaram maiores valores. Os valores mais elevados de Ca foram encontrados nas amostras SB3 e SF3. De acordo com Cochrane *et al.* (1985) essas concentrações são classificadas como médias e baixas respectivamente. Os valores médios de Ca e Mg encontrados nas amostras SB3 e SB4 podem ser um resíduo de clagem doméstica colocada na área cultivada.

Os valores de Mg das amostras SB e SF de acordo com Cochrane *et al.* (1985), são classificados como baixos e médios. Os maiores valores foram verificados nas amostras SB3 e SF1 e SF3. Segundo Hart. (1996), valores de pH inferior a 4,5 no solo indicam baixos teores de Ca e Mg, boa disponibilidade dos micronutrientes Fe, Mn e Zn, deficiência de P e possível toxidez por alumínio.

Os teores de Al das amostras apresentaram valores altos de acordo com a classificação de Cochrane *et al.* (1985), podendo ser nocivo para plantas sensíveis. Os solos de floresta nativa apresentaram teores mais elevados que os solos rizosféricos de árvores frutíferas. A amostra SF3 apresentou um valor bem superior em relação às demais amostras. SB3 foi a amostra rizosférica que apresentou teor de Al mais elevado. De acordo com Romhelf (1999), a ocorrência de Al em níveis tóxicos pode ser mais elevado nos solos argilosos e mais baixo nos solos arenosos, discordando dos resultados desse trabalho. Raven, (2001) diz que o Al é o metal mais comum encontrado no solo, e em solos ácidos, torna-se solúvel, é absorvido pelas raízes e pode inibir o crescimento de plantas sensíveis. As espécies frutíferas do presente estudo e da floresta de Urucu, no entanto, podem estar adaptadas aos teores de Al disponíveis nesses solos.

As amostras apresentaram teores de K baixos e médios de acordo com a classificação de Cochrane *et al.* (1985). A amostra SB3 apresentou maior valor entre os solos rizosféricos de árvores frutíferas e a amostra SF1 entre os solos de floresta nativa.

Os teores de P das amostras de solo rizosférico de árvores frutíferas apresentaram valores elevados segundo a classificação de Cochrane *et al.* (1985), já as amostras de solo de floresta nativa apresentaram valores mais baixos e segundo o já referido autor são classificadas como baixas e médias. Segundo Bataglia (2001), os elevados teores de P nos solos rizosféricos de árvores frutíferas são indicativos de que tais solos receberam adubação. E o baixo pH dos solos de

floresta explica a baixa quantidade de P, já que este se torna indisponível, por haver interação do P com Al e Fe do solo originando fosfato de alumínio e fosfato de ferro.

Os teores de Fe das amostras de acordo com Cochran *et al.* (1985) apresentaram-se altos. A quantidade de Zn das amostras de solos rizosféricos de árvores frutíferas ainda segundo a classificação do já citado autor, classificaram-se como satisfatórias, já as amostras de solo de floresta apresentaram teores baixos. Observaram-se baixos teores de Mn nas amostras SB1, SB2, SB4, SF2, SF3, SF4 e teores satisfatórios nas amostras SB3 e SF1.

4.2 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS

As tabelas 6 e 7 apresentam a evolução, com o tempo, da contagem dos microrganismos dos solos rizosféricos de floresta nativa de Urucu utilizando como fonte de carbono, gasolina e óleo diesel, respectivamente, durante os 28 dias de enriquecimento.

Tabela 6. Avaliação do crescimento de bactérias de solos rizosféricos de floresta de Urucu com potencial para biodegradação de gasolina.

Solos/Tratamentos		Enriquecido	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
.....n° 10 ⁶ bactérias g ⁻¹ solo.....						
SF1*	1	Não	24	2182	254	2
	2	Sim	285	347	307	4
SF2*	4	Não	23	198	38	4
	5	Sim	195	203	129	2
SF3*	7	Não	36	204	29	4
	8	Sim	133	16986	277	3
SF4*	10	Não	578	303	23	4
	11	Sim	167	35	372	3

* Rizosfera de camada superficial de área de floresta da BOGPM: Base de Operações Geólogo Pedro de Moura, Urucu, Coari, Amazonas.

Aos 7 dias de enriquecimento, as amostras SF1, SF2 e SF3 apresentaram aumento de população nos tratamentos 2, 5 e 8, que receberam gasolina como fonte de carbono quando comparadas com suas respectivas testemunhas (tabela 6). Esse resultado deve-se aos nutrientes disponíveis no solo e também aos nutrientes orgânicos oferecidos pela gasolina, que foram bem utilizados pelos microrganismos presentes. Segundo Melo & Azevedo (1997), a presença de hidrocarbonetos no solo contaminado pode ocasionar aumento do tamanho da população microbiana. Os tratamentos 1, 4 e 7, que não receberam gasolina, não apresentaram aumento substancial na população, pois dispuseram apenas das fontes de carbono presentes na matéria orgânica da camada superficial do solo. A amostra de solo de floresta SF4 apresentou resultado diferenciado em relação às já citadas anteriormente (SF1, SF2 e SF3). A adição de gasolina (tratamento 11) resultou numa inibição parcial inicial da população de microrganismos desse solo até os 14 dias de incubação, quando então aumentou aos 21 dias e, como as demais, aos 28 dias, já havia consumido a maior parte das fontes de carbono autóctone e a adicionada na forma de gasolina. Melo & Azevedo (1997) citam que a presença do petróleo e seus derivados no solo, além do enriquecimento, provocam o decréscimo de alguns microrganismos expostos aos componentes do petróleo. Isso pode explicar os dados obtidos com a amostra SF4 aos 7 dias e 14 dias. A ação pode ser bacteriostática ou bactericida, dependendo da concentração. Outros microrganismos ainda se comportam de forma neutra em resposta à adição de hidrocarbonetos. No último caso, não há alteração da população. Para Brooks (1998), poucos microrganismos têm capacidade de degradar e assimilar carbono orgânico de cadeias complexas, como os hidrocarbonetos. Sem a adição da gasolina (tratamento 10), observou-se uma queda gradual já aos 21 dias, indicando o consumo das fontes de carbono

natural presentes no solo pela degradação da liteira e exsudatos radiculares das plantas presentes na área florestal.

Campbell *et al.* (1992) afirmam que o monitoramento da comunidade microbiana pode ser utilizado como indicativo de qualidade do solo. Nos casos das amostras de solo de floresta SF1 e SF4, os teores de matéria orgânica e principalmente os de P presente na camada superficial aparentemente são capazes de suprir as necessidades de uma alta população de microrganismos, o que pode ser observado pelos valores numéricos apresentados na tabela 5. Os teores de P de ambas as amostras podem ser o principal responsável pelos resultados obtidos, tendo em vista seus maiores valores (tabela 5) e sua importância como componente da formação de energia (ATP) para microrganismos de acordo com Rosato (1997).

Aos 14 dias de enriquecimento, percebeu-se aumentos populacionais em quase todas as amostras de solo rizosférico de floresta, exceto para os tratamentos 5 (SF2 enriquecido) e, 10 e 11 (SF4), destacando-se as amostras SF1, tratamento 1 (sem gasolina) e SF3, tratamento 8 (com gasolina) que apresentaram um grande aumento em relação às demais amostras de solo de floresta neste intervalo de tempo. Healy *et al.* (1996) explicam que evolutivamente, bactérias se adaptam para sintetizarem produtos ativos de superfície, capacitando-as para a absorção, emulsificação, dispersão ou solubilização de substâncias não miscíveis em água, o que explica a utilização de gasolina e óleo diesel como fonte de energia.

Aos 21 dias, as amostras de solo rizosférico de floresta em geral apresentaram queda populacional. Ao se comparar com a avaliação aos 14 dias,

com exceção do tratamento 11. Isso se deve à diminuição de nutrientes disponíveis e início da fase de declínio dos microrganismos presentes nas amostras de solo e capazes de degradar a gasolina. A amostra SF4, tratamento 11 (com gasolina) apresentou ainda um aumento populacional, diferenciando-se das demais amostras. Atlas (1984) explica que a poluição do solo pode conduzir a um decréscimo na diversidade microbiana em termos de abundância de espécies, devido à extinção de espécies não adaptadas ao estresse imposto; mas pode também ocasionar o enriquecimento de espécies particulares mais adaptadas a esse estresse.

Aos 28 dias, todas as amostras de solo rizosférico de floresta nativa apresentaram brusca queda populacional, devido à diminuição de nutrientes necessários à sua multiplicação, indicando a fase de declínio.

Aos 7 dias de enriquecimento (Tabela 7), todas as amostras de solo rizosférico de floresta (SF1, SF2, SF3 e SF4) que receberam óleo diesel como fonte de carbono (tratamentos 3, 6, 9 e 12) apresentaram maior crescimento populacional em relação aos tratamentos sem adição do óleo diesel, indicando que também usaram esta fonte de carbono para se multiplicarem. Assim, os microrganismos presentes nessas amostras de solos rizosféricos de floresta mostraram-se capazes de utilizar tanto a gasolina (tabela 6) quanto o óleo diesel (tabela 7) como fontes de carbono. Os hidrocarbonetos presentes no solo, originados da adição do óleo diesel, podem ocasionar no aumento populacional de microrganismos, dependendo da composição química do óleo contaminante e das espécies microbianas presentes no solo (Melo & Azevedo, 1997). Já os demais tratamentos (1, 4, 7 e 10) apresentaram menores populações de microrganismos, por utilizarem apenas os nutrientes do solo

e não terem disponível mais nenhuma fonte de carbono exceto as que já se encontravam nos solos.

Tabela 7. Avaliação do crescimento de bactérias de solos rizosféricos de floresta de Uruçu com potencial para biodegradação de óleo diesel.

Solos/Tratamentos		Enriquecido	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
.....n°10 ⁶ bactérias g ⁻¹ solo.....						
SF1	1	Não	25	207	195	1
	3	Sim	187	96	160	2
SF2	4	Não	15	127	33	2
	6	Sim	200	97	402	1
SF3	7	Não	24	152	35	2
	9	Sim	149	2600	247	5
SF4	10	Não	14	21	97	3
	12	Sim	199	188	163	2

Aos 14 dias de enriquecimento, as populações das amostras enriquecidas não apresentaram aumento, talvez por que tenham usado os componentes do óleo diesel mais facilmente disponíveis consumidos antes desse período de incubação, ficando apenas aqueles de menor capacidade de decomposição, mais complexos, de cadeia carbônica mais longa. Tal acontecimento deve-se ao fato de os hidrocarbonetos do óleo diesel serem constituídos por moléculas de 8 a 40 átomos de carbono, sendo, portanto, mais pesados do que aqueles que compõem a gasolina (Rosato, 1997). A amostra SF3 foi exceção, pois continuou a apresentar aumento populacional no tratamento enriquecido (tratamento 9). Apresentou também acréscimo da população no tratamento sem enriquecimento com óleo diesel (tratamento 7). Portanto, essa população de microrganismos de solo de floresta apresentou melhor capacidade de utilização dos nutrientes (matéria orgânica) presentes no solo em relação aos demais tratamentos que não receberam óleo diesel (tratamentos 1, 4 e 10). Os microrganismos presentes neste mesmo solo que

recebeu óleo diesel (tratamento 9), apresentaram-se capazes de adaptar-se rapidamente á presença desse poluente, utilizando-o como fonte de carbono em placa de Petri. A contaminação de sedimentos por hidrocarbonetos influencia a taxa de desenvolvimento bacteriano e atividades enzimáticas, os quais determinam as taxas de utilização dos hidrocarbonetos de petróleo (Silva *et al.*, 2002).

Aos 21 dias de experimento, os tratamentos 1 e 3 da amostra SF1 e os tratamentos 10 e 12 da amostra SF4 (sem e com óleo diesel) mantiveram o número de microrganismos, sem apresentar aumento ou diminuição da população, demonstrando que sua capacidade degradadora é mais lenta em relação às demais amostras de solo rizosférico de floresta que receberam óleo diesel como fonte de carbono. A degradação dos HPAs no solo pode ser limitada pela incapacidade dos microrganismos em metabolizar de maneira eficiente esses compostos, seja pela falta de nutrientes à microbiota degradadora ou pela baixa biodisponibilidade dos HPAs aos microrganismos degradadores (Jacques *et al.*, 2007). De acordo com Jacobucci (2000), o aumento da degradação de hidrocarbonetos está relacionado com a reposição contínua do substrato utilizado como fonte de carbono.

Aos 28 dias, todas as amostras apresentaram declínio significativo do número de bactérias.

A tabela 8 apresenta os resultados do enriquecimento das amostras de rizosfera de espécies frutíferas da Comunidade do Brasileirinho com gasolina.

Tabela 8. Avaliação do crescimento de bactérias de solos rizosféricos da comunidade do Brasileirinho com potencial para biodegradação de gasolina.

Solos/Tratamentos	Enriquecido	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	
.....n°10 ⁶ bactérias g ⁻¹ solo.....						
SB1	1	Não	13	16	27	2
Cupuaçu	2	Sim	235	149	20	22
SB2	4	Não	5	11	230	1
Graviola	5	Sim	390	205	35	9
SB3	7	Não	44	13	273	3
Camu-camu	8	Sim	16	>500	710	62
SB4	10	Não	6	50	12	2
Araçá-boi	11	Sim	137	>500	187	2

Percebe-se que aos 7 dias, os tratamentos 2, 5 e 11, que receberam gasolina, apresentaram maiores populações de microrganismos capazes de utilizá-la como fonte de carbono quando comparadas com suas testemunhas. De acordo com Healy *et al.* (1996), pela evolução, as bactérias foram se adaptando do ponto de vista nutricional, sendo capazes de utilizar variadas fontes de carbono, inclusive substâncias imiscíveis em água como a gasolina. A presença de populações de microrganismos capazes de degradar a gasolina em áreas nunca contaminadas com esse componente indicam que podem apresentar diferentes mecanismos de adaptações às condições edafoclimáticas locais. A única amostra enriquecida com gasolina e que apresentou resultado semelhante à sua testemunha foi a amostra de rizosfera do camu-camu (SB3). A baixa taxa de degradação de um contaminante no solo pode ser resultado do número reduzido ou inexistente de microrganismos com habilidade de degradação do composto (Jacques *et al.*, 2007). Segundo Piehler (2003), concentrações sub-letais de poluentes podem fazer com que espécies que não são naturalmente dominantes sejam selecionadas em ecossistemas. As demais amostras que não receberam derivado de petróleo apresentaram menores crescimentos, pois dispuseram apenas das fontes de carbono presentes no solo rizosférico.

Aos 14 dias, houve uma pequena redução das populações dos tratamentos 2 e 5 das amostras de solo das rizosferas de cupuaçu e graviola respectivamente. Segundo Melo & Azevedo (1997), nessa situação, o decréscimo pode ter sido seletivo da população microbiana. Schocher (1991) e Mester (1995) citam que um grande número de compostos orgânicos pode ser rapidamente degradado sob condições aeróbicas onde o oxigênio serve como aceptor de elétrons durante a biodegradação. Porém, em muitos sítios contaminados, a difusão de oxigênio dentro dos solos é insuficiente para manter os níveis necessários da atividade aeróbica para a efetiva remediação. Houve uma alta elevação das populações nos tratamentos 8 e 11 das amostras de solo rizosférico do camu-camu e araçá-boi, quando comparadas com as ocorridas aos 7 dias de experimento. O tratamento 8 que aos 7 dias não apresentou aumento populacional, aos 14 dias apresentou elevação substancial da população microbiana, tal fato, pode ser explicado, de acordo com Melo & Azevedo (1997), pela adaptação envolvendo enzimas específicas e mudanças genéticas, que levam a novas atividades metabólicas, como o aumento da capacidade degradadora desses microrganismos. Atlas (1991) e Mendonça (2002) afirmam que a biodegradação de derivados de petróleo por populações naturais de microrganismos, representa um dos mecanismos primários pelo qual os compostos poluentes são eliminados do meio ambiente. Sendo assim, o grau de biodegradação e a mineralização de hidrocarbonetos contaminantes podem ser influenciados, tanto por fatores físicos e químicos, quanto por fatores biológicos. Nas amostras sem adição de gasolina observou-se uma elevação apenas da população do tratamento 10 (araçá-boi), em relação à observada aos 7 dias.

Aos 21 dias a amostra de rizosfera de cupuaçu que recebeu gasolina, apresentou queda no crescimento bacteriano, demonstrando, que os microrganismos presentes nessa amostra degradaram com facilidade e rapidez a gasolina adicionada ao meio, e tal queda no crescimento microbiano, deve-se a diminuição das fontes de carbono presentes na gasolina. No processo de biodegradação de petróleo e seus derivados, em certos casos, há o enriquecimento primário de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos e secundariamente por microrganismos capazes de utilizar os metabólitos produzidos pelos organismos primários, ocasionando na rápida retirada do poluente do ambiente (Melo & Azevedo, 1997). O tratamento dessa mesma amostra (SB1), que não recebeu gasolina (tratamento 1) apresentou leve aumento da população e a amostra de solo da graviola (SB2) sem gasolina, apresentou aumento substancial da população de microrganismos. Em ambos os casos, o aumento populacional pode ter ocorrido pela boa disponibilidade de nutrientes presentes no solo rizosférico, ou ainda, pela interação entre as plantas e a microbiota na rizosfera (Adam e Duncan, 1999). O tratamento 5, da rizosfera de graviola com gasolina, apresentou queda populacional, provavelmente pela diminuição de fontes de carbono da gasolina. A amostra SB3 apresentou aumento de crescimento nos dois tratamentos (sem gasolina, 7; com gasolina, 8), demonstrando que a matéria orgânica presente no solo rizosférico de camu-camu ainda se apresentava em quantidade suficiente para proporcionar elevados crescimentos da microbiota. Os elevados teores de matéria orgânica dos solos rizosféricos de árvores frutíferas, deve-se à ação antrópica, como, a adição de nutrientes e adubação, sendo assim, de acordo com Siciliano & Germida (1999), as plantas podem estimular o desaparecimento da contaminação pela estimulação da atividade degradativa de microrganismos presentes na

rizosfera, explicando assim, o aumento populacional no tratamento que recebeu gasolina.

Na amostra de rizosfera de araçá-boi isso não ocorreu. Houve então decréscimo populacional da microbiota nos dois tratamentos (tratamentos 10 e 11), indicando diminuição da quantidade de matéria orgânica e matéria orgânica mais gasolina, respectivamente. De acordo com Rahman *et al*, (2002), a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo no solo pode ser limitada pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizar eficientemente esses compostos, pela falta de nutrientes à microbiota degradadora ou pela baixa biodisponibilidade dos hidrocarbonetos aos microrganismos degradadores, devido à sorção à fase sólida mineral e orgânica do solo.

Aos 28 dias de incubação, todas as amostras enriquecidas com gasolina apresentaram brusco declínio no número populacional de microrganismos indicando diminuição de fontes de alimento presentes nas rizosferas dessas frutíferas e diminuição de fontes de carbono disponibilizadas pela gasolina.

Na tabela 9 observa-se o comportamento das amostras de rizosfera de árvores frutíferas da Comunidade do Brasileirinho que receberam como fonte de carbono, o óleo diesel.

Aos 7 dias, observa-se que apenas a população de microrganismos da rizosfera de camu-camu não respondeu positivamente à adição de óleo diesel, demonstrando baixa capacidade em degradar esse poluente. A baixa taxa de

degradação de um contaminante no solo pode ser resultado do número reduzido ou inexistente de microrganismos com habilidade de degradação do composto (Jacques *et al.*, 2007). O referido autor cita ainda que, para que um microrganismo utilize estes compostos como fonte de C e energia para o seu crescimento, é necessário que possua as várias enzimas que transformam as complexas moléculas dos hidrocarbonetos de petróleo em intermediários comuns das suas rotas catabólicas.

Tabela 9. Avaliação do crescimento de bactérias de solos rizosféricos da comunidade do Brasileirinho com potencial para biodegradação de óleo diesel.

Solos/ Tratamentos		Enriquecido	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
.....n° 10 ⁶ bactérias g ⁻¹ solo.....						
SB1	1	Não	19	11	2,6	1
Cupuaçu	3	Sim	99	667	73,5	39,00
SB2	4	Não	2	13	0,02	≤0,01
Graviola	6	Sim	4700	1031	26,3	5,10
SB3	7	Não	3	26	12,1	≤0,01
Camu-camu	9	Sim	5	138	64	30,00
SB4	10	Não	9	14	8,6	13,80
Araçá-boi	12	Sim	69	131	26,5	40,00

Aos 14 dias, a amostra de rizosfera de cupuaçu, tratamento 3, manteve seu aumento da população de microrganismos, confirmando a degradação do óleo diesel, porém lentamente, talvez pela complexidade da molécula do poluente. O tratamento 1, sem enriquecimento com óleo diesel, apresentou queda de população microbiana, demonstrando queda da quantidade de nutrientes presentes no solo rizosférico do cupuaçu. A amostra da rizosfera de graviola com óleo diesel apresentou queda populacional; seu aumento populacional foi vigoroso nos primeiros 7 dias alcançando um valor de 4700 UFC, e mesmo com uma diminuição aos 14 dias, permaneceu com um número de microrganismos elevado, em

comparação às demais amostras enriquecidas com óleo diesel, confirmando a potencialidade de degradação de combustível pelos microrganismos presentes nessa amostra. Tal acontecimento pode ser explicado, segundo Jacques *et al.* (2007), pela ocorrência de uma grande variedade de espécies bacterianas presentes no mesmo ambiente. Consórcios bacterianos podem favorecer na degradação de gasolina e óleo diesel, pois apresentam maior capacidade de utilização de um grande número de hidrocarbonetos presentes no petróleo e seus derivados. Richard & Vogel (1999), estudando um consórcio bacteriano degradador de óleo diesel no solo, verificaram que, dos sete membros deste consórcio, quatro não utilizavam diretamente o óleo como fonte de carbono e energia; no entanto, a presença destes aumentava a produção de CO₂ pelo consumo de intermediários produzidos pelos demais membros.

Na amostra de camu-camu, tratamento 9, os microrganismos presentes apresentaram uma queda até o 7º dia, como resposta adaptativa às condições de bioensaio, de acordo com Atlas (1984). Aos 14 dias apresentou aumento considerável no número de bactérias, quando comparada ao tratamento 7 (sem óleo diesel) da mesma amostra. Aos 14 dias, a amostra de rizosfera de araquá-boi que recebeu óleo diesel como fonte de carbono manteve o crescimento bacteriano já observado aos 7 dias, indicando utilização de óleo diesel como fonte de carbono pela microbiota dessa amostra. Richard & Vogel (1999), estudando um consórcio bacteriano degradador de óleo diesel no solo, verificaram que, dos sete membros deste consórcio, quatro não utilizavam diretamente o óleo como fonte de carbono e energia; no entanto, a presença destes aumentava a produção de CO₂ pelo consumo de intermediários produzidos pelos demais membros.

Com 21 dias de experimento, todas as amostras e todos os tratamentos (com óleo diesel e sem óleo diesel), apresentaram queda das populações microbianas, indicando diminuição de matéria orgânica e fontes de energia. Destacou-se nesse período, a amostra de graviola sem óleo diesel, que apresentou diminuição significativa em comparação aos demais tratamentos que não receberam esse componente, indicando dessa forma, sua rápida utilização.

Ao final de 28 dias de enriquecimento, as amostras que receberam óleo diesel (tratamentos 3, 9 e 12) apresentaram queda populacional pequena quando comparadas ao tratamento 6 da rizosfera de graviola, que apresentou considerável diminuição populacional. Sendo assim, percebe-se que os microrganismos das amostras das rizosferas de cupuaçu, camu-camu e araçá-boi degradam o óleo diesel mais lentamente que a microbiota presente na amostra de graviola, apresentando-se mais eficiente no processo de biorremediação. Todos os tratamentos que não passaram pela adição do óleo diesel apresentaram diminuição das populações de microrganismos passados 28 dias de incubação.

Diversos autores (Atlas, 1984; Campbell *et al.*, 1992; Jacques *et al.*, 2007; Melo & Azevedo, 1997; Rosato, 1997; Silva *et al.*, 2002) citam a importância da adição de nutrientes para a melhoria na eficiência da biodegradação de resíduos. A utilização de gasolina e óleo diesel como substrato para os microrganismos presentes nas amostras pôde ser demonstrado pelos seus aumentos populacionais. De acordo com Pirôllo (2005), a adição de óleo diesel provoca um aumento na quantidade de carbono no meio de cultivo, promovendo o crescimento celular, demonstrando a capacidade desses microrganismos em degradar esse

hidrocarboneto. Conforme Norris *et al.* (1994, *apud* Lima, 2002), entre outros fatores, o aumento da concentração de elementos nutritivos determina a dinâmica metabólica.

De acordo com Baker & Herson (1994), existe um período de adaptação dos microrganismos ao meio. Tais autores reconhecem esse período como fase *lag*, a qual precede a fase do crescimento exponencial do número de bactérias, quando ocorre a maior degradação microbiana. Conforme os resultados apresentados, a maioria das amostras mostrou um aumento substancial já aos 7 dias, supondo que esta fase não ocorreu. Ensaio realizado por Pirôllo (2005) mostraram resultados semelhantes, onde o crescimento celular máximo foi atingido nas primeiras 48 horas após adição de diferentes concentrações de óleo diesel. Sendo assim, provavelmente os microrganismos utilizaram grande parte da fonte de carbono da gasolina e óleo diesel nos primeiros 7 dias.

Savergnini e Crapez (1998), em estudo de produção de surfactantes por consórcios bacterianos isolados de algas sob a influência de hidrocarbonetos verificaram que a adição de benzeno, tolueno e xileno em um período de 30 dias promoveram o aumento da biomassa aos 15 dias e declínio até os 30 dias e as taxas de emulsificação em geral apresentaram aumento após 15 dias de experimento.

Savergnini e Crapez (1998) citam que a diversidade de substratos que abrigam comunidades bacterianas são áreas ainda a serem exploradas. Um aspecto importante neste trabalho é a utilização de solos não contaminados por derivados de

petróleo da região amazônica para selecionar bactérias com o potencial de degradar gasolina e óleo diesel. Diversos estudos já foram realizados utilizando solos contaminados por petróleo ou por seus derivados, para selecionar bactérias com potencial degradador (Balba *et al*, 1998; Crapez *et al*, 2002; Cury,2002; Nicolotti & Egly, 1998). Praticamente se desconhece a diversidade de comunidades microbianas nativas de locais não impactados, que apresentam potencialidades em degradar petróleo e derivados, conforme pesquisas realizadas no Rio de Janeiro, Brasil (Evans *et al.*, 2004ab).

4.3 CONTAGEM, ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS.

A adição de fontes de carbono contaminantes em certos ambientes pode aumentar a concentração de microrganismos nativos, embora esse acréscimo não seja suficiente para degradar totalmente o contaminante (Walker *et al.*, 1975 *apud* Del'Arco, 1999). A aceleração da biodegradação natural, através do aumento da população microbiana degradadora de fontes contaminantes, resulta no processo da biorremediação e a contagem microbiana torna-se imprescindível no monitoramento dessa etapa (Baker & Herson, 1994).

Alguns trabalhos efetuados por Del'Arco (1999) mostram a contagem da população microbiana na aplicação da biorremediação, em bioreatores usados na simulação de derrames de óleo em sedimentos costeiros. No atual trabalho, a contagem microbiana foi realizada visualmente através da contagem das UFC/mL de meio e posteriormente os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição de cada amostra, obtendo-se, assim, os números de células totais.

A contagem de colônias de microrganismos capazes de degradar gasolina e/ou óleo diesel permitiu o aparecimento de uma população microbiana que se isolada, purificada e testada, poderá ser usada em processos de biorremediação de solos contaminados com esses derivados de petróleo. Em vista disso, foi realizado esse trabalho. Assim, dos solos rizosféricos de floresta nativa de Urucu, foram obtidos 38 isolados e de rizosfera de espécies frutíferas do Brasileirinho, 32 isolados, classificados de acordo com a tabela 10.

Os isolados de URU001 a URU010 foram purificados da amostra SF1, de URU11 a URU017 da amostra SF2, URU18 a URU26 da SF3 e, de URU27 a URU38 da SF4. Nas amostras do Brasileirinho, de BR001 a BR 010 foram isolados da amostra SB1 (cupuaçu), BR011 a BR 019 da SB2 (graviola), BR020 a BR 026 da SB3 (camu-camu) e BR027 a BR 032 da SB4 (araçá-boi).

Na identificação dos isolados de Urucu e do Brasileirinho pela coloração de Gram, observou-se a presença de bacilos e cocos Gram negativos (Anexos C.1 e C.2).

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE PETRODERIVADOS

Utilizou-se o indicador redox-2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) em meio de cultivo BH para detecção do potencial bacteriano em degradar hidrocarbonetos (Hanson *et al.*, 1993), de acordo com as condições descritas anteriormente.

Todas as linhagens obtidas dos solos rizosféricos de floresta nativa de Urucu e de espécies frutíferas do Brasileirinho apresentaram resultado positivo, obtidos a partir da observação visual da descoloração do indicador redox após 24 horas de incubação para gasolina (figuras 5 e 6).

No entanto, no caso das amostras com óleo diesel, além da descoloração ocorrer após 48 horas, observou-se que apenas 23 linhagens de Urucu e 15 do Brasileirinho apresentaram resultado positivo pelo teste do indofenol. As demais linhagens apresentaram resultado negativo. Além disso, 38 dos isolados degradaram ambos derivados de petróleo, ou seja, de um total de 70 isolados (Urucu e Brasileirinho), 54% degradaram a gasolina e o óleo diesel (tabela 11). Os resultados negativos para gasolina e óleo diesel indicaram a não oxidação destes compostos e não ocorreu descoloração do meio após 72 horas. Portanto, os hidrocarbonetos dos combustíveis não foram utilizados pelos microrganismos nestes casos.

Piróllo (2006) realizou o mesmo estudo com cepas de *Pseudomonas aeruginosa* LBI na degradação de óleo diesel e obteve resultados positivos a partir de 23 horas de incubação. Cepas de *P. aeruginosa* LBI testadas com querosene e borra oleosa apresentaram descoloração após 68 horas e descoloração parcial após 72 horas respectivamente. Já poluentes como benzeno e tolueno não apresentaram resultados positivos.

Segundo Souza *et al.* (2004), as bactérias apresentaram resultado positivo para biodegradação de óleo diesel em até 24 horas após a adição do indofenol,

observado pela descoloração do meio. No mesmo estudo, quando houve a adição de gasolina como fonte de carbono, as bactérias apresentaram resultado positivo em 24 horas após a adição do indicador.

Tabela 10. Isolados microbianos obtidos de solos rizosféricos de floresta nativa de Urucu e de espécies frutíferas do Brasileirinho.

Amostras de Urucu		Amostras do Brasileirinho	
Amostras de solo	Isolados	Amostras de solo	Isolados
SF1	URU 001	SB1	BR 001
	URU 002		BR 002
	URU 003		BR 003
	URU 004		BR 004
	URU 005		BR 005
	URU 006		BR 006
	URU 007		BR 007
	URU 008		BR 008
	URU 009		BR 009
	URU 010		BR 010
SF2	URU 011	SB2	BR 011
	URU 012		BR 012
	URU 013		BR 013
	URU 014		BR 014
	URU 015		BR 015
	URU 016		BR 016
	URU 017		BR 017
SF3	URU 018	SB3	BR 018
	URU 019		BR 019
	URU 020		BR 020
	URU 021		BR 021
	URU 022		BR 022
	URU 023		BR 023
	URU 024		BR 024
	URU 025		BR 025
	URU 026		BR 026
SF4	URU 027	SB4	BR 027
	URU 028		BR 028
	URU 029		BR 029
	URU 030		BR 030
	URU 031		BR 031
	URU 032		BR 032
	URU 033		
	URU 034		
	URU 035		
	URU 036		
	URU 037		
	URU 038		

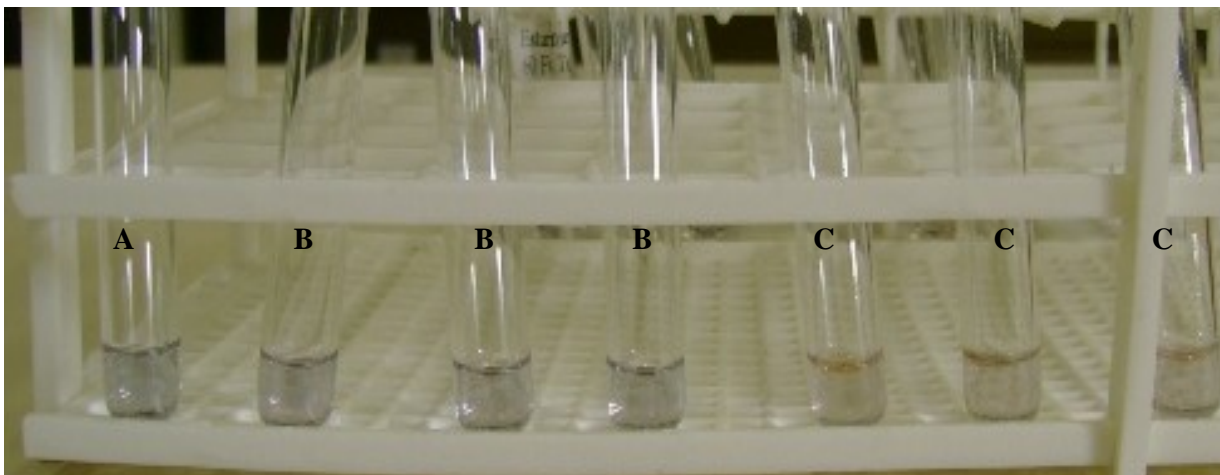


Figura 5: Resultado do teste de biodegradação de gasolina.
A- Controle negativo; B-BR028 (óleo diesel); C-BR028 (gasolina)

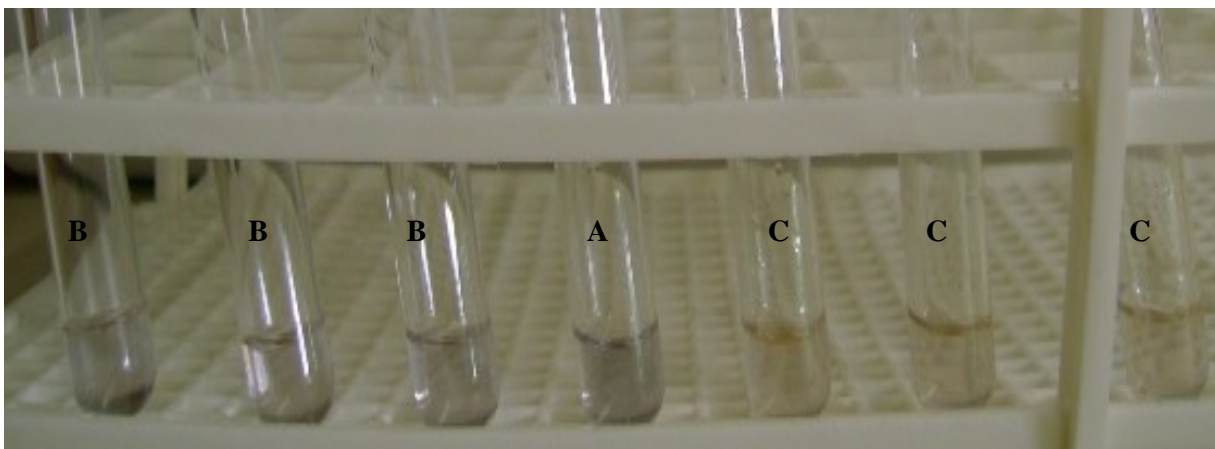


Figura 6: Resultado do teste de biodegradação de gasolina e óleo diesel.
A- Controle negativo; B-URU009 (óleo diesel); C-URU009 (gasolina)

Tabela 11. Resultado do teste de biodegradação de gasolina e óleo diesel com o indicador redox-2,6-diclorofenol-indofenol.

AMOSTRAS URU	DEGRADAÇÃO			AMOSTRAS BRA	DEGRADAÇÃO		
	GAS	O. D	HORAS		GAS	O. D	HORAS
001	+	-	48	001	+	-	48
002	+	-	48	002	+	-	48
003	+	-	48	003	+	+	24
004	+	+	48	004	+	+	24
005	+	-	48	005	+	-	48
006	+	+	24	006	+	+	48
007	+	+	24	007	+	+	24
008	+	-	48	008	+	-	48
009	+	+	24	009	+	-	48
010	+	-	48	010	+	-	48
011	+	-	48	011	+	-	48
012	+	-	24	012	+	-	48
013	+	-	48	013	+	+	48
014	+	+	24	014	+	-	48
015	+	+	48	015	+	+	24
016	+	+	24	016	+	+	24
017	+	-	48	017	+	-	24
018	+	+	48	018	+	-	48
019	+	-	48	019	+	-	48
020	+	-	48	020	+	+	48
022	+	-	48	021	+	+	24
022	+	+	24	022	+	-	48
023	+	+	24	023	+	+	48
024	+	+	24	024	+	+	24
025	+	+	24	025	+	-	48
026	+	+	24	026	+	+	24
027	+	+	24	027	+	-	48
028	+	+	24	028	+	-	48
029	+	+	24	029	+	-	48
030	+	+	24	030	+	+	24
031	+	+	24	031	+	+	48
032	+	+	24	032	+	+	48
033	+	+	48				
034	+	+	24				
035	+	+	24				
036	+	-	48				
037	+	+	24				
038	+	-	48				

GAS= gasolina; **O.D.=**óleo diesel

5 CONCLUSÕES

A interpretação dos resultados desse trabalho permite concluir que:

- Todas as amostras de solos rizosféricos testadas apresentaram microrganismos capazes de usar gasolina e óleo diesel como fonte de carbono.

- A adição de gasolina ou óleo diesel às amostras de solos rizosféricos de floresta nativa e de espécies frutíferas proporcionou aumentos substanciais dos números de microrganismos.

- As amostras de solo rizosférico de floresta nativa de Urucu apresentaram crescimento semelhante tanto com a adição de gasolina quanto com a adição de óleo diesel.

- As amostras de solos rizosféricos de cupuaçu, camu-camu e araçá-boi apresentaram melhor crescimento com a adição de gasolina, com exceção do solo rizosférico de graviola que apresentou crescimento substancial com a adição de óleo diesel.

- Todas as amostras enriquecidas com gasolina e óleo diesel apresentaram crescimento microbiano significativo já nos primeiros 7 dias de enriquecimento.

- Todas as amostras enriquecidas ou não com 1% de gasolina ou óleo diesel apresentaram declínio populacional microbiano significativo aos 28 dias de experimento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, G. e DUNCAN, H. J. Effect of diessel fuel on growth of selected plant species. **Enviromenment Geochemistry and Health**, Amsterdam, v. 21, p. 353-357, 1999.

AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA - IEA, 2003. Disponível em < <http://www.iea.gov>>. Acesso em 17 de dezembro de 2008.

ALBERICI R. M., ZAMPRONIO, C. G., POPPI, R. J., EBERLIN, M. N. **Water Solubilization of ethanol and BTEX from gasoline: on-line monitoring by membrane introduction mass spectrometry**. 230 -234p. 2002.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2.ed. New York: Academic. 453p. 1999.

AMRO M. M., **Chemical Engineering & Technology**, 27p, 2004.

ATLAS, R.M. Microbial Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of Oil Spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.52, p.149-156, 1991

ATLAS, R. M. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. In: KLUG M. J.; REDDY, C. A. **Current perspectives in microbial ecology**. Washington: American Society for Microbiology. 540-545p, 1984.

ATLAS RM & BARTHA R. Abundance, distribution and oil biodegradation potential of microorganisms in Raritan Bay. **Environ. Pollution** v 4, p 291–300, 1973.

AZAM F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. **Science** 280: p 694–696. 1998.

AZAM, F; SMITH, D.C; STEWARD. G.F. & HAGSTROM, A. Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. **Microbial Ecology**, v 28 p.167-179. 1993.

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Biorremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assesment and field evaluation. **Journal Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 32, p. 155-167, 1998.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BATAGLIA, O.C.; SANTOS, W.R. Estado nutricional de plantas perenes: avaliação e monitoramento. **Informações agronômicas**, nº. 96. 2001.

BROOKS, G. F. *et al.*, **Microbiologia Médica**, 21ª Edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 611p. 1998.

CAMPBELL, C.A.; MOULIN, A.P.; BOWREN, K.E.; JANZEN, H.H.; TOWNLEY-SMITH, L.; BIEDERBRCK, V.O. Effect of crop rotations on microbial biomass, specific respiratory activity and mineralizable nitrogen in a Black Chernozemic soil. **Canadian Journal Soil Science**, Ottawa, v. 72, p. 417-427, 1992.

CETESB. **Poluição das águas subterrâneas no Estado de São Paulo: Estudo Preliminar**. São Paulo: Secretaria de Obras e do Meio Ambiente. 88p, 1977.

CHAKRADEO, P. P. et al. Effect of benzo(a)pireno and methyl(acetoxymethyl)nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal esophageal cells in culture. **Cellular Biology International**, Amsterdam, v.17, n.7, p.671- 676, 1993.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTOAMBIENTAL – CETESB, 2005. **Vazamentos do óleo**. Disponível em < <http://www.cetesb.sp.gov/emergencia/vazamento/vazamento.asp>>. Acesso em 07 de maio de 2008.

CORRÊA, O. L. S. In: **Petróleo, noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência (2003).

COWAN, I. BROOKEY, T. An overview of low toxicity Oils”. IADC 1984. **Drilling Technology Conferebce Transections**, p.309.

CRAPEZ, M.A.C; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C.; 2002. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo, **Ciência Hoje**, Vol 30, N 179.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado por petróleo**. Piracicaba, 2002. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

DEL 'ARCO, J. P. **Degradação de Hidrocarbonetos por Bactérias e Fungos em Sedimento Arenoso.**, Rio de Janeiro, 1990. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro-UERJ.

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Ed.). Defining soil quality for a sustainable environment. **Madison: Soil Science Society of America**, 1994. p.3-21.

EMBRAPA. 1997. Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos – Embrapa. Rio de Janeiro, 2^a edição. 212 p.

EVANS, F. F, ROSADO, A. S; SEBASTIÁN, G. V; CASELLA, R; MACHADO, PLOA; HOLMSTROM, C; KJELLEBERG, S. ELSAS, J. D. VAN; SELDIN, L. 2004a. Impact of oil contamination and bioestimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, 49:295-305.

EVANS, F. F, SELDIN, L.; SEBASTIÁN, G. V., KJELLEBERG, S; HOLMSTROM, C., ROSADO, A. S. 2004b. Influence of petroleum contamination and bioestimulation of *Pseudomonas* spp. In soil microcosms as evaluated by 16S rRNA based-PCR and DGGE. **Letters in Applied Microbiology**. 38:93-98.

GABORIAU, H.; SAADA, A., Influence of heavy organic pollutants of anthropic origin on PAH retention by kaolinite. **Chemosphere**, vol. 44, n 7, p. 1633-1639. 2001.

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.

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

HART, S. In Situ Bioremediation: Defining the limites. **Environmental Science Technology**, v 30(9), p. 398A-401A, 1996.

HEALY, M. G.; DEVINE, C.M. AND MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. **Resources, Conservation and Recycling** V.18: 41-57p. 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE PETRÓLEO, GÁS E BIOCMBUSTÍVEIS. **Gasolina automotiva**. Disponível em < hhttp:// www.ibp.or.br > Acesso em 17 de dezembro de 2008.

JACOBUCCI CARVALHO, D. F. **Estudo da influência de biosurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos.** Campinas, 2000. 117 p. Dissertação (mestrado) – FEA, UNICAMP. 2000.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1192-1201, jul-ago, 2007

JACQUES, R.J.S. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo.** 2005. 170f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

JOHNSEN, A. R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v.133, n.1, p.71- 84, 2005.

LIMA, C. B. S. et. al. Efluentes: a qualidade da água comprometida. In: MENEGAT, R. et al. (Ed). **Atlas ambiental de Porto Alegre.** Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 1998. p.157-158.

MACLEOD, C.T.; DAUGULIS A.J. Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic Mycobacteriu. **Process Biochemistry**, Oxon, v.40, n.5, p.1799–1805, 2005.

MANZOCHI, C. De olho nos postos de abastecimento. **Ciência Hoje**. v. 29. n 174, p. 40-41, 2001.

MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A. **Imobilização de microrganismos em quitosana para recuperação de ambientes contaminados com petróleo e derivados**. Fortaleza, 2005. Universidade Federal do Ceará.

MELO, J. M. de. **Avaliação do impacto do aumento das concentrações celulares na biodegradação de resíduos oleosos de petróleo**. Rio de Janeiro, 2004. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MELO, I. S. de; AZEVEDO J. L. de. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 1997.440p.

MENDONÇA, E. and PICADO, A. Ecotoxicological monitoring of remediation in a coke oven soil. **Environmental Toxicological**. 17, 74-79, 2002.

MESQUITA, A. C. **Uso das Técnicas de oxidação química e biodegração na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. Rio de Janeiro, 2004. Tese (Doutorado). COPPE, Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MESTER, K.G. 1995. Field evaluation of in situ denitrification for bioremediation of contaminated soils and groundwater. **New Brunswick**, New Jersey. 155p.

MIELKE, H. W.; WANG G . B.; WANG, G.; GONZALES, C.R.; LE B.; QUACH, V.N.; MIELKE P.W. 2001. PAH and metal mixtures in New Orleans soils and sediments, **The Science of the Total Environment**, vol. 281, p. 217-227.

NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S. & BARIK J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

OLIVEIRA, N. C. **Seleção de microrganismos endofíticos com potencialidades para a biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e/ou derivados**. Goiânia, 2005. Universidade Federal de Goiás.

OLIVEIRA, J.R.P.; SOARES FILHO, W.; CUNHA, B. **A cultura da acerola no Brasil**. Cruz das Almas: EMBRAPA. Documento 85. 35p. 1993.

OLIVEIRA, L.A. **Ecologia microbiana nos solos dos trópicos úmidos**. In: III Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo. **Anais**. Londrina. p. 21-23. 1994.

OLIVEIRA, F. J. S. - "Biorremediação de Solo Arenoso Contaminado por Óleo Cru". **Tese M. Sc.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 110 p. 2001.

PAPENDICK, R.; PARRA, J.F. Soil quality: The key to sustainable agriculture American. **Journal of Alternative Agriculture**, Baltimore, v.7, n.1/2, p2-3, 1992

PAIXÃO, J.F. **Avaliação toxicológica de gasolinas e componentes: subsídio à seleção de formulações mais eco-compatíveis.** Dissertação de Mestrado, Mestrado em Ecologia e Biomonitoramento. Instituto de Biologia.UFBA. Salvador, Bahia. 2005. 186p.

PEIXOTO, R. M., VIEIRA, J. D. G. **Seleção de Microrganismos para a Biorremediação de Ambientes Contaminados com Hidrocarbonetos de Petróleo.** Goiânia, 2005. Universidade Federal de Goiás.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. 1981. **Microbiologia.** Vol II, p.807-856.

PEZESHKI, S. R., HESTER, M. W., LIN, Q., NYMAN, J. A. The effects of oil spill and clean-up on dominant us gulf coast marsh macrophytes: a review. **Environmental Pollution**, Kidlington, v. 108, n. 2, p. 129-139, 2000.

PIEHLER, M. F. *et al* **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**; 2003 (297) 219-237

PIRÔLLO, M. P. S. Estudo da Produção de Biossurfactantes Utilizando Hidrocarbonetos. Rio Claro, 2006. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

POTIN, O. *et al.* Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v.54, n.1, p.45-52, 2004.

RAHMAN, K.S.M, BANAT, I.M. AND THAHIRA, J., 2002 THA. THAYAUMANAVAN, LAKSHMANAPERMALESAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coriander pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 81: 25-32p.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro – RJ. 6ª Edição. 906p. 2001.

RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v.44, n.2-3, p.93-100, 1999.

RIZZO, A. C. L., LEITE, S. G. F., SORIANO, A. U., SANTOS, R. L.C., SOBRAL, L. G. S. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores**. CETEM/MCT. 2006.

ROMHELP, V.; EI-FOULY. **Foliar nutrient application: Challenges and limits in crop production**. Proceedings of the 2nd International Workshop on Foliar Fertilization. Fertilizer Society of Thailand. Bangkok, Thailand, p. 10-14. 1999.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. *In*: **Microbiologia Ambiental**. Melo, I. S. & Azevedo, J.L. (Ed.). p. 307-334, EMBRAPA; 438p, 1997

SAVERGNINI, F. CRAPEZ, M. A. C. **Produção de Surfactante por Consórcios Bacterianos Isolados de *Dictyota menstrualis*, *Laurencia obtusa* e *Caulerpa***

racemosa, sob a Influência de Hidrocarbonetos Aromáticos. Niterói, Rio de Janeiro. 2004.

SICILIANO, S.D. & GERMIDA, J.J. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. **Environ. Rev.** **6**: 65-79, 1998.

SIQUEIRA, J. O. FRANCO, A. V.; **Biotecnologia do solo: Fundamentos e Perspectivas.** Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 231p.

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

SOARES, A.; ROSA, D.; AMORIM, E.; JARDIM, W.F. **Remediação *in-situ* de solos e águas subterrâneas contaminados com compostos orgânicos monoaromáticos (btex) utilizando processos oxidativos avançados.** São Paulo, 2005. Universidade de Campinas (UNICAMP).

SCHOCHER, R.J., SEYFRIED, B., VASQUEZ, F., ZEYER, J. 1991. Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. **Archives of Microbiology.** Vol. 157. p. 7 – 12.

SOUZA E SILVA, P. T.; NETO, B. B.; SOBRINHO, M. A. M.; SILVA, V. L. **Emprego de Técnicas de Baixo Custo Capazes de Remediar Solos Contaminados por Petróleo e seus derivados.** Pernambuco, 2005. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

SOUZA, C. S.; MIRANDA, R. C. M.; SENA, K. X. F. R.; ARAÚJO, J. M.; CHIAPPETA, A. A.; SOUSA, M. F. V. Q. **Isolamento e Seleção de Microrganismos Degradadores de Derivados de Petróleo.** Pernambuco, 2004. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

TRINDADE, P. V. O., RIZZO, A. C. L., SORIANO, A. U., SOBRAL, L.G. S., LEITE, S. G. F. Biorremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere**, 58: 515-522 (2005).

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M., ed. **Biologia dos Solos dos Cerrados.** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. 524p.

WAKE, H., ***Estuarine coastal and Shelf Science***, 2005, 62 (1-2): 131-140

ZHANG, G.; WU, Y.; QIAN, X.; MENG, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, Hangzhou, v. 6B, n.8, p.725-730, 2005.

ANEXOS

ANEXO A – Análise Granulométrica do Solo

ANÁLISE GRANULOMÉTRICA Dispersão Total

Princípio

Baseia-se na velocidade de queda das partículas que compõem o solo. Fixa-se o tempo para o deslocamento vertical na suspensão do solo com água, após a adição de um dispersante químico (pirofosfato de sódio). A matéria orgânica é oxidada por aquecimento com peróxido de hidrogênio que destrói o excedente por ebulição. Pipeta-se um volume de 20 ml da suspensão, para determinação da argila que após seca em estufa é pesada. As frações grosseiras (areia fina e grossa) são separadas por tamisação (peneiras), secas em estufa e pesadas para obtenção dos respectivos percentuais. O silte corresponde ao complemento dos percentuais para 100 %, sendo este obtido por diferença das outras frações em relação à amostra original.

Procedimento

1. Determinação do teor de umidade

- Pesar a cápsula de alumínio, anotar o peso;
- Tarar a balança com a cápsula de alumínio;
- Pesar exatamente 10 g de TFSA e colocar na estufa a 105°C durante 24 horas;
- Retirar da estufa e colocar no dessecador para esfriar;
- Pesar a cápsula de alumínio e solo seco, anotar o valor.

2. Pré-tratamento, eliminação da Matéria Orgânica (M.O.)

- Pesar em erlenmayer de 500 ml 10 g de TFSA;
- Adicionar 10 ml de Peróxido de Hidrogênio na amostra;
- Deixar reagindo por uma noite;
- Quando cessar a reação (queima da matéria orgânica), adicionar 100ml de água destilada e levar para estufa à 105°C para eliminar o peróxido de hidrogênio;
- Deixar na estufa por 4 horas;
- Deixar esfriar.

3. Dispersão

- Completar o volume para 200 ml

- Em cada amostra pipetar 20 ml do dispersante Pirofosfato de Sódio;
- Agitar e deixar em contato com o pirofosfato por uma noite.
- Agitar no mixer por 15 minutos para solos argilosos e 5 para solos arenosos.

4. Separação das frações de areia

4.1. Areia Total

- Passar a amostra pela peneira de malha 0.053 mm;
- OBS.: A amostra que passou através da peneira deve ser armazenada em proveta de 1000 ml, para continuar o processo da granulometria para argila e silte.
- Lavar a areia retida na peneira com bastante água destilada;
- Passar a areia retida na peneira para uma placa de petri devidamente numerada;
- Colocar a areia para secar em estufa a 105 °C por 24 horas;
- Retirar da estufa e colocar pra esfriar em dessecador;
- Em seguida pesar e anotar o valor da areia total.

4.2. Areia Grossa

- Após o termino do processo da areia total;
- Passar pela peneira de malha de 0,212 mm;
- Pesar o conteúdo de areia (grossa) retida na peneira e anotar o valor.

4.3. Areia Fina

- Obtém-se o valor da areia fina por diferença de peso entre areia total e areia grossa.

5. Determinação da Argila

- Após ter colocado a amostra na proveta de 1000 ml;
- Completar com água destilada o volume da proveta para 1000 ml;
- Fazer uma prova em branco: adicionar em proveta de 1000 ml, 20 ml do dispersante (Pirofosfato de sódio) e completar com água destilada até 1000 ml;
- Medir a temperatura da prova em branco e anotar;
- Agitam-se todas as amostras 40 vezes com bastão de madeira, anotando a hora na bancada no final da agitação;
- Conferir na tabela o tempo necessário para queda de 5 cm de partículas de 20 μ m;
- Introduzir a pipeta de 20 ml na proveta até uma profundidade de 5 cm, pipetar 20ml de cada amostra, incluindo a prova em branco;
- Transferir para becker de 50 ml;
- Colocar para secar em estufa a 105° C por 24 horas;
- Retirar da estufa e colocar pra esfriar em dessecador;
- Em seguida pesar e anotar o valor do becker mais a argila;
- Lavar o becker e colocar para secar em estufa a 105° C;

- Retirar o becker da estufa e colocar pra esfriar em dessecador;
- Em seguida pesar o becker vazio e anotar o valor.

6. Determinação do silte

- O silte é determinado pela diferença entre argila e areia.

7. Frações silte e argila usando o método da pipeta

7.1. Frações silte fino e argila

- Anotar a hora quando a sedimentação das frações siltes finos e argila será realizada;
- Introduzir a pipeta de 100 ml na proveta até uma profundidade de 10 cm, pipetar 100ml de cada amostra, incluindo a prova em branco;
- Transferir a amostra pipetada (100 ml) para bécker de 250 ml e colocar pra secar em estufa a 105° C por 24 horas;
- Retirar da estufa e colocar pra esfriar em dessecador;
- Em seguida pesar o béquer mais a argila e o silte fino, e anotar o valor;
- Lavar o béquer e colocar para secar em estufa a 105° C;
- Retirar o béquer da estufa e colocar pra esfriar em dessecador;
- Em seguida pesar o béquer vazio e anotar o valor;

7.2. Fração argila

- Conferir na tabela o tempo necessário para a queda de 10cm de partículas de 2µm e realizar todo procedimento acima indicado para as frações siltes finos e argila.

7.3. Silte Grosso

- Passar o restante do material que ficou na proveta em peneira de 20µm e colocar em placa de petri numerada;
- Colocar pra secar em estufa a 105° C durante 24 horas;
- Retirar da estufa e colocar pra esfriar em dessecador;
- Em seguida pesar amostra e anotar o valor do silte grosso.

CÁLCULOS

Teor de Umidade: para dar os resultados de granulometria em função da Terra Seca em Estufa = TSE

$$\%U = \frac{PU - PS}{PS} \times 100$$

Areia Grossa

$$\% \text{AreiaGrossa} = \frac{MAG}{PS} \times 100$$

Areia Fina

$$\% \text{AreiaFina} = \frac{MAF}{PS} \times 100$$

Argila

$$\% \text{Argila} = \frac{(\text{Argila} - \text{Branco}) \times 1000 \times 100}{100 - PS}$$

Silte

$$\% \text{Silte} = \% \text{Argila} - \% \text{Areia Grossa} - \% \text{Areia Fina}$$

Onde:

%U= Porcentagem de Umidade

PU= Peso Úmido

PS = Peso Seco

MAG= Massa de areia grossa

MAF= Massa de areia fina

PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

1. Solução de pirofosfato de sódio: para 1 litro de solução

- Pesar 50 g de Pirofosfato de sódio;
- Transferir para balão volumétrico de 1 litro e acrescentar água destilada.

ANEXO B - Metodologia para Análise Química do Solo

Análise Química do Solo

COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Coleta de amostras

A escolha da área deve ser feita de acordo com os objetivos do trabalho. Quanto maior for o número de amostras simples coletadas para se fazer uma amostra composta, mais confiável será a amostra. Para a realização das coletas do solo devem-se levar em consideração alguns fatores, tais como: vegetação, textura do solo, topografia, produtividade e histórico de aplicações de corretivos.

A coleta do solo deve ser realizada com auxílio de uma pá ou trado, no ponto de amostragem limpar superficialmente a vegetação evitando retirar camadas de solo. Para análises de rotina, a amostra deve ser feita na camada de 0-5 cm, 5-10 cm ou 10-20 cm de profundidade. Podem ser retiradas amostras mais profunda para se conhecer o perfil do solo, nesse caso as amostras sempre devem ser feitas em camadas de 20 centímetros, por exemplo: 0 a 20, 20 a 40, 40 a 60 cm e assim por diante. Para análise da fertilidade são coletadas amostras compostas.

Após a coleta do solo, retirar o fôlico e as raízes grandes e pedaços de carvão. As amostras devem ser devidamente identificadas e armazenadas em saco plástico para análises posteriores. As mesmas devem ser encaminhadas para um local específico para secar, destorroar e peneirar o solo (usando peneira de 2 mm).

Secagem

A secagem objetiva impedir alterações químicas e ou biológicas do solo. É importante que as amostras sejam colocadas para secar logo após a coleta e não guardá-las por vários dias, pois durante esse período podem ocorrer perdas ou ganhos de nutrientes, causadas por materiais em decomposição.

O solo deve ser secado de preferência à temperatura ambiente (casa de secagem), essa secagem recebe a seguinte denominação: Terra Fina Seca ao Ar – TFSA (após secas, destorroadas e peneiradas), ou em estufa com ventilação forçada sob uma temperatura máxima de 40°C (TFSE).

Moagem

Antes de começar a destorroar o solo, com uma pinça deve-se fazer uma breve limpeza retirando as raízes e o carvão. Com o auxílio de uma garrafa de vidro, previamente limpa e de uma bandeja, destorroar o solo. Passar por uma peneira de 2 mm de diâmetro, assim somente serão tamisados os agregados com diâmetro menor que esse, separando-se outras impurezas que se encontram no solo, obtendo-se a chamada TFSA. As amostras devem ser armazenadas em saco

plástico devidamente etiquetado. Antes de se realizar pesagens e ou tomadas de alíquotas do solo deve-se homogeneizar a amostra.

MÉTODOS ANALITICOS

DETERMINAÇÃO DE pH EM ÁGUA E KCL

PRINCÍPIO

A reação de uma solução (ácida, neutra ou alcalina) é conhecida pela determinação da concentração efetiva de íons H^+ nessa solução, por meio de eletrodo combinado, imerso em suspensão solo: água na proporção de 1: 2,5 ml. Essa atividade é conhecida como Potencial de Hidrogênio - pH, sua escala varia de 0 a 14.

pH	Estado do Solo
Abaixo de 4.5	Excessivamente ácido
De 5.3 a 5.8	Muito ácido
De 5.3 a 5.8	Ácido
De 5.9 a 6.4	Pouco ácido
De 6.5 a 7.1	Praticamente neutro
De 7.2 a 8.0	Alcalino

pH EM ÁGUA

- Nota: Calibrar o phgmetro meia hora antes de iniciar as leituras.
- Pesar 10 g de TFSA em Becker de 50 mL;
- Adicionar 25 mL de água destilada;
- Agitar individualmente a mistura com bastão de vidro por 1 minuto;
- Deixar em repouso por 1 hora;
- Agitar novamente cada amostra com bastão de vidro, mergulhar o eletrodo na mesma e efetuar a leitura do pH.

pH EM KCl

- Após efetuar a última leitura de pH em água adicionar uma medida (pazinha: 1,86g) de KCl em cada amostra;
- Agitar a mistura com bastão de vidro, individualmente, por 1 minuto;
- Deixar em repouso por 10 minutos;
- Sem agitar as amostras, mergulhar o eletrodo na suspensão e efetuar a leitura do pH.

Cálculos:

Leitura direta no aparelho. Não há cálculo a efetuar.

EXTRAÇÃO COM SOLUÇÃO DE KCl 1N: Cálcio, Magnésio e Alumínio Trocável

PRINCÍPIO

O Ca^{+2} , Mg^{+2} e Al trocáveis são extraídos por KCl 1N. O Al trocável, titulando-se numa fração do extrato com NaOH 0,025 N, na presença de azul de bromotimol como indicador. Em outra fração do extrato o Ca^{+2} e Mg^{+2} são determinados por Espectrofotometria de Absorção Atômica – EAA.

EXTRAÇÃO

- Pesar 5 gramas de TFSA em vidros específicos;
- Adicionar 50 ml da solução extratora, usando uma proveta;
- Agitar em agitador horizontal;
- Se for filtrar, agitar por 15 min (300 rpm);
- Usando Papel Filtro Quanta JP42 – Faixa Azul (15 cm Ø e 8 µm) filtrar em frasco limpo;
- Se não for filtrar, agitar por 5 min (250 rpm) e deixar decantar até o dia seguinte, esta decantação deve ser feita entre 12 e 14 horas (recomenda-se fazer este processo sempre no final da tarde às 17:00 horas);
- Pipetar o sobrenadante e armazená-lo em frasco limpo (se trabalhar em série não exceder o tempo de 2 horas para pipetar o sobrenadante).

DETERMINAÇÃO: Cálcio e Magnésio

- Importante: Informar ao analista a procedência do material, para que o mesmo possa indicar-lhe o quanto será necessário diluir;
- Retido o extrato das amostras, prepará-las para leitura na EAA;
- Exemplo para diluição: o volume final deve ser completado com Lantânio 0,1%.

$$V_{\text{total}} \text{ (mL)} = V_1 \text{ (mL)} + V_2 \text{ (mL)}$$

$$V_1 \text{ (mL)} = \frac{V_{\text{total}} \text{ (mL)}}{D}$$

Onde:

V_{total} (mL) = volume final

D = indica a quantidade de vezes que deseja diluir

V_1 (mL) = indica a quantidade que deve pipetar da amostra

V_2 (mL) = indica a quantidade que deve pipetar de lantânio.

CÁLCULOS

$$\text{Ca}^{++} \text{ (cmol/kg)} = \frac{(\text{AMOSTRA} \cdot \text{DILUIÇÃO-BRANCO}) \cdot 50 \cdot 100}{(1000 \cdot \text{PESO SOLO} \cdot 40,08) / 2}$$

$$\text{Ca}^{++} \text{ (mg/kg)} = \text{Ca}^{++} \text{ (cmol/kg)} \cdot 200,4$$

$$\text{Mg}^{++} \text{ (cmol/kg)} = (\text{AMOSTRA} \cdot \text{DILUIÇÃO-BRANCO}) \cdot 50 \cdot 100 / (1000 \cdot \text{PESO SOLO} \cdot 24,213) / 2$$

$$\text{Mg}^{++} \text{ (mg/kg)} = \text{Mg}^{++} \text{ (cmol/kg)} \cdot 121,56$$

Onde:

Amostra (extrato) = leitura da amostra feita pela absorção atômica;

Diluição = quantas vezes a amostra foi diluída;

Branco (solução extratora) = leitura do branco feita pela absorção atômica;

50 = volume (mL) da solução extratora;

100 = para expressar a unidade de miliequivalência (cmol de carga);

1000 = para expressar a unidade de kilogramas;

Peso do solo = gramas de TFSA;

40,08 = número atômico do elemento;

2 = valência do elemento.

PREPARO DE SOLUÇÕES

1. Solução extratora de KCl 1N: para 1 litro de solução.

- Pesar 74,55 gramas de KCl;
- Transferir para balão volumétrico de 1 litro e completar com água destilada.

2. Solução de Oxido Lantânio (La_2O_3) 10 % : para 1 litro de solução.

- Em um becker pesar 117 gramas de La_2O_3 ;
- Adicionar aos poucos HCl concentrado até dissolver completamente;
- Passar para balão e completar com água destilada até 1 litro.

3. Solução de Oxido Lantânio (La_2O_3) 0,5 % : para 1 litro de solução.

- Em um becker pesar 5,85 gramas de La_2O_3 ;
- Adicionar aos poucos HCl concentrado até dissolver completamente;
- Passar para balão e completar com água destilada até 1 litro.

4. Solução de Oxido Lantânio (La_2O_3) 0,5 % : para 1 litro de solução, partindo da solução de Oxido Lantânio (La_2O_3) 10 %:

- Em um balão de 1 litro pipetar 10 mL da solução La_2O_3 10 %;
- Completar com água destilada até 1 litro.

DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO TROCÁVEL (Al^{3+})

PRINCÍPIO

Método volumétrico por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,025 N, após a extração do alumínio do solo por KCl 1N.

Padronização do NaOH 0,025N

- Medir 10 ml de HCl 0,025N em um becker (triplicatas);

- Adicionar 3 gotas do indicador azul de bromotimol;
- Titular com NaOH 0,025N;
- Registrar o volume gasto, que não pode ser menos que 10 mL e nem mais que 10,8 mL;
- Tirar à média dos valores encontrados e aplicar na fórmula:
- $0,025 \text{ N (HCl)} \times 10 \text{ mL de HCl} \div \text{pelo volume consumido de NaOH} = \text{normalidade do NaOH.}$
- OBS. O volume gasto não pode ser acima de 10,8 mL, pois implica para uma normalidade muito baixa, o que dificulta na viragem da coloração que acontece ao longo do processo. A normalidade aceita para se trabalhar é de 0,025 N até 0,023 N.

PROCEDIMENTO

- Pipetar 25mL do extrato usando pipeta volumétrica, transferir para erlenmayer de 125mL;
- Adicionar 3 gotas do indicador de azul de bromotimol 1g/L;
- Titular com solução de NaOH 0,025N;
- A viragem se encerra quando se verifica uma leve mudança do amarelo para o verde;
- Verificar o número de milímetros (volume) gastos na titulação e anotar (Al^{+3}).

CÁLCULOS

$$\text{FATOR} = 0,025 \text{ N} \times 50 \text{ mL} \times 100$$

$$\text{Al}^{+3} (\text{cmol}_c \text{ Kg}^{-1}) = \frac{\text{Amostra} - \text{Branco} \times \text{Fator}}{25 \text{ mL} \times 5\text{g}}$$

Onde:

0,025 N = normalidade do NaOH;

50 mL = volume da solução extratora;

100 = para expressar a unidade de miliequivalência ($\text{cmol}_c \text{ Kg}^{-1}$ de carga);

25 mL = volume da solução extratora a ser titulado;

5g = Peso do solo = gramas de TFSA;

Amostra = volume em mL gasto de NaOH na titulação

Branco = solução extratora

Fator =

PREPARO DE SOLUÇÕES

1. Solução de Hidróxido de sódio (NaOH) 0,025 N: para 1 litro de solução.

- Medir com pipeta graduada 25 mL de NaOH 1 N (se encontra na geladeira);
- Diluir em balão de 1 litro com água destilada.
- LEMBRETE: exemplo de diluição - NaOH 1 N

$$\begin{array}{l}
 1\text{N} \text{-----} 1000 \text{ ml (1litro)} \\
 0,025 \text{ N} \text{-----} X? \\
 X = \frac{0,025 \times 1000 \text{ ml}}{1 \text{ N}} \\
 X = 25 \text{ ml de NaOH } 1 \text{ N para } 1 \text{ litro}
 \end{array}$$

2. Solução indicadora de Azul de Bromotimol 1 g/ L: para 100 mL de solução.

- Pesar 0,1 gramas do indicador e colocar em gral;
- Adicionar 1.6 mL de NaOH 0,1M;
- Triturar bem até a mistura ficar azul-esverdeada;
- Nota: Se a cor permanecer âmbar, apesar de bem triturada, nesse caso adicionar mais algumas gotas de solução de NaOH 0,1M e a cor azul-esverdeada aparecerá;
- Transferir para balão aferido de 100 mL, lavando bem o gral com água destilada com o auxílio de uma pisseta;
- Completar o volume com água destilada;
- Guardar em frasco escuro.

DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EFETIVA ($\text{Al}^{3+} + \text{H}^+$)

PRINCÍPIO

Mesmo com métodos titulométricos também é possível separar do extrato de KCl os teores de $\text{Al}^{3+} + \text{H}^+$. Após a titulação do extrato de KCl 1 N com NaOH 0,025 N, é necessário adicionar uma solução de fluoreto de sódio (NaF 1M), pois, o íon fluoreto forma um complexo estável com o Al^{3+} , denominado de fluoraluminato, liberando hidroxila para o meio, que é retrotitulada com uma solução padronizada de HCl 0,025 N.

PROCEDIMENTO

- Após o último passo do alumínio trocável, utilizando a mesma amostra para dar continuidade no procedimento para acidez efetiva ($\text{Al}^{3+} + \text{H}^+$);
- Adicionar gota a gota a solução de HCl 0,025 N até ficar incolor;
 - Pipetar 2 mL de NaF para que a amostra volte a coloração amarelo;
 - Titular com a solução de HCl 0,025 N, a reação se encerra quando a amostra ficar completamente incolor;
 - Verificar o número de milímetros (volume) gastos na titulação e anotar (H^+).

CÁLCULOS

Verificar fórmula no computador do LTSP.

PREPARO DE SOLUÇÕES

1. Solução de Fluoreto de sódio (NaF) 1 M: para 1 litro de solução.

- Pesar 42 g de fluoreto de sódio;
- Diluir com água destilada até completar 1 litro.

2. Solução de Ácido clorídrico (HCl) 0,025 N: para 1 litro de solução.

- Medir com pipeta graduada 25 mL de HCl 1 N;
- Diluir em balão de 1 litro com água destilada.

EXTRAÇÃO COM SOLUÇÃO MEHLICH 1: Fósforo, Potássio, Sódio e micronutrientes: Ferro, Zinco, Manganês e Cobre

PRINCÍPIO

A solução extratora de Mehlich I, também chamada de solução de duplo-ácido ou Carolina do Norte, é constituída por uma mistura de HCl 0,05 M + H₂SO₄ 0,0125 M. O emprego dessa solução como extratora de fósforo, potássio, sódio e micronutrientes do solo (Ferro, Zinco, Manganês e Cobre), baseia-se na solubilização desses elementos pelo efeito de pH, entre 2 e 3, sendo o papel do Cl⁻ o de restringir o processo de reabsorção dos fosfatos recém extraídos. A relação solo: extrato sugerido é de 1:10 mL.

EXTRAÇÃO

- Pesar 5 gramas de TFSA em frasco de vidro específico;
- Adicionar 50 mL de solução extratora, usando uma proveta;
- Agitar em agitador horizontal;
- Se for filtrar, agitar por 15 minutos (300 rpm);
- Usando Papel Filtro Quanta JP42 – Faixa Azul (15 cm Ø e 8 µm) filtrar as amostras em frasco limpo;
- Se não for filtrar, agitar por 5 minutos (250rpm) e deixar decantar até o dia seguinte, esta decantação deve ser feita entre 12 e 14 horas (recomenda-se fazer este processo sempre no final da tarde às 17:00 horas);
- Pipetar o sobrenadante e armazená-lo em frasco limpo (se trabalhar em série não exceder o tempo de 2 horas para pipetar o sobrenadante);
- Retido o extrato das amostras, prepará-las para leitura em absorção atômica.

DETERMINAÇÃO: Sódio, Zinco, Manganês e Cobre

A leitura é feita diretamente do material extraído, determinados por Espectrofotometria de Absorção Atômica – EAA.

DETERMINAÇÃO: Ferro e Potássio

- Importante: Antes de proceder às diluições para Fe e K, informe ao analista o procedimento do seu material (solo), para que este possa lhe dizer o quanto você deve diluir.
- Para leitura com diluição de 10 vezes;
- Pipetar em tubo de ensaio 1 mL da amostra extraída;
- 9 mL de água destilada e agitar;
- Ler na EAA.

CÁLCULOS

$$\text{Na}^+ \text{ (cmol/kg)} = \frac{(\text{AMOSTRA} \cdot \text{DILUIÇÃO-BRANCO}) \cdot 50 \cdot 100}{1000 \cdot \text{PESO SOLO} \cdot 22,9898}$$

$$\text{Na}^+ \text{ (mg/kg)} = \text{Na (cmol/kg)} \cdot 230$$

$$\text{K}^+ \text{ (cmol/kg)} = \frac{(\text{AMOSTRA} \cdot \text{DILUIÇÃO-BRANCO}) \cdot 50 \cdot 100}{1000 \cdot \text{PESO SOLO} \cdot 39,102}$$

$$\text{K}^+ \text{ (mg/kg)} = \text{K (cmol/kg)} \cdot 391$$

$$\text{Zn (mg/kg)} = \frac{(\text{AMOSTRA} \cdot \text{DILUIÇÃO-BRANCO}) \cdot 50 \cdot 1000}{1000/5}$$

$$\text{Mn (mg/kg)} = \frac{(\text{AMOSTRA} \cdot \text{DILUIÇÃO-BRANCO}) \cdot 50 \cdot 1000}{1000/5}$$

$$\text{Fe (mg/kg)} = \frac{(\text{AMOSTRA} \cdot \text{DILUIÇÃO-BRANCO}) \cdot 50 \cdot 1000}{1000/5}$$

$$\text{Cu (mg/kg)} = \frac{(\text{AMOSTRA} \cdot \text{DILUIÇÃO-BRANCO}) \cdot 50 \cdot 1000}{1000/5}$$

Onde:

Amostra (extrato) = leitura da amostra feita pela absorção atômica;

Diluição = quantas vezes a amostra foi diluída;

Branco (solução extratora) = leitura do branco feita pela absorção atômica;

50 = volume (mL) da solução extratora;

100 = para expressar a unidade de miliequivalência (cmol de carga);

1000 = para expressar a unidade de kilogramas;

Peso do solo ou 5 = peso (gramas) de TFSA;

40,08 = número atômico do elemento;

2 = valência do elemento.

DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO DISPONÍVEL

Princípio

A leitura é feita diretamente do material extraído com duplo-ácido (HCl 0,05 M + H₂SO₄ 0,0125 M), determinado por calorimetria no Espectrofotômetro usando molibdato de amônio e ácido ascórbico a 3%.

Procedimento

- Importante: Ligar o espectrofotômetro 30 minutos antes de iniciar a leitura, para evitar oscilação e ter uma leitura estável.
- Pipetar 5 mL da amostra (material extraído com solução de duplo-ácido) em tubos de ensaio;
- Fazer a curva padrão de fósforo - são concentrações conhecidas, os pontos das concentrações mais usados são: 0 (água destilada); 0,1; 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2 ppm de fósforo, pipetar 5 mL de cada concentração;
- Pipetar 1 mL de molibdato de amônio;
- Adicionar 1 mL de vitamina C 3% (ácido ascórbico);
- Agitar e deixar em repouso por 30 minutos para desenvolvimento da coloração, a qual indica a presença de P (fósforo) na amostra;
- Ler em espectrofotômetro usando um comprimento de onda 660 nm;
- Nota: Se durante o processo de leitura a amostra apresentar um valor de concentração acima do último ponto da curva, diluir esta amostra.

Procedimento de diluição: seguir a operação matemática abaixo para fazer qualquer diluição.

$$V_1 \text{ (mL)} = V_{\text{final}} \text{ (mL)}$$

D

$$V_2 \text{ (mL)} = V_{\text{final}} \text{ (ml)} - V_1 \text{ (mL)}$$

Onde:

Volume final = quantidade da amostra mais a água destilada (5 mL)

D = indica a quantidade de vezes que deseja diluir

V₁ (mL) = indica quanto deve pipetar da amostra

V₂ (mL) = indica quanto deve pipetar de água destilada.

Procedimento de leitura das amostras

- Selecionar 660 nm (nanômetros);
- Zerar o aparelho com água destilada;
- Fazer a leitura das amostras começando com a água (0), a curva, o branco, o solo padrão e as amostras.

CÁLCULOS

$$P \text{ (}\mu\text{g/mL)} = \frac{\text{AMOSTRA} - \text{INTERCEPÇÃO}}{\text{INCLINAÇÃO} \cdot \text{DILUIÇÃO} - \text{CURVA}}$$

$$P \text{ (mg/kg)} = P \text{ (}\mu\text{g/mL)} \cdot 50 / \text{PESO DO SOLO}$$

Onde:

Amostra (extrato) = leitura da amostra feita pelo espectrofotômetro;
 Intercepção = é a divisão da curva padrão do eixo X (pontos da curva) multiplicado pelo eixo Y (absorbância da curva);
 Inclinação = é o contrario da intercepção, divide o eixo Y pelo X;
 Diluição = quantas vezes a amostra foi diluída;
 Branco (solução extratora) = leitura do branco feita pela absorção atômica;
 Curva padrão = branco, pontos da curva, absorbância da curva;
 50 = volume (mL) da solução extratora;
 Peso do solo = peso (gramas) de TFSA;

PREPARO DE SOLUÇÕES

1. Solução extratora de Duplo ácido: HCl 2 N e H₂SO₄ 1 N: soluções preparadas separadamente.

Solução Mãe de Ácido Clorídrico (HCl) 2 N: para 1 litro de solução.

- Medir em proveta 170 mL de HCl concentrado;
- Transferir para balão volumétrico de 1 litro;
- Completar com água destilada.

Solução Mãe de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 1 N: para 1 litro de solução.

- Medir em proveta 30 mL de H₂SO₄ concentrado;
- Transferir para balão volumétrico de 1 litro;
- Completar com água destilada.

2. Solução extratora de Duplo ácido: Solução filha = HCl 0,05N + H₂SO₄ 0,025N: para 1 litro de solução.

- Nota: usar pipeta VOLUMÉTRICA.
- Em um balão volumétrico de 1 litro pipetar 25 mL de HCl 2N;
- Adicionar 25 mL de H₂SO₄ 1N;
- Completar com água destilada.

3. Solução Sulfomolibidica: para 1 litro de solução.

- Pesar 1 grama de Subcarbonato de bismuto ((BiO)₂CO₃) e dissolver com aproximadamente 300 mL de água destilada em balão volumétrico de 1 litro;
- Adicionar cuidadosamente 138 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado;
- Ao cessar a reação o sal de bismuto deve estar completamente dissolvido;
- Pesar 20 gramas de molibdato de amônio (MoNH₄) e dissolver em ± 200 mL de água destilada;
- Juntar as duas soluções e completar o volume para 1 litro.

4. Solução de Ácido ascórbico 3%: para 100 mL de solução.

- Pesar 3 gramas de ácido ascórbico
- Dissolver com água destilada em balão volumétrico de 100 mL.

5. Solução para curva de FÓSFORO:

Solução Estoque de 100 ppm de fósforo: para 250 mL de solução.

- Pesar 1,098 gramas de KH_2PO_4 (Fosfato Ácido de Potássio);
- Dissolver em um balão de 250 mL com água destilada.

Soluções das curvas de fósforo de 0,1; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2: para 100 mL de solução.

- Pipetar com pipeta automática 0,1 da solução concentrada de 100 ppm;
- Diluir em balão de 100 mL e completar com água destilada;
- Fazer o mesmo processo para as curvas de 0,3; 0,6; 0,9; e 1,2.

DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ POTENCIAL (Hidrogênio + Alumínio) EXTRAÇÃO COM SOLUÇÃO DE ACETATO DE CÁLCIO

Princípio

Extração da acidez potencial de solos com solução de acetato de cálcio e titulação alcalimétrica do extrato. A extração do $\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$ pelo acetato de cálcio é baseada na propriedade tampão do sal, decorrente da presença de ânions acetatos. Com o pH ajustado em 7, ele extrai grande parte da acidez potencial do solo até esse valor de pH.

Extração

- Pesar 5 gramas de TSFA;
- Adicionar 75 mL de solução de acetato de cálcio 0,5 N pH 7,1 – 7,2;
- Agitar por 15 minutos se for filtrado;
- Agitar por 5 minutos se for colocar para decantar.

Determinação

- Pipetar 25 mL do extrato e passar para um béquer ou erlenmayer;
- Adicionar 3 gotas do indicador fenolftaleína;
- Titular com solução de NaOH 0,025 normal;
- Efetuar uma prova em branco, para estabelecer o ponto de viragem de cada amostra em comparação com a tonalidade do róseo obtida nesta prova;
- A titulação se completa quando o líquido, antes incolor, apresentar uma cor rósea persistente;
- Anotar o número de mililitros gastos (volume) de NaOH na titulação da amostra e da prova em branco.
- Nota: A prova em branco deve ser feita, seguindo o mesmo procedimento das amostras.

CÁLCULO: O teor de $\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$ existente na amostra é dado pela igualdade.

$$\text{cmolc de H}^+ + \text{Al}^{3+} / \text{Peso da TSFA} = (L - L_b) \times 1,65$$

Onde:

L = número de mililitros gastos na titulação da amostra;

L_b = número de mililitros gastos na titulação da prova em branco

1,65 = fator de correção (constante), decorrente das alíquotas tomadas e do método que só extrai 90% da acidez.

PREPARO DE SOLUÇÕES

Lembrete: A solução extratora de ACETATO DE CÁLCIO, antes de ser corrigida a sua acidez, tem o pH em torno de 9,68 a 9,70 (solução básica).

1. Solução extratora de Acetato de Cálcio 0,5 N pH 7,1 – 7,2: para 1 litro de solução.

- Pesar 88,10 gramas de acetato de cálcio [(CH₃COO)₂ Ca.H₂O];
- Colocar em balão volumétrico, dissolver e completar o volume com água destilada;
- Quando a solução estiver ácida, corrigir o pH para 7,1 – 7,2 com ácido acético glacial, pingando gota a gota e agitando sempre.

2. Solução de NaOH 0,025 N:

- O procedimento é o mesmo descrito para a determinação do alumínio trocável.

3. Solução de Fenolftaleína a 10 g/l: para 100 mL de solução.

- Pesar 1,00 gramas de fenolftaleína;
- Transferir para balão volumétrico de 100 mL;
- Dissolver e completar o volume com álcool absoluto.

DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL - Método KJELDAHL

Digestão Sulfúrica - Método da Destilação

PRINCÍPIO

O nitrogênio em solos tropicais está praticamente ligado à matéria orgânica. A determinação do N total mais difundido foi desenvolvida por Kjeldahl em 1883, nome dado ao método. Este método fundamenta-se na conversão do N em sulfato de amônio por meio de uma digestão com uma mistura de sulfato de cobre, ácido sulfúrico e selenito de sódio. Posteriormente, em meio alcalino, o sulfato de amônio convertido da matéria orgânica libera amônia (NH⁴⁺) que, em câmara de difusão, é complexada em solução de ácido bórico contendo indicador misto, sendo a dosagem deste por meio da quantificação de NO⁻³ liberada pela destilação do digerido. Finalmente, o N é determinado por acidimetria (ácido sulfúrico ou clorídrico). Assim o

método processa-se em duas etapas: digestão sulfúrica e destilação seguida de titulação.

PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO

- Moer, aproximadamente 10 gramas de TFSA em moinho apropriado ou em grau de porcelana e passar todo o material por peneira 0,2 mm (60mesh).

IMPORTANTE: O preparo destas amostras (digestão) e das soluções deve ser feito em capela (com exaustor + circulador de água) própria para este tipo de trabalho, e usar todo o material de proteção adequado, pois ao aquecer o ácido sulfúrico libera gás tóxico.

Aplique as regras de uso da capela ao realizar este trabalho.

DIGESTÃO

- Pesar 0,5 gramas da TFSA em papel manteiga, e transferir para tubos de digestão;
- Usando o dispensador, adicionar 5 ml da solução digestora nas amostras, branco e padrão;
- Fazer um branco (5 ml da solução digestora), por cada bloco digestor;
- Colocar os tubos de digestão no bloco digestor e ligá-lo;
- Iniciar a digestão com uma temperatura de 50^o C, alcançando a temperatura desejada (50^o C), aguarda-se 20 minutos;
- Após os 20 minutos, aumentar gradativamente a temperatura para 100^o C, e aguardar os 20 minutos;
- Seguir esse processo aumentando a temperatura gradativamente de 50^o C em 50^o C, aguardando sempre os 20 minutos entre eles, até atingir a temperatura final de 350^o C.
- A digestão estará pronta quando do tubo digestor estiver saindo densos fumos brancos e o extrato apresentar-se incolor, e o volume final chegar a mais ou menos 1 mL.

NOTA: A solução digestora tem a sua coloração verde menta, mudará de cor tornando-se escura quando estiver no processo de digestão. A digestão estará completa quando a solução voltar à sua cor de origem (verde menta).

DESTILAÇÃO

- Após esfriar o extrato (amostra);
- Diluir a amostra com 20 mL de água destilada medida em proveta no mesmo tudo que se encontra a mesma;
- Transferir o extrato (amostra) para o balão de destilação;
- Adicionar 15 mL de Hidróxido de Sódio (NaOH) 40%;
- Levar ao destilador;
- Colocar em um becker de 100 ml, 10 ml de Ácido Bórico (H₃BO₃) - solução receptora e levar ao condensador do destilador;

- A destilação se completa quando o volume do becker chegar a 60 mL de uma solução com coloração verde menta ou marrom.
- OBS: A coloração verde menta indica que há nitrogênio na amostra.

TITULAÇÃO

- Usando bureta digital ou graduada, titular com ácido sulfúrico a 0,01 N;
- A amostra deverá ficar com a coloração rósea permanente;
- Anotar o volume de ácido sulfúrico que foi consumido pela amostra.

CÁLCULO

Os valores do nitrogênio total são calculados conforme a equação:

$$N \text{ total (g/Kg)} = \frac{(\text{AMOSTRA-BRANCO}) * \text{TITULO H}_2\text{SO}_4 * 14 * 1000}{\text{PESO do Solo}}$$

Onde:

Amostra = volume de H₂SO₄ gasto na titulação da amostra;

Branco = volume de H₂SO₄ gasto na titulação do branco;

Titulo do H₂SO₄ = concentração real do ácido sulfúrico (mol L+1);

14 = peso equivalente de N (14) dividido por 10 (conversão de unidade);

1000 = para expressar a unidade de kilogramas;

Peso do solo = gramas de TFSA.

PREPARO DE SOLUÇÕES

IMPORTANTE: Sempre colocar o ácido na água, nunca o contrário.

1. Solução Digestora: para 1 litro de solução.

NOTA: A solução digestora tem a sua coloração verde menta.

Primeiro passo:

- Dissolver em um becker de 2 litros contendo 500 mL de água destilada, mexendo sempre com um bastão de vidro até dissolver totalmente cada reagente:
- 0,25 g de Na₂SeO₃ (Selenito de Sódio);
- 11.25g de CuSO₄5H₂O (Sulfato de Cobre);
- 47.50g de Na₂SO₄ (Sulfato de Sódio).

Segundo passo:

- Dissolver em um becker de 1 litro contendo 500 mL de ácido sulfúrico:

- 1,25 gramas de ácido salicílico, mexendo devagar com um bastão de vidro até dissolvê-lo completamente;
- Após preparar as duas soluções misturar as mesmas;
- Colocando devagar a solução de ácido sulfúrico na solução de água destilada;
- Deixar esfriar;
- Colocar a solução no DISPENSADOR (calibrar para 5 mL).
- Importante: a solução tem que ficar com uma coloração verde menta.

2. Solução indicadora “receptora” de Ácido Bórico: para 1 litro de solução.

- Pesar 20g de H_3BO_3 (Ácido Bórico);
- Diluir em 700 mL de água morna;
- Deixar esfriar;
- Colocar em um balão de 1 litro;

OBS.: No balão já deve conter:

- 200 mL de água destilada;
- 20 mL do Indicador Misto (colocar com a pipeta volumétrica);
- Agora é só completar o volume do balão para 1 litro com água destilada.

3. Indicador misto: para 100 mL de solução.

- 0,066 mg de vermelho de metila;
- 0,099 mg de verde de bromocresol;
- Diluir em 100 mL de álcool etílico.

4. Solução de NaOH – 40% - (Hidróxido de sódio): para 1 litro de solução.

- Pesar 400 gramas de NaOH;
- Diluir em um balão de um litro com água destilada;
- Armazenar em frasco de plástico.
- Nota: Não completar com a água destilada no balão de uma só vez, porque a solução esquentada, e quando ela esfriar baixa de volume. Assim sendo, é necessário completar com água novamente até a solução ficar estável.

5. Solução de H_2SO_4 0,01 N: para 1 litro de solução.

- Pipetar 10 mL de H_2SO_4 1 N, e completar para 1 litro com água destilada.

DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO - Método Walkley & Black

PRINCÍPIO

Considerando-se que, em média, a matéria orgânica (M.O.) do solo apresenta entre 50 e 58% de carbono (C), estima-se o teor de M.O. do solo multiplicando o teor de C por 1,72 (100/58), sendo este denominado de fator de “Van Bemmelen”, ou seja, o carbono contém de concentração o equivalente a 50 % da matéria orgânica no solo. Método volumétrico, usando o Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$) para oxidação da matéria orgânica em meio sulfúrico, empregando-se como fonte de energia o calor

desprendido do ácido sulfúrico e/ ou aquecimento. O excesso de dicromato após a oxidação é titulado com solução de Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - sal de mohr. A eficiência do método é de 75%.

PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO

- Moer, aproximadamente 10 gramas de TFSA em moinho apropriado ou em grau de porcelana e passar todo o material por peneira 0,2 mm (60mesh).

EXTRAÇÃO

- A relação de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 / \text{H}_2\text{SO}_4$ deve ser 1:2;
- Pesar 0,5 gramas de TSFA;
- Colocar em Erlenmayer de 250 mL;
- Adicionar 5 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N (Dicromato de Potássio);
- Adicionar sobre a suspensão 10 mL de ácido sulfúrico concentrado;
- Girar o Erlenmayer lentamente até que o solo e os reagentes fiquem misturados;
- Efetuar uma prova em branco, a qual deve ser feita seguindo o mesmo procedimento das amostras sendo: 5 mL de dicromato 1 N e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado;
- Deixar em repouso por 30 minutos para esfriar;
- Adicionar 100 mL de água destilada;

TITULAÇÃO: com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato ferroso) a 0,5 N.

- Adicionar 3 gotas do indicador fenantrolina;
- Titular a amostra usando uma bureta digital;
- Para estabelecer o ponto de viragem da prova em branco e de cada amostra, sua tonalidade começa com verde menta, passa para um azul mudando para um marrom café onde se completa a titulação;
- Anotar o volume de Sulfato Ferroso gasto na titulação da prova em branco e nas amostras.

CÁLCULO

$$\% C = \frac{(V_b - V_a) \times N \times 0,3}{P \text{ (g)}} \times 1,33$$

$$\% \text{ de Matéria Orgânica (M.O.)} = \% C \text{ (carbono orgânico)} \times 1,72$$

Onde:

V_b = Volume de Sulfato ferroso 0,5 N gasto para reduzir todo o Bicromato usado no branco;

V_a = Volume de Sulfato ferroso 0,5 N que reduz o Bicromato que não reagiu com a amostra (solo);

N = Normalidade do Sulfato ferroso;

0,3 = resultado da relação entre o número de mols de Cr_2O_7 que reage com Fe^{+2} ;

P = Peso da amostra em grama (g);

1,33 = Fator de correção (a eficiência do método é de 75%);

1,72 = Constante padrão.

PREPARO DE SOLUÇÕES

- Solução de Bicromato de Potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 1 N : para 1 litro de solução.
 - Pesar 49,04 gramas de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, previamente seco em estufa por mais ou menos 1 hora a 105 °C;
 - Diluir em balão volumétrico de 1 litro com água destilada.
- Indicador Fenantrolina: para 100 mL de solução.
 - Pesar 1,485 gramas de fenantrolina monohidratado;
 - Pesar 0,695 gramas de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.A. heptahidratado;
 - Juntar os dois reagentes em balão de 100 mL e completar com água destilada.
- Solução de Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$): para 1 litro de solução.
 - Pesar 139 de gramas de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
 - Dissolver em ± 300 mL de água destilada em balão de 1 litro;
 - Adicionar nessa mistura com muito cuidado 15 mL de ácido sulfúrico concentrado;
 - Deixar esfriar;
 - Completar o volume para 1 litro com água destilada.

CARBONO E NITROGÊNIO TOTAL – CHN – Método da Combustão

PRINCÍPIO

Uma amostra dentro de uma cápsula de Estanto é introduzida em uma coluna de combustão enriquecida em Oxigênio. A temperatura da coluna é de 920°C (quando se utiliza o retentor de cinza metálico) o hélio utilizado como carregador leva os produtos da combustão através de catalisadores (óxido de cromo e óxido de cobalto prateado) para completar a oxidação em seguida os halogênios vão ser retidos na primeira coluna. Na segunda coluna preenchida com cobre reduzido, o óxido nitroso vai ser reduzido em N_2 e o excesso de oxigênio retido. A água é retida numa coluna com Perclorato de magnésio. Na coluna de cromatografia irão ser separados o N_2 e o CO_2 . A detecção é efetuada com um detector a condutividade térmica, o sinal obtido é amplificado e tratado com um Integrador.

Para calcular a concentração de N e C utilizam-se padrões conhecidos de: uréia, acetanilida ou antropina.

PROCEDIMENTO

- Moer, aproximadamente 10 gramas de TFSA em moinho apropriado ou em grau de porcelana e passar todo o material por peneira 0,2 mm (60mesh).
- Pesar 0,5 gramas de solo em cápsulas de estanho;
- Pesar a curva padrão de acetanilida: são concentrações conhecidas de 0,8; 1.5; 2.0; 2.4 mg;
- Introduzir a cápsula na coluna de combustão enriquecida em Oxigênio;

CÁLCULO

Verificar formula no computador do LTSP.

DETERMINAÇÃO DO CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA

PRINCIPIO

A biomassa microbiana do solo é composta por microorganismos, principalmente, bactérias e fungos, os quais funcionam como um indicador da atividade biológica do solo e de seu funcionamento. Para determinar a biomassa microbiana do solo, deve-se determinar seu conteúdo de carbono.

PROCEDIMENTO

- Limpar o solo com o auxílio de uma pinça retirando as raízes, o carvão e pedaços de liteira.

UMIDADE DO SOLO

- Pesar a cápsula de alumínio, anotar o peso;
- Tarar a balança com a cápsula de alumínio;
- Pesar 10 gramas de solo fresco;
- Secar em estufa a 105°C durante 48 horas;
- Retirar da estufa e colocar no dessecador para esfriar;
- Pesar a cápsula de alumínio e solo seco, anotar o valor.

CÁLCULOS

Teor de Umidade

$$\%U = \frac{PU - PS}{PS} \times 100$$

Onde:

%U= Porcentagem de Umidade

PU= Peso Úmido

PS = Peso Seco

METODOLOGIA PARA FUMIGAÇÃO-EXTRAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA, modificada por Witt et al., 2000.

Preparação das amostras sem clorofórmio (A) – Não Fumigadas

- Pesar 30 gramas da amostra de solo fresco em frasco de vidro de Quapark;
- Adicionar 60 mL de K_2SO_4 0,5 M e fechar bem a tampa do frasco;
- Agitar por 4 horas em agitador horizontal a ..rpm;
- Deixar descansar durante uma noite.
- Filtrar as amostras com filtro de papel Whatman 42 (livre de cinzas), usando uma bomba de vácuo (porque o processo de filtração é lento);
- Guardar a amostra em frasco de plástico ou vidro de 50 mL;
- Fazer 2 brancos da solução.

Preparação das amostras com clorofórmio (B) - Fumigadas

IMPORTANTE: todo o processo de preparação das amostras com clorofórmio deve ser feito dentro da capela.

- Pesar 30 gramas da amostra de solo fresco em frasco de vidro de Quapark;
- Adicionar 60 mL de Sulfato de Potássio (K_2SO_4) 0,5 M;
- Adicionar 1 mL de Clorofórmio livre de etanol e fechar bem a tampa do frasco;
- Agitar por 1 horas em agitador horizontal a ..rpm;
- Deixar descansar durante uma noite.
- Filtrar as amostras com filtro de papel Whatman 42 (livre de cinzas), usando uma bomba de vácuo (porque o processo de filtração é lento);
- Guardar a amostra em frasco de plástico ou vidro de 50 mL;
- Fazer 2 brancos da solução.
- Deixar volatilizar o clorofórmio residual da amostra extraída e filtrada na capela (aproximadamente por 5 minutos). Pode remover completamente

NOTA: Algumas desvantagens do método:

- O extrato de algumas amostras é muito pouco, especialmente, nas amostras fumigadas, que apresentam também evaporação da solução.
- As perdas por filtração e evaporação modificam a concentração da solução e, conseqüentemente, os cálculos para a biomassa – C.
- Agitar por somente 4 horas não é suficiente para extrair o máximo da biomassa microbiana, que em solos muito argilosos apresentam maior proteção.
- No geral, 20 – 40 % da biomassa microbiana total são extraídos por esta técnica, variando entre os diferentes tipos de solo.

DETERMINAÇÃO DE CARBONO MICROBIANO (Brookes et al, 1985), após extração com Sulfato de Potássio (K_2SO_4) 0,5 M

PRINCÍPIO

O extrato filtrado é digerido com uma mistura ácida de Dicromato de potássio 0,4 N ($K_2Cr_2O_7$) e Ácido sulfúrico / Ácido fosfórico nas proporções de 2:1 durante 30 minutos a 100°C num bloco digestor. O Dicromato de potássio em excesso é determinado com Sulfato ferroso amoniacal, usando Ferro como indicador.

DIGESTÃO

- Pipetar 8 mL do extrato, transferir para um tubo de digestão (Pirex), já numerado;
- Adicionar 2 mL de $K_2Cr_2O_7$ a 0,0667 M ou 0,4 N;
- Mais 15 ml de ácido sulfúrico/ácido fosfórico (nas proporções de 2:1).
- Colocar as amostras no bloco digestor (dentro da capela);
- Ligar o bloco digestor e iniciar com uma temperatura de 50° C;
- Alcançando a temperatura desejada (50° C), aguarda-se 20 minutos;
- Após os 20 minutos, aumentar gradativamente a temperatura para 100° C durante 30 minutos, tempo que se completa a digestão.
- NOTA: colocar na superfície superior dos tubos de digestão pequenos funis para obter um melhor refluxo.

TITULAÇÃO

- Após a digestão, deixar esfriar as amostras e medir o volume em provetas de 50 mL, completando seu volume com água destilada até 50 mL.

PREPARO DE SOLUÇÕES

Solução de Sulfato de Potássio (K_2SO_4) 0,5 M: para 2 litros de solução

- Pesar 174,26 gramas de K_2SO_4 ;
- Transferir para balão volumétrico de 2 litros e completar com água destilada.

PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DE LIMPEZA

Importante: Todo o processo de preparo deve ser feito dentro de uma capela apropriada para tal trabalho.

1. Solução SULFOCRÔMICA: para 1 litro de solução.

- Pesar 200 gramas de Dicromato de potássio - $K_2Cr_2O_7$;
- Colocar em um becker de 1 litro;
- Acrescentar com cuidado 170 ml de ácido sulfúrico concentrado;
- Misturar com um bastão de vidro até diluir completamente;
- Adicionar água destilada até completar um litro.

2. Solução de ÁCIDO CLORÍDRICO:

- Medir com uma proveta 100 ml de ácido clorídrico concentrado;
- Diluir para 10 litros com água da torneira.

3. Solução de SABÃO NEUTRO:

- Medir com um proveta 5 ml de sabão neutro concentrado;
- Diluir para 1 litro com água da torneira.

ANEXO C – RESULTADO DA COLORAÇÃO DE GRAM NOS ISOLADOS DE URUCU E BRASILEIRINHO

Anexo C.1. Resultado da análise morfológica dos isolados de Urucu pela técnica da coloração de Gram

Isolados	Morfologia	Gram
URU 001	Bacilos	Gram negativos
URU 002	Bacilos	Gram negativos
URU 003	Cocos	Gram negativos
URU 004	Cocos	Gram negativos
URU 005	Bacilos	Gram negativos
URU 006	Bacilos	Gram negativos
URU 007	Bacilos	Gram negativos
URU 008	Bacilos	Gram negativos
URU 009	Cocos	Gram negativos
URU 010	Cocos	Gram negativos
URU 011	Cocos	Gram negativos
URU 012	Bacilos	Gram negativos
URU 013	Bacilos	Gram negativos
URU 014	Bacilos	Gram negativos
URU 015	Bacilos	Gram negativos
URU 016	Cocos	Gram negativos
URU 017	Cocos	Gram negativos
URU 018	Bacilos	Gram negativos
URU 019	Cocos	Gram negativos
URU 020	Cocos	Gram negativos
URU 021	Bacilos	Gram negativos
URU 022	Cocos	Gram negativos
URU 023	Bacilos	Gram negativos
URU 024	Bacilos	Gram negativos
URU 025	Cocos	Gram negativos
URU 026	Bacilos	Gram negativos
URU 027	Cocos	Gram negativos
URU 028	Bacilos	Gram negativos
URU 029	Bacilos	Gram negativos
URU 030	Bacilos	Gram negativos
URU 031	Bacilos	Gram negativos
URU 032	Bacilos	Gram negativos
URU 033	Bacilos	Gram negativos
URU 034	Bacilos	Gram negativos
URU 035	Bacilos	Gram negativos
URU 036	Bacilos	Gram negativos
URU 037	Bacilos	Gram negativos
URU 038	Bacilos	Gram negativos

Anexo C.2. Resultado da análise morfológica dos isolados do Brasileirinho pela técnica da coloração de Gram.

Isolados	Morfologia	Gram
BR001	Cocos	Gram negativos
BR002	Cocos	Gram negativos
BR003	Cocos	Gram negativos
BR004	Cocos	Gram negativos
BR005	Cocos	Gram negativos
BR006	Bacilos	Gram negativos
BR007	Cocos	Gram negativos
BR008	Cocos	Gram negativos
BR009	Cocos	Gram negativos
BR010	Bacilos	Gram negativos
BR011	Cocos	Gram negativos
BR012	Cocos	Gram negativos
BR013	Bacilos	Gram negativos
BR014	Bacilos	Gram negativos
BR015	Cocos	Gram negativos
BR016	Bacilos	Gram negativos
BR017	Bacilos	Gram negativos
BR018	Cocos	Gram negativos
BR019	Cocos	Gram negativos
BR020	Cocos	Gram negativos
BR021	Bacilos	Gram negativos
BR022	Bacilos	Gram negativos
BR023	Cocos	Gram negativos
BR024	Cocos	Gram negativos
BR025	Cocos	Gram negativos
BR026	Cocos	Gram negativos
BR027	Cocos	Gram negativos
BR028	Cocos	Gram negativos
BR029	Cocos	Gram negativos
BR030	Bacilos	Gram negativos
BR031	Cocos	Gram negativos
BR032	Cocos	Gram negativos

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.