

MICRORGANISMOS, GRAMÍNEAS E NUTRIENTES MINERAIS NA
DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL NO SOLO

KÉSSIA BARRETO LIMA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO – 2014

MICRORGANISMOS, GRAMÍNEAS E NUTRIENTES MINERAIS NA
DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL NO SOLO

KÉSSIA BARRETO LIMA

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

Orientador: Prof. Marco Antonio Martins
Co-orientadora: Prof^a Eliane Soares de Souza

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 002/2015

Lima, Késsia Barreto

Microrganismos, gramíneas e nutrientes minerais na degradação de petróleo e óleo diesel no solo / Késsia Barreto Lima. – 2014.

181 f. : il.

Orientador: Marco Antonio Martins.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Bibliografia: f. 163 – 173.

1. Micorriza 2. Fertilizante 3. Surfactante 4. Composto orgânico I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 631.4

MICROORGANISMOS, GRAMÍNEAS E NUTRIENTES MINERAIS NA
DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL NO SOLO

KÉSSIA BARRETO LIMA

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

Aprovada em 23 de julho de 2014


Comissão Examinadora:



Prof^a Cristiane Figueira da Silva (D.Sc., Produção Vegetal) – UFRRJ



Prof^a Eliane Soares de Souza (D.Sc., Engenharia de Reservatório e de
Exploração) – UENF



Prof^a Marta Simone Mendonça Freitas (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



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

*“TUDO TEM O SEU TEMPO DETERMINADO, e há tempo para todo o propósito
debaixo do céu.
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o
que se plantou;
Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;
Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;
Tempo de espalhar pedras, e tempo de juntar pedras; tempo de abraçar, e
tempo de afastar-se de abraçar;
Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar
fora...”*

(Eclesiastes 3:1-6)

*“Talvez, agora seja o ‘Tempo de contaminar’,
mas nem sempre haverá o ‘Tempo de recuperar’...”*

É melhor prevenir do que ‘biorremediar’!

A minha amada e eterna avó Elsa Lima (*in memoriam*),
Dedico...

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida e por todas as conquistas;

Aos meus pais Irineu de A. de Lima Filho e Maria Bernardete Barreto pelo amor, incentivo à educação e por sempre acreditarem em mim;

A meus irmãos, sobrinhos, tios (as), primos (as) e avôs, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que precisei estar ausente;

Ao Professor Marco Antônio pela orientação, pela ajuda, oportunidade e confiança em desenvolver todos os trabalhos durante o meu Mestrado e Doutorado. Obrigada!

A Prof^a Eliane pela coorientação durante o curso de Doutorado e apoio durante a execução das análises geoquímicas de uma parte deste trabalho;

Ao Prof. Carlos García pela colaboração e pelo interesse em participar deste trabalho, pela oportunidade em atuar em seu laboratório, pela confiança depositada e pelas palavras de incentivo;

A técnica Andréia, pela ajuda durante os experimentos, pelo companheirismo e pela de linda amizade. Aos demais técnicos do Laboratório de Solos: Kátia, Vanilda e Ederaldo, obrigada pela ajuda durante as análises. Ao funcionário de apoio ao campo Sr. Zélio pela ajuda na coleta do solo e pelo apoio durante o experimento;

Aos companheiros de Laboratório de Microbiologia do Solo da UENF, Wagner, Vanessa, Sumaya, Letícia, Élide e Gustavo (*in memoriam*) pela ajuda durante a execução dos experimentos, das coletas e durante a preparação de aulas

práticas de Microbiologia Agrícola. Em especial ao meu amigo cubano: Fernando, pela sua grande participação e pelo companheirismo que foram imprescindíveis para a concretização deste trabalho;

Aos companheiros do CEBAS, em especial a Felipe, Alberto e Irene Piñera pela imprescindível ajuda, paciência, compreensão e incentivo. Aos demais amigos, obrigada pela convivência: Sara, Mari Carmen, Carmen, Lola, Patrício, Peppa, Irene e Emanuel. Sinto orgulho de ter trabalhado com vocês! *“Muchas gracias. Os echaré de menos...”*;

A Prof^a Marta agradeço a amizade, o apoio e os conselhos dados nos momentos em que mais precisei;

Às alunas Anna Mara C. De Oliveira e Raiza G. de Souza do curso de graduação em Engenharia de Exploração e Produção de petróleo pela ajuda na execução das análises geoquímicas;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pelos 10 anos de convivência, aprendizagem e história durante o Programa de Jovens Talentos, Graduação, Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado Sanduíche;

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Solos, pela oportunidade de realização deste curso;

A CAPES, por conceder a oportunidade de realizar o sonho de estudar na Espanha, aprender novas técnicas e desenvolver este trabalho;

A Adriana pela amizade, pelo carinho, pela ajuda e companhia, assim como a Larissa, Lívia, Alituanny, Anne, Lílian, Silvana e Janaína por compartilharem momentos inesquecíveis durante o período em que permaneci na Espanha. A Letícia pelos conselhos e dicas durante a estância;

Às amigas Juliana, Scheilla, Kelly, Priscila, Monique e Marianna pela amizade e por compartilhar as experiências ao longo do nosso curso de Doutorado;

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração deste trabalho e agradável convívio...

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A produção de petróleo na região Norte Fluminense.....	3
2.2. Contaminação de solos por hidrocarbonetos e técnicas de remediação no Brasil.....	5
2.3. O petróleo e o óleo diesel: composição e biodegradação no solo.....	10
2.4. Biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo.....	13
2.5. Fitorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo.....	15
2.6. Mecanismos de fitoextração no solo de hidrocarbonetos do petróleo.....	19
2.7. FMAs na fitorremediação de solos contaminados com petróleo.....	23
3. TRABALHOS.....	29
3.1. Solos contaminados com diesel e o impacto no crescimento de <i>Brachiaria brizantha</i> e na colonização micorrízica.....	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO.....	43
LITERATURA CITADA.....	44

3.2. Micorriza, NPK e surfactante no crescimento e na nutrição de mudas de milho em solos contaminados com petróleo.....	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	49
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
CONCLUSÃO.....	70
LITERATURA CITADA.....	71
3.3. Milho, NPK, micorriza e surfactante nas propriedades químicas e na biodegradação de petróleo no solo.....	77
RESUMO.....	77
ABSTRACT.....	79
INTRODUÇÃO.....	80
MATERIAL E MÉTODOS.....	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
3.4. Biodegradação de petróleo e diesel em solo semiárido da Espanha.....	116
RESUMO.....	116
ABSTRACT.....	118
INTRODUÇÃO.....	119
MATERIAL E MÉTODOS.....	121
RESULTADOS.....	127
DISCUSSÃO.....	144
CONCLUSÃO.....	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	159
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	162
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	163
APÊNDICE.....	174
APÊNDICE A.....	175
APÊNDICE B.....	176

RESUMO

LIMA, KÉSSIA BARRETO, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho de 2014. Microrganismos, gramíneas e nutrientes minerais na degradação de petróleo e óleo diesel no solo. Orientador: Marco Antonio Martins, Coorientadora: Prof^a Eliane Soares de Souza.

Acidentes ambientais envolvendo a contaminação com petróleo e óleo diesel no solo têm sido cada vez mais frequentes. Para avaliar o efeito de microrganismos, gramíneas e nutrientes minerais em solos contaminados com petróleo e óleo diesel, foram realizados cinco experimentos. Os experimentos I, II e III foram realizados no Brasil, no Setor de Microbiologia do Solo (LSOL/UENF), em parceria com o setor de Geologia e Geoquímica da UENF (LENEP/CCT). Os experimentos IV foram realizados pelo Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), no Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), em Murcia, Espanha. O objetivo do experimento I foi avaliar o efeito da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no crescimento de *Brachiaria brizantha* em solos contaminados com diferentes concentrações de óleo diesel, após 90 dias de condução experimental. No experimento II foi analisado o crescimento e o estado nutricional da parte aérea e raízes das mudas de milho, bem como a colonização micorrízica das raízes, em solos contaminados a 4% de petróleo, utilizando-se a inoculação com FMAs, e aplicação de NPK e surfactante, de modo combinado ou separado, quanto à colonização de FMAs, após 60 e 120 dias de condução experimental. No experimento III foi observado o

potencial de mudas de milho, FMAs, NPK e surfactante em influenciar as propriedades químicas e a capacidade de degradar hidrocarbonetos do solo contaminado a 4% de petróleo, após 60 e 120 dias de condução experimental. No experimento IV foram realizados dois ensaios. Foi avaliada a eficácia da utilização de diferentes tratamentos: composto orgânico, aeração, produto biológico bacteriano e/ou cevada. Foram avaliados: o crescimento das plantas, os processos de degradação de petróleo e óleo diesel em solos semiáridos da Espanha contaminados com 2%, além de avaliar a qualidade do solo, aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental. No experimento I foi observado que o crescimento da *B. brizantha* foi beneficiado pela inoculação com FMAs em solos contaminados a 1% de óleo diesel no solo, sendo superiores às mudas não inoculadas. Com o aumento das concentrações de óleo diesel no solo, houve redução no crescimento das mudas de *B. brizantha* e na colonização micorrízica. No experimento II, as mudas de milho cultivadas com fungos micorrízicos, NPK e surfactante químico de forma combinada apresentaram maior crescimento, nutrição nas raízes e parte aérea e colonização micorrízica, em solos contaminados com petróleo a 4%. No experimento III, a maioria dos tratamentos de fitorremediação apresentou melhora nas propriedades físico-químicas do solo, em relação ao solo sob atenuação natural. No que se refere à degradação de n-alcenos no solo, os tratamentos de fitorremediação e biorremediação foram superiores aos solos mantidos sob a atenuação natural; Nos experimentos IV, os tratamentos com composto orgânico na presença e ausência da planta proporcionaram maior crescimento das plantas, melhora na qualidade dos solos contaminados com petróleo e diesel e aumento na biodegradação de petróleo. Nos solos contaminados com diesel, todos os tratamentos apresentaram baixo índice de degradação. A inoculação bacteriana prejudicou o crescimento das plantas, e as técnicas de bioaumentação e de aeração no solo não proporcionaram a melhora na qualidade do solo e a biodegradação de petróleo e diesel.

Palavras-chave: micorriza, fertilizante, surfactante, composto orgânico.

ABSTRACT

LIMA, Késsia Barreto, Biologist, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, May 2014. Microorganisms, grasses and mineral nutrients on the diesel and petroleum degradation of soil contaminated. Advisor: Marco Antonio Martins. Co-advisor: Prof^a Eliane Soares de Souza.

In order to evaluate the performance of phytoremediation and bioremediation of crude oil-polluted soils and diesel oil were performed experiments involving different plant species and microorganisms with potential to biodegrade oil and diesel. The three initial experiments were carried out in Brazil, by Department of Soil Microbiology (LSOL/UENF), in partnership with the Department of Geology and Geochemistry of UENF (LENEP/CCT). The two subsequent experiments were performed by Consejo Superior and Science and Research (CSIC), in the Center of Edafología y Biología Applied del Segura (CEBAS), in Murcia, Spain. The objective of the experiment I was to evaluate the effect of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on growth of *Brachiaria brizantha* in contaminated soils under different concentrations of diesel oil after 90 days of experiment. In experiment II was analyzed the growth and nutritional status of the shoots and roots of seedlings of maize in oil contaminated soils (4%), using the inoculation with AMF, and application of NPK and surfactant, mixtured or separated, as the colonization of AMF, after 60 and 120 days of experiment. In

experiment III was observed the potential of seedlings of maize, AMF, NPK and surfactant on the chemical properties and the ability to degrade hydrocarbons from oil contaminated soil (4%) around 60 and 120 days after the experiment started. Experiments IV were conducted two trials. Efficacy was evaluated using different treatments: organic compost, aeration, biological bacterial product and/or barley. Were assessed: plant growth, the processes of degradation of petroleum and diesel in semi-arid soils from Spain contaminated with 2%, in addition to evaluating the quality of the soil to 15, 30 and 50 days after the start of treatment. In experiment I, it was observed that the growth of *B. brizantha* was benefited by the inoculation with AMF in contaminated soils to 1% in the soils that are higher than the seedlings not inoculated. With the increase in the concentrations of diesel oil on the ground, there was a reduction in the growth of seedlings of *B. brizantha* and colonization micorrízica. In experiment II, seedlings of maize treated with mycorrhizal fungi, and NPK chemical surfactant in combination showed greater growth, nutrition in root and shoot growth and mycorrhizal colonization oil contaminated soils at 4%. In experiment III, the majority of soils treated with phytoremediation showed improvement in physico-chemical properties in relation to soil under natural attenuation. Regarding the degradation of n-alkanes in soil, natural attenuation was higher than the other treatments, except for the treatment of phytoremediation containing corn + FMA + NPK that was more responsive; In experiment IV, the treatments with compost and compost + plant showed higher plant growth, improved quality of contaminated oil and diesel and increase in biodegradation of petroleum soils. In soils contaminated with diesel, all treatments showed a low rate of degradation. The bacterial inoculation affected the growth of the plants, no the improvement in the quality of the soil did not favor the biodegradation of both contaminants.

Keywords: mycorrhiza, fertilizer, surfactant, organic compost.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o Brasil alcançou o recorde na produção de barris de petróleo por dia (bbl/d), com aproximadamente 2,18 milhões em 2010, totalizando 2,62 milhões de barris de óleo equivalente por dia (boe/d). Dentre todos os estados brasileiros produtores, o Rio de Janeiro concentra a maior parte da produção (77,1%), estimada em 1.681.332 bbl/d e 1.856.628 boe/d. A Bacia de Campos é responsável por 85,5% da produção de petróleo de todo o país.

A indústria petrolífera é uma das que sofre grandes quantidades de penalidades por danos causados ao meio ambiente, principalmente nos setores de exploração, transporte e armazenagem. Isto gera graves consequências, como a contaminação do solo, provocando impactos econômicos, ambientais e sociais. Quando o solo é contaminado, o valor de mercado da propriedade é afetado, devido aos custos de limpeza, às altas penalidades e às multas impostas pelas violações ambientais, gerando-se passivo ambiental (Galdino et al., 2004). Além disso, a sociedade se torna exposta aos perigos gerados pelo passivo. Dentre os poluentes ambientais derivados do petróleo, estão os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) que possuem efeitos tóxicos, mutagênicos e propriedades cancerígenas (IARC, 2011; Park et al., 2008).

No Brasil, o Estado de São Paulo possui a legislação que trata da contaminação do solo e das águas subterrâneas, através da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) que dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São

Paulo (CETESB, 2005). De acordo com o CETESB (2011), dentre os principais problemas decorrentes das emergências químicas atendidas pela CETESB em 2010, destaca-se a contaminação do solo (53,6%). Em adição, os postos de combustíveis se destacam como a atividade mais poluidora, concentrando 79% do total dos casos registrados (CETESB, 2010).

Para a recuperação de solos contaminados por petróleo e seus derivados, técnicas que promovam o uso biotecnológico, tendem a ser mais eficientes e menos onerosas que os processos químicos. A biorremediação e fitorremediação são técnicas eficazes que utilizam microrganismos e plantas, respectivamente e seus produtos, na recuperação de solos contaminados (Nie et al., 2011). Em contraste com a maioria das técnicas de remediação, estas técnicas oferecem várias vantagens, como os baixos custos, devido à ausência de equipamentos que consomem energia e manutenção limitada, favorecem o controle da erosão, restauração do local e possuem maior aceitação pública (Kathi e Khan, 2011; Van Aken et al., 2010). Entretanto, apesar dos diversos benefícios apresentados, uma pesquisa realizada pela CETESB (2010), apontou que dentre as técnicas mais utilizadas para remediar as áreas contaminadas, a fitorremediação é a menos empregada.

A aplicação da fitorremediação na recuperação de solos contaminados por petróleo no Brasil ainda é um grande desafio. Apesar das condições edafoclimáticas serem favoráveis no país, a maioria dos estudos sobre a fitorremediação tem sido realizada nos EUA e Europa sob condições e espécies de clima temperado (Marques et al., 2011; Jacques et al., 2007). Neste sentido, o conhecimento acerca do potencial de muitas espécies de plantas capazes de se adaptarem às condições tropicais e subtropicais e a sua tolerância na presença de contaminantes passíveis de remoção ou degradação e os efeitos subsequentes ainda é limitado. Da mesma forma, pouco se conhece a respeito da interação dos microrganismos da rizosfera, da planta e dos solos tropicais contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, ou outros contaminantes orgânicos (Marques et al., 2011; Lamego e Vidal, 2007; Aguiar, 2006).

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de diferentes gramíneas, fungos micorrízicos arbusculares, bactérias, surfactante, compostos orgânicos e nutrientes minerais, em solos contaminados com petróleo e óleo diesel.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A produção de petróleo na região Norte Fluminense

A indústria petrolífera engloba um conjunto de diversos setores, tais como a exploração, a perfuração, a produção, o transporte, o refino e a distribuição de petróleo e derivados, os quais, devidamente interligados, formam um dos maiores ramos industriais do mundo. Cada setor possui características peculiares, sendo responsáveis por diferentes áreas de atuação, pontos específicos, e regulações normativas distintas (Ribeiro e Campos, 2011).

O Brasil produziu 2,18 milhões de barris de petróleo por dia em dezembro de 2010, totalizando, aproximadamente, o recorde de 2,62 milhões de barris de óleo equivalente por dia (boe/d). Dentre todos os estados brasileiros produtores, o Rio de Janeiro concentra a maior parte da produção (77,1%), produzindo o valor estimado de 1.681.332 barris de petróleo por dia (bbl/d) e 1.856.628 boe/d (Tabela 1) (ANP, 2011).

Tabela 1. Participação dos Estados brasileiros na produção de petróleo, gás natural e óleo equivalente em dezembro de 2010 (ANP, 2011)

FONTE ANP/SDP/SIGEP

Estado	Petróleo (bbl/d)	Gás Natural (Mm ³ /d)	Produção (boe/d)
Rio de Janeiro	1.681.332	27.869	1.856.628
Espírito Santo	281.178	12.906	362.354
Amazonas	36.256	11.003	105.468
Bahia	46.022	9.095	103.229
Rio Grande do Norte	58.740	1.665	69.210
Sergipe	40.126	3.304	60.910
São Paulo	22.755	1.711	33.519
Alagoas	5.760	1.580	15.696
Ceará	7.903	77	8.385
Total geral	2.180.071	69.210	2.615.401

* Barris de petróleo por dia (bbl/d); metros cúbicos por dia (Mm³/d); barris de óleo equivalente por dia (boe/d);

A Bacia de Campos é responsável pela produção de 85,5% da produção de petróleo (Figura 1) de todo o país. Dentre os 20 maiores campos produtores de petróleo e óleo equivalente, a plataforma P-52, localizada no Campo de Roncador, Bacia de Campos, destaca-se como a unidade com a maior produção (ANP, 2011).

FONTE ANP/SDP/SIGEP

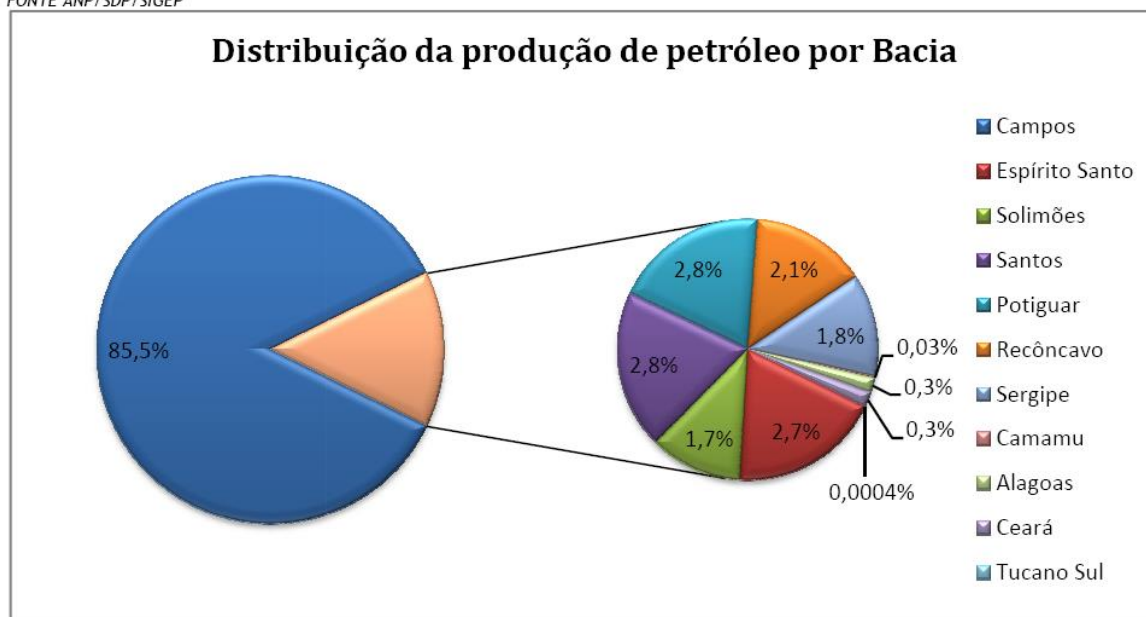


Figura 1. Distribuição da produção de petróleo no Brasil por Bacia em 2010 (ANP, 2011).

Diante da escassez internacional de novas fronteiras exploratórias e visto que a indústria de petróleo e gás é fortemente integrada ao mercado internacional, os investimentos nessa indústria no Brasil vêm crescendo de modo significativo e a expectativa é de que atinjam cerca de R\$ 380 bilhões no período 2011-2014. A indústria petrolífera promove o desenvolvimento econômico regional e nacional. Com as descobertas de petróleo e gás nas camadas de pré-sal, novas perspectivas se abrem ao país com a possibilidade de garantir às próximas gerações a oportunidade de milhares de empregos, o aumento da renda, a arrecadação de royalties, além de fortalecer o capital local com a formação de novas empresas (Piquet, 2010).

Apesar da relevância da cadeia produtiva da indústria petrolífera no país e suas características na região Norte Fluminense, do qual dispõe as maiores reservas de petróleo e gás do Brasil, localizadas na plataforma continental da Bacia de Campos, cresce também os impactos não favoráveis ao desenvolvimento regional. De acordo com Silva (2008), dentre os principais impactos ocasionados na região Norte Fluminense estão o risco de acidentes marítimos, a pressão sobre a infraestrutura urbana e social, a exposição da população a riscos e acidentes, a aceleração da expansão do espaço urbano, a intensificação do movimento migratório, os problemas de saúde ocupacional, o derrame de óleo com prejuízo para a pesca e a contaminação ambiental.

Ações emergentes que promovam a recuperação dos impactos decorrentes da atividade de exploração de petróleo na região Norte Fluminense têm sido amplamente buscadas, a fim de minimizar os reflexos gerados, através de uma gestão integradora de fatores econômicos, sociais, políticos e ideológicos.

2.2. Contaminação de solos por hidrocarbonetos e técnicas de remediação no Brasil

No Brasil, o Estado de São Paulo possui legislação que trata da contaminação do solo e das águas subterrâneas, através da Decisão de Diretoria Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) que dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo

(CETESB, 2005). O Estado do Rio de Janeiro adota os respectivos valores determinados pelo CETESB para restaurar a qualidade do solo.

O petróleo é uma fonte energética que causa um dos maiores impactos ao longo de todo o seu ciclo de vida, que vai desde a extração até o consumo final (como as emissões dos veículos e as atividades industriais) (Galdino et al., 2004). De acordo com a CETESB (2010), dentre as atividades mais poluidoras, os postos de combustíveis destacam-se em São Paulo, concentrando 2.279 registros (79% do total), seguidos das atividades industriais com 382 (13%), das atividades comerciais com 123 (4%), das instalações para destinação de resíduos com 96 (3%) e dos casos de acidentes e fonte de contaminação de origem desconhecida com 24 (1%).

A partir do momento em que o solo é removido da zona de contaminação, o solo passa a ser um resíduo, também chamado de passivo ambiental, que se acumula e demanda tratamento, uma vez que pode se tornar uma futura fonte de contaminação, além de prejudicar a imagem da empresa (CETEM, 2000).

A Agência de Proteção Ambiental norte-americana (United State Environmental Protection Agency - USEPA) apresenta algumas ferramentas de avaliação para cada tipo de passivo relativo a danos em recursos naturais, assim como referências bibliográficas para situações ambientais, tais como locais com resíduos perigosos e não-perigosos, tanques de armazenamento subterrâneos e acidentes durante o transporte nas empresas de exploração de petróleo. Segundo a USEPA (2004), resíduos perigosos são os subprodutos ou resíduos manufaturados e de outros processos que têm alguma propriedade perigosa, geralmente, classificados como: corrosivos, inflamáveis, tóxicos, reativos, ou de alguma forma prejudiciais às pessoas ou ao meio ambiente.

No Brasil, os resíduos perigosos são classificados de acordo com a norma ABNT 10.004 de 2004. Existem legislações e normas específicas para tratar as questões dos resíduos industriais, dentre as quais estão: a Constituição Brasileira em seu Artigo 225, que dispõe sobre a proteção ao meio ambiente, a Lei 6.938/81 que estabelece a Política Nacional de Meio Ambiente e a Lei 6.803/80 que dispõe sobre as diretrizes básicas para o zoneamento industrial em áreas críticas de poluição.

A indústria petrolífera é uma das que sofre grandes quantidades de penalidades por danos causados ao meio ambiente, principalmente nos setores

de exploração, transporte e armazenagem. Isto gera graves consequências, como a contaminação do solo, provocando impactos ambientais, econômicos e sociais. Quando o solo é contaminado, além do passivo ambiental gerado, o valor de mercado da propriedade é afetado, devido aos custos de limpeza, às altas penalidades e às multas impostas pelas violações ambientais (Galdino et al., 2004). Além disso, dentre os poluentes ambientais derivados do petróleo, estão os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) que possuem efeitos tóxicos, mutagênicos e propriedades cancerígenas (IARC, 2011; Park et al., 2008), tornando a sociedade cada vez mais preocupada diante dos perigos que poderão expô-las ao passivo.

A distribuição dos produtos no Brasil provenientes dos setores químico, petroquímico e de refino de petróleo é realizada na sua maioria por meio de rodovias (Ribeiro e Campos, 2011). De acordo com o CETESB (2011), o transporte rodoviário lidera as estatísticas de acidentes ambientais, sendo a principal atividade geradora de emergências químicas ocorridas no Estado de São Paulo entre 1978 e 2010, seguido pelo descarte de produtos químicos, por indústrias e pelo armazenamento, representando 76,0% do total de atendimentos (Tabela 2).

No Brasil, o transporte de petróleo é o principal setor de distribuição de produtos refinados. A maior parte do petróleo produzido é transportada por via marítima. Entretanto o setor ferroviário transporta grande quantidade de petróleo e derivados para o interior dos continentes, a médias e grandes distâncias por vias terrestres. No entanto, o meio terrestre mais apropriado para o transporte de grandes volumes, de forma mais segura e econômica, é o dutoviário, uma vez que, só a carga é transportada (Ribeiro e Campos, 2011). De acordo com a Transpetro (2011), mais de 13 mil km de dutos (entre oleodutos e gasodutos) interligam todas as regiões brasileiras, abastecendo, assim, os mais longínquos pontos do País.

O armazenamento, transporte ferroviário e transporte por duto são atividades importantes para a indústria petrolífera e que podem afetar o solo, durante a distribuição do petróleo. Enquanto, o transporte rodoviário pode afetar o solo por meio de seus derivados.

Tabela 2. Atendimentos emergenciais realizados pela CETESB por atividade e os respectivos percentuais relativos ao período de 1978 a 2008 e os anos de 2009 e 2010 (CETESB, 2011).

Atividades	1978 a 2008		2009		2010	
	Total	%	Total	%	Total	%
Armazenamento	200	2,6	9	2,2	16	3,5
Descarte de resíduos químicos	285	3,8	45	11,0	39	8,5
Indústria	534	7,0	28	6,8	29	6,3
Mancha órfã	75	1,0	9	2,2	4	0,9
Nada constatado	420	5,5	30	7,3	23	5,0
Não identificada	779	10,3	25	6,1	23	5,0
Outras	866	11,4	21	5,1	31	6,1
Postos e sistemas retalhistas de combustíveis	686	9,0	19	4,6	14	3,0
Transporte ferroviário	84	1,1	11	2,7	4	0,9
Transporte marítimo	365	4,8	8	2,0	8	1,7
Transporte por duto	205	2,7	10	2,4	4	0,9
Transporte rodoviário	3098	40,8	195	47,6	266	57,7
TOTAL	7597	100	410	100	461	100

Em decorrência das emergências químicas atendidas pela CETESB, os meios mais afetados nos acidentes com produtos químicos são o solo e o ar, respectivamente (CETESB, 2011). Em 2010, 247 casos (53,6% do total) causaram contaminação do solo, 216 casos (46,8% do total) do ar e em 107 casos (23,2% do total) causaram contaminação do recurso hídrico, afetando-se também a flora e a fauna, respectivamente (CETESB, 2011).

Os principais grupos de contaminantes presentes nas áreas contaminadas inventariadas em São Paulo pelo CETESB (2010) foram os solventes aromáticos, os combustíveis líquidos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), os metais e os solventes halogenados. Isto mostra que a maior parte dos contaminantes encontrados é derivada do petróleo.

A descontaminação de solos contaminados com petróleo e seus derivados pode ser realizada através de métodos físico-químicos e/ou biológicos. Atualmente, existe um grande número de técnicas que podem ser realizadas no local do acidente (*in situ*) ou fora deste (*ex situ*), empregadas como alternativas de remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos, tais como escavação, incineração e lavagem de solo.

Dentre as principais técnicas mais empregadas no tratamento de solos (zonas não saturadas) estão a remoção de solo/resíduo e a extração de vapores,

enquanto as técnicas de bombeamento e tratamento, a recuperação de fase livre e a extração multifásica destacam-se como as mais utilizadas para águas subterrâneas (zona saturada) (Figura 2) (CETESB, 2010). A fitorremediação é a técnica menos utilizada para remediar as áreas contaminadas.

De acordo com Cunha (2009), os métodos de tratamento de resíduos de petróleo mais utilizados hoje na indústria são: estabilização, solidificação, secagem e desidratação de lodos, incineração, landfarming, co-processamento, plasma, biorremediação e fitorremediação.

As técnicas que empregam processos físicos e químicos para recuperar solos contaminados com petróleo tendem a ser mais onerosas e, em sua maioria, pouco eficientes em comparação com as técnicas que envolvem processos biológicos (Sangabriel et al., 2006; Frick et al., 1999). A técnica de biorremediação constitui uma boa alternativa na descontaminação de ambientes poluídos por petróleo e seus derivados, apresentando, na maioria das vezes, baixo custo de implementação, e menor risco ambiental do que técnicas de limpeza que envolvem processos físicos e químicos (Wetler-Tonini et al., 2010).

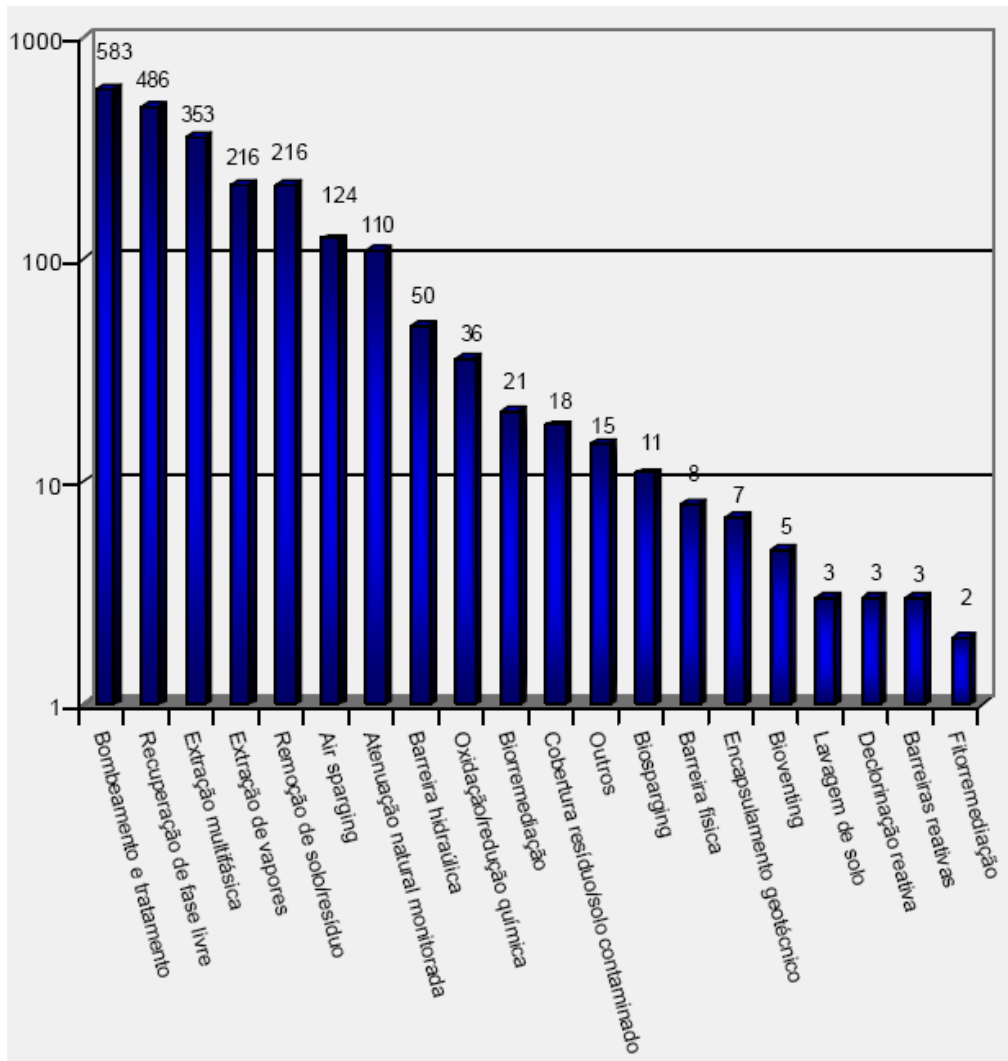


Figura 2. Técnicas de remediação aplicadas em áreas contaminadas inventariadas pela CETESB em São Paulo e frequência de ocorrência (CETESB, 2010).

Diante do crescente índice de acidentes ambientais e de contaminação de solos com hidrocarbonetos derivados do petróleo no Brasil, é importante ressaltar a necessidade do desenvolvimento de técnicas eficientes e de baixo custo, que permitam recompor as propriedades físicas e químicas dos solos, tornando-os biologicamente ativos.

2.3. O petróleo e óleo diesel: composição e biodegradação no solo

O petróleo pode ser definido como uma mistura complexa de hidrocarbonetos gerados ao longo de milhões de anos (15 a 500 milhões de anos) da decomposição da matéria orgânica de algas terrestres e aquáticas e dentre outros fósseis. Esta mistura de compostos consiste, predominantemente, em hidrocarbonetos e, em menor quantidade, derivados orgânicos sulfurados,

nitrogenados, oxigenados e organo-metálicos. Segundo Zílio e Pinto (2002), a composição global do petróleo pode ser definida pelo teor de:

- hidrocarbonetos saturados, que compreendem alcanos de cadeia normal e ramificada (parafínicos) e cicloalcanos (naftênicos);
- hidrocarbonetos aromáticos, que incluem moléculas aromáticas puras, cicloalcano-aromáticos (naftenoaromáticos) e, usualmente, compostos cíclicos de enxofre;
- resinas e asfaltenos, que são componentes policíclicos, de alto peso molecular, compreendendo átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio.

A alta proporção de carbono e hidrogênio existente no petróleo mostra que os hidrocarbonetos podem variar de 50–98% de sua composição, sendo os seus principais constituintes (Gad, 2005). Diferentes tipos de hidrocarbonetos são encontrados no petróleo e podem ser agrupados em diferentes categorias. Os compostos alifáticos que contêm ligações simples e formam cadeias lineares ou ramificadas (alcanos ou parafinas); Os compostos cicloalifáticos ou alicíclicos (os naftenos ou cicloparafinas); e aromáticos; além de outros hidrocarbonetos (Gad, 2005; Tissot e Welte, 1984).

O óleo diesel é um combustível produzido a partir do petróleo pelo processo de craqueamento ou destilação do petróleo bruto que é separada por diversas frações definidas. A composição de um óleo diesel específico depende da fonte do petróleo e dos métodos utilizados para produzi-lo. O óleo diesel é formado a partir de uma mistura de destilados intermediários do óleo cru do petróleo, com hidrocarbonetos variando de C8 a C30, sendo composto de aproximadamente 40% de n-alcanos, 40% de iso e cicloalcanos, 20% de hidrocarbonetos aromáticos e menores porcentagens de compostos de enxofre, nitrogênio e oxigenado. No óleo diesel também podem ser adicionados vários tipos de aditivos (inibidores de corrosão, surfactantes e aditivos para melhorar a estabilidade e ignição) (Lee et al., 1992).

Diversas propriedades físico-químicas do petróleo, tais como: viscosidade, tensão superficial e volatilização variam de acordo com a sua origem e influenciam significativamente a sua toxicidade (Gad, 2005).

Dentre os principais hidrocarbonetos que estão presentes no petróleo e que compõem o óleo diesel, os que demandam uma maior preocupação, pela sua

característica mais tóxica, são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), dos quais fazem parte os seguintes compostos: *naftaleno*, *acenaftileno*, *acenafteno*, *fluoreno*, *fenantreno*, *antraceno*, *fluoranteno*, *pireno*, *benzo(a)antraceno*, *criseno*, *benzo(b) fluoranteno*, *benzo(k)fluoranteno*, *benzo(a)pireno*, *dibenzo(a,h)antraceno*, *benzo(g,h,i)perileno* e *indeno(1,2,3-cd)pireno*. A maior presença de HPAs nas amostras de água subterrânea e solo pode caracterizar uma maior toxicidade da contaminação. Sabe-se que os HPAs e seus derivados estão associados ao aumento da incidência de câncer no homem. Nos EUA, a EPA estabeleceu a inclusão destes 16 HPAs na lista dos contaminantes orgânicos prioritários, motivado pelo alto grau de toxicidade, potencial carcinogênico e mutagênico (Park et al., 2008) e ao fato de serem resistentes à biodegradação (IARC, 2011).

Os hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos são compostos pouco solúveis em água. Nos solos, os hidrocarbonetos de petróleo tendem a ser adsorvidos aos coloides do solo e ao material vegetal, limitando sua dispersão (Joner e Leyval, 2001; Atlas, 1981). A migração do petróleo no solo ocorre através de dois mecanismos (Reid et al., 2000): o primeiro é quando a massa de óleo se infiltra no solo por ação da força da gravidade e da capilaridade; e o segundo através da percolação, quando os compostos individuais se separam da mistura de componentes, dissolvendo-se na água ou volatilizando no ar.

A maior parte dos componentes do petróleo, entre 60% a 90% é biodegradável. Entretanto, o restante que varia de 10% a 40%, em estado bruto ou refinado, é recalcitrante. Apesar da menor proporção, isto pode representar toneladas de poluentes, impactando ecossistemas e sendo bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica. O destino destes compostos após um derrame irá depender da interação entre vários fatores, podendo-se destacar a degradação microbiana (Crapez et al., 2002).

A permanência de hidrocarbonetos de petróleo no ambiente está intimamente ligada a fatores abióticos que influenciam a biodegradação do petróleo. Fatores que influenciam as taxas de crescimento microbiano e a atividade enzimática afetam as taxas de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. A persistência do contaminante depende da quantidade e qualidade da mistura de hidrocarbonetos e nas propriedades do ecossistema afetado, podendo

persistir indefinidamente ou ser totalmente biodegradado dentro de poucas horas ou em poucos dias (Atlas, 1981).

Para aumentar a biodegradação de petróleo e óleo diesel no solo, algumas estratégias têm sido adotadas, como a utilização de fertilizantes e surfactantes. Os fertilizantes estimulam a biodegradação fornecendo nutrientes para os microrganismos do solo presentes no sistema, capazes de degradar os hidrocarbonetos, como fonte de carbono. No mesmo sentido, os surfactantes que são moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, obtidos a partir de sínteses químicas, produzidos por microrganismos (biosurfactantes) têm sido utilizados para emulsificar e aumentar a solubilidade dos contaminantes hidrofóbicos no solo, tornando-os disponíveis para o ataque microbiano (Colla e Costa 2003).

2.4. Biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo

No cenário global com o aumento da contaminação no solo provocados por acidentes com petróleo e derivados, várias técnicas têm sido empregadas. Dentre as técnicas mais empregadas para a eliminação dos hidrocarbonetos contidos nos solos, destacam-se: a extração dos hidrocarbonetos à vácuo, a lavagem do solo contaminado com água, a incineração, a recuperação eletrocinética, dentre outras (Clark, 1995). Com a aplicação de algumas destas técnicas, tem-se conseguido efeitos positivos, mas seu elevado custo econômico constitui atualmente um obstáculo para serem empregadas. Neste sentido, alternativas viáveis para a eliminação dos hidrocarbonetos contidos nos solos que sejam ambientalmente corretas, simples e econômicas têm sido amplamente buscadas. Desta forma, surgiu a técnica de biorremediação e fitorremediação, que consistem em fazer o uso de microrganismos ou plantas, respectivamente, para conseguir eliminar, mediante a biodegradação de uma determinada contaminação por compostos orgânicos (Atlas e Pramer 1990; Bollag e Bollag, 1995), e constitui uma tecnologia em clara expansão e muito competitiva, capaz de conseguir a biodegradação dos hidrocarbonetos contidos nos solos. A biorremediação é uma técnica inovadora que foi desenvolvida nas décadas de 80 e 90, e tem sido aplicada com êxito no tratamento de solos com alta composição

de contaminantes com hidrocarbonetos. No entanto, a aplicação desta técnica tem encontrado certa resistência devido ao tempo necessário para completar o processo até conseguir as metas de recuperação das áreas desejadas.

Entre os tratamentos de biorremediação “in situ” encontram-se: (i) a *bioestimulação* que consiste na estimulação das populações microbianas nativas existentes no solo mediante a adição de nutrientes, regulação de condições redox, mudança de pH, ou outras condições diversas sobre as que se podem influenciar; (ii) a inoculação com microrganismos capazes de atuar especificamente em determinados ambientes contaminados (*bioaugmentação*). Praticamente em qualquer solo (com exceção de casos muito particulares, como os desertos), e em qualquer momento, a maioria das espécies de microrganismos existentes, consegue realizar a degradação dos hidrocarbonetos, entretanto, muitas vezes, a quantidade não é elevada para que estes microrganismos atuem, e nesse caso, as inoculações de microrganismos podem ser aplicadas para descontaminar um determinado ambiente; (iii) aplicação de *enzimas imobilizadas* capazes de transformar ou degradar alguns contaminantes específicos; e (iv) o “*landfarming*” que é uma técnica de biorremediação que pode ser utilizada para descontaminação tanto “in situ”, como “ex situ”, e consiste em provocar a oxidação biológica dos hidrocarbonetos contidos no solo, por meio da estimulação da microflora natural que se encontra no solo (leveduras, fungos ou bactérias) mediante a adição de nutrientes, aeração e irrigação superficial. Basicamente, se trata de uma bioestimulação das populações de interesse em ser ativadas (Qiao et al., 2014).

Os microrganismos decompõem os contaminantes orgânicos em compostos inofensivos, principalmente dióxido de carbono e água. Uma vez degradados os contaminantes, as populações microbianas são reduzidas, ao esgotar-se o carbono, utilizado como fonte de energia (Alvarez et al., 2001). No entanto, a eficácia da remediação de solos contaminados depende de numerosos fatores tais como: o tipo e a concentração do contaminante, os nutrientes, a aeração, as condições ambientais, a presença de inibidores, as concentrações de microrganismos, dentre outros (Marin et al., 2006; EPA, 2001). Desta forma, é importante a realização de estudos envolvendo a aplicação da biorremediação para estudar o comportamento e a eficácia das comunidades microbianas, assim como a capacidade de degradar os contaminantes no solo de acordo com as

características físico-químicas do solo e as condições climáticas encontradas no ambiente.

2.5. Fitorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo

Tecnologias *in situ* capazes de remediar solos impactados por hidrocarbonetos derivados do petróleo de uma forma ambientalmente responsável e de baixo custo têm sido constantemente buscadas (Greenberg et al., 2007). Os hidrocarbonetos, assim como os metais pesados apresentam uma grande resistência no solo, dificultando a sua extração, imobilização ou amenização (Coutinho e Barbosa, 2007). Esse tipo de poluição é complexo, pois os contaminantes de petróleo tendem a ser fortemente adsorvidos na matéria orgânica do solo com taxa de dessorção muito baixa, causando a formação de resíduos ligados não-extraíveis (Lamego e Vidal, 2007).

Uma técnica eficaz na recuperação de solos contaminados por petróleo é a fitorremediação (Vieira et al., 2011; Nie et al., 2011; Pacwa-Płociniczak et al., 2011; Lamego e Vidal, 2007; Campanella et al., 2002). A fitorremediação é uma tecnologia emergente que utiliza plantas para a extração, a imobilização de contenção, e/ou degradação de contaminantes e que mantém uma grande promessa para a descontaminação de uma ampla gama de poluentes ambientais orgânicos e inorgânicos, visando amenizar ou até mesmo despoluir totalmente as áreas contaminadas (Greenberg et al., 2007; Coutinho e Barbosa, 2007).

O uso da técnica da fitorremediação tem crescido anualmente nos Estados Unidos da América (EUA), na Europa e, mais recentemente, no Brasil. As companhias de consultoria ambiental incluem a fitorremediação em seus pacotes de tecnologia. Nos EUA são gastos com o processo de fitorremediação, aproximadamente, US\$ 100 a 150 milhões por ano, correspondendo 0,5% do total do mercado de remediação de áreas poluídas (Pilon-Smits, 2005). O Brasil possui grande potencial de uso da fitorremediação de solos contaminados devido às condições edafoclimáticas e a sua biodiversidade que tornam favoráveis o uso desta tecnologia. Por outro lado, o conhecimento a cerca da fitorremediação está limitado quase que exclusivamente a países de clima temperado (Aguiar, 2006). Isto pode explicar o baixo índice de aplicação desta técnica no Brasil na

remediação de áreas contaminadas, de acordo com o levantamento realizado pelo CETESB (2010) (Figura 2).

De acordo com Marques et al. (2011), as barreiras de natureza socioeconômicas para ampla disseminação da fitorremediação são: (a) falta de informação no meio técnico e na sociedade em geral; (b) ausência de instrumentos reguladores que promovam a fitorremediação; (c) competição com métodos mais conhecidos, dominados e aceitos por empresas de consultoria; e (d) investimentos limitados para o desenvolvimento de tratamentos inovadores. Em adição, a fitorremediação possui baixo apelo comercial, por limitar o direito de propriedade, enquanto técnicas com base em processos físicos e químicos são mais facilmente patenteáveis.

Os mecanismos envolvidos na fitorremediação são (Figura 3): *Fitoestabilização*, que é um processo de contenção, reduzindo-se a biodisponibilidade do contaminante através da utilização de plantas, a fim de estabilizar mecanicamente o local e reduzir a transferência do poluente para outros compartimentos do ecossistema da cadeia alimentar; *Fitoextração*, que é um processo de remoção do poluente do solo para a parte aérea e folhas, onde é estocado; *Fitovolatilização*, que é um processo que emprega a capacidade metabólica de plantas e microrganismos associados à rizosfera para transformar os poluentes em compostos voláteis que são liberados para a atmosfera; A *Fitodegradação*, que se refere à capacidade metabólica de plantas e microrganismos da rizosfera de degradar orgânicos poluentes no solo; *Fitoestimulação* (ou rizodegradação), que compreende o processo de degradação de poluentes orgânicos por microrganismos na rizosfera, estimulada pelas plantas (Wenzel, 2009; Kaimi et al., 2006; Pilon-Smits, 2005; Germida et al., 2002).

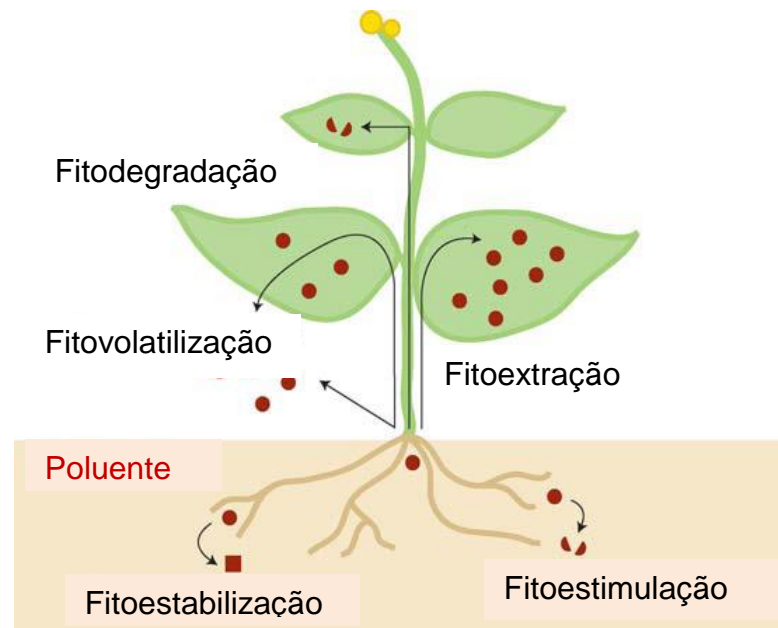


Figura 3. Fitorremediação de poluentes orgânicos no solo mediado por plantas e microrganismos na rizosfera (Pilon-Smits, 2005).

A fitorremediação oferece várias vantagens em relação às técnicas utilizadas na recuperação de solos contaminados. O emprego desta técnica para o tratamento dos resíduos gerados pelas indústrias de petróleo promove o baixo consumo de água e energia, por se tratar de um processo biológico governado pela energia solar, proporcionando o baixo custo, da ordem de R\$ 200,00/m³, de fácil aplicação e permite simplicidade no estabelecimento (Cunha 2009; Greenberg et al., 2007). Além disso, a fitorremediação, em contraste com a maioria das outras técnicas de remediação, não é invasiva, uma vez que preserva a estrutura das partículas do solo, além de aumentar o sequestro de carbono no solo (Kathi e Khan, 2011), tornando-o biologicamente ativo (Van Aken et al., 2010; Wenzel, 2009; Germida et al., 2002).

A aceitação pública da fitorremediação pode ser favorecida pelo fato de que técnicas verdes são em geral mais atraentes do que soluções técnicas, que envolvem poluição visual, equipamentos pesados na área e incluem escavações, ruído, entre outros. Contudo, essa aceitação também depende da percepção acerca dos riscos para saúde humana e o ambiente produzido pela técnica, da disseminação de informação confiável e do nível educacional da comunidade (Marques et al., 2011).

Além da responsabilidade ambiental e maior atratividade do público, a fitorremediação pode oferecer outra importante vantagem para as empresas. A combustão do petróleo resulta na emissão de gases atmosféricos que contribuem para o aquecimento global (CO₂), a chuva ácida (SO₂, NO_x) e grandes quantidades de partículas microscópicas podem ficar suspensas no ar, atingindo centenas de quilômetros (Yakubu, 2007). Atualmente, as indústrias têm criado formas de inventariar o grau de gases de efeito estufa gerado nos processos produtivos e traçar metas para a sua redução. As usinas de combustíveis fósseis representam 78% na distribuição global de principais fontes de emissão de CO₂ e os processos industriais (incluindo biomassa) correspondem a 22% (Rubin, 2005). A técnica de fitorremediação em solos contaminados com petróleo pode promover o aumento no acúmulo de carbono no solo, reduzindo-se a sua emissão para a atmosfera.

Apesar dos benefícios proporcionados, a fitorremediação é uma técnica que apresenta algumas limitações. A aplicabilidade da fitorremediação *in situ* fica limitada à zona da raiz, ou seja, atingindo poucos decímetros ou metros da superfície do solo, dependendo da arquitetura do sistema radicular e de sua morfologia. Esta técnica pode necessitar de um período de tempo relativamente longo para o crescimento das espécies vegetais e para alcançar os contaminantes no solo, tornando-se um processo mais lento do que outros métodos de correção utilizados, como os processos de escavação, incineração e bombeamento e tratamento (ou “pump-and-treat”). Além disso, a fitorremediação também pode ser limitada pela biodisponibilidade dos poluentes (Wenzel, 2009; Cunha, 2009; Pilon-Smits, 2005).

A natureza hidrofóbica de compostos do petróleo é um fator que limita severamente a sua aceitação pelas plantas (Chaudhry et al., 2005), principalmente quando ocorre a mistura de poluentes, dificultando a seleção de plantas resistentes e fitorremediadoras para este conjunto de compostos. Estudos mostram que a tolerância de espécies vegetais às concentrações de petróleo (óleo cru) no solo apresentam limites, dependendo da espécie, em 3% e 5% de acordo com Merkl et al. (2005) e de 6%, segundo Rosa (2006).

Diferentes propriedades das plantas são importantes para a fitorremediação. Em geral, as plantas utilizadas na fitorremediação de poluentes no solo necessitam possuir determinadas características como: boa capacidade

de absorção, sistema radicular profundo, acelerada taxa de crescimento, fácil colheita, competitividade, vigor e que apresentem uma grande tolerância ao poluente (Lamego e Vidal, 2007; Coutinho e Barbosa, 2007). Plantas com essas características podem ser utilizadas como agentes de despoluição.

As espécies vegetais podem apresentar comportamentos diferenciados. Estudos têm demonstrado que as gramíneas são mais tolerantes que leguminosas na presença de petróleo e derivados nos solos (Sangabriel et al., 2006; Smith et al., 2005) e podem estimular a proliferação de microrganismos na rizosfera. Dentre as principais gramíneas estudadas na fitorremediação de solos contaminados com petróleo e derivados, encontram-se a braquiária (Merkl et al., 2005), o milho (Mendez-Natera, 2004; Ogboghodo et al., 2004; Quiñones-Aguilar et al. 2003), a cevada (Houshmandfar e Asli, 2011) e o arroz (Tao et al., 2006).

Estudos detalhados ainda são necessários nas condições de clima, solos e biodiversidade existente em países tropicais, focando o estabelecimento, crescimento e metabolismo de espécies vegetais e microrganismos associados em resposta à contaminação por compostos de petróleo, tendo em vista que estes fatores podem afetar o desempenho da fitorremediação (Aguiar, 2006). A maioria dos estudos com plantas na recuperação de áreas contaminadas tem sido desenvolvida em países de clima temperado, onde o potencial da fitorremediação é limitado por fatores climáticos. No Brasil, o conhecimento acerca do potencial fitorremediador das várias espécies de plantas e comunidades microbianas em solos tropicais é ainda muito escasso, que associado à falta de instrumentos de aferição e de apoio à decisão, dificulta sua recomendação por parte das agências ambientais e empresas (Marques et al., 2011).

2.6. Mecanismos de fitoextração no solo de hidrocarbonetos derivados de petróleo

A planta pode influenciar potencialmente a remediação de compostos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), levando ao aumento do interesse no estudo sobre os efeitos da rizosfera na dissipação de HPAs (Parrish et al, 2005). No entanto, as espécies de plantas variam muito em sua eficiência durante a dissipação de HPAs. Em geral, a fitorremediação é potencialmente associada à capacidade da espécie vegetal de suportar determinados tipos e níveis de contaminação (Sung et al., 2001). Informações

sobre a distribuição e concentração de HPAs em plantas são essenciais para prever a eficácia de uma operação utilizando o processo de fitorremediação.

As plantas exercem um papel importante na degradação dos HPAs por influenciarem a sua biodisponibilidade. Conforme as raízes se desenvolvem, elas penetram através do solo, e expõem os contaminantes que estavam adsorvidos no solo e que estavam inacessíveis, aumentando assim, a sua disponibilidade para a degradação. Além disso, compostos são exsudados através das raízes e de microrganismos associados que aumentam a dessorção dos contaminantes do solo, além de agirem como surfactantes, aumentando a concentração disponível do contaminante no solo (Parrish et al., 2005). As plantas também transferem oxigênio pelas raízes para o solo adjacente, o que facilita as transformações aeróbicas. As substâncias que as plantas liberam no solo incluem quelatos ligantes e enzimas, os primeiros podem diminuir a toxicidade de um metal, por exemplo, mediante sua complexação, e as últimas podem biodegradar os poluentes orgânicos (Baird, 2002).

A hidrofobicidade dos compostos orgânicos, que é indicada pelo coeficiente de partição octanol-água (k_{ow}), define a sua afinidade por tecidos lipídicos, determinando assim, a sua tendência em acumular nos tecidos biológicos e tecidos vivos. Assim, pode afetar a absorção dos compostos pelas raízes e a translocação para o interior da planta. Em geral, compostos orgânicos moderadamente hidrofóbicos ($\log k_{ow}$ entre 0,5 e 3,0) são mais rapidamente absorvidos e translocados para dentro das plantas. Os compostos lipofílicos (hidrofóbicos) do solo, também podem ser confinados nas superfícies das raízes podendo ou não, ser translocados posteriormente para dentro da planta (ITRC, 2001).

Os mecanismos de translocação de hidrocarbonetos derivados do petróleo não são bem conhecidos, mas estudos apontam que a absorção pelas plantas ocorre em função de vários fatores, como a lipofilicidade da planta, a concentração de compostos orgânicos do solo e o coeficiente octanol-água (k_{ow}) dos compostos. (Watts et al., 2006; Trapp et al., 1990). A solubilidade indica a mobilidade dos compostos no solo, e o k_{ow} indica a propensão de ser absorvido na fase orgânica. O transporte via xilema na planta é mediado por água e em função disto, os compostos menos solúveis em água, possuem maior dificuldade

para entrarem nos tecidos vegetais (Watts, et al. 2006, Gao e Zhu, 2004; Kipopoulou et al., 1999).

As plantas podem reduzir as concentrações lábeis de vários HPAs e quando associadas aos microrganismos, podem exsudar compostos que melhoram a disponibilidade destes contaminantes para a degradação (Fava et al. 2004; Makkar e Rochne, 2003), com exceção do fenantreno (Parrisch et al., 2005).

O destino dos HPAs e outros contaminantes orgânicos no ambiente está intimamente associado aos processos bióticos e abióticos, incluindo a volatilização, a fotoxidação, a oxidação química, a bioacumulação e transformação pelos microrganismos. A atividade microbiana tem sido considerada como a principal causa de remoção de HPAs (Daane et al., 2001). Os HPAs podem sofrer bioacumulação, biotransformação e biodegradação pelos microrganismos. Sob condições anóxicas, no entanto, os HPAs são degradados muito lentamente e podem persistir indefinidamente (Kennish, 2004).

Durante as últimas décadas, tem crescido significativamente o interesse em compreender a absorção e acumulação de HPAs pelas plantas (Howsam et al., 2001; Ryan et al., 1988; Simonich e Hites, 1994; Wild e Jones, 1992). Pons-Jiménez et al. (2011) observaram que as maiores concentrações de hidrocarbonetos totais, se encontraram em solos com maiores teores de matéria orgânica no solo. A baixa solubilidade em água e baixa polaridade dos HPAs os convertem em compostos com alta capacidade de serem adsorvidos pela matéria orgânica do solo. Desta forma, os poluentes orgânicos lipofílicos, incluindo HPAs ficam fortemente adsorvidos ao solo. Em função disto, não é esperado que esta fração orgânica, seja muito susceptível a absorção pela planta e translocação subsequente (Wild e Jones, 1992; Simonich e Hites, 1995). Com isso, a principal via de acumulação destes compostos é atribuída a partir do ar para a superfície da folha (Kipopoulou et al., 1999).

Muitos estudos sugerirem que HPAs encontrados em tecidos de plantas são originados principalmente pela absorção foliar, através da deposição sobre as folhas ou pela absorção dos estômatos (Wild et al., 1992; Kampe, 1989). Entretanto, a absorção pelas raízes e translocação de HPAs pelo xilema aos tecidos aéreos também tem sido relatada (Trapp, 2000; Sicbaldi et al. 1997).

Moléculas de HPAs podem alcançar grandes distâncias e ainda serem removidas da atmosfera através da precipitação ou por deposição seca. Os HPAs são acumulados nos organismos terrestres e aquáticos. A taxa de captação de HPAs pelas plantas do solo e a subsequente biomagnificação geralmente são muito baixa (Gao e Zhu, 2004). Em um estudo de absorção de HPAs de solos cultiváveis, observou-se que altas concentrações de HPAs no solo não foram correlacionadas com as concentrações de HPAs nos tecidos das plantas. Logo, a quantidade de HPAs encontrada nas plantas foi atribuída à deposição atmosférica (Wild e Jones, 1992).

Em geral, os compostos de HPAs com 2 e 3 anéis são mais voláteis e existem primariamente na fase gasosa da atmosfera, e tendem a ser depositados sobre as plantas por meio gasoso seco e /ou por deposição úmida. Os compostos de HPAs com 5 e 6 anéis são menos voláteis e provavelmente são depositados sobre a superfície da planta e ligados às partículas por deposição seca ou úmida. Para os compostos de pressão atmosférica intermediária (HPAs de 4 anéis, por exemplo), o composto orgânico gasoso é dependente da temperatura e a partição da molécula de HPA e está sujeita às duas vias de deposição seca e úmida (McVeety e Hites, 1967; Bidleman 1988; Lane, 1988).

Tao et al. (2006) determinaram os níveis e padrões de distribuição de HPAs em plantas de arroz coletadas a partir de um local contaminado com HPAs e estudaram as similaridades e diferenças de perfis de HPAs entre vários tecidos de plantas, bem como entre as plantas, o solo e o ar do ambiente contaminado. As amostras foram divididas em vários tecidos, incluindo: grãos, cascas, eixos axiais, a primeira, a segunda, e demais entrenós, bainhas das folhas bandeiras, lâminas de folhas bandeiras, lâminas de outras folhas adultas maduras e raízes durante três fases de crescimento (até atingir a fase madura da planta). Estes autores observaram que as concentrações de HPAs em raízes de plantas de arroz foram muito mais elevadas do que em tecidos aéreos de arroz. A área de superfície parece ser um fator importante para controlar os níveis de HPAs em vários tecidos de plantas expostos. Tendências específicas de deslocamento da raiz para a parte aérea não foram observadas. Correlações significativas entre conteúdos de HPAs e de lipídios foram observados apenas durante a fase de maturidade plena da planta. Houve semelhança nos perfis de HPAs entre certos tecidos de plantas e do ar. As concentrações totais de 15

HAPs (HPA15) em vários tecidos de plantas de arroz obtidas por Tao et al. (2006). As medições para as três fases de crescimento e todas as duplicatas foram agrupadas para comparações diretas entre os tecidos.

Pesquisas têm demonstrado que os contaminantes nos solos entram primariamente nas raízes das plantas pelo processo de transporte passivo. Esse processo de transporte pode ser tratado como uma série de partições do contaminante, compreendendo partições do solo para solo, poro e água dos poros do solo e desta água dos poros para a raiz das plantas e em seguida esta água é distribuída do xilema para a parte aérea das plantas (Gao et al., 2010; Gao e Collins, 2009; Li et al., 2005).

A capacidade de metabolizar HPAs oriundos do solo pela planta tem sido demonstrada (Wild et al., 2005; Li et al., 2001). Contudo, dentre os HPAs de alta massa molecular e com muitos anéis benzênicos, como fenantreno e pireno, apenas uma pequena porção é metabolizada nas plantas. A fitovolatilização tem sido demonstrada ser significativa para compostos orgânicos voláteis hidrofílicos (Li et al., 2005). A translocação destes compostos a partir da raiz para a parte aérea pode ser altamente restringida em função de sua elevada massa molecular (Gao e Ling, 2006). Desta forma, a fitovolatilização de fenantreno e pireno deve ser insignificante. Os mecanismos básicos envolvidos permanecem pouco compreendidos, e ainda existe uma falta de informações sobre a contribuição da absorção dos HPAs pelas plantas, assim como outros componentes do petróleo presentes no solo e seus comportamentos em relação a sua translocação, ainda não são bem-definidos (Gao et al., 2011; Kipopoulou et al., 1999).

De forma mais abrangente, existe uma grande necessidade de intensificar pesquisas sobre a bioacumulação destes compostos nos tecidos das plantas, especialmente, na parte aérea da planta, a partir de levantamentos de campo e experimentos de laboratório, envolvendo processos de absorção pelas plantas de HPAs e a descrição de diferentes vias de acumulação.

2.7. FMAs na fitorremediação de solos contaminados com petróleo

Certos fungos do solo capazes de estabelecer relações simbióticas mutualistas nas raízes das plantas são caracterizados como micorrizas (Silveira, 1992). De acordo com as características morfológicas e espécies de fungos e plantas envolvidas, sete diferentes categorias de micorrizas têm sido distinguidas:

arbuscular, ecto, ectendo, arbutoide, monotrofoide, ericoide e orquidoide (Finlay, 2008; Smith e Read, 1997). Dentre estes, a micorriza arbuscular (MA) é a mais ancestral e apresenta melhor distribuição e ocorrência nas plantas tropicais e de interesse agrícola (Michereff e Barros, 2001), formando associações simbióticas mutualistas em mais de 80% das plantas vasculares (Schubler et al., 2001; Smith e Read, 1997).

Apesar da maior parte dos estudos na literatura relatarem a influência dos FMAs na nutrição mineral de plantas, em especial o fósforo, estes microrganismos possuem papéis multifuncionais (Berbara et al., 2006; Hart e Travers, 2005; Finlay, 2004). De modo geral, o estabelecimento da simbiose resulta em diversos benefícios para a planta hospedeira como: a redução da suscetibilidade a certos patógenos, a tolerância aos estresses climáticos e edáficos como, melhor resistência ao estresse hídrico, às temperaturas elevadas, à acidez, à salinidade e à maior tolerância às condições de toxidez do solo (Fernandes, 2006; Bacon e White, 2000; Smith e Read, 1997), além de acúmulo de estoques de carbono (Smith et al., 2009; Rillig et al., 2001; Treseder e Allen, 2000), estruturação e maior estabilidade dos agregados no solo (Rillig et al., 2007; Rillig, 2001; Bacon e Francis, 2000).

Devido à grande potencialidade dos FMAs em ambientes submetidos a estresses abióticos, estudos envolvendo FMAs na fitorremediação de metais pesados têm sido intensificados. De acordo com Göhre e Paszkowski (2006), a inoculação de FMAs pode favorecer o processo de fitoestimulação, imobilizando o contaminante na rizosfera e o processo de fitoextração, além da capacidade de aumentar a retenção do contaminante na parte aérea e a biomassa das plantas.

Da mesma forma, a contribuição de FMAs no processo de fitorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos derivados por petróleo tem sido demonstrada (Yu et al., 2011; Gao et al., 2010; Volante et al., 2005; Joner e Leyval, 2003; Joner e Leyval, 2001). A natureza hidrofóbica de compostos de petróleo limita severamente a sua aceitação pelas plantas e a inoculação de FMAs pode contribuir significativamente na fitorremediação de solos contaminados por petróleo (Alarcón et al., 2008). Entretanto, poucos estudos na literatura evidenciam a contribuição de FMAs no processo de fitoestimulação e fitoextração em solos contaminados por hidrocarbonetos derivados por petróleo (Gao et al., 2010; Tao et al., 2006).

Dentre as espécies de FMAs mais estudadas, destacam-se: *Glomus claroideum*, *Glomus diaphanum*, *Glomus albidum* (Hernández-Ortega, 2011), *Glomus intraradices* (Gao et al., 2010; Debiane et al., 2009; Alarcón et al., 2008), *Glomus mosseae* (Yu et al., 2011; Gao et al., 2010; Volante et al., 2005; Joner e Leyval, 2003; Joner e Leyval, 2001), *Glomus etunicatum* (Gao et al., 2010), *Gigaspora margarita* (Alarcón et al., 2006; Volante et al., 2005), *Glomus caledonium* (Huang et al., 2007; Liu et al., 2004), *Echinochloa polystachya* (Alarcón et al., 2006) e *Gigaspora rosea* (Volante et al., 2005).

Em relação às espécies vegetais mais relatadas na literatura, capazes de se associarem aos FMAs e utilizadas na fitorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos derivados do petróleo, encontram-se: *Lolium multiflorum* (Yu et al., 2011; Gao et al., 2010; Alarcón et al., 2008), *Melilotus albus* (Hernández-Ortega et al., 2011), *Cichorium intybus* (Debiane et al., 2009), *Zea mays* L. (Huang et al., 2007), *Echinochloa polystachya* (Alarcón et al., 2006), *Allium porrum* L. (Volante et al., 2005), *Medicago sativa* (Liu et al., 2004), *Lolium perene* e *Trifolium repens* (Joner e Leyval, 2001; Joner e Leyval, 2003). Todavia, a maior parte das espécies listadas foram avaliadas sob condições edafoclimáticas de países temperados.

Um critério essencial para alcançar o sucesso da fitorremediação é a elevada produção de biomassa vegetal (Greenberg et al., 2007). Estudos mostram que os FMAs possuem a capacidade de acelerar o crescimento (Harms et al., 2011; Alarcón et al., 2006) e melhorar o estado nutricional das plantas (Hernández-Ortega, 2011) durante o processo de fitorremediação em solos contaminados por derivados de petróleo. A influência de FMAs no crescimento de plantas em solos contaminados por BTEX foi observado por Volante et al. (2005), com o incremento de 30%, em relação às plantas não micorrizadas. Nie et al. (2011), observaram que o estágio de crescimento da planta e a sua interação com a concentração de petróleo foram significativamente afetados pela colonização de FMAs. A taxa mais elevada de colonização de FMAs foi encontrada em raízes de plantas de solos contaminados em comparação àqueles de solos não poluídos em fase inicial de crescimento vegetativo.

De acordo com Debiane et al. (2009), os FMAs podem proteger as plantas contra o estresse oxidativo provocado pela presença de exposição de benzo[a]pireno. Sob a contaminação de diesel no solo, Hernández-Ortega (2011)

observaram que raízes de plantas micorrizadas tiveram alta atividade antioxidante total e atividade de nitrato redutase total, e maior degradação do conteúdo de compostos fenólicos solúveis na rizosfera. Estes resultados sugerem melhores respostas fisiológicas na presença dos FMAs para aliviar o estresse induzido pela toxicidade provocada pelo diesel do que as plantas não micorrizadas.

Estudos envolvendo solos contaminados mostram a contribuição de micorrizas arbusculares na degradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo, como: óleo diesel (Hernández-Ortega et al., 2011); óleo cru (Alarcón et al., 2008); BTEX (Volante et al., 2005); e HPAs: fenantreno (Yu et al., 2011; Gao et al., 2010; Alarcón et al., 2006); pireno (Yu et al., 2011); benzo[α]pireno (Debiane et al., 2009; Alarcón et al., 2006; Liu et al., 2004); fluoreno (Gao et al., 2010); atrazina (Huang et al., 2007); antraceno, criseno e dibenzo(a,h) antraceno (Joner e Leyval, 2001).

A capacidade de raízes micorrizadas em explorar maior volume de solo contaminado por HPAs é proveniente das hifas dos FMAs. A colonização micorrízica resulta na formação abundante de hifas extraradiculares e devido ao seu pequeno diâmetro, tem acesso à fina camada de poros no solo que são inacessíveis às raízes das plantas (Hart e Trevors, 2005; Khan et al., 2000). Isto indica o potencial de sua aplicação em nível de campo em solos contaminados. No entanto, a evidência da translocação direta de compostos orgânicos hidrofóbicos de produtos químicos por hifas micorrízicas ainda é escassa. Gao et al. (2010), demonstraram o grande potencial no transporte dos HPAs fluoreno e fenantreno no solo através das hifas de FMAs, em comparação com as raízes das plantas. No entanto, a translocação pelas hifas tende a ser maior, em proporção ao menor peso molecular e maior solubilidade em água apresentada pelo contaminante.

Hernández-Ortega et al. (2011) observaram em solos contaminados com óleo diesel que as plantas micorrizadas degradaram 47,7% dos hidrocarbonetos de petróleo totais, enquanto as plantas não micorrizadas dissiparam apenas 29,8%. Ao comparar o efeito da rizosfera na dissipação de HPAs em dois solos industriais diferentes, com o cultivo de plantas micorrizadas e não micorrizadas, Joner e Leyval (2003) observaram que a dissipação de HPAs foi mais rápida em amostras de solo distantes das superfícies das raízes micorrizadas que ao redor de raízes não micorrizadas. Joner et al. (2001) demonstraram que plantas

micorrizadas reduziram 66% e 42% as concentrações de criseno e dizobenzo (a,h)-antraceno, respectivamente, contra 56% e 20% em plantas não micorrizadas. Liu et al. (2004), avaliando solos contaminados por benzo[α]pireno nas concentrações de 1, 10 e 100 mg kg⁻¹, observaram que as taxas de degradação na presença de plantas de alfafa e FMAs foram de 86%, 87% e 57%, respectivamente, ao passo que na ausência de plantas micorrizadas foram de 76%, 78% e 53%. Além disso, a taxa de degradação de solos contaminados por benzo[α]pireno sem plantas foi significativamente inferior aos solos cultivados. No entanto, a capacidade de plantas micorrizadas em dissipar ou degradar HPAs na rizosfera pode ser influenciada pela dependência micorrízica da planta hospedeira (Leyval e Binet, 1998).

Os FMAs também podem contribuir na estrutura física e química das partículas do solo (Harms et al., 2011; Alarcón et al., 2006). Entretanto, estudos que avaliem a contribuição dos FMAs durante o processo de fitorremediação na estrutura de solos contaminados por hidrocarbonetos derivados do petróleo ainda são escassos na literatura. Da mesma forma, apesar das vantagens apresentadas na introdução de FMAs no sistema de fitorremediação, ainda é necessário intensificar pesquisas que avaliem a potencialidade destes microrganismos sob condições de clima tropical, uma vez que a maior parte das pesquisas é realizada em países de clima temperado e que os FMAs variam com as condições edafoclimáticas do ambiente.

O primeiro e predominante passo na determinação do processo de absorção de compostos orgânicos pelas plantas é o particionamento de compostos orgânicos químicos entre a água e a raiz. Na presença de FMAs, as extensões das hifas aumentam a área de superfície de contato entre o solo e a raiz, e o comprimento das hifas pode ser muito maiores em muitas ordens de magnitude do que as raízes das plantas (Xiao et al., 2005; Khan et al., 2000).

O particionamento do fenantreno entre a raiz da planta e a água, bem como, hifas de FMAs e água em mudas de alfafa, foram examinados por Gao et al. (2011). O comprimento de hifas extraradiculares foram maiores em várias ordens de magnitude do que a das raízes de plantas. Desta forma, a maior capacidade de aquisição de HPA por raízes de alfafa foi na presença de FMAs, que foi possivelmente atribuída ao aumento do particionamento de HPAs em raízes colonizadas pelos FMAs.

É relatado que a colonização micorrízica pode modificar exsudações radiculares, tanto qualitativa, como quantitativamente, resultando em mudanças na comunidade microbiana. A formação de uma região com hifas predominantes no solo circundando as raízes modifica claramente o ambiente do solo, incluindo sua estrutura microbiana (Joner et al., 2001). Deste modo, ocorre aumento do número de bactérias, fungos e actinomicetos. Nos solos rizosféricos e solos com maior predominância de hifas de FMAs, as comunidades microbianas diferem significativamente (Xiao et al., 2009). A porção destes HPAs depois de serem absorvidos por pelos das raízes nos solos contaminados é metabolizada pela planta.

3. TRABALHOS

3.1. CRESCIMENTO DE *Brachiaria brizantha* E COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA EM SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO DIESEL⁽¹⁾

Késsia Barreto Lima⁽²⁾, Fernando Fundora Tellechea⁽³⁾, Marco Antônio Martins⁽⁴⁾, Eliane Soares de Souza⁽⁵⁾

RESUMO

Acidentes envolvendo o derrame de óleo diesel têm sido cada vez mais freqüentes, afetando áreas de interesse agrônômico e florestal. Em programas de recuperação de solos contaminados com óleo diesel, podem ser aplicadas as técnicas de fitorremediação e biorremediação, que consistem na utilização de plantas e microrganismos, respectivamente, para atuar na degradação destes compostos que são hidrofóbicos e limitam severamente a aceitação pelas plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no crescimento de *Brachiaria brizantha* sob diferentes concentrações de óleo diesel no solo. Foi utilizado o delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados, sendo seis concentrações de

óleo diesel no solo (0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5%) e duas condições de inoculação com FMAs (*Rhizophagus clarum* + *Gigaspora margarita*) e controle sem FMAs. Foram avaliadas as massas secas da raiz, parte aérea, total, e colonização micorrízica das raízes aos 90 dias após a semeadura. Em solos contaminados a 1% de óleo diesel no solo, a altura e massas secas da parte aérea e total foram significativamente superiores quando as plantas foram inoculadas com os FMAs. Entretanto, com o aumento das concentrações de óleo diesel no solo, houve redução no crescimento das plantas e na colonização micorrízica.

Termos de indexação: bioaugmentação, micorriza, fitotoxicidade.

- (1) Parte da Tese de Doutorado da primeira autora, em Produção Vegetal, apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF;
- (2) Doutoranda, Laboratório de Solos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: kblima@hotmail.com;
- (3) Doutorando, Laboratório de Solos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: fundotell@gmail.com;
- (4) Professor Titular, Laboratório de Solos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: marco@uenf.br;
- (5) Professora Adjunta, Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo, Centro de Ciência e Tecnologia-UENF. Rodovia Amaral Peixoto Km 163, Avenida Brennand s/n, Imboacica. CEP 27925-310, Macaé (RJ). E-mail: eliane@lenep.uenf.br;

***Brachiaria brizantha* GROWTH AND MYCORRHIZAL COLONIZATION IN SOIL CONTAMINATED WITH DIESEL**

ABSTRACT

Accidents caused by diesel spillages are common, affecting areas of agronomic and forestry interests. In recovery of soils contaminated by diesel, bioremediation and phytoremediation techniques, involving the use of plants and microorganisms, respectively, may apply to act in the degradation of these compounds are hydrophobic and severely limit the uptake by plants. The objective of this study was to evaluate the influence of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Brachiaria brizantha* tolerance under different concentrations of diesel in soil. The experimental design used was a randomized complete block design with 6 x 2 factorial arrangement, with six concentrations of diesel oil in soil: 0, 1, 2, 3, 4 and 5%; two inoculation conditions: AMF (*Rhizophagus clarum* + *Gigaspora margarita*) and control (without AMF). Roots, shoots and total dry mass, and mycorrhizal colonization of roots at 90 days after sowing were evaluated. It was observed that with increasing concentrations of diesel fuel in the soil, there was reduction in the plant growth and mycorrhizal colonization. The effect of mycorrhizal inoculation was not observed. Root dry weight was influenced only by increasing the concentration of diesel oil in soil. The height, shoot and total dry weight were benefited from inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi in diesel contaminated soil at 1%. This effect was higher than seedlings not inoculated soils. In the other concentrations, seedling growth was not stimulated or suppressed by mycorrhizal inoculation.

Index terms: bioaugmentation, mycorrhiza, phytotoxicity.

INTRODUÇÃO

A espécie *Brachiaria brizantha* tem sido recomendada para estudos envolvendo a sua aplicação na fitorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos derivados do petróleo (Mezzari et al., 2011; Aguiar, 2006; Rosa, 2006; Sangabriel et al., 2006; Merkl et al., 2005). As espécies de *Brachiaria* são importantes forrageiras de regiões tropicais como África, Ásia e Austrália. No Brasil, existem aproximadamente 95 milhões de hectares (ha) cultivados com espécies de *Brachiaria*, incluindo a *Brachiaria brizantha* (60 milhões ha⁻¹), *Brachiaria decumbens* (25 milhões ha⁻¹), dentre outras espécies (10 milhões ha⁻¹) (Ferraz, 2003).

A espécie *B. brizantha* é capaz de promover a redução de 50% na concentração de hidrocarbonetos saturados e dissipação de 15% de compostos aromáticos, quando comparadas com solos sem cultivo de plantas, sendo considerada uma das espécies mais indicadas para a aplicação na fitorremediação de solos contaminados por petróleo em regiões tropicais (Merck et al., 2005). Sangabriel et al. (2006) observaram que a *B. brizantha* foi a espécie com maior capacidade de degradação e que apresentou maior potencial na fitorremediação de solos contaminados com óleo combustível (50.000 mg kg⁻¹). Entretanto, Rosa (2006) verificou que a *B. brizantha* apresentou redução significativa de biomassa, apesar da germinação não ter sido influenciada sob diferentes concentrações de petróleo no solo.

Estudos mostram que *Brachiaria brizantha* é capaz de se associar com FMAs em solos contaminados com hidrocarbonetos derivados do petróleo, favorecendo o seu crescimento, acúmulo de massa seca da parte aérea e raízes em solos contendo resíduos de “landfarming” (Paula et al., 2006) e contaminados com antraceno e creosoto (Paula et al., 2007). Os FMAs micorrízicos são capazes de se estabelecerem em solos contaminados com óleo diesel (Kirk et al., 2005). De acordo com Debiane et al. (2009), os FMAs podem proteger as plantas contra o estresse oxidativo provocado pela presença de benzo[a]pireno. Hernández-Ortega (2012) observaram que sob a contaminação de diesel no solo, raízes de *Melilotus albus* micorrizadas tiveram alta atividade antioxidante total e atividade

de nitrato redutase total, além de maior degradação de compostos fenólicos solúveis na rizosfera. Estes resultados sugeriram melhores respostas fisiológicas na presença dos FMAs para aliviar o estresse induzido pela toxicidade provocada pelo diesel do que as plantas não micorrizadas.

A natureza hidrofóbica dos compostos que compõem o petróleo é um fator que limita severamente a sua aceitação pelas plantas (Chaudhry et al., 2005) e o conhecimento acerca da tolerância das plantas na presença de contaminantes passíveis de remoção ou degradação e os efeitos subsequentes ainda são limitados. A maioria dos estudos sobre a fitorremediação tem sido realizada em condições e espécies de clima temperado (Marques et al., 2011) e pouco se conhece a respeito da interação dos microrganismos da rizosfera, da planta e dos solos tropicais contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, ou outros contaminantes orgânicos (Marques et al., 2011; Lamego e Vidal, 2007; Aguiar, 2006).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da inoculação com FMAs no crescimento das mudas de *Brachiaria brizantha* sob diferentes concentrações de óleo diesel no solo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação, no Campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizado em Campos dos Goytacazes-RJ (Latitude = 21°19'23"; Longitude = 41°10'40" W; Altitude = 14m), de março a maio de 2012. No período experimental, a temperatura variou de 16,0 °C a 46,9 °C e a temperatura média mensal foi de 27,4 °C.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, em arranjo fatorial 6 x 2, sendo seis concentrações de óleo diesel no solo (0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5%) e duas condições de inoculação (com FMAs *Rhizophagus clarum* + *Gigaspora margarita*) e controle (sem FMAs). Os tratamentos foram constituídos por quatro repetições, totalizando-se 12 tratamentos, e a unidade

experimental foi composta por vasos de 0,4 dm³ com três mudas, totalizando 48 parcelas.

O solo destinado ao preparo do inóculo de FMAs (*Rhizophagus clarum* e *Gigaspora margarita*), classificado como Cambissolo Háplico Tb Distrófico típico, foi coletado na profundidade de 0-20 cm, peneirado em malha de 2 mm, misturado com areia lavada na proporção de 1:1 (v:v) e esterilizado em autoclave à temperatura de 121°C por 2 horas. Foi realizada uma análise química do fósforo disponível no solo, para garantir a baixa disponibilidade deste nutriente e a não interferência no desempenho dos FMAs.

Para multiplicação do inóculo, foram semeadas em vasos de cultura contendo 4 dm³ de solo autoclavado, seis sementes de *Brachiaria brizantha*. Estas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, durante 15 minutos e posteriormente lavadas com água destilada, por quatro vezes consecutivas. Foram adicionados 50 cm³ de inóculo das espécies de FMAs *Rhizophagus clarum* e *Gigaspora margarita*, respectivamente, em cada vaso. Após o plantio, os vasos foram mantidos em casa de vegetação por um período de 90 dias. Seqüencialmente, as partes aéreas foram podadas e os vasos cobertos com folhas de papel, sem irrigação, por um mês, para facilitar a esporulação dos fungos. Transcorrido este período, o inóculo permaneceu conservado em câmara fria a 4°C. Para a contagem de esporos no inóculo foram realizados os métodos de decantação e peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e de centrifugação e flutuação em sacarose (Jenkins, 1964). A quantificação dos esporos foi realizada em placas de acrílico com anéis concêntricos, sob microscópio estereoscópico (40x).

Para a realização do experimento, o solo classificado como Latossolo Amarelo, predominantemente argiloso, foi coletado na profundidade de 0-20 cm, peneirado em malha de 2 mm, misturado com areia lavada na proporção de 1:1 (v:v). Este solo apresentou as seguintes características: pH (água), 6,1; M.O. 12,07 g dm⁻³; P, 16,0 mg dm⁻³; S, 1,0 mg dm⁻³; K⁺, 2,4 mmolcdm⁻³; Ca²⁺, 1,09 mmolc dm⁻³; Mg²⁺, 6,6 mmolc dm⁻³; Al³⁺, 0,0 mmolc dm⁻³; H⁺Al, 11,9 mmolc dm⁻³; SB, 20,20 mmolc dm⁻³; CTC, 32,10 mmolc dm⁻³; Fe, 118,72 mg dm⁻³; Cu, 0,55 mg dm⁻³; Zn, 4,75 mg dm⁻³; Mn, 31,41 mg dm⁻³ e B, 0,37 mg dm⁻³.

O óleo diesel foi obtido de um posto de abastecimento de combustível da PETROBRAS localizado no município de Campos dos Goytacazes – RJ,

certificado de acordo com a legislação vigente. O óleo diesel foi armazenado em recipientes de vidro, e posteriormente, incorporado homoganeamente ao solo, simulando-se a contaminação com seis concentrações diferentes (0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5%). O solo permaneceu incubado por 20 dias para ocorrer a volatilização de parte dos compostos voláteis. Os solos correspondentes aos tratamentos controles não foram contaminados, porém foram mantidos sob as mesmas condições experimentais em relação aos demais tratamentos.

As sementes de *Brachiaria brizantha* foram submetidas ao método de superação de dormência, no período antecedente ao plantio. Para tal, as sementes foram imersas em H₂SO₄ (98% 36N) por 15 minutos, seguido de lavagem em água corrente e secagem a sombra (Gapar-Oliveira et al., 2008). Foram adicionadas 10 sementes em cada vaso. No momento do plantio foram inoculados os FMAs nas sementes, sendo adicionados 30 cm³ vaso⁻¹ do inóculo fúngico contendo a mistura das espécies *Rhizophagus clarum* e *Gigaspora margarita*, sendo adicionados 15 cm³ vaso⁻¹ do inóculo de cada espécie fúngica. Os tratamentos controles (sem FMAs) receberam 30 cm³ vaso⁻¹ do substrato autoclavado utilizado durante a preparação do inóculo, sem a presença de FMAs, para manter o equilíbrio da microbiota do solo. A aplicação dos FMAs foi realizada em uma profundidade aproximada de 3 cm nos vasos dos tratamentos correspondentes, procedendo-se a semeadura.

O desbaste das mudas foi realizado aos 30 dias após a semeadura, deixando-se três plantas mais vigorosas de cada espécie vegetal em cada vaso. Irrigações diárias foram realizadas durante todo o período de condução experimental. Aos 45 dias após a semeadura, foi efetuada a adubação nitrogenada no solo, utilizando-se como fonte NH₄NO₃, correspondente a 20 mg/kg, parceladas em duas aplicações, com intervalos de 20 dias.

Aos 90 dias após a semeadura, foi realizada a avaliação do crescimento das mudas, sendo mensuradas: a altura e as massas secas das raízes, da parte aérea e massa seca total (soma das massas secas de folhas, caule e raiz), após a secagem em estufa sob circulação forçada de ar, a 65°C por 48 horas. A porcentagem de colonização micorrízica das raízes foi determinada após a coloração pelo método descrito por Grace e Stribley (1991), adaptado com KOH (2,5%) a 80°C, por 10 minutos, e H₂O₂ alcalina 5%, por 5 minutos. Os segmentos

de raízes foram levados ao microscópio óptico para a observação da presença de estruturas de FMAs.

Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância. Para os dados quantitativos, como o fator concentração de óleo diesel, foi utilizada análise de regressão polinomial, teste F da análise de variância da regressão e coeficientes do modelo estatisticamente significativo e maior R^2 . Para os dados qualitativos, no caso do fator tratamentos microbiológicos, foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa SISVAR 5.3 Build 77 (Ferreira, 2011).

RESULTADOS

A altura e as massas secas da parte aérea e total foram influenciadas pelas concentrações de óleo diesel no solo e pela inoculação micorrízica (Tabela 1). Os valores obtidos para a altura das mudas de *Brachiaria brizantha* inoculadas com FMAs foram significativamente superiores às mudas não inoculadas apresentando incremento de 83.5% e 62.6% em solos contaminados em 1% e 5% de óleo diesel, respectivamente. Entretanto, no que se refere à massa seca da parte aérea e total das mudas inoculadas com FMAs, foram observados incrementos apenas na concentração de 1% de óleo diesel no solo de 70,2% e 70,5%, respectivamente, em relação às mudas não inoculadas. No que se refere à massa seca das raízes, não houve efeito da inoculação fúngica.

Os resultados do teste F e os valores dos coeficientes de determinação indicaram forte relação entre a aplicação de diferentes concentrações de diesel no solo e a altura e as massas secas da raiz, parte aérea e total das mudas de *B. brizantha*. Na Figura 1 é possível observar que as mudas inoculadas com FMAs em solos contaminados com diesel em 1% foram beneficiadas em relação à altura, às massas secas da parte aérea e total das mudas de *B. brizantha* aos 90 dias após a semeadura. Em contrapartida, houve uma tendência das plantas reduzirem o seu crescimento em função do aumento da concentração de óleo diesel no solo, independente da inoculação micorrízica (Figura 2). Além disso,

com o aumento das concentrações do contaminante no solo, houve redução do acúmulo de massa seca e a colonização micorrízica nas raízes. Isto mostra o efeito fitotóxico do diesel, principalmente no que se refere à estrutura radicular das mudas de *B. brizantha*, além de reduzir a sua capacidade de serem colonizadas pelos fungos.

Tabela 1. Altura, Massas secas da parte aérea, raiz e total de mudas de *Brachiaria brizantha* em função dos níveis de contaminação do óleo diesel e da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), aos 90 dias após a semeadura

Diesel %	Altura			Massa Seca								
	(cm)			Parte Aérea (g planta ⁻¹)			Raiz (g planta ⁻¹)			Total (g planta ⁻¹)		
	Sem FMA	Com FMA	Média	Sem FMA	Com FMA	Média	Sem FMA	Com FMA	Média	Sem FMA	Com FMA	Média
0	11,4 a	9,9 a	10,7	0,538 a	0,487 a	0,512	0,474 a	0,450 a	0,462	1,013 a	0,936 a	0,975
1	6,6 a	12,1 b	9,3	0,267 a	0,455 b	0,361	0,177 a	0,302 a	0,239	0,444 a	0,757 b	0,601
2	5,8 a	5,7 a	5,7	0,158 a	0,147 a	0,153	0,132 a	0,128 a	0,130	0,290 a	0,276 a	0,283
3	5,4 a	5,3 a	5,3	0,139 a	0,134 a	0,137	0,106 a	0,130 a	0,118	0,246 a	0,264 a	0,255
4	6,1 a	6,0 a	6,0	0,158 a	0,137 a	0,148	0,115 a	0,176 a	0,146	0,273 a	0,314 a	0,293
5	2,8 a	4,5 b	3,6	0,065 a	0,083 a	0,074	0,042 a	0,057 a	0,049	0,108 a	0,140 a	0,124
Média	6,4	7,2		0,221	0,241		0,174	0,207		0,396	0,448	
CV		18,3%			29,4%			33,5%			23,5%	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

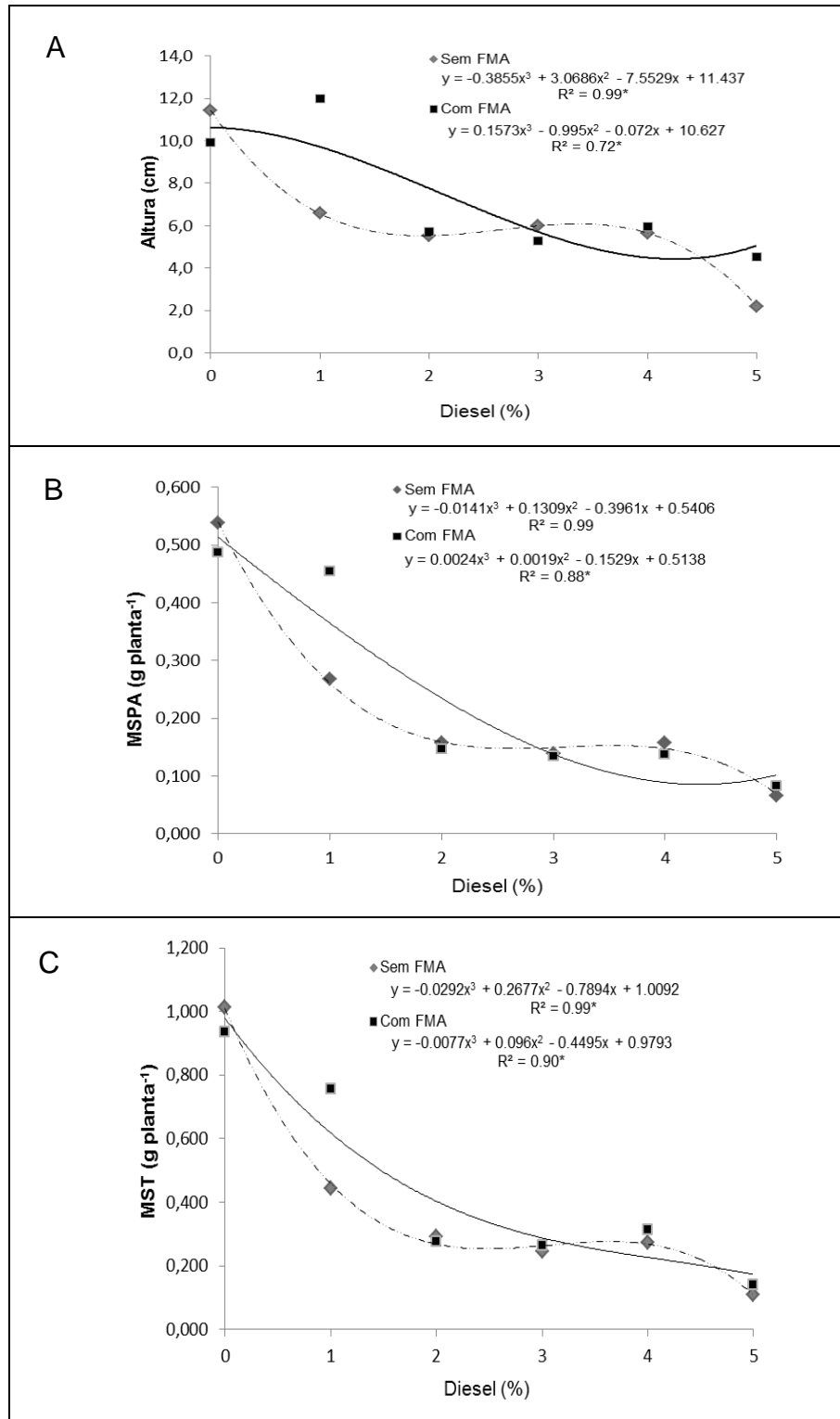


Figura 1. Altura (A), massas secas da parte aérea (B) e total (C) das mudas de *Brachiaria brizantha* em função dos níveis de contaminação do óleo diesel e da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), aos 90 dias após a semeadura.

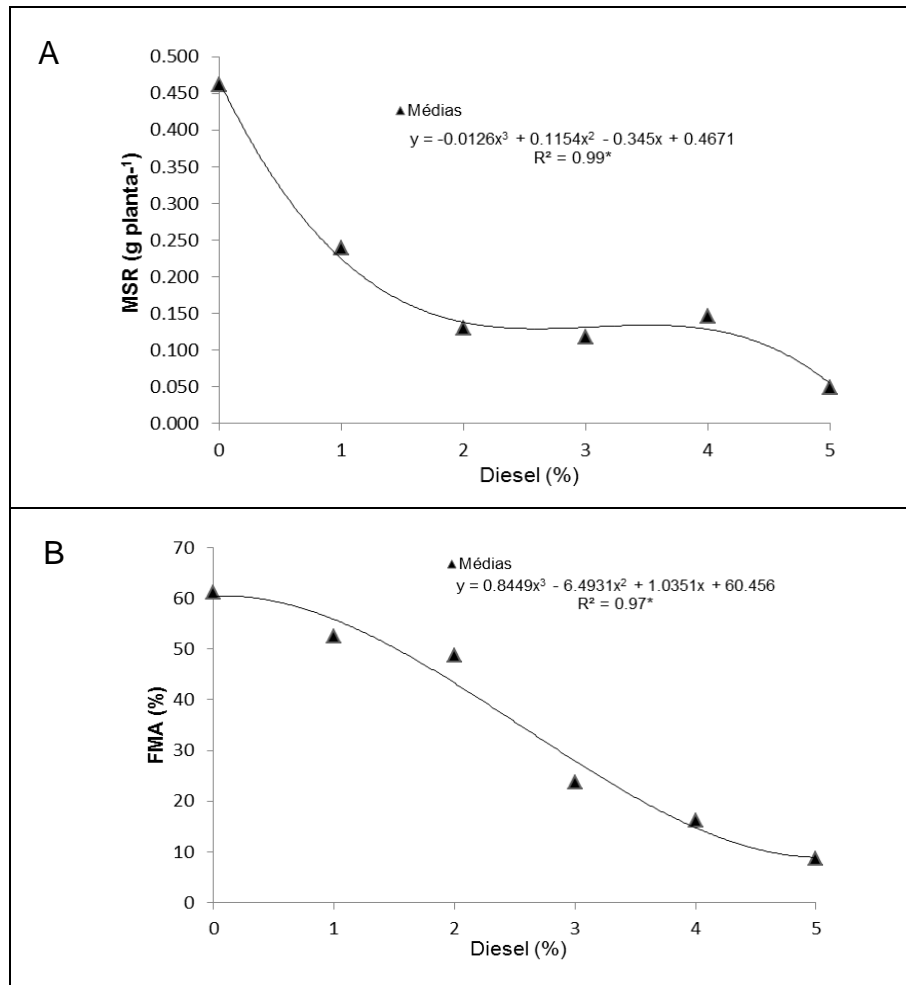


Figura 2. Massa seca e colonização micorrízica das raízes das mudas de *Brachiaria brizantha* em função dos níveis de contaminação do óleo diesel no solo, aos 90 dias após a semeadura.

A Figura 3 mostra que os tratamentos inoculados apresentaram maior porcentagem de colonização micorrízica do que os tratamentos não inoculados com FMAs.

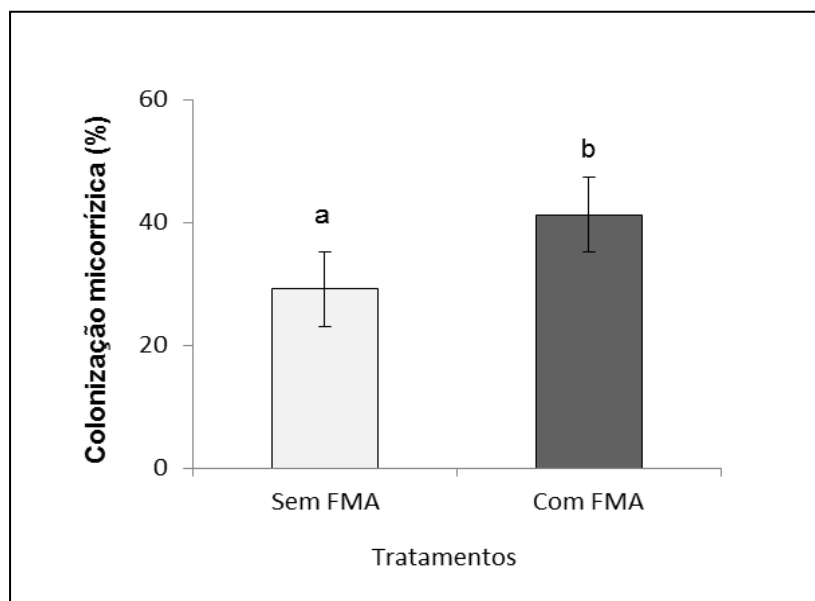


Figura 3. Porcentagem de colonização micorrízica das raízes das mudas de *Brachiaria brizantha* não inoculadas (sem FMA) e inoculadas (FMA) aos 90 dias após a sementeira.

DISCUSSÃO

O efeito negativo de hidrocarbonetos de petróleo em *B. brizantha* foi demonstrado por Hernández-Valencia e Mager (2003) no México. Estes autores observaram que concentrações de até 30 g kg⁻¹ de solo de hidrocarbonetos poluidores não limitaram o crescimento das plantas nos primeiros 45 dias de exposição, mas causaram redução acentuada aos 280 dias. Esses resultados indicam que *B. brizantha* cv. Marandu apresenta sensibilidade aos hidrocarbonetos derivados de petróleo. Rosa (2006) avaliando o efeito de diferentes concentrações de petróleo no solo (0% a 6%) observou que o aumento da concentração de petróleo no solo, resultou na elevação da taxa de germinação tardia das sementes e na queda da biomassa da parte aérea da espécie.

Mezzari et al., (2011) avaliando o crescimento de três espécies de gramíneas (*Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* e *Paspalum notatum*) e a

sobrevivência de comunidades bacterianas associadas à zona de raízes sob diferentes concentrações de óleo diesel, observaram que a germinação, altura e biomassa da *B. brizantha* não foram inibidas e tolerantes às concentrações de 0 e 1% de diesel no solo, indicando potencial efetivo para remediar áreas de solo contaminados com derrame de óleo diesel. Além disso, a presença das gramíneas em solos com diesel propiciou o crescimento de bactérias no solo em até cinco vezes, evidenciando as interações positivas entre a rizosfera e as bactérias degradadoras de hidrocarbonetos na remediação de solos contaminados com diesel.

Apesar dos tratamentos inoculados apresentarem maior porcentagem de colonização micorrízica em comparação com os tratamentos não inoculados com FMAs, o efeito tóxico do óleo diesel no solo pode reduzir a capacidade dos FMAs de colonizarem o tecido radicular das mudas de *B. brizantha*. A troca recíproca de nutrientes entre os FMAs e a planta associada, é um dos requisitos para um bom funcionamento da simbiose (Javot et al., 2007). Entretanto, esta simbiose apresenta um alto custo energético para a planta fornecendo aos FMAs fonte de carbono a partir de seus fotoassimilados (Solaiman e Saito, 1997), que por sua vez, aumentam a capacidade de absorção de nutrientes no solo que vão além da zona radicular (George et al., 1995). Em condições de estresse ambiental, além do efeito tóxico do contaminante no solo, a inoculação micorrízica pode prejudicar ou favorecer o crescimento e nutrição das plantas dependendo de seu balanço energético.

A influência de FMAs no crescimento de plantas em solos contaminados por hidrocarbonetos monoaromáticos como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEXs), que apresentam elevada toxicidade e solubilidade em água, foi avaliada por Volante et al. (2005). Estes autores observaram incrementos de 30% no crescimento vegetal em relação às plantas não inoculadas com FMAs. Nie et al. (2011), observaram que o estágio de crescimento da planta e a sua interação com a concentração de petróleo foram significativamente afetados pela colonização de FMAs. A maior taxa de colonização de FMAs foi encontrada em raízes de plantas de solos contaminados em comparação àqueles de solos não contaminados em fase inicial de crescimento vegetativo, não corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Paula et al. (2006) observaram que a inoculação com *Rhizophagus clarum* e *Paraglomus occultum* favoreceu o crescimento da *Brachiaria brizantha*, uma vez que aumentou a colonização micorrízica em solos autoclavados e não autoclavados oriundos de área de “landfarming” de resíduo petroquímico. Em solo não autoclavado, a inoculação com FMAs foi capaz de aumentar mais de 300 e 800% a massa seca da parte aérea e raízes, respectivamente, evidenciando os benefícios da inoculação no crescimento desta espécie.

A inoculação com distintas espécies de FMAs pode apresentar respostas variadas na presença de diferentes plantas e de contaminantes no solo. Efeitos de diferentes concentrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), como antraceno e creosoto no crescimento e na colonização micorrízica de *B. brizantha* e *Pueraria phaseoloides* em solo inoculado com o FMA *Glomus etunicatum*, foram observados por Paula et al. (2007). Estes autores verificaram que *P. phaseoloides* mostrou-se insensível ao antraceno e creosoto, enquanto a *B. brizantha*, foi insensível ao antraceno e sensível ao creosoto nas condições e doses aplicadas no solo. A inibição em *B. brizantha* ocorreu na primeira dose aplicada (0,05 %) em solo contaminado, indicando elevada sensibilidade desta espécie ao creosoto, sendo verificada redução de 30% na massa seca da parte aérea na dose de 0,1%, em relação ao controle. Além disso, os dois HPAs estudados exerceram efeito inibitório acentuado na colonização de *P. phaseoloides* por *Glomus etunicatum*.

CONCLUSÕES

1. A altura e as massas secas da parte aérea e total foram beneficiadas pela inoculação com FMAs em solos contaminados em 1% de óleo diesel, sendo superiores às mudas não inoculadas. Nas demais concentrações avaliadas, o crescimento das mudas não foi influenciado pela inoculação micorrízica.
2. Não houve influência da inoculação micorrízica no acúmulo de massa seca da raiz.
3. Com o aumento das concentrações de óleo diesel no solo, houve redução no crescimento das mudas de *B. brizantha* e na colonização micorrízica.

LITERATURA CITADA

- AGUIAR, C.R.C. Desempenho de soja e braquiária na fitorremediação de solos contaminados com petróleo. Rio de Janeiro, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2006. 109p. (*Dissertação de Mestrado*).
- CHAUDHRY, Q.; BLOM-ZANDSTRA, M.; GUPTA, S. & JONER, E. J. Utilising the Synergy between Plants and Rhizosphere Microorganisms to Enhance Breakdown of Organic Pollutants in the Environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 12:34-48, 2005.
- DEBIANE, D.; GARCON, G.; VERDIN, A.; FONTAINE, J.; DURAND, R., SHIRAL, P.; GRANDMOUGIN-FERJANI, A. & LOUNÉS-HADJ SAHRAOUI, A.L.H. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phys. Chem.*, 70:1421-1427, 2009.
- FERRAZ, F.M. Pastagens garantem o futuro da agropecuária brasileira. In: NAKAMAE, I.J. ed. Anualpec–Anuário da pecuária brasileira. 10.ed. São Paulo, FNP *Consultoria e Agroinformativos*, 2003. p.55-56.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. agrotec.* 35: 1039-1042, 2011.
- GASPAR-OLIVEIRA, C.M.; MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Duração do teste de germinação de *Brachiaria brizantha* cv. MARANDU (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. *Revista Brasileira de Sementes*, 30:3:030-038, 2008.
- GEORGE, E.; MARSCHNER & H.; JAKOBSEN, I. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Crit Rev Biotechnol*, 15:257-270, 1995.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 46:235-244, 1963.
- HERNÁNDEZ-ORTEGA, H.A.; ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R.; ZAVALETA-MANCERA, H.A.; ARACELI, H. & LOPEZ-DELGADO, H.A. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant

- activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate, *J. Environ. Manage.*, 95:319-324, 2012.
- HERNÁNDEZ-VALENCIA, I. & MAGER, D. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro.*, 15:149-155, 2003.
- JAVOT, H.; PUMPLIN, N. & HARRISON, M. J. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.*, 30:310-322, 2007.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis.*, Beltsville, 48:692, 1964.
- KIRK, J.L.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H. & TREVORS, J.T. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environ. Poll.*, 133:455-465, 2005.
- LAMEGO, F.P. & VIDAL, R.A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? Pesticidas. *Rev. Ecotox. Meio Amb.*, 17:9-18, 2007.
- MARQUES, M.; AGUIAR, C.R.C. & SILVA, J.J.L.S. da. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 35:1-11, 2011.
- MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R. & ARIAS, M. Influence of fertiliser levels on phytoremediation of crude oil with the tropical pasture grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A.Rich.) Stapf. *Int. J. Phytoremediat.*, 7:217-230, 2005.
- MEZZARI, M.P.; ZIMERMANN, D.M.H.; CORSEUIL, H.X. & NOGUEIRA, A.V. Potential of grasses and rhizosphere bacteria for bioremediation of diesel-contaminated soils. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 35:227-2236, 2011.
- NIE, M.; WANG, Y.; YU, J.; XIAO, M.; JIANG, L.; FANG, C.; CHEN, J. & LI, B. Understanding plant-microbe interactions for phytoremediation of petroleum-polluted Soil. *PLoS ONE*, 6:17961, 2011.
- PAULA, A. M.de; SIQUEIRA, J.O. de & SOARES, C.R.F.S. Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 31:805-811, 2007.
- PAULA, A. M. de; SOARES, C. R. F. & SIQUEIRA, J. O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos. *Rev. bras. eng. agríc. ambiente*, 10:448-455, 2006.

- ROSA, G.S. Avaliação do potencial de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por petróleo. Rio de Janeiro, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2006. 144p. (*Dissertação de Mestrado*).
- SANGABRIEL, W; FERRARA-CERRATO R., TREJO A.D.; MENSONZA, L.M.R.; CRUZ, S.J.S.; LÓPEZ, O.C. DELGADILLO, M.J. & ALARCÓN, A. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 22:63-73, 2006.
- SOLAIMAN, M.D. & SAITO, M. Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytol.*, 136:533-538, 1997.
- VOLANTE, A.; LINGUA, G.; CESARO, P.; CRESTA, A.; POPPO, M.; ARIATI, L. & BERTA, G. Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. *Mycorrhiza*, 16:43-50, 2005.

3.2. MICORRIZA, NPK E SURFACTANTE NO CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO DE MUDAS DE MILHO EM SOLOS CONTAMINADOS COM PETRÓLEO

Késsia Barreto Lima⁽¹⁾, Fernando Fundora Tellechea⁽²⁾, Marco Antônio Martins⁽³⁾, Wagner de Souza Siqueira Hernandez⁽⁴⁾, Eliane Soares de Souza⁽⁵⁾

Resumo – Conduziu-se um experimento em casa de vegetação com o objetivo de avaliar o crescimento e conteúdo de macronutrientes da parte aérea e raízes das mudas de milho, na presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), NPK e surfactante em solos contaminados com 4% de petróleo. Foram utilizados nove tratamentos: FMA, NPK e surfactante, aplicados de forma separada e combinada entre si, além dos controles: planta 0% e 4% de petróleo. O trabalho foi avaliado aos 60 e 120 dias de condução experimental. Foram avaliados: a altura, o diâmetro do colo, as massas secas da parte aérea, raiz e total, a total colonização micorrízica, o acúmulo de macronutrientes, os teores de polifenóis totais e o carbono orgânico nas raízes e parte aérea das mudas de milho. As mudas cultivadas simultaneamente com FMA, NPK e surfactante apresentam maior colonização micorrízica, crescimento e nutrição na parte aérea e raízes, em solos contaminados com petróleo (4%). As mudas tratadas com NPK apresentam melhor desempenho no crescimento e no conteúdo de macronutrientes das plantas, sobretudo aos 120 dias de condução experimental. Entretanto, as mudas

cultivadas separadamente com NPK, surfactante e FMA em solo contaminado, apresentam baixo desempenho no crescimento e no conteúdo de macronutrientes, e apresentam maiores teores de polifenóis em relação às plantas controles cultivadas em solo contaminado e não contaminado (0 e 4%) aos 60 dias, em resposta às condições de estresse ambiental.

Termos para indexação: *Zea mays* L., fitorremediação.

- (1) Doutoranda, Laboratório de Solos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: kblima@hotmail.com;
- (2) Doutorando, Laboratório de Solos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: fundotell@gmail.com;
- (3) Professor Titular, Laboratório de Solos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: marco@uenf.br;
- (4) Graduando em Agronomia, UENF/LFIT, Brasil, wagner_hernandes@hotmail.com;
- (5) Professora Adjunta, Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo, Centro de Ciência e Tecnologia-UENF. Rodovia Amaral Peixoto Km 163, Avenida Brennand s/n, Imboacica. CEP 27925-310, Macaé (RJ). E-mail: eliane@lenep.uenf.br;

MYCORRHIZA, NPK AND SURFACTANT ON THE GROWTH AND NUTRITION OF MAIZE IN PETROLEUM-CONTAMINATED SOILS

Abstract - This objective was to evaluate the growth and nutritional status of shoots and roots of maize seedlings in the presence of AMF, NPK and surfactant with 4% petroleum contaminated soils. In a greenhouse, 9 remediation treatments were evaluated: mycorrhizal fungi (AMF), NPK and surfactant separately and combined form, beyond the controls : plant 0% and 4% oil; and 2 evaluation periods: 60 and 120 days of trial conduction. Were quantified height, diameter, dry weight of shoot, root and dry root colonization and accumulation of macronutrients, total polyphenols and organic carbon in roots and shoots of seedlings. Seedlings grown simultaneously with mycorrhizal fungi, NPK and surfactant have higher mycorrhizal colonization, growth and nutrition in root and shoot of oil contaminated soil. All treatments containing NPK are more responsive compared to other treatments, especially at 120 days of trial conduction. Plants grown separately with NPK, surfactant and FMA in contaminated soil, have low performance on growth and nutrition in relation to plants and controls 4% have higher polyphenol concentration at 60 days, in response to environmental stress conditions.

Index terms: *Zea mays* L., phytoremediation, mycorrhiza.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de gramíneas utilizadas na fitorremediação de solos contaminados, está o milho (*Zea mays* L.), que tem sido indicado como uma espécie de grande potencial e promissora na recuperação ambiental. O milho é uma gramínea amplamente cultivada, cresce anualmente de forma rápida, produz uma raiz fibrosa e extensiva, possui grande produção de biomassa de parte aérea por hectare. Esta cultura tem sido alvo de estudos em testes fitotóxicos em solos contaminados com petróleo (Mendez-Natera, 2004; Ogboghodo et al., 2004; Amakiri e Onofeghara, 1984) e óleo diesel (Ogbo, 2009), além de testes que avaliam a fitoextração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Lin et al., 2007). Estudos demonstram a capacidade de sementes de milho germinar e se desenvolver em solos contaminados com petróleo sob as concentrações entre 0,05% a 6% (Mendez-Natera, 2004; Ogboghodo et al., 2004; Quiñones-Aguilar et al. 2003; Amakiri e Onofeghara, 1984).

O aumento das concentrações dos hidrocarbonetos do petróleo no solo provoca a redução da germinação das sementes e do crescimento vegetal (Mendez-Natera, 2004; Quiñones-Aguilar et al. 2003). Uma estratégia para contornar este problema, consiste na inoculação de microrganismos no sistema de fitorremediação, um processo também chamado de bioaugmentação. Estudos revelam que os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em solos contaminados, podem contribuir não apenas por reduzirem os efeitos tóxicos induzidos pelo petróleo (Alarcón et al., 2008), mas por conseguirem explorar maior volume de solo contaminado, através das hifas fúngicas, do que as raízes não micorrizadas (Gao et al., 2010; Joner e Leyval, 2003), aumentam a degradação de poluentes derivados do petróleo no solo (Hernández-Ortega, 2011; Alarcón et al., 2008). Também podem influenciar a estrutura física e química das partículas do solo, acelerar o crescimento (Harms et al., 2011; Nie et al., 2011; Alarcón et al., 2006), proteger (Debiane et al., 2009) e melhorar o estado nutricional da planta (Hernández-Ortega, 2011) na presença do contaminante. Entretanto, poucos estudos na literatura evidenciam a participação de FMAs no processo de

fitoestimulação e fitoextração em solos contaminados com petróleo (Hernández-Ortega, 2011; Alarcón et al., 2008).

Além disso, outra técnica muito utilizada é a bioestimulação que consiste no favorecimento das condições ambientais (como por exemplo, o teor e disponibilidade de nutrientes inorgânicos, aeração, pH, dentre outros) para estimular a ação dos microrganismos presentes no solo contaminado com petróleo (Magalhães e Cunha, 2003). Os fertilizantes estimulam a biodegradação fornecendo nutrientes para os microrganismos do solo presentes no sistema, capazes de degradar os hidrocarbonetos, como fonte de carbono.

Da mesma forma, os surfactantes químicos têm sido muito utilizados pela indústria petrolífera devido a sua capacidade de emulsificar e aumentar a solubilidade dos contaminantes hidrofóbicos no solo, tornando-os disponíveis para o ataque microbiano (Colla e Costa, 2003) e reduzir a repelência do solo à água (Roy e McGill, 2000). Entretanto, dependendo das concentrações e da composição utilizada, a aplicação de alguns surfactantes sintéticos pode ter caráter fitotóxico durante o processo de fitorremediação de solos contaminados com compostos orgânicos hidrofóbicos (Gao et al., 2007).

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação de FMAs, adição de nutrientes e de surfactante em solo contaminado com 4% de petróleo, bem como, o crescimento e conteúdo de macronutrientes da parte aérea e raízes das mudas de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um experimento em casa de vegetação no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) (Latitude= 21° 19' 23"; Longitude = 41° 10' 40" W; Altitude= 14 m), em Campos dos Goytacazes – RJ de setembro a dezembro de 2012. No período experimental, a temperatura variou de 12,6°C a 49,6°C e a temperatura média mensal foi de 29,4 °C.

O delineamento experimental foi realizado em blocos inteiramente casualizados, sendo nove tratamentos: 1) Planta 0% (PL 0%); 2) Planta 4% (PL 4%); 3) Planta + NPK 4% (PL+NPK); 4) Planta + surfactante 4% (PL+SFT); 5) Planta + NPK + surfactante 4% (PL+NPK+SFT); 6) Planta + FMA 4% (PL+FMA); 7) Planta + FMA + NPK 4% (PL+FMA+NPK); 8) Planta + FMA + surfactante 4% (PL+FMA+SFT); 9) Planta + FMA + NPK + surfactante 4% (PL+FMA+NPK+SFT). Os tratamentos foram avaliados aos 60 e 120 dias de condução experimental.

Em cada tratamento foram utilizados quatro repetições, totalizando-se 72 parcelas. A unidade experimental foi composta por vaso de barro contendo 2 kg de solo, contendo duas mudas em cada vaso. Não foram avaliados solos contaminados na ausência de plantas e com a inoculação de FMAs, por serem caracterizados como biotróficos obrigatórios.

Para a realização do experimento, o solo classificado como Latossolo Amarelo, predominantemente argiloso, foi coletado na profundidade de 0-20 cm, peneirado em malha de 2 mm, misturado com areia lavada na proporção de 1:1 (v:v). Este solo apresentou as seguintes características: pH (água) 6,1; M.O. 12,07 g dm⁻³; P, 16,0 mg dm⁻³; S, 1,0 mg dm⁻³; K⁺, 2,4 mmol_cdm⁻³; Ca²⁺, 1,09 mmol_c dm⁻³; Mg²⁺, 6,6 mmol_c dm⁻³; Al³⁺, 0,0 mmol_c dm⁻³; H+Al, 11,9 mmol_c dm⁻³; SB, 20,20 mmol_c dm⁻³; CTC, 32,10 mmol_c dm⁻³; Fe, 118,72 mg dm⁻³; Cu, 0,55 mg dm⁻³; Zn, 4,75 mg dm⁻³; Mn, 31,41 mg dm⁻³ e B, 0,37 mg dm⁻³.

O petróleo oriundo da Bacia de Campos (26º API) foi incorporado homogeneamente ao solo, simulando-se a contaminação, sob a concentração de 4%. Posteriormente, o solo permaneceu incubado por 20 dias para ocorrer a volatilização de parte dos compostos voláteis.

Sementes do híbrido *Zea mays* L. (UENF 506, Safra 2012 e taxa de germinação: 96%) foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (0,5%) por 15 minutos, seguido de lavagem em água corrente e secagem a sombra. Em cada vaso correspondente aos tratamentos contendo NPK foram aplicados ao solo 4 g de adubo NPK 20-10-10, o equivalente a 2 ton/ha de fertilizante, conforme Chorom et al. (2010).

Foi utilizado um surfactante sintético de fácil obtenção comercial e de uso próprio para facilitar a indicação no processo de fitorremediação em solos contaminados com petróleo e óleo diesel. O surfactante químico utilizado foi o Lauril Eter Sulf. de Sódio (designação genérica empregada para o Dodecil Sulfato

de Sódio). Foram aplicadas soluções aquosas do surfactante (10 mL), preparado em uma relação massa do surfactante por massa de solo correspondente a 4 mL kg⁻¹ ou 0,4% (v/v).

Para multiplicação do inóculo de FMAs, foram plantadas em vasos de cultura contendo 4 dm³ de solo autoclavado, dez sementes de *Zea mays* L. desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, durante 15 minutos e, posteriormente, lavadas com água destilada, por quatro vezes consecutivas. Os inóculos destinados aos tratamentos contendo os FMA *Rhizophagus clarum* e *Gigaspora margarita* foram obtidos a partir do Banco de Inóculo da Microbiologia do Solo, armazenados em câmara fria a 4°C. Foram adicionados 50 cm³ de inóculo de FMAs em cada vaso. Após o plantio, os vasos foram mantidos em casa de vegetação por um período de 90 dias. Seqüencialmente, as partes aéreas foram podadas e os vasos cobertos com folhas de papel, sem irrigação, por um mês, para facilitar a esporulação dos fungos. Transcorrido este período, o inóculo permaneceu conservado em câmara fria a 4°C. Para a contagem de esporos no inóculo foram realizados os métodos de decantação e peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e de centrifugação e flutuação em sacarose (Jenkins, 1964). A quantificação dos esporos foi realizada em placas de acrílico com anéis concêntricos, sob microscópio estereoscópico (40x).

As mudas foram previamente produzidas em bandejas de poliestireno expandido de 128 células. Foi plantada uma semente em cada célula, a 1,0 cm de profundidade. As mudas destinadas aos tratamentos fúngicos, foram inoculadas com a mistura de FMAs (*G. margarita* e *R. clarum*), correspondendo a 10% sobre o volume do solo experimental. As mudas foram obtidas aos 15 dias após a semeadura.

No momento da implantação experimental, foram transplantadas 6 mudas de milho para os vasos dos respectivos tratamentos compostos por plantas. A inoculação com FMAs foi realizada de acordo com os tratamentos correspondentes. Para a inoculação das sementes foram adicionadas 100 cm³ vaso⁻¹ do inóculo fúngico, contendo a mistura das espécies *R. clarum* e *G. margarita*, correspondendo a 50 cm³ vaso⁻¹ de inóculo de cada espécie, contendo, respectivamente, 8.600 e 3.400 esporos. Os tratamentos controles (sem FMAs) receberam 100 cm³ vaso⁻¹ do substrato autoclavado utilizado durante a

preparação do inóculo (sem FMA), para manter o equilíbrio da microbiota do solo. A aplicação foi realizada entre 2 a 3 cm abaixo da superfície do solo.

Aos 30 dias após a semeadura, foi realizado o desbaste das mudas, deixando-se duas plantas mais vigorosas em cada vaso. A aplicação de adubação nitrogenada foi realizada utilizando-se como fonte nitrato de potássio, correspondente a 200 g/kg, parceladas em duas aplicações, com intervalos de 20 dias. A primeira fase experimental foi finalizada aos 60 dias de condução experimental. As plantas foram cortadas e retiradas do solo, sequencialmente lavadas e separada a parte aérea da raiz.

Os solos de todos os tratamentos foram revolvidos para proporcionar maior aeração. A condução experimental foi realizada sob as mesmas condições da primeira fase (60 dias), com o transplântio de mudas produzidas 15 dias após a semeadura e reinoculação com 100 dm³ de FMAs, e reaplicação de 4 g de NPK por vaso. Entretanto, o surfactante não foi reaplicado em função da sua toxicidade sobre as plantas e a microbiota do solo.

Irrigações diárias foram realizadas durante todo o período de condução experimental. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação por um período total de 120 dias.

Após a coleta, as plantas obtidas de cada vaso aos 60 e 120 dias de condução experimental foram divididas em partes aéreas e raízes. As raízes frescas foram lavadas em água corrente e as raízes finas foram separadas, cortadas em aproximadamente 2 cm de comprimento e armazenadas em álcool etílico 50% para a avaliação da porcentagem de colonização micorrízica. A coloração das raízes em azul tripano foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Grace e Stribley (1991), com as seguintes adaptações (KOH 2,5% por 5 minutos, HCL por 5 minutos). Posteriormente, o material vegetal foi colocado em estufa com circulação de ar forçada, a 40°C por 48 horas e as massas secas da parte aérea e das raízes foram determinadas, utilizando-se uma balança digital com precisão de três casas decimais adaptado de Malavolta et al. (1989).

Após a quantificação da massa seca, o material foi triturado em moinho tipo Wiley, usando peneira de 20 mesh, e acondicionado em recipientes plásticos hermeticamente fechados. Foram obtidos os teores de fenóis totais solúveis da parte aérea e das raízes, os quais foram extraídos com metanol em 50 % e

determinados por colorimetria, utilizando-se o reagente de Folin-Denis, (Anderson e Ingram, 1996). A absorvância foi medida em 600 nm, utilizando-se espectrofotômetro. A determinação do conteúdo dos macronutrientes foi realizada a partir do material triturado da digestão sulfúrica (H_2SO_4 e H_2O_2), obtendo-se um extrato. O N foi determinado pelo método de Nessler. Através da digestão nitroperclórica foram determinados colorimetricamente o P, pelo método azul de molibdato por espectrofotometria e o K através da espectrofotometria de emissão de chama. Os nutrientes Ca e Mg foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (Zeiss AAS4) e o S, por turbidimetria com cloreto de bário (Malavolta et al., 1997). O carbono orgânico na parte aérea e nas raízes das mudas foi determinado pela oxidação com $K_2Cr_2O_7$ $1,25 \text{ mol}_c \text{ L}^{-1}$ em meio ácido (Anderson e Ingram, 1996).

Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância e à comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade através do programa SISVAR 5.3 Build 77 (Ferreira, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que os tratamentos de fitorremediação variaram em função dos diferentes tempos de condução experimental, em relação à altura, ao diâmetro do colo, às massas secas da parte aérea, raízes e total das mudas de milho (Tabela 1). Foi observado que as mudas de milho cultivadas na ausência de contaminação, foram significativamente superiores aos 60 dias de condução experimental quando comparado aos 120 dias, em relação às variáveis utilizadas para avaliar o crescimento da planta, ao passo que as mudas de milho cultivadas sob a concentração de 4% de petróleo no solo, não diferiram entre os períodos avaliados.

As espécies vegetais podem apresentar comportamentos diferenciados no seu desenvolvimento dependendo da composição do contaminante presente no solo. Smith et al. (2005) concluíram que o crescimento de espécies de leguminosas foi mais afetado que espécies de gramíneas pela presença de

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Da mesma forma, Sangabriel et al. (2006) demonstraram que espécies de gramíneas foram mais tolerantes que leguminosas na presença de solo contaminado com petróleo. A presença das plantas em solo contaminado estimulou a proliferação de microrganismos na rizosfera, que também foram estimulados pela presença do contaminante no solo. Merck et al. (2005) comparando três espécies de leguminosas e de gramíneas em solos contaminados com petróleo (5%), observaram que as leguminosas morreram entre o período de 6 a 8 semanas, ao passo que, as gramíneas apresentaram a produção de biomassa reduzida sob a influência do contaminante, além da correlação positiva entre a produção de biomassa radicular e degradação de óleo.

O efeito de HPAs no crescimento das plantas é dependente de concentração no solo. Plantas expostas às baixas concentrações de HPAs tendem a aumentar o acúmulo de massa vegetal, um fenômeno atribuído, em geral, a uma resposta sob condições de estresse ambiental (Calabrese, 2009; Belz et al., 2008). Em contraste, doses elevadas de HPAs, podem eventualmente, dificultar ou inibir o crescimento da planta. Os HPAs são capazes de penetrar através das membranas celulares das plantas (Chaîneau et al., 1997), decrescer a eficiência de utilização de água e nutrientes (Reilley et al., 1996) e inibir a atividade fotossintética e o transporte de elétrons (Mallakin et al., 2002). Diferentes espécies de plantas respondem de diversas formas à presença de HPAs no solo (Lee et al., 2008).

Tabela 1. Altura, diâmetro do colo, massas secas da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST) em função de diferentes tratamentos de fitorremediação aos 60 e 120 dias de condução experimental

Tratamentos*	Altura (cm)		Diâmetro (mm)		MSPA (g planta ⁻¹)		MSR (g planta ⁻¹)		MST (g planta ⁻¹)	
	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias
PL 0%	35,1 bcB	24,1 aA	6,7 bcB	5,9 bA	6,08 bB	3,79 bA	3,45 bcB	2,27 bA	9,52 bB	6,07 bA
PL 4%	20,9 aA	18,3 aA	4,3 aA	3,8 aA	1,26 aA	0,66 aA	1,13 aA	0,48 aA	2,39 aA	1,14 aA
PL+NPK	35,2 bcA	54,4 bB	5,9 bA	9,6 cdB	4,56 bA	12,46 dB	3,15 bA	4,99 cB	7,71 bA	17,45 dB
PL+SFT	21,7 aA	18,8 aA	3,7 aA	3,5 aA	1,05 aA	0,61 aA	0,48 aA	0,53 aA	1,54 aA	1,14 aA
PL+NPK+SFT	45,3 cA	51,7 bA	6,8 bcA	9,3 cB	6,81 bA	9,68 cB	3,14 bA	4,36 cB	9,95 bA	14,04 cB
PL+FMA	26,9 abB	20,0 aA	4,1 aA	4,6 aA	1,57 aA	1,70 abA	1,22 aA	1,13 abA	2,80 aA	2,83 aA
PL+FMA+NPK	45,1 cA	52,8 bB	6,7 bcA	9,8 cdB	5,61 bA	13,04 dB	4,31 bcA	11,53 dB	9,93 bA	24,57 eB
PL+FMA+SFT	25,6 abA	25,6 aA	4,4 aA	4,7 abA	1,84 aA	1,61 abA	1,05 aA	1,00 abA	2,89 aA	2,61 aA
PL+FMA+NPK+SFT	41,1 cA	53,6 bB	7,3 cA	10,7 dB	10,10 cA	14,72 dB	4,84 cA	10,49 dB	14,94 cA	25,21 eB
Médias	33,0	36,8	5,5	6,9	4,32	6,66	2,53	4,19	6,85	10,85
CV (%)	13,4		8,8		21,3		18,7		15,8	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Planta, 0% (PL 0%); Planta, 4% (PL 4%); Planta + NPK, 4%; (PL+NPK); Planta+surfactante, 4% (PL+SFT); Planta+NPK+surfactante, 4% (PL+NPK+SFT); Planta+FMA, 4% (PL+FMA); Planta+FMA+NPK, 4% (PL+FMA+NPK); Planta+FMA+surfactante, 4% (PL+FMA+SFT); Planta+FMA+NPK+surfactante, 4% (PL+FMA+NPK+SFT).

Por outro lado, a aplicação de NPK estimulou o crescimento das mudas de milho em solos contaminados com petróleo (PL+NPK, PL+NPK+SFT, PL+FMA+NPK e PL+FMA+NPK+SFT), sendo superiores aos demais tratamentos, ou equivalente às mudas cultivadas na ausência (PL 0%) e presença de contaminação (PL 4%) em ambos os períodos avaliados (60 e 120 dias) (Tabela 1). Além disso, estes mesmos tratamentos promoveram melhor desenvolvimento das mudas aos 120 dias de condução experimental, quando comparado aos 60 dias.

Os maiores incrementos quanto à altura, diâmetro, massas secas da parte aérea, raiz total foram obtidos pelo tratamento contendo a combinação de plantas, fungos micorrízicos arbusculares, NPK e surfactante (Tabela 1). Isto demonstra que a aplicação simultânea de processos de bioaumentação e bioestimulação, além da aplicação de surfactantes, é mais eficiente em promover o desenvolvimento do milho em solos contaminados com 4% de petróleo, quando comparados à aplicação desses processos isoladamente. Além disto, é possível que estes resultados estejam relacionados com a colonização micorrízica das mudas, uma vez que este tratamento apresentou a maior taxa de colonização em relação aos demais tratamentos, incluindo as mudas cultivadas em solo não contaminado (PL 0%), em ambos os períodos avaliativos, correspondendo a 100% aos 120 dias de colonização experimental (Tabela 2). O aumento no crescimento das plantas durante o processo de fitorremediação, com a inoculação conjunta com FMAs (bioaumentação) e fertilizante (bioestimulação) foi observado por Alarcón et al. (2008) em mudas de *Lolium multiflorum* cv. Passerel Plus, corroborando com os dados encontrados neste trabalho.

Foi observado que a colonização micorrízica do tratamento controle PL 0%, foram significativamente superior aos solos controles que continham 4% de petróleo no solo (Tabela 2). Isto evidencia a presença de FMAs nativos nos tratamentos controles (PL 0% e PL 4%) e a redução da colonização micorrízica provocada pelo efeito tóxico do contaminante no solo (PL 4%), principalmente aos 60 dias de condução experimental. Entretanto, sob as mesmas condições de contaminação com petróleo no solo, as mudas de milho inoculadas com FMAs na presença de NPK e/ou surfactante químico (PL+FMA+NPK; PL+FMA+SFT; PL+FMA+NPK+SFT), apresentaram elevada porcentagem de

colonização micorrízica, em comparação aos demais tratamentos, em ambos os períodos avaliativos. A maioria dos tratamentos inoculados com FMAs apresentou maior taxa de colonização micorrízica aos 120 dias de condução experimental.

Campos et al. (2010) comparando em casa de vegetação o crescimento e a micorrização por FMAs, em nove genótipos de milho em solos não contaminados, observaram que a inoculação de FMAs proporcionou incrementos na produção de massa seca, da parte aérea e do sistema radicular, de forma diferenciada entre genótipos de milho. Nos genótipos não responsivos ou pouco responsivos à micorrização, ocorre comportamento diferente quanto à colonização, proporcionando média de 60%. Huang et al. (2007) observaram que em solos contaminados com atrazina na concentração de 5 mg kg^{-1} , a colonização micorrízica das mudas de milho decresceram nas concentrações entre 0 a 2 mg kg^{-1} . Entretanto, quando a concentração de atrazina aumentou no solo para 5 mg kg^{-1} , a colonização micorrízica foi aumentada e as massas secas da parte aérea e raízes de milho não foram afetadas pelos tratamentos. Alguns estudos indicam o efeito negativo ou nulo pelos hidrocarbonetos na colonização micorrízica (Alarcón et al., 2006; Gaspar et al., 2002).

Tang et al. (2009) verificaram que o conteúdo de clorofila de mudas de milho cultivadas em solos contaminados com óleo diesel na ausência de inoculação com FMA (*Glomus constrictum* Trappe) foi significativamente reduzido. Contudo, na presença da inoculação micorrízica houve aumento no teor de clorofila, melhora da capacidade de sintetizar enzimas e proteger ou retardar o processo de degradação de clorofila. Além disso, estes autores observaram que as enzimas antioxidantes têm grande influência sobre a biomassa das plantas, e os FMAs podem aumentar a capacidade de remoção do oxigênio reativo e aliviar as mudas de milho submetidas às condições de estresse em solos contaminados com óleo diesel. Este fato pode estar associado à maior taxa de germinação e massa seca de raiz, parte aérea e total obtidos, no presente trabalho, nos tratamentos inoculados com FMAs sob as diferentes concentrações de petróleo no solo.

Tabela 2. Porcentagem de colonização micorrízica (FMA) e teor de polifenóis totais de mudas de milho, em função de diferentes tratamentos de fitorremediação aos 60 e 120 dias de condução experimental

Tratamentos*	FMA		Polifenóis Totais (g kg ⁻¹)			
	%		Parte Aérea		Raiz	
	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias
PL 0%	45 bA	85 dB	6,97 aA	5,73 aA	3,16 abA	2,42 abA
PL 4%	8 aA	58 bcB	8,90 aB	5,44 aA	1,51 aA	4,10 bcB
PL+NPK	0 aA	3 aA	7,30 aB	5,85 aA	2,38 abA	3,12 abA
PL+SFT	3 aA	53 bB	7,72 aB	5,20 aA	5,81 cdB	3,58 abA
PL+NPK+SFT	3 aA	8 aA	6,66 aA	6,87 aA	6,59 dA	6,15 cA
PL+FMA	13 aA	83 cdB	7,57 aB	5,99 aA	4,45 bcdA	3,54 abA
PL+FMA+NPK	65 bA	95 dB	6,94 aA	6,12 aA	2,82 abA	1,42 aA
PL+FMA+SFT	43 bA	83 cdB	7,65 aA	6,84 aA	2,88 abA	4,05 bcA
PL+FMA+NPK+SFT	93 cA	100 dA	6,80 aA	5,88 aA	3,64 abcB	2,07 abA
Médias	30,0	59,7	7,4	6,2	3,16	3,5
CV (%)	24,8		15,0		29,9	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Planta, 0% (PL 0%); Planta, 4% (PL 4%); Planta + NPK, 4%; (PL+NPK); Planta+surfactante, 4% (PL+SFT); Planta+NPK+surfactante, 4% (PL+NPK+SFT); Planta+FMA, 4% (PL+FMA); Planta+FMA+NPK, 4% (PL+FMA+NPK); Planta+FMA+surfactante, 4% (PL+FMA+SFT); Planta+FMA+NPK+surfactante, 4% (PL+FMA+NPK+SFT).

Nas Figuras 3 e 4 é possível observar fotomicrografias obtidas a partir de fragmentos de raízes de mudas de milho cultivadas em solos contaminados e não contaminados com petróleo em 4%, cultivadas aos 60 e 120 dias, respectivamente. Houve colonização micorrízica nas raízes das plantas não inoculadas com FMAs (A) no solo não contaminado (PL 0%), demonstrando a presença de FMAs nativos. Nos solos controles contaminados com petróleo (PL 4%) foi caracterizada pela baixa frequência de colonização micorrízica (B). Entretanto, diferentes estruturas fúngicas foram observadas nas mudas inoculadas com FMAs (C, D, E e F) em solos contaminados com petróleo aos 60 e 120 dias.

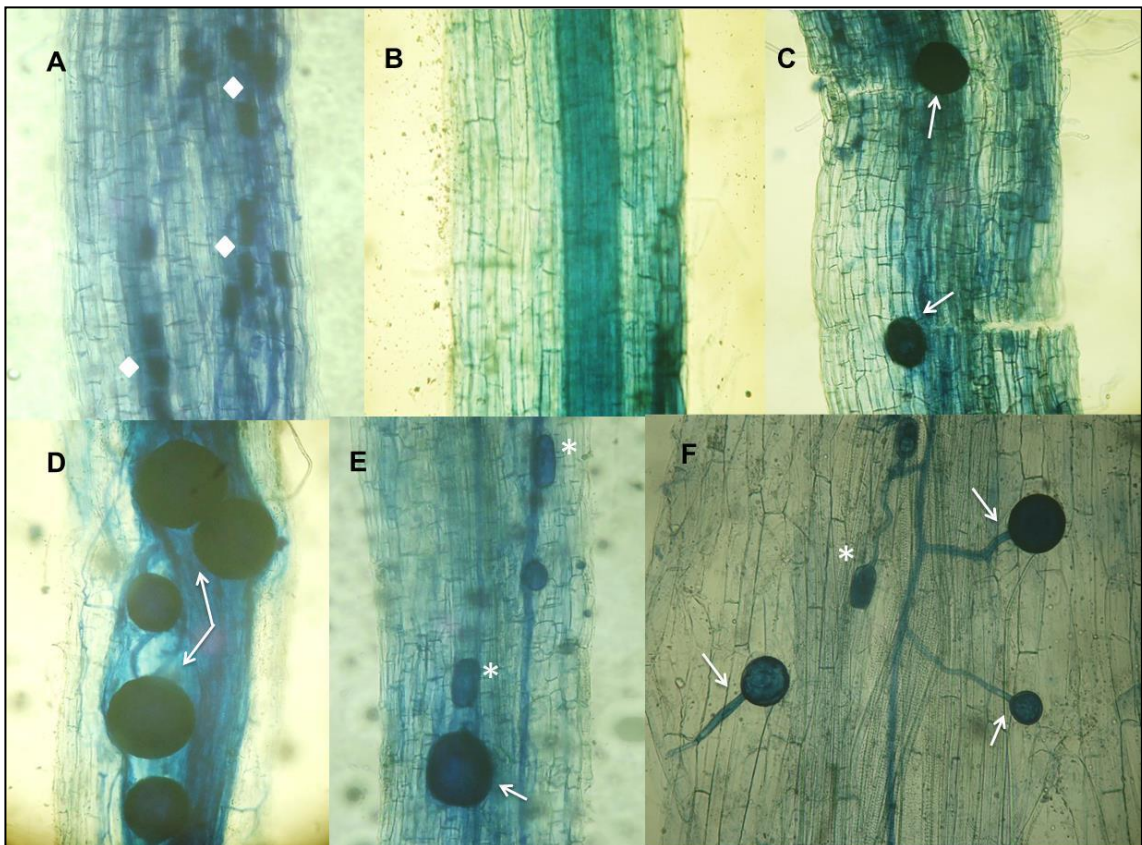


Figura 3. Fotomicrografia de raízes de mudas de milho aos 60 dias de condução experimental, colonizadas ou não por FMAs. Detalhes evidenciando a colonização micorrízica, com a formação de arbúsculos (◆), esporos (→) e vesículas (*) obtidos pelos respectivos tratamentos/ concentração de petróleo no solo, respectivamente: (A) Planta/ 0%; (B) Planta/ 4% (não colonizadas); (C) Planta+FMA/ 4%; (D) Planta+FMA+NPK/ 4%; (E) Planta+FMA+surfactante/ 4%; (F) Planta+FMA+NPK+surfactante/ 4%.

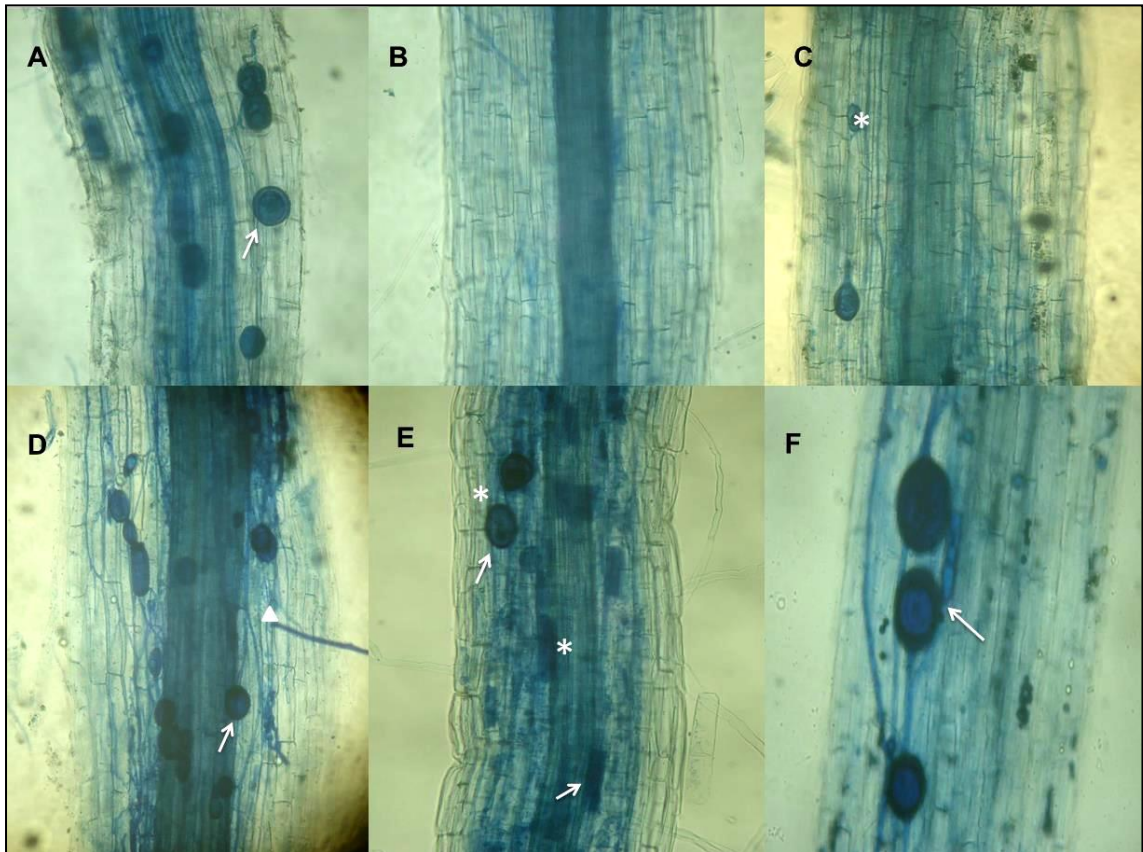


Figura 4. Fotomicrografia de raízes de mudas de milho aos 120 dias de condução experimental, colonizadas ou não por FMAs. Detalhes evidenciando a colonização micorrízica, com a formação de esporos (\rightarrow), hifas (Δ) e vesículas (*), obtidos pelos respectivos tratamentos/ concentração de petróleo no solo, respectivamente: (A) Planta/ 0%; (B) Planta/ 4% (não colonizadas); (C) Planta+FMA/ 4%; (D) Planta+FMA+NPK/ 4%; (E) Planta+FMA+surfactante/ 4%; (F) Planta+FMA+NPK+surfactante/ 4%.

Em relação ao teor de polifenóis totais na parte aérea das mudas de milho não foi observada diferença significativa entre os tratamentos de fitorremediação e os tratamentos controles aos 60 e 120 dias (Tabela 2). No entanto, aos 60 dias foi observado maiores valores nos teores de polifenóis dos tratamentos PL 4%, PL+NPK, PL+SFT e PL+FMA, em relação aos 120 dias. Isto demonstra que as plantas submetidas a condições desfavoráveis, podem aumentar a produção destes compostos como mecanismo de defesa em resposta a contaminação no solo. Além disso, estes resultados podem estar associados ao baixo crescimento e acúmulo de massa seca das mudas obtida por estes tratamentos.

Aos 60 dias de condução experimental, a produção de polifenóis totais nas raízes das mudas de milho apresentou maior concentração no solo tratado com surfactante e NPK (PL+NPK+SFT), não diferindo das mudas e daquelas tratadas com surfactante (PL + SFT). Além disso, após 120 dias, foi observado os maiores teores de polifenóis totais no tratamento PL+NPK+SFT. No entanto, este não diferiu dos tratamentos PL 4% e PL+FMA+SFT. Os teores de polifenóis nas raízes foram estatisticamente maiores aos 60 dias nos solos tratados com PL+SFT e a mistura PL+FMA+NPK+SFT, em relação aos 120 dias, ao passo que o controle PL 4% apresentou maior teor aos 120 dias de condução experimental.

Alguns trabalhos têm avaliado o aumento dos teores de polifenóis na planta como resposta ao estresse ambiental (Alarcón et al., 2008; Vollenweider et al., 2005). O desbalanço oxidativo celular resultante de estresses bióticos e abióticos, gera a indução do metabolismo de polifenóis pelas plantas. A desintoxicação de metais em plantas, por exemplo, pode ser atribuída ao acúmulo de compostos polifenóis, como taninos e ligninas. Vollenweider et al. (2005) observaram que a indução do metabolismo de polifenóis parece ser uma estratégia da planta em aumentar sítios de ligação na parede celular capazes de complexar o Cd, antes mesmo de o metal provocar danos oxidativos. O aumento da lignificação das paredes celulares da epiderme e colênquima, do tecido vascular e da endoderme também é associado em níveis críticos tóxicos de Cd e de Zn no solo nas folhas de milho aos 30 dias após a contaminação (Cunha et al., 2008). O primeiro trabalho envolvendo polifenóis totais em plantas inoculadas com FMA e microrganismos degradadores de petróleo durante a fitorremediação de solos contaminados com petróleo foi realizado por Alarcón et al. (2008). Apesar disto, estes autores não encontraram redução no teor de polifenóis totais, sendo os tratamentos de fitorremediação, bioinoculação e bioestimulação iguais aos controles em mudas de *Lolium multiflorum*.

Os conteúdos de nitrogênio (N), fósforo (P) (Tabela 3), potássio (K) e cálcio (Ca) (Tabela 4) na parte aérea e raiz de mudas de milho variaram em função de diferentes tratamentos de fitorremediação aos 60 e 120 dias de condução experimental. As mudas de milho cultivadas em solos não contaminados (PL 0%) apresentaram maior conteúdo de K nas raízes e parte aérea aos 60 dias, enquanto o acúmulo de Ca foi maior aos 120 dias. Por outro lado, as mudas cultivadas em solos contaminados com petróleo não diferiram

entre si. Além disso, é possível observar que as mudas tratadas com NPK apresentaram maior acúmulo de N, P, K e Ca na parte aérea e raízes, em relação aos demais tratamentos, sendo superiores aos 60 dias em relação ao tratamento controle PL 4%, aos 60 dias. As mudas inoculadas com FMAs nos tratamentos PL+FMA+NPK e PL+FMA+NPK+SFT se destacaram apresentando os maiores conteúdos destes nutrientes. Os acúmulos de N, P e Ca nas raízes e P e K na parte aérea das mudas, nesses tratamentos, foram superiores aos 120 dias de condução experimental. A maior colonização radicular apresentada por estes tratamentos pode estar relacionada aos maiores conteúdos de nutrientes como N, P, K e Ca, direcionados a parte aérea e raízes das plantas, através de sua inoculação, ainda que na presença do contaminante no solo (Tabela 2).

Para uma eficiente absorção de nutrientes, a maioria das plantas precisa se associar a fungos micorrízicos para suprir os minerais necessários, aumentando sua produtividade e conferindo resistência a condições de estresses (Reinhardt, 2007). A exploração destas simbioses em ambientes naturais e agronômicos é de alto valor ambiental e econômico (Bonfante e Anca, 2009). O aumento da absorção de nutrientes ocorre através da extensão do sistema radicular pelas hifas dos FMAs, que proporcionam aumento da área da superfície de contato com o solo, favorecendo a maior absorção de nutrientes como: P, Cu, Zn (Kirkby e Römheld, 2007; Fernandes, 2006; Kahneh et al., 2006), Fe (Kahneh et al., 2006), N (Govindarajulu et al., 2005) e K (Gupta et al., 2002).

Tabela 3. Conteúdos de nitrogênio (N) e fósforo (P) na parte aérea e raiz de mudas de milho, em função de diferentes tratamentos de fitorremediação aos 60 e 120 dias de condução experimental

Tratamentos*	N (g planta ⁻¹)				P (g planta ⁻¹)			
	Parte Aérea		Raiz		Parte Aérea		Raiz	
	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias
PL 0%	57,56 bcB	24,31 aA	24,10 abA	11,18 aA	8,75 cdA	7,80 bA	2,71 bcA	2,00 aA
PL 4%	18,76 aA	8,72 aA	9,17 aA	4,24 aA	1,21 aA	0,89 aA	0,64 abA	0,46 aA
PL+NPK	91,19 cA	88,58 bcA	35,41 bA	58,24 bcB	5,77 bcA	14,23 cB	1,75 abA	6,68 bcB
PL+SFT	27,23 abA	5,67 aA	7,53 aA	3,54 aA	1,17 aA	0,74 aA	0,30 aA	0,44 aA
PL+NPK+SFT	129,31 dB	78,79 bA	37,73 bA	39,05 bA	8,05 cdA	13,73 cB	2,83 bcA	5,05 bB
PL+FMA	28,68 abA	14,66 aA	10,97 aA	7,92 aA	1,90 abA	2,33 aA	0,97 abA	1,16 aA
PL+FMA+NPK	174,59 eB	130,36 dA	72,92 cA	68,51 cA	8,52 cdA	22,56 dB	4,51 cdA	8,61 cB
PL+FMA+SFT	27,70 abA	11,20 aA	8,03 aA	6,37 aA	2,19 abA	2,72 aA	0,70 abA	0,97 aA
PL+FMA+NPK+SFT	186,45 eB	115,72 cdA	36,59 bA	96,21 dB	10,80 dA	25,98 dB	6,05 dA	14,94 dB
Médias	82,4	63,5	26,9	35,6	5,4	10,0	2,3	4,6
CV (%)	22,8		32,4		24,5		31,1	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Planta, 0% (PL 0%); Planta, 4% (PL 4%); Planta + NPK, 4%; (PL+NPK); Planta+surfactante, 4% (PL+SFT); Planta+NPK+surfactante, 4% (PL+NPK+SFT); Planta+FMA, 4% (PL+FMA); Planta+FMA+NPK, 4% (PL+FMA+NPK); Planta+FMA+surfactante, 4% (PL+FMA+SFT); Planta+FMA+NPK+surfactante, 4% (PL+FMA+NPK+SFT).

Tabela 4. Conteúdos de potássio (K) e cálcio (Ca) na parte aérea e raiz de mudas de milho, em função de diferentes tratamentos de fitorremediação aos 60 e 120 dias de condução experimental

Tratamentos*	K (g planta ⁻¹)				Ca (g planta ⁻¹)			
	Parte Aérea		Raiz		Parte Aérea		Raiz	
	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias
PL 0%	85,46 bB	58,04 bA	53,56 cdB	27,45 aA	24,07 bA	37,94 bB	9,56 bcdA	5,19 aB
PL 4%	27,29 aA	14,52 aA	16,32 abA	4,44 aA	6,53 aA	6,51 aA	1,82 aA	1,36 aA
PL+NPK	93,41 bA	173,64 cdB	36,16 bcA	131,88 dB	19,12 abA	57,34 cB	3,75 abA	14,50 bB
PL+SFT	27,56 aA	14,22 aA	5,54 aA	5,07 aA	6,25 aA	5,68 aA	1,66 aA	1,11 aA
PL+NPK+SFT	122,07 bcA	150,38 cB	37,99 bcA	72,44 bB	42,97 cA	50,81 bcA	7,12 abcA	7,23 aA
PL+FMA	32,64 aA	29,41 abA	7,19 aA	26,23 aB	8,26 abA	13,39 aA	2,53 aA	3,42 aA
PL+FMA+NPK	122,69 bcA	205,57 dB	78,85 deA	71,87 bA	48,78 cA	79,36 dB	12,59 cdA	22,12 cB
PL+FMA+SFT	31,58 aA	30,71 abA	12,23 abA	6,69 aA	8,78 abA	14,34 aA	1,99 aA	3,35 aA
PL+FMA+NPK+SFT	148,05 cA	216,78 dB	94,23 eA	104,75 cA	56,38 cA	55,61 cA	14,69 dA	49,02 dB
Médias	76,8	103,3	38,0	53,2	24,6	35,3	6,2	12,3
CV (%)	21,5		26,8		24,1		31,8	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Planta, 0% (PL 0%); Planta, 4% (PL 4%); Planta + NPK, 4%; (PL+NPK); Planta+surfactante, 4% (PL+SFT); Planta+NPK+surfactante, 4% (PL+NPK+SFT); Planta+FMA, 4% (PL+FMA); Planta+FMA+NPK, 4% (PL+FMA+NPK); Planta+FMA+surfactante, 4% (PL+FMA+SFT); Planta+FMA+NPK+surfactante, 4% (PL+FMA+NPK+SFT).

O estabelecimento da simbiose resulta em diversos benefícios para a planta hospedeira, dentre eles, a redução da suscetibilidade a certos patógenos, tolerância aos estresses climáticos e edáficos como, melhor resistência ao estresse hídrico, às temperaturas elevadas, à acidez, à salinidade e à maior tolerância às condições de toxidez do solo (Fernandes, 2006; Bacon e White, 2000; Smith e Read, 1997). Além de acúmulo de estoques de carbono, estruturação e maior estabilidade dos agregados no solo (Treseder e Allen, 2000).

Os efeitos benéficos de FMAs sobre a nutrição de plantas têm sido documentados por Smith e Read (2008). De acordo com Hernández-Ortega et al. (2011), pouco se sabe sobre os efeitos de contaminantes orgânicos na nutrição das plantas. Estes autores não observaram diferenças entre os tratamentos de fitorremediação, com e sem inoculação com FMAs no que se refere aos conteúdos de N, P, K, Ca. No entanto, as plantas inoculadas apresentaram maior teor de macronutrientes e micronutrientes, quando comparadas às plantas não inoculadas. Não há muita informação disponível sobre a contribuição de FMAs sobre o estado nutricional das plantas expostas a hidrocarbonetos de petróleo. Sabe-se que alguns micronutrientes são cofatores para os sistemas antioxidantes enzimáticos nas células (Lee et al., 2007). Isto pode, em parte, explicar como plantas inoculadas com FMAs têm mecanismos fisiológicos para reduzir os efeitos nocivos do diesel sobre o crescimento da planta na presença do contaminante.

O efeito da inoculação com a espécie de FMA *Glomus geosporum* em solo contaminado com o hidrocarboneto policíclico fenantreno foi observado em raízes de milho por Gaspar et al. (2002). Estes autores constataram ainda, que o contaminante, quando envolvido pelas hifas do FMA, não era degradado por enzimas, mas mantido nos esporos sem modificação, sendo capaz de remover o poluente do solo por bioimobilização, reduzindo o efeito tóxico do contaminante livre ao redor das raízes no solo. Os FMAs podem ser importantes componentes da rizosfera capazes de explorar maior volume de solo contaminado, através das hifas fúngicas, do que as raízes não micorrizadas, por potencializarem a degradação de poluentes derivados do petróleo no solo, influenciarem a estrutura física e química das partículas do solo e acelerarem o crescimento (Harms et al., 2011; Hernández-Ortega, 2011; Nie et al., 2011; Gao et al., 2010; Alarcón et al., 2008; Joner e Leyval, 2003) na presença do contaminante.

Na Tabela 4 é possível observar o acúmulo de K e Ca na parte aérea e nas raízes das mudas de milho cultivadas em solos tratados sob diferentes condições de tratamentos de fitorremediação e períodos experimentais. As mudas de milho cultivadas em solos não contaminados (PL 0%) apresentaram maior conteúdo de K nas raízes e na parte aérea aos 60 dias, enquanto o acúmulo de Ca foi maior aos 120 dias. Por outro lado, as mudas cultivadas em solos contaminados com petróleo não diferiram entre si.

Da mesma forma, foi observada interação entre os tratamentos de fitorremediação e os períodos experimentais avaliados, no que se refere ao acúmulo de Mg e S na parte aérea e nas raízes das mudas de milho (Tabela 5). Foi observado que as mudas de milho tratadas com NPK (com exceção do tratamento PL+NPK+SFT) apresentaram maiores conteúdos de Mg e S aos 120 dias de condução experimental. O maior acúmulo de Mg e S foi observado no tratamento PL+FMA+NPK+SFT, nas mudas de milho em solos contaminados com 4% de petróleo.

A porcentagem de carbono orgânico na parte aérea das mudas de milho foi influenciada pelos diferentes tratamentos de fitorremediação, independentemente do tempo de condução experimental (Tabela 6). Isto pode estar associado à redução dos contaminantes no solo pela ação dos tratamentos ou pelo processo de atenuação natural.

Tabela 5. Conteúdos de magnésio (Mg) e enxofre (S) na parte aérea e raiz de mudas de milho, em função de diferentes tratamentos de fitorremediação aos 60 e 120 dias de condução experimental

Tratamentos*	Mg (g planta ⁻¹)				S (g planta ⁻¹)			
	Parte Aérea		Raiz		Parte Aérea		Raiz	
	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias
PL 0%	21,12 bcdA	19,54 bcA	4,86 bcdA	3,65 abA	4,02 abA	3,94 aA	4,35 abA	2,70 abA
PL 4%	5,75 aA	3,61 aA	0,91 abA	1,01 aA	1,44 aA	0,98 aA	1,45 aA	0,61 aA
PL+NPK	18,83 abcA	31,31 cB	1,95 abA	7,08 bB	6,73 bcA	12,79 bcB	4,05 abA	23,61 dB
PL+SFT	5,23 aA	2,96 aA	0,56 aA	0,68 aA	1,73 aA	0,71 aA	0,75 aA	0,91 aA
PL+NPK+SFT	33,51 deA	30,59 cA	2,98 abcA	2,61 aA	9,38 cdA	10,37 bA	5,07 abA	7,30 bA
PL+FMA	6,91 aA	8,65 abA	2,06 abA	3,36 abA	1,79 aA	1,51 aA	1,51 aA	1,77 aA
PL+FMA+NPK	27,60 cdA	49,76 dB	6,94 cdA	25,90 cB	9,30 cdA	18,70 dB	7,77 bA	13,98 cB
PL+FMA+SFT	7,94 abA	8,35 abA	0,99 abA	2,99 abA	2,14 abA	1,63 aA	1,54 aA	2,45 aA
PL+FMA+NPK+SFT	43,43 eA	61,22 dB	8,04 dA	36,61 dB	12,66 dA	16,98 cdB	13,40 cA	35,78 eB
Médias	18,9	24,5	3,3	9,4	5,5	7,9	4,4	10,4
CV (%)	28,4		28,5		32,8		29,0	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Planta, 0% (PL 0%); Planta, 4% (PL 4%); Planta + NPK, 4%; (PL+NPK); Planta+surfactante, 4% (PL+SFT); Planta+NPK+surfactante, 4% (PL+NPK+SFT); Planta+FMA, 4% (PL+FMA); Planta+FMA+NPK, 4% (PL+FMA+NPK); Planta+FMA+surfactante, 4% (PL+FMA+SFT); Planta+FMA+NPK+surfactante, 4% (PL+FMA+NPK+SFT).

Tabela 6. Conteúdo de carbono orgânico na parte aérea e raiz de mudas de milho, em função de diferentes tratamentos de fitorremediação

Tratamentos	Carbono orgânico (%)	
	Parte Aérea	Raiz
PL 0%	43,06 bc	35,77 a
PL 4%	43,05 bc	40,93 a
PL+NPK	43,54 bc	38,30 a
PL+SFT	39,73 a	36,13 a
PL+NPK+SFT	42,82 bc	40,57 a
PL+FMA	41,34 ab	37,34 a
PL+FMA+NPK	42,69 abc	37,25 a
PL+FMA+SFT	42,85 abc	38,20 a
PL+FMA+NPK+SFT	44,57 c	34,74 a
Médias	42,84	37,69
CV (%)	4,6	14,6

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Planta, 0% (PL 0%); Planta, 4% (PL 4%); Planta + NPK, 4%; (PL+NPK); Planta+surfactante, 4% (PL+SFT); Planta+NPK+surfactante, 4% (PL+NPK+SFT); Planta+FMA, 4% (PL+FMA); Planta+FMA+NPK, 4% (PL+FMA+NPK); Planta+FMA+surfactante, 4% (PL+FMA+SFT); Planta+FMA+NPK+surfactante, 4% (PL+FMA+NPK+SFT).

A inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no sistema de fitorremediação pode contribuir reduzindo a toxidez do solo, beneficiando a planta dos efeitos tóxicos induzidos pelo petróleo (Alarcón et al., 2008), e por conseguir explorar maior volume de solo contaminado, através das hifas fúngicas, do que as raízes não micorrizadas, (Gao et al., 2010; Joner e Leyval, 2003) e proteger (Debiane et al., 2009) e melhorar o estado nutricional da planta (Hernández-Ortega, 2011) na presença do contaminante.

4. CONCLUSÕES

1. As mudas de milho tratadas com fungos micorrízicos, NPK e surfactante químico de forma combinada apresentam maior colonização micorrízica,

crescimento e nutrição nas raízes e na parte aérea em solos contaminados com 4% de petróleo.

2. Nos solos contaminados com petróleo, as mudas de milho tratadas separadamente com SFT, FMA e NPK apresentam baixo desempenho quanto ao crescimento e à nutrição, em relação aos demais tratamentos e maior resposta ao estresse ambiental, a partir da avaliação dos conteúdos de polifenóis.
3. As mudas de milho tratadas com NPK nos solos apresentaram maior crescimento e nutrição em comparação com os demais tratamentos, sobretudo aos 120 dias de condução experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCÓN, A.; DELGADILLO-MARTÍNEZ, J.; FRANCO-RAMÍREZ, A.; DAVIES, F.T.J; FERRERA-CERRATO, R. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita-Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Rev. Int. Contam. Amb*, v.22, p.39-47. 2006.
- ALARCÓN, A.; DAVIES, F.T.J; AUTENRIETH, R.L.; ZUBERER, D.A. (2008) Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Int. J. Phytorem*, v.10, p. 251-263, 2008.
- AMAKIRI, J.O. & ONOFEGHARA, F.A. Effects of crude oil pollution on the germination of *Zea mays* and *Capsicum frutescens*. *Environ. Poll*, 35:159–167, 1984.
- ANDERSON, J.D. & INGRAM, J.S.I. Tropical soil biology and fertility: A handbook of methods. 2 ed. Wallingford, CAB International, 1996. 171p.
- BACON, C.W.; WHITE, J.F. (2000) Microbial Endophytes. Publicado por CRC Press, 487 p.
- BELZ, R.G.; CEDERGREEN, N.; SORENSEN, H. (2008). Hormesis in mixtures – Can it be predicted? *Science of the Total Environment*. 404: 77-87.

- BONFANTE, P., and ANCA, I.A. Plants, mycorrhizal fungi and bacteria: a network of interactions. *Annu Rev Microbiol*, 63: 363–383, 2009.
- CALABRESE, E.J., BLAIN, R.B., 2009. Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution*. 157:42–48.
- CAMPOS, D.T.S.; ANDRADE, J.A.C.; CASSIOLATO, A.M.R.; Crescimento e micorrização de genótipos de milho em casa de vegetação. *Bragantia*, Campinas. 69: 555-562, 2010.
- CHAINEAU, C.H., MOREL, J.L., OUDOT, J., 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality*. 26:1478–1483.
- CHOROM, M.; SHARIFI, H. S.; MOTAMEDI, H. (2010) Bioremediation of a crude oil – polluted soil by application of fertilizers. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*. v. 7, No. 4, pp. 319-326.
- COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. (2003) *Obtenção e aplicação de biossurfactantes*. *Vetor*, Rio Grande, 13: 85-103.
- CUNHA, K.P.V.da; NASCIMENTO, C.W.A.do; PIMENTEL, R.M.M.; ACCIOLY, M.A.; SILVA, A.J.da. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, 32: 1319-1328. 2008.
- DEBIANE, D.; GARÇON, G., VERDIN, A.; FONTAINE, J.; DURAND, R.; SHIRAL, P.; GRANDMOUGIN-FERJANI, A.; LOUNÈS-HADJI SAHRAOUI, A.L.H. (2009) Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phytochemistry*, v.70, p.1421–1427.
- FERNANDES, M.S. (2006) *Nutrição Mineral de Plantas*. *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*. Viçosa, MG. 432p.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35: 1039-1042, 2011.
- GAO, Y.Z.; CHENG, Z.X.; LING, W.T.; HUANG, J. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots. *Bioresour. Technol.*, 101: 6895–6901, 2010.
- GAO, Y.Z.; LING, W.T.; ZHU, L.Z.; ZHAO, B.W.; ZHENG, Q.S. Surfactant-Enhanced Phytoremediation of Soils Contaminated with Hydrophobic Organic Contaminants: Potential and Assessment. *Pedosphere*. 17:409–418, 2007.

- GASPAR, M.L.; CABELLO, M.N.; CAZAU, M.C.; POLLERO, R.J. Effect of phenanthrene and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots. *Mycorrhiza*, 12:55–59, 2002.
- GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of British Mycological Society*, London, 46:235-244, 1963.
- GOVINDARAJULU, M; PFEFFER, P.E.; JIN, H.; ABUBAKER, J.; DOUDS, D.D; ALLEN, J.W.; BUCKING, H.; LAMMERS, P.J.; SHACHAR-HILL, Y. (2005) Nitrogen Transfer in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Nature Magazine*. 435: 819-823, 2005.
- GRACE, C; STRIBLEY, D.P. (1991) A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Res.*, 95:1160-1162.
- GUPTA, M.L.; PRASAD, A., RAM, M.; KUMAR, S. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different
- HARMS, H.; SCHLOSSER, D; WICK, L.Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9:177-192, 2011.
- HERNÁNDEZ-ORTEGA, H.A., ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R.; ZAVALERA-MANCERA, H.A.; LÓPEZ-DELGADO, H.A.; MENDONZA-LOPEZ, M.R. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate, *Journal of Environmental Management*, 10:10-16, 2011.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, Beltsville, 48:692, 1964.
- JONER, E.J. & LEYVAL, C. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.* 37: 2371–2375, 2003.
- KAHNEH, E., RAMENSANPOUR, H., RAMENSANPOUR, M.R. HAGHPARAST, M. R.; SHIRINFEKR, A. Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Phosphorus Supplement on Leaf P, Zn, Cu and Fe Concentrations of Tea Seedlings. *Caspian J. Env. Sci.*, 4: 53-58, 2006.

- KIRKBY, E. A., ROMHELD, V. (2007) Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. Versão em português do boletim Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mability. Trad. Ferreira, S. O., *The International Fertiliser Society*, P. O. Box 4, York, YO32 5 YS, Reino Unido.
- LEE, S.H., LEE, W.S., LEE, C.H., KIM, J.G., Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *Journal of Hazardous Materials*, 153, 892–898, 2008.
- LEE, S.-H.; AHSAN, N.; LEE, K.W.; LEE, D.H.; KIM, D.G.; LEE, S.S.; KWAK, T.H.; KIM, B.; LEE, B.H. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J. Plant Physiol.*, 164:1626–1638, 2007.
- LIN, H.; TAO, S.; ZUO, B.; COVENEY, R.M. (2007) Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. *Environmental Pollution*, 148:614-619.
- MAGALHÃES, M.H.; CUNHA, D.C. (2003) Avaliação da técnica de Bioaumento no tratamento de solo impactado por petróleo. CETEM, 10 p.
- MALLAKIN, A., BABU, T.S., DIXON, D.G., GREENBERG, B.M., 2002. Sites of toxicity of specific photooxidation products of anthracene to higher plants: inhibition of photosynthetic activity and electron transport in *Lemna gibba* L. G-3 (duckweed). *Environmental Toxicology*. 17:462–471.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989.201p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. (1997) *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2.ed. Piracicaba: Potafos, 319 p.
- MÉNDEZ-NATERA J.R.; ZAPATA, C.R.; ZAPATA, K.; OTAHOLA-GÓMEZ, V.A. Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95. *Revista UDO Agrícola* 4: 66-71, 2004.
- MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165:195-209, 2005.

- NIE, M.; WANG, Y.; YU, J.; XIAO, M.; JIANG, L.; FANG, C.; CHEN, J.; LI, B. Understanding plant-microbe interactions for phytoremediation of petroleum-polluted Soil. *Plos One*. 6:17961, 2011.
- OGBO, E.M. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants -*Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology*, 8:250-253, 2009.
- OGBOGHODO, A.; IRUAGA, E.K.; OSEMWOTA, I.O; CHOKOR, J.U. An assesment of the effects of crude oil pollution on soil properties, germination and growth of maize (*Zea mays*) usind two crude types – forcados light and escravos light. *Environmental Monitoring and Assessment*, 96:143–152, 2004.
- QUIÑONES-AGUILAR, E.E.; FERRERA-CERRATO, R. F.; GAVI-REYES, L.; FERNÁNDEZ-LINARES, L.; RODRÍGUEZ-VASQUEZ, R.; A. ALARCÓN. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado com petróleo crudo. *Agrociencia*, 37: 585-594, 2003.
- REILLEY, K.A., BANKS, M.K., SCHWAB, A.P., 1996. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality* 25, 212–219.
- REINHARDT, D. (2007) Programming good relations-development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Biology*, v. 10, p. 98-105.
- ROY, J.L.; MCGILL, W.B. (2000) Flexible conformation in organic matter coatings: An hypothesis about soil water repellency. *Can. J. Soil. Sci.*, p.143-154.
- SANGABRIEL, I.W.; FERRARA-CERRATO, R.; TREJO, A.D.; MENDONZA, L.M.R.; CRUZ, S.J.S., LÓPEZ, O.C.; DELGADILLO, M.J.; ALARCÓN, A. (2006) Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 2: 63-73.
- SMITH, M.J.; FLOWERS, T.H.; DUNCAB, H.J.; ALDER, J. (2005) Effects of polycyclic aromatichydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshlycontaminated soil with aged PAHs residues. *Environmental Pollution*, 28:1-7.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis* (2008) 3.ed. Academic Press, San Diego, CA, p.787.
- SMITH, S. E.; READ, D. J (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. 2. ed. San Diego, Academic Press, p. 605.

- TANG M., H. CHEN, J.C. HUANG, Z.Q.T. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biology & Biochemistry*, 41:936–940, 2009.
- TRESEDER, K.K.; ALLEN, M.F. (2000) Mycorrhizal fungi have a potencial role in soil carbon storage under elevated CO and nitrogen deposition. *New Phytology*. 147:189-200.
- VOLLENWEIDER, P.; COSIO, C.; GUNTARDT-GOERG, M.S. & KELLER, C. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) Part II Microlocalization and cellular effects of cadmium. *Environ. Exper. Bot.* 58:1-16, 2005.

3.3. MICORRIZA, MILHO, NPK, E SURFACTANTE NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO

Késsia Barreto Lima⁽²⁾, Fernando Fundora Tellechea⁽²⁾, Marco Antônio Martins⁽³⁾,
Eliane Soares de Souza⁽⁴⁾

RESUMO

Em casa de vegetação foi conduzido um experimento para avaliar o potencial de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), mudas de milho, fertilizante e surfactante químico quanto à capacidade de influenciar as características químicas de um solo contaminado com petróleo. O delineamento experimental foi realizado em blocos inteiramente casualizados, sendo 14 tratamentos: 1) Solo controle não contaminado, 0%; 2) Planta, 0%; 3) Solo com NPK, 4%; 4) Solo controle contaminado, 4%; 5) Solo com Surfactante, 4%; 6) Solo com NPK+surfactante, 4%; 7) Planta, 4%; 8) Planta + NPK, 4%; 9) Planta+surfactante, 4%; 10) Planta+NPK+surfactante, 4%; 11) Planta+FMA, 4%; 12) Planta+FMA+NPK, 4%; 13) Planta+FMA+surfactante, 4%; 14) Planta+FMA+NPK+surfactante, 4%. Os tratamentos foram avaliados aos 60 e 120 dias de condução experimental. A inoculação mista com as espécies de FMAs

(*Rhizofagus clarum* e *Gigaspora margarita*) foi utilizada. A unidade experimental foi composta por vasos com 2 kg de substrato, contendo três mudas de milho. Aos 60 e 120 dias de condução experimental foram determinadas as seguintes características químicas: pH, C, H, N e P, relação C/N, carbono orgânico, compostos orgânicos extraídos pelo solvente diclorometano e a degradação n-alcanos no solo. A fitorremediação combinada ao processo de bioaugmentação e bioestimulação favoreceu as propriedades químicas em relação ao solo sob atenuação natural (solos contaminados a 4%). Houve redução da relação C:N e aumento de carbono orgânico aos 120 dias de condução experimental. Os teores de compostos orgânicos extraídos pelo solvente diclorometano foram significativamente menores em solos tratados com mudas de milho em relação aos demais tratamentos. A degradação de n-alcanos nos solos tratados pelos processos de fitorremediação e biorremediação apresentou resultados equivalentes aos solos mantidos sob a atenuação natural. Aos 60 dias os solos contaminados com petróleo tratados com a combinação de milho+FMA+NPK foram mais responsivos em relação aos demais tratamentos de remediação, no que se refere à degradação de n-alcanos.

Termos de indexação: fitorremediação, biorremediação.

- (1) Doutoranda, Laboratório de Solos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: kblima@hotmail.com;
- (2) Doutorando, Laboratório de Solos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: fundotell@gmail.com;
- (3) Professor Titular, Laboratório de Solos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: marco@uenf.br;
- (4) Professora Adjunta, Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo, Centro de Ciência e Tecnologia-UENF. Rodovia Amaral Peixoto Km 163, Avenida Brennand s/n, Imboacica. CEP 27925-310, Macaé (RJ). E-mail: eliane@lenep.uenf.br;

MYCORRHIZA, MAIZE, NPK , AND SURFACTANT IN CHEMICAL CHARACTERISTICS OF CONTAMINATED SOIL WITH PETROLEUM

ABSTRACT

The greenhouse experiment was conducted to evaluate the potential of arbuscular mycorrhizal fungi (FMAs), maize seedlings, fertilizer and chemical surfactant as the ability to influence the chemical characteristics of a soil contaminated with oil. The experimental design was completely randomized blocks performed, being 14 treatments: 1) uncontaminated control Soil, 0%; 2) plant, 0%; 3) soil with NPK, 4%; 4) control contaminated Soil, 4%; 5) soil with Surfactant, 4%; 6) soil with NPK + surfactant, 4%; 7) plant, 4%; 8) NPK +Plant, 4%; 9) surfactant + Plant, 4%; 10) NPK + Plant + surfactant, 4%; 11) Plant + FMA, 4%; 12) Plant + FMA + NPK, 4%; 13) Plant + FMA + surfactant, 4%; 14) Plant + FMA + NPK + surfactant, 4%. The treatments were evaluated after 60 and 120 days. Mixed inoculation with FMAs species (*Rhizofagus clarum* e *Gigaspora margarita*) was used. The experimental unit was composed of containers with 2 kg of substrate, containing three mayze seedlings. After 60 and 120 days, the chemical characteristics: pH, C, H, N and P, c/n ratio, organic carbon, organic compounds extracted by dichloromethane and solvent n-alkanes degradation in soil were determined. The phytoremediation combined to bioaugmentation and biostimulation process favored the chemical properties in relation to soil under natural attenuation (4%) of the contaminated soils. There was a reduction of the C:N relationship and increase organic carbon to 120 days. The levels of organic compounds extracted by dichloromethane solvent were significantly lower in treated soils with corn seedlings in relation to other treatments. The degradation of n-alkanes in soils treated by bioremediation and phytoremediation processes presented results equivalent to those held under the soils natural attenuation. To 60 days the oil-contaminated soils treated with the combination of maize + AMF + NPK were more responsive compared to other remediation treatments and degradation of n-alkanes.

Index terms: phytoremediation, bioremediation.

1. INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera é uma das que sofre grandes quantidades de penalidades por danos causados ao meio ambiente, principalmente nos setores de exploração, transporte e armazenagem. Isto gera graves consequências, como a contaminação do solo, provocando impactos econômicos, ambientais e sociais. Quando o solo é contaminado, o valor de mercado da propriedade é afetado, devido aos custos de limpeza, as altas penalidades e as multas impostas pelas violações ambientais, gerando-se passivo ambiental (Galdino et al., 2004). Além disso, a sociedade se torna cada vez mais preocupada diante dos perigos que poderão expô-las ao passivo. Dentre os poluentes ambientais derivados do petróleo, estão os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) que possuem efeitos tóxicos, mutagênicos e propriedades cancerígenas (IARC, 2011).

Para a recuperação de solos contaminados por petróleo e seus derivados, técnicas que utilizem processos biotecnológicos tendem a ser mais eficientes e menos onerosas que os processos químicos. Uma técnica biotecnológica eficaz na recuperação de solos contaminados por petróleo é a fitorremediação (Nie et al., 2011; Pacwa-Płociniczak et al., 2011; Lamego e Vidal, 2007). Em contraste com a maioria das técnicas de remediação, a fitorremediação oferece várias vantagens, como o baixo custo, devido à ausência de equipamentos que consomem energia e manutenção limitada, não oferece impacto negativo ao meio ambiente, não é invasivo e torna o solo intacto e biologicamente ativo. Além disso, trata-se de um processo biológico eficaz no tratamento de solos contaminados, que favorece o controle da erosão e restauração do local no solo (Van Aken et al., 2010; Wenzel, 2009).

O milho (*Zea mays* L.) tem sido indicado como uma espécie com potencial fitorremediador em solos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo (Ogbo, 2009; Huang et al., 2007; Lin et al., 2007; Mendez-Natera, 2004; Ogboghodo et al., 2004; Quiñones-Aguilar et al. 2003). Além disso, o milho oferece uma vantagem em programas de fitorremediação de solos contaminados com petróleo, devido à destinação do material vegetal à produção de biodiesel, evitando-se a bioacumulação ao longo da cadeia trófica.

Para aumentar a biodegradação de petróleo no solo, algumas outras estratégias também têm sido adotadas, como a bioaugmentação e a bioestimulação. A bioestimulação consiste no favorecimento das condições ambientais (teor e disponibilidade de nutrientes inorgânicos, aeração, pH e dentre outros) para estimular a ação dos microrganismos presentes no material contaminado (Magalhães e Cunha, 2003). Com a aplicação de fertilizantes no solo, os microrganismos presentes no sistema são estimulados podendo acelerar a biodegradação de hidrocarbonetos que são utilizados como fonte de carbono. Da mesma forma, os surfactantes, que são moléculas anfipáticas (ou anfifílicas) com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, obtidos a partir de sínteses químicas ou produzidos por microrganismos (biosurfactantes) têm sido utilizados para emulsificar e aumentar a solubilidade dos contaminantes hidrofóbicos no solo, tornando-os disponíveis para o ataque microbiano (Colla e Costa, 2003), e reduzir a repelência do solo à água (Roy e McGill, 2000).

Outra técnica é a bioaugmentação, onde microrganismos com capacidade de degradar determinados poluentes são aplicados no processo de remediação. Diversas espécies são selecionadas e introduzidas no meio para auxiliar na conversão desses poluentes em substâncias menos tóxicas (Magalhães e Cunha, 2003). A inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no sistema de fitorremediação, por exemplo, pode contribuir para reduzir os efeitos tóxicos induzidos pelo petróleo (Alarcón et al., 2008) e também contribuir na estrutura física e química das partículas do solo (Harms et al., 2011; Alarcón et al., 2006).

Entretanto, estudos que avaliem a contribuição dos FMAs durante o processo de fitorremediação na estrutura de solos contaminados por hidrocarbonetos derivados do petróleo ainda são escassos na literatura. Da mesma forma, apesar das vantagens apresentadas na inoculação com FMAs no sistema de fitorremediação, ainda é necessário intensificar pesquisas que avaliem a potencialidade destes microrganismos sob condições de clima tropical, uma vez que a maior parte das pesquisas é realizada em países de clima temperado.

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de FMAs, mudas de milho, fertilizante e surfactante químico quanto à capacidade de influenciar as características químicas de um solo contaminado com petróleo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local e delineamento experimental

O experimento foi realizado em casa de vegetação no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) (Latitude= 21° 19' 23"; Longitude = 41° 10' 40" W; Altitude= 14 m), em Campos dos Goytacazes – RJ, durante o período de setembro a dezembro de 2012. A temperatura variou de 12,6°C a 49,6°C e a temperatura média mensal foi de 29,4 °C.

As análises foram realizadas no Laboratório de Solos (LSOL/CCTA) setor de Microbiologia do Solo e no Laboratório de Engenharia e Produção de Petróleo (LENEP/CCT), setor de Geologia e Geoquímica da UENF, localizado na cidade de Macaé – RJ.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, sendo 14 tratamentos: 1) Solo controle não contaminado, 0% (SOLO 0%); 2) Planta, 0% (PL 0%); 3) Solo com NPK, 4% (NPK); 4) Solo controle contaminado, 4% (SOLO 4%); 5) Solo com Surfactante, 4% (SFT); 6) Solo com NPK+surfactante, 4% (NPK + SFT); 7) Planta, 4% (PL 4%); 8) Planta + NPK, 4%; (PL+NPK); 9) Planta+surfactante, 4% (PL+SFT); 10) Planta+NPK+surfactante, 4% (PL+NPK+SFT); 11) Planta+FMA, 4% (PL+FMA); 12) Planta+FMA+NPK, 4% (PL+FMA+NPK); 13) Planta+FMA+surfactante, 4% (PL+FMA+SFT); 14) Planta+FMA+NPK+surfactante, 4% (PL+FMA+NPK+SFT). Os tratamentos foram avaliados aos 60 e 120 dias de condução experimental.

Os tratamentos permaneceram dispostos em blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições, totalizando-se 112 parcelas. A unidade experimental foi composta por vaso de barro de 2 kg de solo, e duas mudas em cada vaso. Não foram avaliados solos contaminados na ausência de plantas e com a inoculação de FMAs, por serem caracterizados como biotróficos obrigatórios.

Condução experimental

Para a realização do experimento, o solo classificado como Latossolo Amarelo, predominantemente argiloso, foi coletado na profundidade de 0-20 cm, peneirado em malha de 2 mm, misturado com areia lavada na proporção de 1:1 (v:v). Este solo apresentou as seguintes características: pH (água), 6,1; M.O. 12,07 g dm⁻³; P, 16,0 mg dm⁻³; S, 1,0 mg dm⁻³; K⁺, 2,4 mmol_cdm⁻³; Ca²⁺, 1,09 mmol_c dm⁻³; Mg²⁺, 6,6 mmol_c dm⁻³; Al³⁺, 0,0 mmol_c dm⁻³; H+Al, 11,9 mmol_c dm⁻³; SB, 20,20 mmol_c dm⁻³; CTC, 32,10 mmol_c dm⁻³; Fe, 118,72 mg dm⁻³; Cu, 0,55 mg dm⁻³; Zn, 4,75 mg dm⁻³; Mn, 31,41 mg dm⁻³ e B, 0,37 mg dm⁻³.

O petróleo oriundo da Bacia de Campos (26º API) foi incorporado homogeneamente ao solo, simulando-se a contaminação, sob a concentração de 4% e foi distribuído em vasos. Posteriormente, o solo permaneceu incubado por 20 dias para ocorrer a volatilização de parte dos compostos voláteis. Os solos correspondentes aos tratamentos controles não foram contaminados, porém foram mantidos sob as mesmas condições experimentais em relação aos demais tratamentos. Foram realizadas análises geoquímicas dos solos contaminados e não contaminados referente ao período inicial do experimento.

Sementes do híbrido *Zea mays* L. (UENF 506, Safra 2012 e taxa de germinação: 96%) foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (0,5%) por 15 minutos, seguido de lavagem em água corrente e secagem à sombra. Em cada vaso correspondente aos tratamentos contendo NPK foram aplicados ao solo 4 g de adubo NPK 20-10-10, o equivalente a 2 ton/ha de fertilizante, conforme Chorom et al. (2010).

Foi utilizado um surfactante sintético de fácil obtenção comercial e de uso próprio para facilitar a indicação no processo de fitorremediação em solos contaminados com petróleo e óleo diesel. O surfactante químico utilizado foi o Lauril Eter Sulf. de Sódio (designação genérica empregada para o Dodecil Sulfato de Sódio - SDS). Foram aplicadas soluções aquosas do surfactante (10 mL), preparado em uma relação massa do surfactante por massa de solo correspondente a 4 mL kg⁻¹ ou 0,4%. Os solos dos tratamentos controles foram proporcionalmente umedecidos.

Para a multiplicação do inóculo, foram plantadas em vasos de cultura contendo 4 dm³ de solo autoclavado, dez sementes de *Zea mays* L. desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, durante 15 minutos, posteriormente

lavadas com água destilada, por quatro vezes consecutivas. Os inóculos destinados aos tratamentos contendo os FMAs (*Rhizophagus clarum* e *Gigaspora margarita*) foram obtidos a partir do Banco de Inóculo da Microbiologia do Solo, armazenados em câmara fria a 4°C. Foram adicionados 50 cm³ de inóculo de cada espécie de FMAs em cada vaso. Após o plantio, os vasos foram mantidos em casa de vegetação por um período de 90 dias. Seqüencialmente, as partes aéreas foram podadas e os vasos cobertos com folhas de papel, sem irrigação, por um mês, para facilitar a esporulação dos fungos. Transcorrido este período, o inóculo permaneceu conservado em câmara fria a 4°C. Para a contagem de esporos no inóculo foi realizado os métodos de decantação e peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e de centrifugação e flutuação em sacarose (Jenkins, 1964). A quantificação dos esporos foi realizada em placas de acrílico com anéis concêntricos, sob microscópio estereoscópico (40x).

As mudas foram previamente produzidas em bandejas de poliestireno expandido de 128 células. Foi plantada uma semente em cada célula, a 1,0 cm de profundidade. As mudas destinadas aos tratamentos fúngicos, foram inoculadas com a mistura de FMAs (*G. margarita* e *R. clarum*), correspondendo a 10% sobre o volume do solo experimental. As mudas foram obtidas aos 15 dias após a sementeira.

No momento da implantação experimental, foram transplantadas 6 mudas de *Zea mays* L. para os vasos dos respectivos tratamentos compostos por plantas. A inoculação com FMAs foi realizada de acordo com os tratamentos correspondentes. Para a inoculação das sementes foram adicionados 100 cm³ vaso⁻¹ do inóculo fúngico, contendo a mistura das espécies *Rhizophagus clarum* e *Gigaspora margarita*, correspondendo a 50 cm³ vaso⁻¹ de inóculo de cada espécie, contendo, respectivamente, 8.600 e 3.400 esporos. Os tratamentos controles (sem FMAs) receberam 100 cm³ vaso⁻¹ do substrato autoclavado utilizado durante a preparação do inóculo (sem FMAs), para manter o equilíbrio da microbiota do solo. A aplicação foi realizada entre 2 a 3 cm abaixo da superfície do substrato.

Aos 30 dias após a sementeira, foi realizado o desbaste das mudas, deixando-se duas plantas mais vigorosas em cada vaso. A aplicação de nitrogênio foi realizada utilizando-se como fonte nitrato de potássio, correspondente a 200 g Kg⁻¹, parcelados em duas aplicações, com intervalos de

20 dias. A primeira fase experimental foi finalizada aos 60 dias de condução experimental. As plantas foram cortadas e retiradas do solo.

Sequencialmente, os solos de todos os tratamentos foram revolvidos para proporcionar maior aeração. A condução experimental foi realizada sob as mesmas condições da primeira fase, com o transplante de novas mudas produzidas 15 dias após a semeadura, reinoculação 100 dm³ de FMAs, aplicação de 4 g de NPK por vaso. Entretanto, o surfactante não foi reaplicado em função da sua toxicidade sobre as plantas e a microbiota do solo.

Irrigações diárias foram realizadas durante todo o período de condução experimental. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação por um período total de 120 dias de condução experimental.

Os solos foram revolvidos, homogeneizados e coletados aos 60 e 120 dias de condução experimental. A quantidade de amostra coletada foi de 400g. Estas foram secas ao ar, destorroadas e passadas em peneira com malha de 2,0 mm, para obtenção de terra fina seca ao ar e procedidas as determinações químicas segundo Embrapa (1997), sendo acondicionadas e mantidas sob refrigeração, entre 4 e 8 °C, visando determinar a degradação dos hidrocarbonetos.

Caracterização química dos solos

A análise do pH foi realizada de acordo com a Embrapa (1999) e determinado potenciométricamente na suspensão solo-líquido de 1:2. O carbono orgânico total foi analisado de acordo com o método descrito por Anderson e Ingram (1996). Os teores fósforo extraível por Mehlich⁻¹ foram determinados por colorimetria, de acordo com a EMBRAPA (1999). A quantificação do carbono total, hidrogênio, nitrogênio total: nitrogênio (relação C:N) foi obtida pelo processo de combustão seca em analisador (Perkin Elmer 2400-Series II elemental analyzer A). O carbono orgânico no solo foi determinado pela oxidação com K₂Cr₂O₇ 1,25 mol_c L⁻¹ em meio ácido (Anderson e Ingram, 1996).

Extração de compostos orgânicos e degradação de n-alcenos nos solos

Os extratos foram obtidos a partir da mistura de 10 g de solo úmido, 5 g de sulfato de sódio anidro calcinado (400°C por 1 hora) e 10 mL do solvente diclorometano em um recipiente hermeticamente fechado, realizado de acordo com Baptista (2003). A mistura permaneceu sob agitação (TECNAL TE - 420), a

uma temperatura de 25°C e rotação de 200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro recipiente utilizando-se papel de filtro quantitativo (15 cm, com permeabilidade ao ar de 3 l/s m² com poros de 8 µm; filtração lenta). Em seguida, o processo de extração foi repetido, adicionando-se ao solo 10 mL de diclorometano, que permaneceu sob agitação por 10 minutos e, sequencialmente, filtrado sob as mesmas condições. O extrato com o solvente foi mantido sob temperatura ambiente por 6 dias e após a sua evaporação, foram quantificados os recipientes contendo o extrato. O teor de compostos orgânicos extraídos com o solvente diclorometano foi quantificado, conforme a metodologia descrita por Baptista (2003). O extrato foi obtido pela diferença de peso do recipiente contendo compostos orgânicos totais extraídos pelo diclorometano e o recipiente vazio, conforme a equação:

$$\text{Teor de COT do Extrato (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{(P_1 - P_0) * 1000}{m}$$

Onde:

- Teor de COT do Extrato = teor dos compostos orgânicos totais extraídos do solo obtido pelo solvente diclorometano [mg/g]
- P₁= massa do recipiente contendo o extrato com os compostos orgânicos extraído do solo [g]
- P₀= massa do recipiente vazio [g]
- m= massa do recipiente utilizado [g].

O cálculo dos teores de COT do extrato de cada tratamento foi realizado nos períodos de 60 e 120 dias de condução experimental. Além disso, para quantificar a redução relativa dos teores de compostos orgânicos totais extraídos pelo solvente diclorometano, em relação ao controle contaminado em 4%, foi utilizada a seguinte equação: [RR%= 100(x-y)/y], sendo x: teor de compostos orgânicos extraídos a partir do respectivo tratamento de remediação dos solos, e y: teor de compostos orgânicos extraídos a partir de solos contaminados em 4% de petróleo.

Foram realizadas determinações de n-alcenos por frações de saturados através de análises geoquímicas do óleo extraído, com o objetivo de qualificar as mudanças na composição química do óleo submetido às diferentes condições

experimentais avaliadas. A determinação dos hidrocarbonetos foi realizada pelo setor de Geologia e Geoquímica da UENF, localizado na cidade de Macaé – RJ.

Para realizar a separação das frações do petróleo pelo método de cromatografia líquida em coluna, preparou-se a amostra pesando-se 0,04g de petróleo extraído do solo em um vidro de relógio. Em seguida, adicionou-se alumina e diclorometano que foram homogeneizados com a amostra de petróleo. Deixou-se o solvente evaporar e transferiu-se a mistura para coluna onde foi feita a separação das frações do petróleo. A coluna foi preparada empacotando-a com sílica gel, ativada durante 12h na estufa, utilizando-se n-hexano como solvente. Para retirada da primeira fração do petróleo constituída de compostos saturados foi adicionado à coluna, com a mistura, 15 mL de n-hexano. Em seguida para retirada da segunda fração do petróleo constituída de compostos aromáticos foi adicionado à coluna 15 mL de diclorometano. As frações foram recolhidas em béckers de massas conhecidas, assim por diferença conseguiu-se obter as massas das frações contidas em 0,04g de petróleo.

Além das amostras que passaram pelos tratamentos mencionados, foi realizada a separação das frações por cromatografia líquida de amostras extraídas do solo contaminado e não contaminado com petróleo no estágio inicial do experimento. A análise química dos componentes das frações do petróleo foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM). As frações de saturados foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, em uma concentração de 0,01 mg/μl onde foi analisado o íon m/z 85 (alcanos).

- **Cromatografia Líquida**

As amostras de óleo presentes no solo foram fracionados em coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh; Merck), previamente ativada em estufa a 120 °C durante 12 h, obtendo-se três frações distintas: i) hidrocarbonetos saturados (F1), eluídos com 30 mL de *n*-hexano, ii) hidrocarbonetos aromáticos (F2), eluídos com 30 mL de diclorometano e iii) compostos polares (F3), eluídos com 30 mL de metanol. Já as amostras de óleo presentes na parte aérea da planta foram fracionadas em coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh; Merck), previamente ativada em estufa a 120 °C durante 12 h, obtendo-se três frações distintas: i) hidrocarbonetos saturados (F1), eluídos com 5 mL de *n*-hexano, ii)

hidrocarbonetos aromáticos (F2), eluídos com 5 mL de diclorometano e iii) compostos polares (F3), eluídos com 5 mL de metanol (Wang et al., 1996).

As frações foram recolhidas em béqueres, no qual o solvente foi evaporado, e estes posteriormente pesados. Por fim, as frações foram transferidas quantitativamente para frascos de cor âmbar, devidamente etiquetados, utilizando-se de *n*-hexano para a fração F1 e diclorometano para a fração F2. Os frascos foram mantidos em capela à temperatura ambiente para evaporação do solvente, e posteriormente armazenados para posteriores análises por cromatografia gasosa.

- ***Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)***

Para avaliação dos biomarcadores saturados as frações F1 foram analisadas no laboratório de Geoquímica (LENEP/UENF) em um cromatógrafo em fase gasosa Agilent 6890N, equipado com uma coluna D-B5 MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme), acoplado a um detector seletivo de massas Agilent 5973 MSD. A programação de temperatura utilizada foi: temperatura inicial de 60 °C por 2 minutos, a seguir foi realizado um aquecimento a uma taxa de 22 °C/min até 200 °C, sendo mantida a esta temperatura por 3 minutos. Uma nova rampa de aquecimento foi estabelecida, partindo de 200 °C, com taxa de aquecimento de 3 °C/min, chegando a 300 °C, e finalmente permanecendo nesta temperatura por mais 25 minutos.

A temperatura do injetor do cromatógrafo foi de 300 °C e da linha de transferência foi de 280 °C. Utilizou-se o método de monitoramento seletivo de íons. Os resultados qualitativos das análises gerados por esse método foram processados pelo sistema Agilent Chemstation.

Já para a avaliação dos biomarcadores aromáticos analisou-se as frações F2, também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em um equipamento com as mesmas especificações citadas anteriormente. A programação de temperatura utilizada foi: temperatura inicial de 70 °C por 1 minuto, a seguir foi realizado um aquecimento a uma taxa de 22 °C/min até 110 °C, sendo mantida a esta temperatura por 1 minuto. Uma nova rampa de aquecimento foi estabelecida, partindo de 110 °C, com taxa de aquecimento de 1,5 °C/min, chegando a 200 °C, sendo mantida a esta temperatura por 1 min. E

então novamente um aquecimento de 3,0 °C/min, chegando a 300 °C, e finalmente permanecendo nesta temperatura por mais 10 minutos.

A temperatura do injetor do cromatógrafo foi de 300 °C e da linha de transferência foi de 280 °C. Utilizou-se o método de monitoramento seletivo de íons. Os resultados qualitativos das análises gerados por esse método foram processados pelo sistema Agilent Chemstation.

Para a obtenção dos resultados finais das concentrações de n-alcenos no solo, os valores das médias obtidas pelo solo não contaminado (0%) no tempo inicial (Tempo 0) foram descontados nas concentrações de todos os tratamentos avaliados, assim como, as concentrações obtidas pelo tratamento planta 0%, em relação a todos os tratamentos que continham planta (4%) aos 60 e 120 dias de condução experimental.

Análise estatística

Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância e à comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade através do programa SISVAR 5.3 Build 77 (Ferreira, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização química dos solos

Foi observado que o pH dos solos não contaminados e contaminados com petróleo foram influenciado pelos tratamentos, em função dos períodos de condução experimental (Tabela 1). Aos 60 dias de condução experimental, os tratamentos que continham NPK apresentaram redução significativa no pH em relação aos demais tratamentos. Entretanto, de modo geral, o pH do solo de todos os tratamentos apresentou variação na faixa de 5.

A faixa ideal de pH para que os microrganismos tenham atividade máxima é entre 6,5 e 8,5 (Andrade et al., 2010). Em solos ácidos o desenvolvimento dos microrganismos é bastante reduzido, principalmente das bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico, além de tornar o fósforo de difícil

aproveitamento pelos vegetais. Nesta situação, embora a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo seja, na maioria das vezes, realizada por bactérias, os fungos podem ser mais eficientes do que as bactérias para agirem em condições ambientais adversas, como em valores extremos de pH (menor que 5 e maior que 10), em concentrações limitantes de nutrientes e de umidade (Vidali, 2001). Desta forma, isto pode favorecer a aplicação de fungos micorrízicos arbusculares na remediação de solos contaminados, que pode ser uma opção considerada bastante viável, uma vez que baixos teores de P no solo podem favorecer a sua eficiência no processo de associação com a planta e degradação de petróleo no solo.

Tabela 1. pH do solo em função de diferentes tratamentos de remediação aos 60 e 120 dias de condução experimental

Tratamentos*	pH (H ₂ O)	
	60 dias	120 dias
SOLO 0%	5,91 dB	5,67 abcA
PL 0%	5,93 dA	5,80 cA
SOLO 4%	5,94 dA	5,81 cA
NPK	5,48 abA	5,59 abcA
SFT	5,59 abcdA	5,77 cA
NPK + SFT	5,36 aA	5,73 bcB
PL 4%	5,90 dA	5,74 cA
PL+NPK	5,40 aA	5,60 abcA
PL+SFT	5,87 cdA	5,72 bcA
PL+NPK+SFT	5,51 abcA	5,56 abcA
PL+FMA	5,79 bcdA	5,71 bcA
PL+FMA+NPK	5,28 aA	5,31 aA
PL+FMA+SFT	5,83 bcdA	5,67 abcA
PL+FMA+NPK+SFT	5,37 aA	5,36 abA
Médias	5,65	5,64
CV (%)	2,7	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à porcentagem de carbono total, hidrogênio e nitrogênio total no solo, foi observada variação entre os tratamentos, independentemente do tempo de condução experimental (Tabela 2). Os solos não contaminados dos tratamentos controles SOLO 0% e com planta a 0% (PL 0%), apresentaram porcentagens de C e H inferiores em comparação com os demais tratamentos, ao

passo que o tratamento controle SOLO 4% apresentou o maior valor de C e H no solo. Os valores de C em todos os solos contaminados e que receberam inoculação com FMAs, foram inferiores aos solos contaminados tratados sem a inoculação micorrízica. As porcentagens de N total nos solos contaminados com petróleo, e tratados sob diferentes condições, não apresentaram variação quando comparadas ao controle SOLO 4%. Os solos tratados com NPK e surfactantes apresentaram maiores porcentagens de C, H e N em relação aos controles SOLO 0% e SOLO 4%, respectivamente. Apesar da aplicação de NPK poder estimular a microbiota do solo e aumentar a biodegradação do contaminante, o surfactante pode ser um fator limitante, podendo ser tóxico dependendo das condições edáficas. Além disso, independentemente do efeito entre os diferentes tratamentos nos solos, foi observado que as porcentagens de C, H e N no solo foram significativamente maiores após 120 dias de condução experimental.

Foi observado que a relação C:N e a porcentagem de carbono orgânico no solo foram influenciados pelos tratamentos, aos 60 e 120 dias de condução experimental (Tabela 3). A relação C:N no solo de todos os tratamentos foi significativamente maiores aos 60 dias do que aos 120 dias de condução experimental. Em função de sua própria composição, a contaminação com petróleo levou ao aumento na quantidade de carbono do solo, elevando a relação C:N no solo, em comparação com os tratamentos controle (SOLO 0% e PL 0%). Aos 60 dias de condução experimental, todos os tratamentos não contaminados apresentaram menor relação C:N, em comparação com os solos controles contaminados em 4% de petróleo. Aos 120 dias, a relação C:N no solo entre os diferentes tratamentos apresentou resultados semelhantes e a menor relação C:N foi observada nos tratamentos PL+FMA e PL+FMA+NPK, quando comparada ao tratamento SOLO 4%.

Tabela 2. Carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) orgânico no solo de diferentes tratamentos de remediação aos 60 e 120 dias de condução experimental

Tratamentos*	C (%)			H (%)			N (%)		
	60 dias	120 dias	Média	60 dias	120 dias	Média	60 dias	120 dias	Média
SOLO 0%	2,21	2,80	2,51 a	0,53	0,82	0,67 ab	0,15	0,73	0,44 a
PL 0%	1,86	2,48	2,17 a	0,37	0,66	0,52 a	0,16	0,77	0,46 ab
SOLO 4%	8,09	8,18	8,14 f	1,29	1,45	1,37 d	0,24	0,78	0,51 abc
NPK	7,30	8,03	7,66 def	1,12	1,38	1,25 cd	0,24	0,83	0,54 bc
SFT	6,77	8,59	7,68 def	1,05	1,54	1,29 cd	0,23	0,82	0,53 abc
NPK + SFT	7,28	8,59	7,94 ef	1,11	1,52	1,32 cd	0,25	0,87	0,56 c
PL 4%	6,91	7,39	7,15 cdef	1,10	1,36	1,23 cd	0,25	0,82	0,53 bc
PL+NPK	6,11	7,06	6,58 bcdef	0,92	1,30	1,11 bc	0,24	0,86	0,55 bc
PL+SFT	5,74	6,68	6,21 bcde	0,88	1,30	1,09 cd	0,20	0,82	0,51 abc
PL+NPK+SFT	6,38	6,39	6,38 bcdef	1,08	1,27	1,17 cd	0,26	0,76	0,51 abc
PL+FMA	5,62	4,85	5,23 b	0,88	0,99	0,94 bc	0,22	0,76	0,49 abc
PL+FMA+NPK	5,32	6,01	5,66 bc	0,76	1,23	0,99 bcd	0,21	0,84	0,52 abc
PL+FMA+SFT	5,62	6,46	6,04 bcd	0,86	1,33	1,09 cd	0,22	0,82	0,52 abc
PL+FMA+NPK+SFT	6,04	6,22	6,13 bcde	0,99	1,26	1,12 cd	0,25	0,84	0,54 bc
Médias	5,80 A	6,41 B		0,92 A	1,24 B		0,22 A	0,81 B	
CV (%)		17,1			20,9			10,3	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Solo controle não contaminado, 0% (SOLO 0%); Planta, 0% (PL 0%); Solo com NPK, 4% (NPK); Solo controle contaminado, 4% (SOLO 4%); Solo com Surfactante, 4% (SFT); Solo com NPK+surfactante, 4% (NPK + SFT); Planta, 4% (PL 4%); Planta + NPK, 4%; (PL+NPK); Planta+surfactante, 4% (PL+SFT); Planta+NPK+surfactante, 4% (PL+NPK+SFT); Planta+FMA, 4% (PL+FMA); Planta+FMA+NPK, 4% (PL+FMA+NPK); Planta+FMA+surfactante, 4% (PL+FMA+SFT); Planta+FMA+NPK+surfactante, 4% (PL+FMA+NPK+SFT).

Tabela 3. Relação C/N, carbono orgânico e fósforo (P) no solo em função de diferentes tratamentos de remediação aos 60 e 120 dias de condução experimental

Tratamentos*	Relação C:N		Carbono orgânico (%)		P mg kg ⁻¹	
	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias
SOLO 0%	14,76 bB	3,83 aA	1,92 abA	2,31 aA	13,63 aA	12,50 abA
PL 0%	11,56 aB	3,23 aA	1,42 aA	2,49 aA	10,00 aA	12,65 abA
SOLO 4%	33,58 gB	10,46 dA	7,37 cA	10,13 bcB	8,25 aA	11,13 abA
NPK	30,06 fB	9,67 cdA	6,28 cA	10,01 bcB	14,25 aA	35,38 eB
SFT	29,33 efB	10,47 dA	6,89 cA	11,88 bcB	6,75 aA	10,63 aA
NPK + SFT	29,20 efB	9,88 cdA	6,75 cA	13,32 cB	12,63 aA	30,50 deB
PL 4%	27,64 defB	9,05 bcdA	6,09 cA	11,76 bcB	10,25 aA	16,00 abcB
PL+NPK	25,36 cdB	8,25 bcdA	6,67 cA	9,79 bcB	13,13 aA	20,75 bcB
PL+SFT	28,44 defB	8,17 bcdA	5,61 bcA	8,72 bB	8,00 aA	10,38 aA
PL+NPK+SFT	24,36 cB	8,56 bcdA	7,15 cA	8,65 bA	14,25 aA	24,00 cdB
PL+FMA	25,65 cdB	5,92 abA	7,39 cA	8,35 bA	11,50 aA	10,13 aA
PL+FMA+NPK	25,87 cdB	7,18 bcA	5,50 abcA	9,99 bcB	11,63 aA	19,50 abcB
PL+FMA+SFT	26,24 cdeB	7,88 bcdA	6,30 cA	9,80 bcB	8,50 aA	11,38 abA
PL+FMA+NPK+SFT	24,16 cB	7,46 bcdA	6,89 cA	9,43 bcB	11,13 aA	18,38 abcB
Médias	25,44	7,86	5,87	9,04	10,99	17,38
CV (%)	7,7		22,6		27,9	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Solo controle não contaminado, 0% (SOLO 0%); Planta, 0% (PL 0%); Solo com NPK, 4% (NPK); Solo controle contaminado, 4% (SOLO 4%); Solo com Surfactante, 4% (SFT); Solo com NPK+surfactante, 4% (NPK + SFT); Planta, 4% (PL 4%); Planta + NPK, 4%; (PL+NPK); Planta+surfactante, 4% (PL+SFT); Planta+NPK+surfactante, 4% (PL+NPK+SFT); Planta+FMA, 4% (PL+FMA); Planta+FMA+NPK, 4% (PL+FMA+NPK); Planta+FMA+surfactante, 4% (PL+FMA+SFT); Planta+FMA+NPK+surfactante, 4% (PL+FMA+NPK+SFT).

A contaminação do solo com hidrocarbonetos de petróleo tem um efeito negativo sobre o ecossistema do solo e ciclagem de nutrientes. As populações microbianas podem ser inibidas por este tipo de contaminação, mas alguns microrganismos, que usam os hidrocarbonetos como fontes de carbono sobrevivem e aumentam a sua atividade metabólica sobre estas condições de estresse. A dimensão e duração destes efeitos dependerão da natureza do contaminante de hidrocarbonetos e das características do solo. A inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no sistema de fitorremediação pode influenciar a estrutura física e química das partículas do solo (Harms et al., 2011; Nie et al., 2011; Alarcón et al., 2006).

Foi possível observar que a porcentagem de carbono orgânico obtida entre os tratamentos de solos contaminados com petróleo foi significativamente superiores aos 120 dias de condução experimental, com exceção dos tratamentos PL+NPK+SFT e PL+FMA (Tabela 3). Os solos contaminados apresentaram valores significativamente maiores quando comparados com os solos não contaminados. Em contrapartida, não foram observadas diferenças expressivas entre as porcentagens de carbono orgânico dos tratamentos de remediação, quando comparadas aos solos dos tratamentos controles contaminados com petróleo em 4%.

Um procedimento de extrema importância em solos contaminados com petróleo durante a remediação é o conhecimento prévio do teor de matéria orgânica no solo (MOS), o qual pode ser expresso pela quantidade de carbono orgânico total no meio. A presença de altas taxas de matéria orgânica e de argila pode afetar a extensão da biodegradação do contaminante no solo, devido à adsorção, ao efeito sobre as comunidades microbianas (Joergensen et al., 1997) e a uma diminuição da acessibilidade a microrganismos (De Jonge et al., 1997; Providenti et al., 1993). Ao avaliar as concentrações de hidrocarbonetos utilizando três solventes em solos com características físicas e químicas diferentes, Pons-Jiménez et al. (2011) observaram que as maiores concentrações de hidrocarbonetos totais, foram encontradas em solos com maiores teores de matéria orgânica no solo. A baixa solubilidade em água e baixa polaridade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são fatores que fazem com que estes se convertam em compostos com alta capacidade de serem adsorvidos pela matéria orgânica do solo.

De acordo com Dorn et al. (2000), solos contaminados com petróleo pesado (com <5% de óleo de v / v) com alto teor de carbono orgânico (4,7%) e recuperados através da biorremediação (com aeração e relação C:N:P 100:1:0,2), apresentaram menor toxicidade e pouco impacto nas populações de organismos no solo. Sob estas condições, não houve correlação direta entre a concentração de hidrocarbonetos totais no petróleo e toxicidade. Estes autores sugeriram ainda, que a resposta ativa da biorremediação do solo pode melhorar a recuperação do solo e reduzir a toxicidade de restauração funcional do solo para a colonização de organismos e reintrodução de plantas, incluindo o milho. Entretanto, altas concentrações de petróleo no solo podem prejudicar diretamente em seus processos fisiológicos pelo contato com estes contaminantes (Gomez, 2006).

Em relação ao teor de fósforo no solo (P), foi observado influência entre os tratamentos de remediação e o tempo de condução experimental (Tabela 3). Apesar de não ter ocorrido diferença estatística entre os tratamentos de remediação aos 60 dias, foi observado que aos 120 dias de condução experimental, devido à aplicação do fertilizante, os tratamentos contendo NPK e NPK+SFT nos solos contaminados em 4% de petróleo, apresentaram teores de P significativamente superiores ao controle PL0% e aos demais tratamentos, incluindo o controle PL4%.

Durante a remediação dos solos contaminados com petróleo, são adicionados ao solo contaminado, nutrientes para estimular a microbiota do solo e acelerar a degradação dos contaminantes, este processo de bioestimulação, geralmente é representado por nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), durante a biorremediação. As principais formas utilizadas são: nitrato de amônio (NH_4NO_3), di-hidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) e nitrato de potássio (KNO_3), respectivamente (Betancur-Galvis et al., 2006).

A disponibilidade de N e P é de extrema importância durante o processo de biodegradação de petróleo no solo. Quando ocorre a contaminação nos solos, diferentes microrganismos participam do processo de degradação. Cada microrganismo degrada um determinado componente do petróleo (isto é, alguns dos componentes da mistura complexa) e, teoricamente, durante a biodegradação são consumidos cerca de 150 mg de N e 30 mg P pelos microrganismos, para converter 1 g de hidrocarboneto para a biomassa microbiana (Rosemberg et al.,

1993). Assim que cada parte do óleo é degradada, diferentes microrganismos continuam o processo de degradação (Gerhardt et al., 2009).

Os componentes dos solos podem interferir diretamente na eficiência dos processos de degradação de contaminantes durante o processo de remediação de solos contaminados, podendo aumentá-la ou diminuí-la (Acioli et al., 2009). Desta forma, antes da escolha da técnica mais adequada para a remediação de solos contaminados com petróleo, é necessário avaliar as suas propriedades e como podem influenciar de forma positiva ou negativa durante o processo de remediação. Em função disso, em alguns casos, as técnicas de tratamento biológico e a fitorremediação não são indicadas. As condições físico-químicas do local contaminado (quantidade de matéria orgânica, disponibilidade de nutrientes, textura do solo, atividade microbiana, umidade, teor de oxigênio, pH e temperatura) são fatores determinantes na limitação e para o sucesso destas técnicas no processo de descontaminação do solo (Jing et al., 2008).

Avaliação de compostos orgânicos totais e degradação de n-alcenos nos solos

Os teores de compostos orgânicos totais extraídos pelo solvente diclorometano foram influenciados pelos diferentes tratamentos, independente do tempo de condução experimental (Tabela 4). Os teores destes compostos em todos os solos tratados com plantas foram significativamente menores em relação ao controle SOLO 4%, com redução relativa de 20,5% a 31,1%. As reduções dos compostos orgânicos totais nos solos dos tratamentos FMA+PLANTA e PL+FMA+NPK+SFT foram de 30,6% e 31,1%, respectivamente, em relação ao solo controle contaminado em 4% de petróleo. Além disso, independente dos tratamentos, os teores dos compostos orgânicos totais (extraídos a partir do solvente diclorometano) foram estatisticamente maiores aos 60 dias de condução experimental.

Tabela 4. Teor e redução relativa de compostos orgânicos totais extraídos pelo solvente diclorometano em solos contaminados e não contaminados com petróleo

Tratamentos*	Teor de compostos orgânicos extraídos pelo diclorometano (mg g ⁻¹)				
	60 dias	120 dias	Média	Total	*RR %
SOLO 0%	0,20	0,07	0,14 a	0,27 a	-
PL 0%	0,32	0,12	0,22 a	0,45 a	-
SOLO 4%	10,78	10,29	10,53 d	21,07 d	-
NPK	9,65	9,01	9,33 cd	18,66 cd	11,4
SFT	7,87	9,24	8,56 cd	17,11 bc	18,8
NPK + SFT	10,02	8,62	9,32 cd	18,64 cd	11,5
PL 4%	8,96	7,74	8,35 bc	16,70 bc	20,7
PL+NPK	7,50	7,34	7,42 bc	14,84 bc	29,6
PL+SFT	7,82	7,01	7,42 bc	14,84 bc	29,6
PL+NPK+SFT	7,77	7,87	7,82 bc	15,64 bc	25,8
PL+FMA	7,31	7,31	7,31 b	14,62 b	30,6
PL+FMA+NPK	8,34	7,16	7,75 bc	15,50 bc	26,4
PL+FMA+SFT	8,74	6,07	7,41 b	14,81 bc	29,7
PL+FMA+NPK+SFT	7,87	6,64	7,25 b	14,51 b	31,1
Médias	7,37 B	6,75 A		14,12	
CV (%)		15,6			10,8

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Solo controle não contaminado, 0% (SOLO 0%); Planta, 0% (PL 0%); Solo com NPK, 4% (NPK); Solo controle contaminado, 4% (SOLO 4%); Solo com Surfactante, 4% (SFT); Solo com NPK+surfactante, 4% (NPK + SFT); Planta, 4% (PL 4%); Planta + NPK, 4%; (PL+NPK); Planta+surfactante, 4% (PL+SFT); Planta+NPK+surfactante, 4% (PL+NPK+SFT); Planta+FMA, 4% (PL+FMA); Planta+FMA+NPK, 4% (PL+FMA+NPK); Planta+FMA+surfactante, 4% (PL+FMA+SFT); Planta+FMA+NPK+surfactante, 4% (PL+FMA+NPK+SFT).

*RR%: Redução relativa do teor de compostos orgânicos totais [RR%= 100(x-y)/y], sendo x: teor de compostos orgânicos extraídos a partir do respectivo tratamento de remediação dos solos, e y: teor de compostos orgânicos extraídos a partir de solos contaminados em 4% de petróleo.

A cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) revelou reduções na abundância molecular dos n-alcenos aos 60 e 120 dias após a condução experimental, e em relação à fase inicial (exceto o n-alceno C-18) (Figura 1). Entretanto, esta redução na abundância molecular de n-alcenos no solo controle contaminado em 4% não variou de forma expressiva entre os períodos de 60 e 120 dias de condução experimental.

As concentrações de n-alcenos mostraram que os efeitos dos tratamentos de remediação sobre a classe destes compostos foram desprezíveis na maioria dos solos tratados, quando comparados com o processo de atenuação natural (solo controle 4%), no qual os contaminantes são imobilizados ou degradados por processos biológicos, físicos e químicos sob condições naturais (Figura 2). Aos 60

dias de condução experimental, houve maior evaporação dos n-alcenos nos solos contaminados, sobretudo os alcanos de fração leve (C7-C16). O acúmulo de alcanos da fração pesada (C17-C31), aos 120 dias, elevou a concentração de n-alcenos por fração de saturados no solo em relação aos 60 dias.

Além disso, aos 60 dias de condução experimental (1ª Fase), a melhor resposta no que se refere à degradação de n-alcenos no solo foi obtida pelo tratamento composto por mudas de milho, fungos micorrízicos arbusculares e NPK (PL+FMA+NPK), em comparação com os demais tratamentos Figura 2 (9.A).

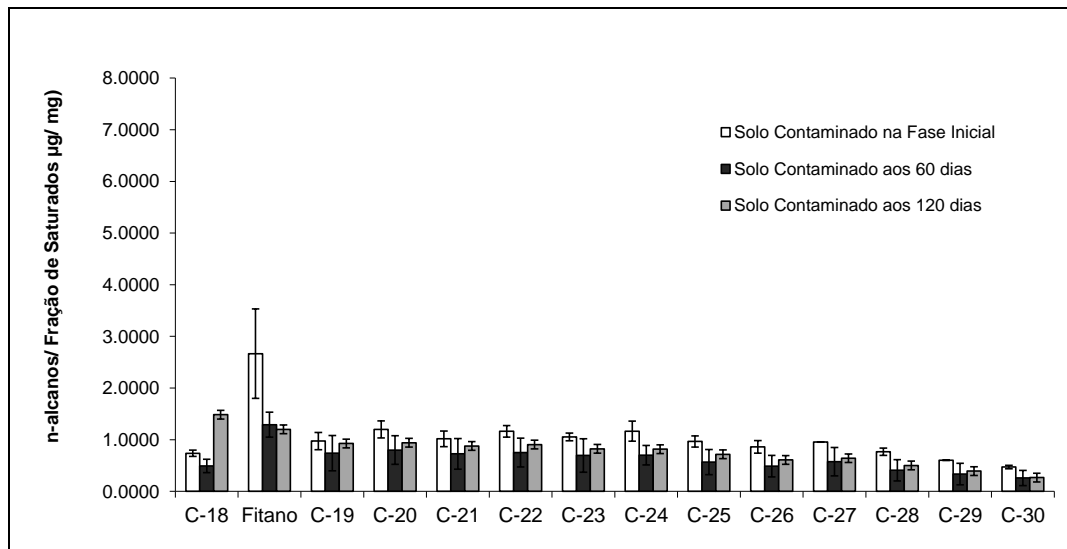


Figura 1. Média de n-alcenos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fração de saturados⁻¹) em solos contaminados com petróleo em 4% durante a fase inicial (Tempo 0) e aos 60 e 120 dias de condução experimental.

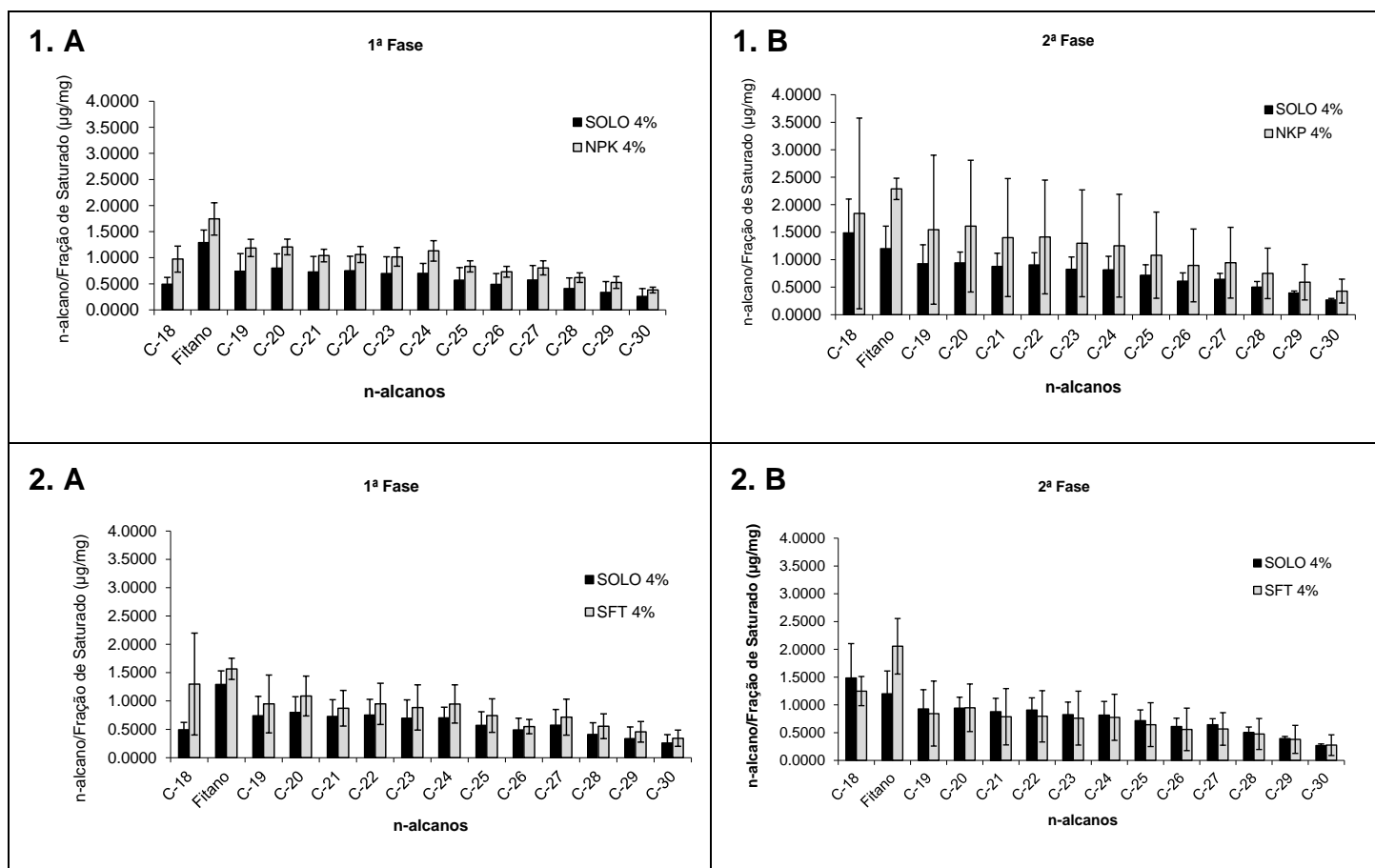


Figura 2. Média de n-alcenos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fração de saturados⁻¹) em solos contaminados com petróleo em 4%, tratados com NPK (1.A e 1.B) e surfactante (2.A e 2.B), em comparação com o solo mantido sob a atenuação natural (SOLO 4%), após 60 dias (1ª fase) e 120 dias (segunda fase) de condução experimental.

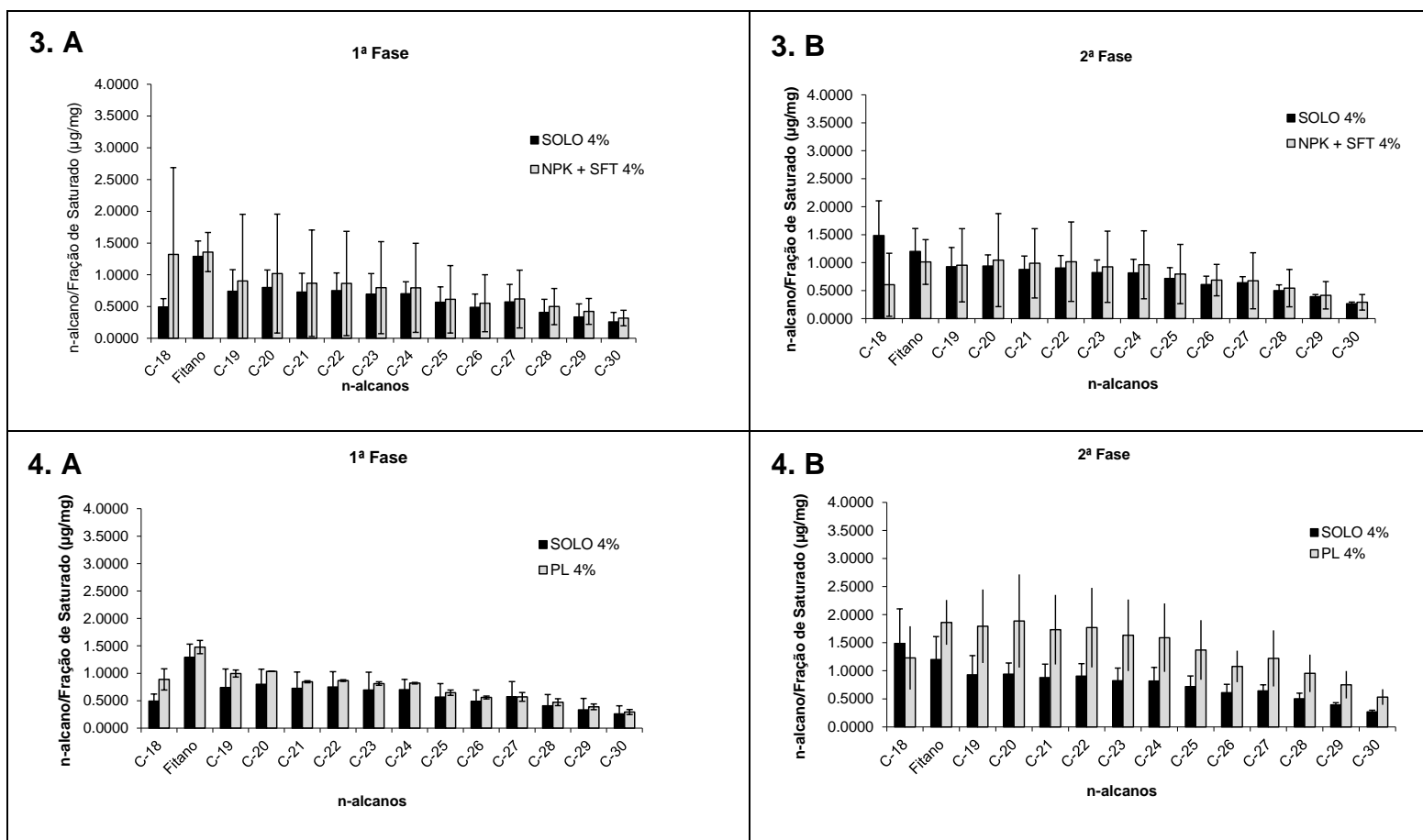


Figura 2. (Continuação) Média de n-alcenos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fração de saturados⁻¹) em solos contaminados com petróleo em 4%, tratados com NPK + surfactante (3.A e 3.B) e planta (4.A e 4.B), em comparação com o solo mantido sob a atenuação natural (SOLO 4%), após 60 dias (1ª fase) e 120 dias (segunda fase) de condução experimental.

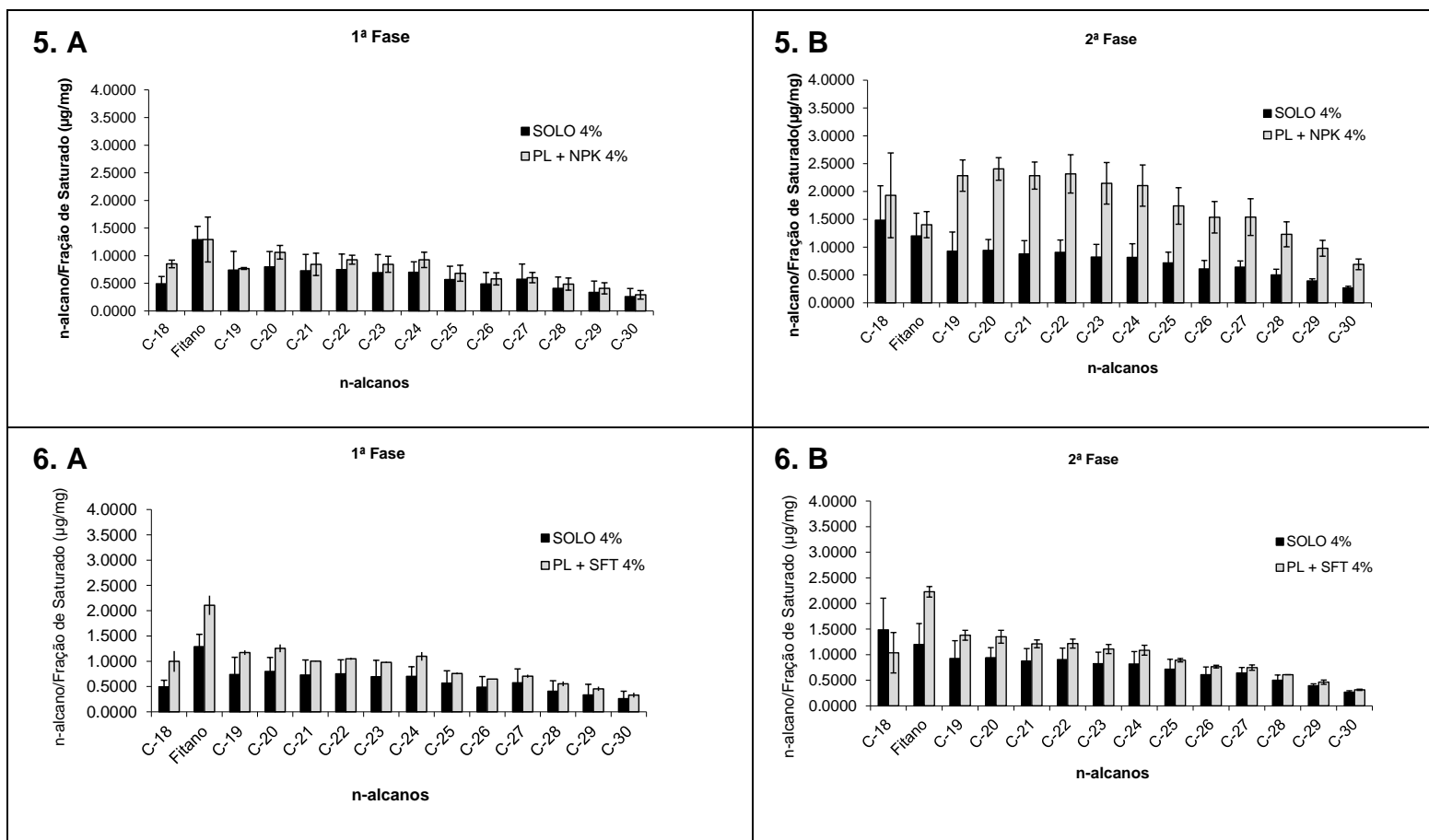


Figura 2. (Continuação) Média de n-alcenos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fração de saturados⁻¹) em solos contaminados com petróleo em 4%, tratados com planta + NPK (5.A e 5.B) e planta + surfactante (6.A e 6.B), em comparação com o solo mantido sob a atenuação natural (SOLO 4%), após 60 dias (1ª fase) e 120 dias (segunda fase) de condução experimental.

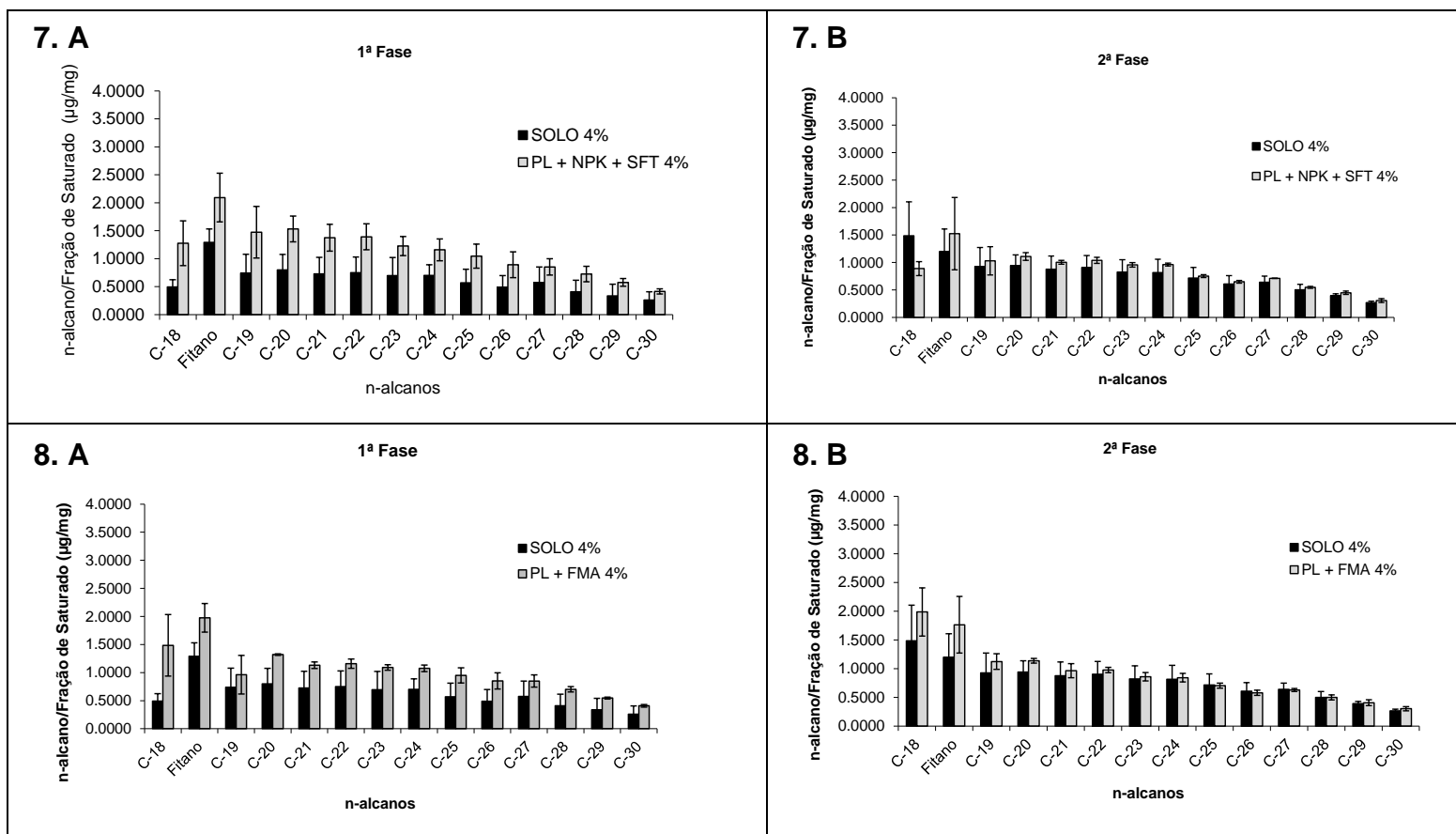


Figura 2. (Continuação) Média de n-alcenos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fração de saturados⁻¹) em solos contaminados com petróleo em 4%, tratados com planta + NPK + surfactante (7.A e 7.B) e planta + fungos micorrízicos arbusculares (8.A e 8.B), em comparação com o solo mantido sob a atenuação natural (SOLO 4%), após 60 dias (1ª fase) e 120 dias (segunda fase) de condução experimental.

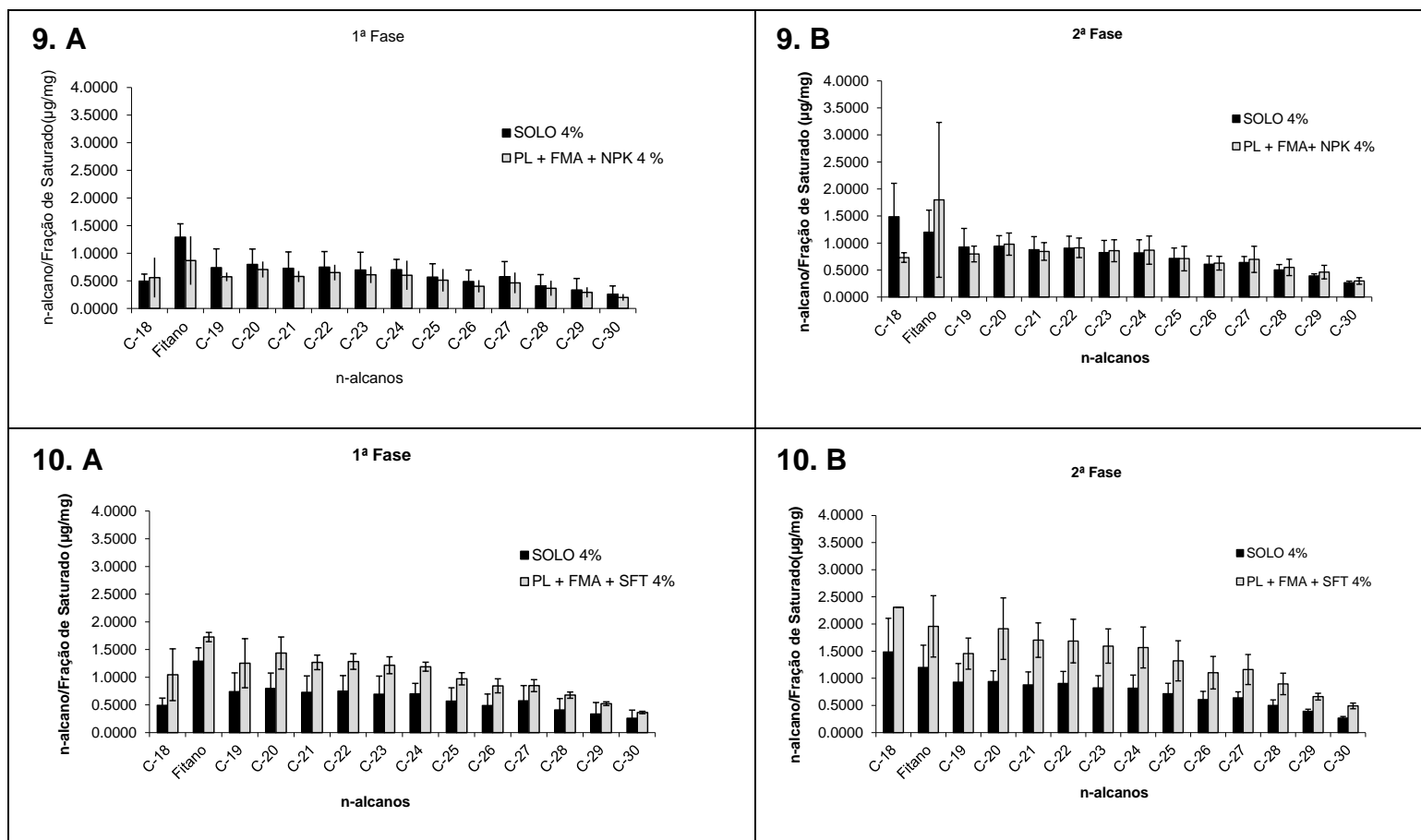


Figura 2. (Continuação) Média de n-alcenos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fração de saturados⁻¹) em solos contaminados com petróleo em 4%, tratados com NPK (1.A e 1.B) e planta (2.A e 2.B), em comparação com o solo mantido sob a atenuação natural (SOLO 4%), após 60 dias (1ª fase) e 120 dias (segunda fase) de condução experimental.

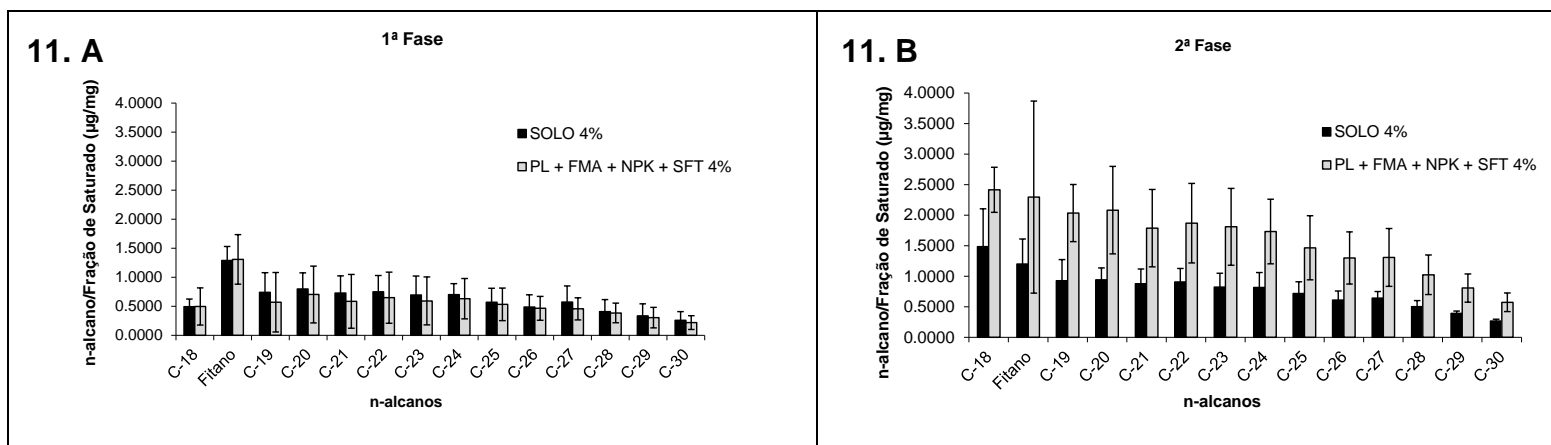


Figura 2. (Continuação) Média de n-alcenos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fração de saturados⁻¹) em solos contaminados com petróleo em 4%, tratados com NPK (1.A e 1.B) e planta (2.A e 2.B), em comparação com o solo mantido sob a atenuação natural (SOLO 4%), após 60 dias (1ª fase) e 120 dias (segunda fase) de condução experimental.

É possível que as plantas tenham participado do processo de biodegradação de outros diferentes compostos do petróleo no solo (como por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs). Entretanto, no presente estudo foi realizada apenas a análise de n-alcenos no solo que são preferencialmente biodegradados pelos microrganismos do solo.

Tem sido geralmente aceito na literatura que a suscetibilidade do ataque microbiano e das plantas aos hidrocarbonetos do petróleo no solo difere entre si. A suscetibilidade do ataque microbiano diminui na seguinte ordem: n-alcenos > alcanos ramificados > aromáticos de baixo peso molecular > alcanos cíclicos (Obbard et al., 2004). Estudos mostram que as plantas podem reduzir as concentrações lábeis de vários HPAs e quando associadas aos microrganismos, podem exsudar compostos que melhoram a disponibilidade destes contaminantes para a degradação (Fava et al. 2004; Makkar e Rochne, 2003). O destino dos HPAs e outros contaminantes orgânicos no ambiente está intimamente associado aos processos bióticos e abióticos, incluindo a volatilização, a fotoxidação, a oxidação química, a bioacumulação e a transformação pelos microrganismos.

A capacidade de metabolizar HPAs oriundos do solo pela planta tem sido demonstrada (Wild et al., 2005). Em geral, os compostos de HPAs com 2 e 3 anéis são mais voláteis e existem primariamente na fase gasosa da atmosfera, e tendem a ser depositados sobre as plantas por meio gasoso seco e /ou por deposição úmida. Os compostos de HPAs com 5 e 6 anéis são menos voláteis e provavelmente são depositados sobre a superfície da planta e ligados às partículas por deposição seca ou úmida. Para os compostos de pressão atmosférica intermediária (HPAs de 4 anéis, por exemplo), o composto orgânico gasoso é dependente da temperatura e do particionamento da partícula de HPAs estando sujeito às duas vias de deposição seca e úmida na forma gasosa e ligado às partículas (McVeety e Hites, 1967; Bidleman, 1988).

A técnica de bioaugmentação, aliada ao processo de fitorremediação, pode aumentar a exploração de maior volume de solo contaminado, através das hifas fúngicas, do que as raízes não micorrizadas (Gao et al., 2010; Joner e Leyval, 2003) e aumentarem a degradação de poluentes derivados do petróleo no solo (Hernández-Ortega, 2011; Gao et al., 2010). Devido à grande potencialidade dos FMA's em ambientes submetidos a estresses abióticos, estudos envolvendo FMA's têm sido desenvolvidos durante a fitorremediação de solos contaminados com:

óleo diesel em (Hernández-Ortega et al., 2011), óleo cru (Alarcón et al., 2008), BTEX (Volante et al., 2005), HPAs: fenantreno (Yu et al., 2011; Gao et al., 2010; Alarcón et al., 2006), pireno (Yu et al., 2011), benzo[α]pireno (Debiane et al., 2009; Alarcón et al., 2006; Liu et al., 2004), fluoreno (Gao et al., 2010), atrazina (Huang et al., 2007), antraceno, criseno e dibenzo(a,h) antraceno (Joner e Leyval, 2001).

De acordo com Göhre e Paszkowski (2006), a inoculação de FMAs pode favorecer o processo de fitoestimulação, imobilizando-se o contaminante na rizosfera e o processo de fitoextração, aumentando-se a capacidade de reter o contaminante na parte aérea e aumentar a biomassa das plantas.

Alarcón et al. (2008) observaram que a inoculação conjunta entre FMA (*Glomus intraradices*) + fungo filamentoso (*Cunninghamella echinulata*) no processo de fitorremediação, proporcionou a degradação de 59% de petróleo no solo contaminado em 6%. Além disso, a fitorremediação também foi aumentada pela inoculação individual destes fungos. A natureza hidrofóbica de compostos de petróleo limita severamente a sua aceitação pelas plantas e a inoculação de FMAs pode contribuir significativamente na fitorremediação de solos contaminados por petróleo (Alarcón et al., 2008). Contudo, poucos estudos na literatura evidenciam a contribuição de FMAs em solos contaminados com petróleo. Da mesma forma, é importante ressaltar que a maior parte dos estudos envolvendo a aplicação de milho no processo de fitorremediação está relacionada à contaminação por metais pesados no solo (Wuana e Okieimen, 2010; Göhre e Paszkowski, 2006).

A contribuição da inoculação com FMAs em mudas de milho em solos contaminados com o herbicida atrazina foi observada por Huang et al. (2007). Esses autores observaram que a inoculação com FMAs proporcionou maior degradação do composto orgânico nas raízes, com redução de 73,7% na concentração de atrazina ($5,0 \text{ mg kg}^{-1}$), ao passo que a redução do tratamento não inoculado foi de 31,4%.

Apesar de não ter sido realizado análises envolvendo os microrganismos hidrocarbonoclasticos no presente trabalho, é possível que os resultados obtidos pela biorremediação e fitorremediação nas concentrações de n-alcanos, estejam associados a uma combinação de fatores como a quantidade de oxigênio necessário para suprir as reações oxidativas das enzimas, reduzindo-

se a degradação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos e a elevada concentração de petróleo no solo.

As plantas podem exercer um papel importante na degradação dos hidrocarbonetos por influenciarem a sua biodisponibilidade. Conforme as raízes se desenvolvem, elas penetram através do solo, e expõem os contaminantes que estavam adsorvidos no solo e que estavam inacessíveis, aumentando assim, a sua disponibilidade para a degradação. Além disso, compostos são exsudados através das raízes e de microrganismos associados que aumentam a dessorção dos contaminantes do solo, além de agirem como surfactantes, aumentando a concentração disponível do contaminante no solo (Parrish et al., 2005). As plantas também transferem oxigênio pelas raízes para o solo adjacente, o que facilita as transformações aeróbicas. As substâncias que as plantas liberam no solo incluem quelatos ligantes e enzimas, capazes de diminuir a toxicidade e biodegradar os poluentes orgânicos (Baird, 2002).

É possível que a concentração de 4% de petróleo no solo tenha sido elevada em relação ao tempo avaliado de degradação. A degradação de elevadas concentrações de petróleo pode afetar o processo de biodegradação dos compostos e o metabolismo das plantas, devido ao seu caráter fitotóxico. A capacidade de sementes do milho de germinar e se desenvolver em solos contaminados com petróleo foi observada sob as concentrações entre 0,05% a 6% (Mendez-Natera, 2004; Ogboghodo et al., 2004; Quiñones-Aguilar et al., 2003; Amakiri e Onofeghara, 1984). Entretanto, o aumento das concentrações dos hidrocarbonetos do petróleo no solo provoca a redução no desenvolvimento da planta.

Apesar de não ter sido observado sob as condições avaliadas conforme a Figura 2 (3, 6, 7, 10 e 11), a aplicação de surfactantes pode contribuir tornando o contaminante prontamente disponível a microbiota do solo e no processo de redução da hidrofobicidade, podendo acelerar o processo de remediação de solos contaminados com petróleo (Guedes et al., 2010) e aumentando a eficiência na remoção de hidrocarbonetos policíclicos totais (Bhandari et al., 2000). Por outro lado, elevadas concentrações de surfactante podem ser tóxicas para a microbiota do solo e para as plantas.

Gao et al. (2007) avaliaram a aplicação de surfactantes no processo de fitorremediação quanto ao potencial para melhorar a dessorção, absorção pelas

plantas e biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo no solo em locais contaminados e observaram que a presença de alguns surfactantes não iônicos, incluindo monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80) e monolaurato de polioxietileno, dodecanol (Brij35) em concentrações relativamente baixas, resultou em efeitos positivos significativos na fitorremediação de solo contaminado com pireno. No entanto, o agente tensoactivo aniónico (dodecil sulfato de sódio, SDS) e o agente tensoactivo catiónico (brometo de cetiltrimetilamônio, CTMAB) não apresentaram fitotoxicidade e baixa eficiência aumentada durante a fitorremediação no solo.

As propriedades químicas e as condições climáticas podem alterar a taxa de biodegradação do petróleo durante o processo de remediação de solos contaminados e limitar a aplicação da técnica de biorremediação e fitorremediação. O tempo requerido para a degradação ou a remoção do composto alvo varia, conforme a técnica empregada. Deve-se avaliar também a concentração e o tipo de contaminantes, pois a presença de contaminantes de baixa solubilidade em concentrações elevadas como os hidrocarbonetos policíclicos totais, podem ser tóxicos aos microrganismos e/ou biodegradáveis e inviabilizar a aplicação destas técnicas. É possível que em concentrações menores de petróleo no solo, a aplicação de técnicas alternativas de remediação seja capaz de influenciar positivamente nas características químicas do solo, quando coordenadas simultaneamente, para potencializar a eficácia da degradação de diferentes compostos orgânicos, como a aplicação conjunta de NPK, surfactante, FMA e surfactantes.

CONCLUSÕES

1. A fitorremediação combinada ao processo de bioaugmentação e bioestimulação favoreceu as propriedades químicas em relação ao solo sob atenuação natural (solos contaminados em 4%);

2. Houve redução da relação C:N e aumento de carbono orgânico aos 120 dias de condução experimental;

3. Os teores de compostos orgânicos extraídos pelo solvente diclorometano foram significativamente menores em solos tratados com mudas de milho em relação aos demais tratamentos;

4. A degradação de n-alcanos nos solos tratados pelos processos de fitorremediação e biorremediação foi equivalente aos solos mantidos sob a atenuação natural;

5. Aos 60 dias os solos contaminados com petróleo tratados com a combinação de milho+FMA+NPK foram mais responsivos em relação aos demais tratamentos, no que se refere à degradação de n-alcanos;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIOLI, C.; AGUIAR, M.R.M.P.; PÉREZ, D.V. Avaliação da potencialidade de processos pseudo-fenton para remediação de solos contaminados por diesel. *Quím. Nova*, 32:2000-2002, 2009.
- ALARCÓN, A.; DELGADILLO-MARTÍNEZ, J.; FRANCO-RAMÍREZ, A.; DAVIES, F.T.J.; FERRERA-CERRATO, R. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita-Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Rev. Int. Contam. Amb*, 22:39-47, 2006.
- ALARCÓN, A.; DAVIES, F.T.J.; AUTENRIETH, R.L.; ZUBERER, D.A. Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Int. J. Phytorem*, 10: 251-263, 2008.
- AMAKIRI, J.O. & ONOFEGHARA, F.A. Effects of crude oil pollution on the germination of *Zea mays* and *Capsicum frutescens*. *Environ. Poll*, 35:159–167, 1984.
- ANDERSON, J.D. & INGRAM, J.S.I. *Tropical soil biology and fertility: A handbook of methods*. 2 ed. Wallingford, CAB International, 1996. 171p.
- ANDRADE, J. de A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclét. Quím.*[online], 35: 17-43, 2010.
- BAIRD, C. *Química Ambiental*. 2 ed., Porto Alegre: Bookman. 622p, 2002.

- BAPTISTA, S. J. *Seleção das melhores condições de biodegradação de petróleo em solo argiloso* - Dissertação Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, UFRJ/EQ, 2003.
- BHANDARI, A.; NOVAK, J. T.; DOVE, D. C. Effect of soil washing on petroleum hydrocarbon distribution on sand surfaces. *Journal Health Services Research*, New York, 2:13, 2000.
- BETANCUR-GALVIS, L.A.; BERNAL, D.A.; RAMOSVALDIVIA, A.C.; DENDOOVEN, L. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated salinealkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere*, 62:1749-1760, 2006.
- BIDLEMAN, TF. Atmospheric processes wet and dry deposition of organic compounds are controlled by their vapor-particle partitioning. *Processes Environ. Sci. Technol.* 21, 361–367, 1988.
- CHOROM, M.; SHARIFI, H. S.; MOTAMEDI, H. Bioremediation of a crude oil – polluted soil by application of fertilizers. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 7: 4: 319-326, 2010.
- COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. (2003) *Obtenção e aplicação de biossurfactantes*. *Vetor*, Rio Grande, 13: 85-103.
- DEBIANE, D.; GARÇON, G., VERDIN, A.; FONTAINE, J.; DURAND, R.; SHIRAL, P.; GRANDMOUGIN-FERJANI, A.; LOUNÈS-HADJI SAHRAOUI, A.L.H. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phytochemistry*, 70:1421–1427, 2009.
- DE JONGE, H., FREIJER, J. I., VERSTRATEN, J. M. and WESTERVELD, J.: 'Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils', *Environ. Sci. Technol.* 31:771–775, 1997.
- DORN, P.B.; SALANITRO, J.P.; TEMPORA L. Ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere*, 40: 419-426, 2000.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Manual de métodos de análises de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos CNPS). 2 ed. rev. atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CNPS, 1997. 212p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. (1999) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, *Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia*. 370p.

- FAVA, F., BERSELLI, S., CONTE, P., PICCOLO, A., MARCHETTI, L. Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biotechnol. Bioeng.* 88:214-223, 2004.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. agrotec.* 35: 1039-1042, 2011,
- GALDINO, C.A.B., SANTOS, E.M.dos, PINHEIRO, J.I. Marques Júnior, S. Passivo ambiental: revisão teórica de custos na indústria do petróleo. *Revista Produção*, 14:54-63, 2004.
- GAO, Y.Z., COLLINS, C.D. Uptake pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons in white clover, *Environ. Sci. Technol.* 43 6190–6195, 2009.
- GAO, Y.Z.; CHENG, Z.X.; LING, W.T.; HUANG, J. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots. *Bioresour. Technol.*, 101: 6895–6901, 2010.
- GAO, Y.Z.; LING, W.T.; ZHU, L.Z.; ZHAO, B.W.; ZHENG, Q.S. Surfactant-Enhanced Phytoremediation of Soils Contaminated with Hydrophobic Organic Contaminants: Potential and Assessment. *Pedosphere*. 17:409–418, 2007.
- GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of British Mycological Society*, London, 46:235-244, 1963.
- GERHARDT, E.; HUANG, X.D.; GLICK, B.R., GREENBERG, B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. 176:20–30, 2009.
- GOMEZ, M. S. Fitorremediación: uma alternativa para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos. Monografía de Especialização em Química Ambiental. Universidade Industrial de Santander, Bucaramanga. 79p., 2006.
- GOHRE, V.; PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Revista Planta*. 223:1115-1122, 2006.
- GUEDES, C.L.B.; CORRER, C.J.; LOBO, I.; ABI-SAAB, O. J.G. Tratamento de Solo Contaminado com Petróleo Utilizando Tensoativos e Peróxido de Hidrogênio Petroleum Contaminated Soil Treatment Using Surfactant and Hydrogen Peroxide. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, 31:87-100, 2010.

- HARMS, H.; SCHLOSSER, D; WICK, L.Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9:177-192, 2011.
- HERNÁNDEZ-ORTEGA, H.A., ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R.; ZAVALERA-MANCERA, H.A.; LÓPEZ-DELGADO, H.A.; MENDONZA-LOPEZ, M.R. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate, *Journal of Environmental Management*, 10:10-16, 2011.
- HUANG, H., ZHANG, Z.; SHAN, X.q.; CHEN, B.D.; ZHU, Y.G.; BELL, JN.B. Effect of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus caledonium*) on the accumulation and metabolism of atrazine in maize (*Zea mays L.*) and atrazine dissipation in soil. *Environmental Pollution*. 146:452-457, 2007.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) Agents reviewed by the IARC monographs, v.1-98. *Disponível em*: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ListagentsCASnos.pdf>>. Acesso em: 06 de julho de 2011.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, Beltsville, 48:692, 1964.
- JING, W.; ZHONGZHI, Z.; YOUMING, S.; WEI, H.; FENG, H.; HONGGUANG, S. Phytoremediation of petroleum polluted soil. *Pet.Sci.*, 5:167-171, 2008.
- JOERGENSEN, R. G., FIGGE, R. M. and KUPSCH, L.: 'Microbial decomposition of fuel oil after compost addition to soil', *Z. Pflanzenernähr. Bodenk*, 160:21–24, 1997.
- JONER, E.J. & LEYVAL, C. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.* 37: 2371–2375, 2003.
- LAMEGO, F.P.; VIDAL, R.A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? Pesticidas: *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 17: 9-18, 2007.
- LIU, S.L.; LUO, Y.M.; CAO, Z.H.; WU, L.H.; DING, K.Q.; CHRISTIE, P. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health*, 26:285–293, 2004.

- MAGALHÃES, M.H.; CUNHA, D.C. Avaliação da técnica de Bioaumento no tratamento de solo impactado por petróleo. CETEM, 10 p., 2003.
- MAKKAR, R.S., ROCHNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol.* 22:2280-2292, 2003.
- MCVEETY, B., HITES, R.A. Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to water surfaces—a mass balance approach. *Atmos. Environ.* 22: 511–536, 1067.
- MÉNDEZ-NATERA J.R.; ZAPATA, C.R.; ZAPATA, K.; OTAHOLA-GÓMEZ, V.A. Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95. *Revista UDO Agrícola*, 4:66-71, 2004.
- NAM, K.; CHUNG, N. ALEXANDER, M. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environmental Science and Technology*, Washington, 32:3785- 3788, 1998.
- NIE, M.; WANG, Y.; YU, J.; XIAO, M.; JIANG, L.; FANG, C.; CHEN, J.; LI, B. Understanding plant-microbe interactions for phytoremediation of petroleum-polluted Soil. *Plos One*. 6:17961, 2011.
- OBBARD, J.P., NG, K.L., Xu, R. Biorremediation of petroleum contaminated beach sediments: use of crude palm oil and fatty acids to enhance indigenous biodegradation. *Water Air Soil Pollut*, 157:149–161, 2004.
- OGBO, E.M. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants -*Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology*, 8:250-253, 2009.
- OGBOGHODO, A.; IRUAGA, E.K.; OSEMWOTA, I.O; CHOKOR, J.U. An assement of the effects of crude oil pollution on soil properties, germination and growth of maize (*Zea mays*) usind two crude types – forcados light and escravos light. *Environmental Monitoring and Assessment*, 96:143–152, 2004.
- PACWA-PLOCINICZAK; M., PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12:633–654, 2011.
- PARRISH, Z. D., BANKS, M. K., SCHWAB A. P. Assessment of Contaminant Lability During Phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Impacted Soil. *Environmental Pollution*. 137:2:187-197, 2005.

- PONS-JIMENEZ, M.; GUERRERO-PEÑA, A.; ZAVALA-CRUZ, J.; Alarcón, A. Extracción de hidrocarburos y compuestos derivaos del petróleo en suelos con características físicas y químicas diferentes. *www.ujat.mx/publicaciones/uciencia*, 27:1-15, 2011.
- PROVIDENTI, M. A., LEE, H. and TREVORS, J. T.: 1993, 'Selected factors limiting microbial degradation of recalcitrant compounds', *J. Ind. Microbiol.* 12, 379–395.
- QUIÑONES-AGUILAR, E.E.; FERRERA-CERRATO, R. F.; GAVI-REYES, L.; FERNÁNDEZ-LINARES, L.; RODRÍGUEZ-VASQUEZ, R.; A. ALARCÓN. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado com petróleo crudo. *Agrociencia*, 37: 585-594, 2003.
- ROSENBERG, E.; LEGMANN,R.; KUSHMARO, A.; TAUBE, R.; ADLER, E.; RON, E.Z. Petroleum bioremediation—a multiphase problema. In *Microorganisms to Combat Pollution. Springer Netherlands*, 213-226. 1993.
- ROY, J.L.; MCGILL, W.B. Flexible conformation in organic matter coatings: An hypothesis about soil water repellency. *Can. J. Soil. Sci.*, 143-154, 2000.
- WANG, Z., FINGAS, M., BLEINKINSOPP, S., SERGY, G., LANDRIAULT, M., SIGOUIN, L. Oil composition changes due to biodegradation and differentiation between these changes and those due to weathering. *Proceedings of the 19th Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar, Canada*, 1:163-183,1996.
- WENZEL, W.W. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil*, 321:385–408, 2009.
- VAN AKEN, B.; CORREA, P.A.; SCHNOOR, J.L. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: New trends and promises. *Environment Science Technology*. 44:2767- 2776, 2010.
- VIDALI, M. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, 73:1163-1172, 2001.
- VOLANTE, A.; LINGUA, G.; CESARO, P.; CRESTA, A.; POPPO, M.; ARIATI, L. & BERTA, G. Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. *Mycorrhiza*, 16:43-50, 2005.
- WILD, E., DENT, J., THOMAS, G.O., JONES, K.C. Direct observation of organic contaminant uptake, storage, and metabolism within plant roots. *Environ. Sci. Technol.* 39: 3695-3702, 2005.

WUANA, R.A.; OKIEMEN, F.E. Phytoremediation Potential of Maize. A Review (*Zea mays* L.). *African Journal of General Agriculture*. 6:1595-6984,2010.

YU, X.Z.; WU, S.C.; F.Y. WU, M.H. WONG. Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 186:1206–1217, 2011.

3.4. BACTÉRIAS, COMPOSTO ORGÂNICO, AERAÇÃO E CEVADA NA DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL EM SOLO SEMIÁRIDO DA ESPANHA

Késsia Barreto Lima⁽¹⁾, Carlos Garcia Izquierdo⁽²⁾, Felipe Bastida⁽²⁾, Marco Antonio Martins⁽¹⁾

RESUMO

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar as propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo, e a capacidade de degradação de petróleo e diesel em regiões semiáridas da Espanha, utilizando-se: composto orgânico, aeração, consórcio bacteriano comercial e/ou planta em diferentes tempos experimentais. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em ambos os experimentos, sendo oito tratamentos compostos por: aeração, composto orgânico, consórcio bacteriano (B 350), planta, planta + B 350, planta+composto orgânico e os solos controle, contendo 0% e 2% de contaminante; três tempos de condução experimental: 15, 30 e 50 dias. Os tratamentos foram avaliados em triplicata, totalizando-se 72 parcelas. A unidade experimental foi composta por vasos contendo 0,4 dm³ de solo. A cevada

(*Hordeum vulgare* L.) foi a espécie vegetal utilizada na fitorremediação dos solos contaminados. Em cada período experimental foram realizadas análises do crescimento e da nutrição das plantas, análises físico-químicas das plantas e do solo, além de avaliações bioquímicas e microbiológicas do solo. Avaliou-se também a degradação de petróleo e diesel no solo no início (tempo 0) e aos 50 dias após a condução experimental. A adição de composto orgânico aos solos contaminados com petróleo beneficiou o crescimento das plantas, e promoveu melhora nas características microbiológicas, bioquímicas e químicas do solo. Houve biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e alcanos promovida pelo composto orgânico na presença e ausência da planta nos solos contaminados com petróleo, sendo estatisticamente iguais em relação ao solo não contaminado. Entretanto, estes mesmos tratamentos nos solos contaminados com diesel apresentaram baixo índice de biodegradação. A inoculação com o consórcio bacteriano prejudicou o crescimento das plantas. A aeração e a inoculação bacteriana não promoveram melhorias na qualidade do solo, assim como a biodegradação de ambos os contaminantes.

Palavras para indexação: consórcio bacteriano, rizorremediação, *Hordeum vulgare*.

⁽¹⁾UENF- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Setor de Microbiologia do Solo. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia. Campos dos Goytacazes. CEP 28013-602, Rio de Janeiro, Brazil. e-mail: kblima@hotmail.com;

⁽²⁾Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Department of Soil Conservation and Waste Management, Campus Universitario de Espinardo, 30100, Espinardo, Murcia, Spain;

**BACTERIA, ORGANIC COMPOST, AERATION
AND BARLEY ON DEGRADATION OF PETROLEUM
AND DIESEL IN SOIL SEMI-ARID REGION OF SPAIN**

ABSTRACT

Two experiments to evaluate different cost-effective and environmentally sustainable techniques in contaminated oil and diesel in semi-arid conditions of the soil Spain were performed. The completely randomized design used in the experiments was 8 x 3 factorial arrangement, eight compounds for treatment: aeration, organic compost, bacterial consortium (B 350), plant, plant + B 350 + composting plant and controls soils containing 0% and 2% of the contaminant; evaluation time: 15, 30 and 50 days. The treatments were evaluated in triplicate, totaling up 72 plots. The experimental unit consisted of 0.4 dm³ pots containing soil. Barley (*Hordeum vulgare* L.) was selected plant species for use in phytoremediation of contaminated soils. In each experimental period analyzes of the growth and nutrition of plants, physical and chemical analysis of the plants and soil were conducted in addition to biochemical and microbiological assessment of soil. The degradation of diesel oil and the soil at the start (time 0) and at 50 days after experimental conduction was determined. The addition of compost to soils contaminated with oil benefited the growth of plants, and promoted improvement in microbiological, biochemical and chemical parameters of the soil. There was biodegradation of PAHs and alkanes promoted by composting and composting + plant in contaminated- soils being statistically similar with respect to uncontaminated soil at 0%. However, all treatments in soils contaminated with diesel showed a low rate of biodegradation. The inoculation with the bacterial consortium affect plant growth did not promote improvement in soil quality, and the biodegradation of the contaminants.

Index terms: bacterial consortium, rhizoremediation, *Hordeum vulgare*.

1. INTRODUÇÃO

Na Região de Murcia localizada no sudeste da Espanha foi construído o Complexo Industrial de Cartagena que é um dos mais importantes complexos de refino de petróleo da Espanha. Neste complexo, são armazenados até 300 milhões de litros de gasolina e óleo diesel e o petróleo é recebido através do Porto de Cartagena. Este Porto faz parte do Complexo Industrial e possui uma posição estratégica em nível internacional no Arco Mediterrâneo, devido à circulação de grande volume de mercadorias e passageiros (Repsol, 2014). Entretanto, a atividade petrolífera durante o transporte e o refino de petróleo resulta em diversos impactos para o meio ambiente, como a contaminação dos solos (Alhama, 2013).

Um dos problemas enfrentados em extensas áreas da Região de Murcia é a grave degradação de seus solos semiáridos pelo processo de erosão. As condições climáticas são adversas, com precipitação anual abaixo de <300 milímetros, elevadas temperaturas e taxa de evapotranspiração, que tornam o crescimento vegetal escasso, além da falta de matéria orgânica no solo que apresenta baixa atividade microbiana (Canton, et al., 2011; Bastida et al., 2008; Bastida et al., 2006). Nestas condições, a remediação de solos contaminados com petróleo e óleo diesel se torna um grande desafio.

Em ecossistemas áridos ou semiáridos ocorre o aumento na capacidade de retenção de petróleo e óleo diesel, causando o risco de exposição à saúde humana (Marusenko et al., 2011). Ao longo das últimas décadas tem crescido o interesse no desenvolvimento de estratégias para remediação de contaminantes que podem persistir no ambiente (Masakorala et al., 2014).

A fitorremediação é uma estratégia de baixo custo que utiliza plantas para degradar, estabilizar e remover os contaminantes do solo e tem sido amplamente estudada (Merkl et al., 2005; Nie et al., 2011). A rizorremediação é um tipo específico de fitorremediação que envolve tanto as plantas quanto os microrganismos na rizosfera que podem ocorrer naturalmente ou com a inoculação de microrganismos específicos. Estes microrganismos podem ser

degradadores de contaminantes e podem promover crescimento da planta sob condições de estresse (Gerhardt et al., 2009).

A aplicação de compostos orgânicos é uma ferramenta apropriada para melhorar a fertilidade do solo, estimular a atividade microbiana através do processo de bioaugmentação e beneficiar o desenvolvimento das plantas. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados em climas semiáridos para avaliar o efeito de tal prática sobre a estrutura e função da comunidade microbiana do solo (Bastida et al., 2008). Além disso, de acordo com Marusenko et al., (2011) existe pouco conhecimento sobre o destino de compostos de petróleo e derivados em ecossistemas áridos e semiáridos.

Dentre as espécies vegetais com potencial para ser utilizada na fitorremediação de solos contaminados com petróleo e derivados, encontra-se a cevada (Alhama, 2013). A cevada é uma gramínea que tem sido avaliada quanto à sua capacidade de ser utilizada na produção de biocombustíveis (Zhang et al., 2013). Desta forma, a destinação da biomassa vegetal para a produção de biocombustíveis após o processo de fitoextração do contaminante, reduziria os riscos de acúmulo ao longo da cadeia trófica. Esta gramínea tem sido indicada como tolerante em solos contaminados com hidrocarbonetos em condições semiáridas (Alhama, 2013).

A fitorremediação em solos contaminados por petróleo e derivados e a sua influência sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo, assim como a sua capacidade de degradação têm sido avaliadas por Masakorala et al. (2014). Do ponto de vista bioquímico e microbiológico, o estado de um solo pode ser avaliado através do estado da atividade e da comunidade microbiana (Bastida et al., 2006). Os microrganismos são os principais responsáveis pelos ciclos dos elementos dentro no sistema edáfico e estão envolvidos na decomposição da matéria orgânica no ecossistema (Bastida et al., 2008). Parâmetros como o C da biomassa microbiana podem fornecer informações sobre o tamanho destas comunidades, enquanto outros estão relacionados com a sua atividade. A atividade microbiana pode ser estimada avaliando-se a respiração, a ATP ou a atividade desidrogenase, ou especificamente relacionado com o ciclo de elementos no solo, como as hidrolases, as ureases, as fosfatases e os β -glicosidases que apresentam atividades específicas relacionadas com os ciclos de N, P e C no solo (García et al., 2003).

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo, e a capacidade de degradação de petróleo e diesel em regiões semiáridas da Espanha, utilizando-se: composto orgânico, aeração, consórcio bacteriano comercial e/ou planta em diferentes tempos experimentais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local e delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos na Universidade de Murcia localizada em Murcia (Espanha) (1°10'W e 38°23'N), no Centro de Edafologia e Biologia Aplicada de Segurança (CEBAS), pertencente ao Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC), de julho de 2013 a janeiro de 2014. O clima é caracterizado como semiárido do Mediterrâneo e a precipitação média anual é de 333 milímetros. A distribuição das chuvas ao longo do ano é muito irregular, com duas máximas (em outubro e abril), e a temperatura média anual é de 17°C.

Para avaliar a remediação dos solos contaminados com petróleo e óleo diesel foram realizados dois experimentos. Para ambos os experimentos, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, sendo oito tratamentos: 1) aeração; 2) composto orgânico; 3) consórcio bacteriano (B 350); 4) planta; 5) planta + B 350; 6) planta + composto orgânico; 7) solos não contaminados (controle 0%); 8) solo contaminado (controle 2%); Em ambos os experimentos foram avaliados os seguintes contaminantes (2%): petróleo e óleo diesel, respectivamente; Foram utilizados três tempos de condução experimental: 15, 30 e 50 dias. Os tratamentos foram avaliados em triplicata, totalizando-se 72 parcelas. A unidade experimental foi composta por vasos contendo 0,4 dm³ de solo.

Para fins comparativos, foram preparados tratamentos controle com solo não contaminado para cada tempo experimental avaliado, sendo mantidos sob as mesmas condições que os demais tratamentos em triplicatas.

Condução experimental

O solo classificado como Calcisol Háplico (Staff, 1998) foi coletado em uma área experimental localizada em Santomera (SE Espanha). Este solo apresenta textura argilo-arenosa (FAO-ISRIC e ISSS, 1998) e é oriundo de uma área afetada por processos de degradação do solo, como a erosão e deficiência de matéria orgânica. A camada superior do solo foi coletada (0 -15 cm), seca ao ar e peneirada a 2 mm. As principais características do solo não contaminado e contaminado com óleo diesel são apresentadas na Tabela 1.

Todos os solos experimentais receberam 100 mL de H₂O destilada e sequencialmente, o petróleo e o óleo diesel (oriundos da Espanha), foram derramados, simulando-se a contaminação, sob a concentração de 2% (8 mL), sendo distribuídos em vasos de 0,5 dm³ de capacidade. Posteriormente, os solos permaneceram incubados por 2 dias para ocorrer a volatilização de parte dos compostos voláteis, sob condições ideais de umidade (50-60% da sua capacidade de retenção de água) e temperatura (28°C).

Após este período, os solos contaminados foram revolvidos, a fim de proporcionar maior aeração inicial e tornar a distribuição dos contaminantes mais homogênea. Os tratamentos controle (0%) não foram contaminados e foram mantidos sob as mesmas condições experimentais em relação aos demais tratamentos.

Foram realizadas análises químicas, biológicas e geoquímicas dos solos contaminados e não contaminados referente ao período inicial do experimento (tempo 0), além da taxa respiratória dos solos através da quantificação acumulativa de liberação de CO₂ (Tabela 1).

Tabela 1. Características físico- químicas e microbiológicas do solo semiárido de Santomera (SE-Espanha) no período inicial dos experimentos (Tempo 0)

Referência	pH	CE*	*COT	*CI	*CT	*NT	P	K	Ca	Mg	S	Respiração		
		mS/cm	mg/l						g/100g			mg C-CO ₂ kg ⁻¹ dia ⁻¹		
Controle	9,10	0,10	11,89	6,15	17,74	3,90	0,01	0,46	14,77	0,41	0,23	4,70		
Diesel	9,04	0,10	11,92	5,96	17,88	3,95	0,01	0,45	13,92	0,43	0,22	5,86		
Petróleo	8,92	0,10	14,89	5,86	21,05	4,48	0,01	0,42	14,58	0,44	0,24	7,38		
	β -glicosidase	Fosfatase	Urease	Na	Al	As	Be	Bi	B	Cd	Co	Cr	Cu	
	mmoles PNP g ⁻¹ solo seco h ⁻¹			g/100g			mg/Kg							
Controle	0,41	1,62	0,36	0,02	1,18	1,71	1,14	7,68	11,36	0,16	<0,5	19,50	9,32	
Diesel	0,35	2,22	0,48	0,02	1,22	1,53	<0,5	7,44	10,73	<0,1	<0,5	19,42	9,17	
Petróleo	0,26	2,03	0,21	0,02	1,18	1,59	<0,5	6,65	10,10	<0,1	<0,5	19,50	9,49	
	Fe	Li	Mn	Mo	Ni	Pb	Sb	Se	Sr	Ti	Tl	V	Zn	
	mg/Kg													
Controle	8289	21	139	0,41	7,69	8,16	<0,5	<0,1	461	106	17,17	18,68	15,53	
Diesel	9117	21	146	0,23	8,59	8,43	<0,5	<0,1	442	110	17,90	19,01	16,14	
Petróleo	8640	21	137	0,20	8,21	8,08	<0,5	<0,1	444	101	16,36	20,31	15,35	

*CE: Condutividade elétrica; COT: Carbono orgânico total; CI: Carbono inorgânico; CT: Carbono total; NT: Nitrogênio total;

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) foi a espécie vegetal selecionada para ser usada na fitorremediação dos solos contaminados. Em cada vaso correspondente aos tratamentos contendo planta e planta + B 350, foram adicionadas 10 sementes de cevada.

A Tabela 2 mostra a composição do composto orgânico utilizado. Em cada vaso, foram aplicados 12 g de composto orgânico, sendo incorporado homogeneamente ao solo contaminado.

Tabela 2. Composição físico-química do composto Pedrin utilizado nos solos tratados com composto orgânico durante o experimento.

Propriedades Físico-químicas									
Umidade (%)		37,56		Carbono Solúvel (ppm)		14710,3			
pH*		8,31		Nitrogênio Solúvel (ppm)		5944,79			
Condutividade elétrica* (mS/cm)		14,21		Matéria Orgânica (g/100g)		Calcinação		53,8	
Carbono total (g/100g)		19,36				Oxidação		25,9	
Nitrogênio total (g/100g)		1,46		Capacidade de Troca Catiônica (ppm)		1219,5			
Carbono Orgânico (g/100g)		18,47		Fósforo Assimilável (mg/kg)		1568,4			
----- Elementos Totais -----								Ânions (mg/L)	
Al (g/100g)	0,93	S (g/100g)	1,59	Cr (mg/kg)	13,80	Sb (mg/kg)	<0,5	Fluoretos	1,65
Ca (g/100g)	9,16	As (mg/kg)	0,16	Cu (mg/kg)	30,92	Se (mg/kg)	<0,5	Cloretos	6993,25
Fe (g/100g)	1,40	Be (mg/kg)	<0,5	Li (mg/kg)	11,99	Sr (mg/kg)	758,31	Nitritos	<0,1
K (g/100g)	4,50	Bi (mg/kg)	<0,5	Mn (mg/kg)	349,48	Ti (mg/kg)	120,74	Brometos	29,9
Mg (g/100g)	1,12	B (mg/kg)	50,02	Mo (mg/kg)	1,85	Tl (mg/kg)	28,01	Nitratos	51,85
Na (g/100g)	0,38	Cd (mg/kg)	0,31	Ni (mg/kg)	6,90	V (mg/kg)	15,87	Fosfatos	266,05
P (g/100g)	0,59	Co (mg/kg)	0,90	Pb (mg/kg)	7,56	Zn (mg/kg)	79,92	Sulfatos	18411,15

* pH e CE: extrato aquoso 1/5

O inóculo comercial bacteriano utilizado foi o produto B-350, fornecido pela empresa COMEI, S.L. (Barcelona, Espanha), sendo específico para a biorremediação de solos afetados por hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos. A inoculação do consórcio bacteriano foi realizada em cada vaso, incorporando-se 10 g do inóculo ao solo previamente contaminado. Durante todo o período experimental os solos tratados com a técnica de aeração foram

revolvidos em intervalos de 4 dias, a fim de proporcionar maior quantidade de oxigênio ao solo.

A incubação de todos os tratamentos foi realizada em uma câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo (12h de luz a 24°C/ 12h escuro a 15°C) e umidade (60% da sua capacidade de retenção de água). Foi realizada a coleta do solo e dos materiais vegetais aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental. Em cada tempo experimental foram realizadas análises do crescimento e teores de N e C da parte aérea das plantas, análises físico-químicas do solo, além de avaliações bioquímicas e microbiológicas do solo. Foram realizadas análises de degradação de hidrocarbonetos no início (tempo 0) e no final (aos 50 dias) da condução experimental. Além disso, foram realizados ensaios de germinação para avaliar a fitotoxicidade dos solos tratados.

Análises das plantas

Contagens de plântulas a partir do dia do início da germinação foram realizadas nos tempos 15, 30 e 50 dias após a implantação do experimento. Os resultados foram avaliados através da análise estatística do número de sementes que germinaram em cada tratamento. Foram realizadas análises das massas úmida e seca das plantas em cada tempo experimental. Os teores de carbono e nitrogênio totais da parte aérea das plantas obtidas a partir de solos contaminados com petróleo foram determinados pelo analisador elementar. O nitrogênio total das plantas foi determinado pelo Método Kjeldahl modificado por Bremner e Mulvaney (1982).

Características físico-químicas do solo

Análises da condutividade elétrica e do pH foram mensuradas em uma solução aquosa de 1/10 (m/v) (Crison mod.2001, Barcelona, Spain). O nitrogênio total dos solos foi determinado pelo Método Kjeldahl modificado por Bremner e Mulvaney (1982). Os nutrientes minerais dos solos foram obtidos através de prévia digestão por micro-ondas em ICP-OEs (Servicio de Instrumentación CEBAS-CSIC). O carbono extraível em água foi obtido por agitação de uma mistura de solo e água destilada na proporção 1:10 (m/v) durante 2 h, seguido de centrifugação e filtração através de papel de filtro (Albet 145 110). Neste extrato, o carbono extraível em água foi determinado através do analisador para amostras

líquidas de C (Shimadzu 5050A, Kyoto, Japão). O carbono orgânico total (COT) e N total foram determinados pelo analisador elementar.

Características bioquímicas e microbiológicas do solo

As análises das características bioquímicas nos solos foram realizadas de acordo com García et al. (2003). Foram quantificadas as atividades enzimáticas e a biomassa microbiana do solo. A atividade da urease foi realizada através da utilização de ureia como substrato e medida do amônio formado na reação de hidrólise (Kandeler et al., 1999). A atividade da β -glucosidase pela utilização do método descrito por Tabatabai (1994) baseando-se na utilização de um substrato artificial, p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (PNG) e a avaliação colorimétrica de p-nitrofenol liberado de forma análoga à determinação descrita na recomendação anterior. A atividade da fosfatase foi determinado pelo método descrito por Tabatabai e Bremner (1969) empregando tampão maleato (pH 6.5) p-nitrofenil fosfato (PNPP) 0.115 mol L^{-1} como substrato.

A respiração microbiana foi determinada mediante a medida periódica, por analisador de gás infravermelho (Toray PG-100) do CO_2 desprendido de amostras de solo (15 g de cada amostra em frascos de 125 mL) umedecidas a 60% de sua capacidade de retenção hídrica, situadas em frascos herméticos. Os frascos permaneceram abertos durante 30 minutos após cada medição, a fim de garantir as condições aeróbicas nas amostras e foram mantidos durante um período de incubação total de 20 dias a 28 °C.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a ANOVA utilizando-se os tratamentos e o tempo de amostragem como fatores através da diferença significativa de teste Tukey post hoc. O teste post hoc aplicado demonstrou se houve diferença significativa pelo método de Fisher (LSD) no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS Statistics versão 15.

4. RESULTADOS

Análises das plantas

- **Petróleo**

Não foi observada interação significativa entre os tratamentos e o tempo em relação ao número de plantas (Figura 1). Os solos tratados com planta + composto orgânico apresentaram maior número de plantas. Em contrapartida, em todos os tempos avaliados, não houve germinação das sementes nos tratamentos que continham o inóculo bacteriano.

Houve interação entre os tratamentos e os diferentes tempos de avaliação em relação às massas frescas e secas das plantas em solos contaminados com petróleo (Figura 1). A adição de composto orgânico favoreceu o crescimento das plantas nos solos na presença do contaminante.

Em relação ao teor de N, foi observado que as plantas que cresceram em solos contaminados com petróleo, ainda que na ausência de composto orgânico apresentaram melhores resultados. Além disso, as plantas crescidas no solo contaminado sem composto orgânico apresentaram maior teor de C.

Foi observado que com o aumento do tempo, houve a redução no teor de N nas plantas, mesmo com a incorporação de composto orgânico nos solos contaminados com petróleo, sendo superiores aos 15 dias, enquanto nestes mesmos tratamentos, os teores de C se mantiveram significativamente iguais durante todos os períodos avaliados (15, 30 e 50 dias).

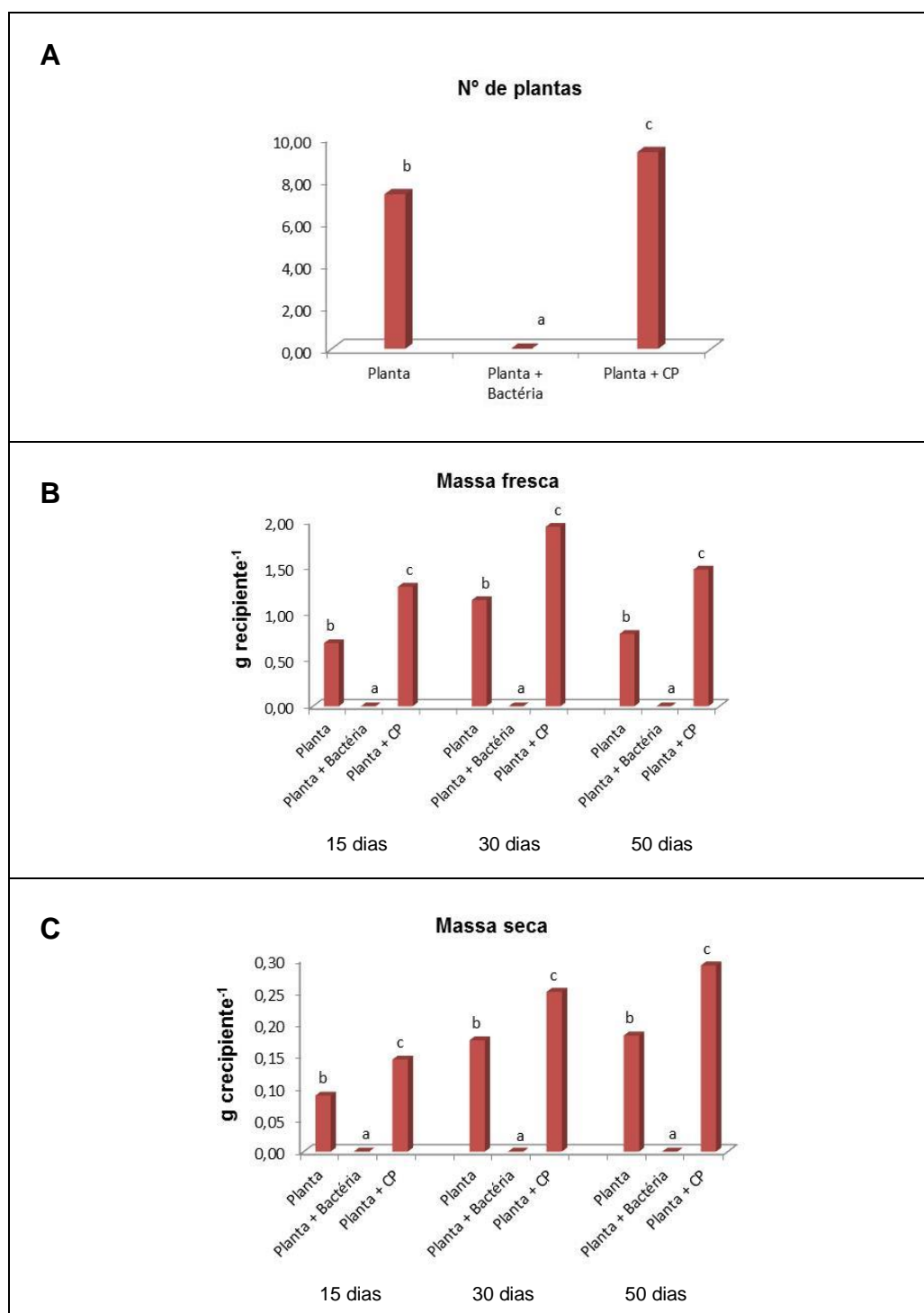


Figura 1. Médias dos números de plantas (A), massa fresca (B) e massa seca (C) das plantas tratadas sob diferentes condições em solos contaminados com petróleo (2%) aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental, respectivamente. Barras com a mesma letra indicam valores que não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey em nível de $p < 0,05$.

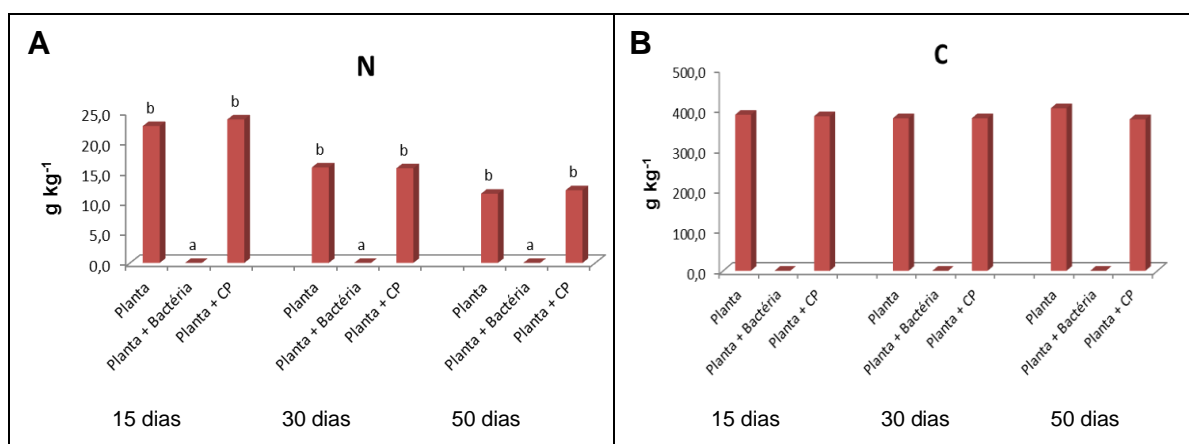


Figura 2. Teores de nitrogênio (N) e carbono (C) nas plantas tratadas sob diferentes condições em solos contaminados com petróleo (2%) aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental, respectivamente. Barras com a mesma letra indicam valores que não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey em nível de $p < 0,05$.

• Óleo diesel

Não foi observada interação significativa entre os tratamentos e o tempo em relação a número de plantas, massas frescas e secas das plantas em solos contaminados com óleo diesel (Figura 3). Em virtude do baixo crescimento das plantas, não foi possível realizar análises de N e C das plantas obtidas a partir de solos contaminados com óleo diesel.

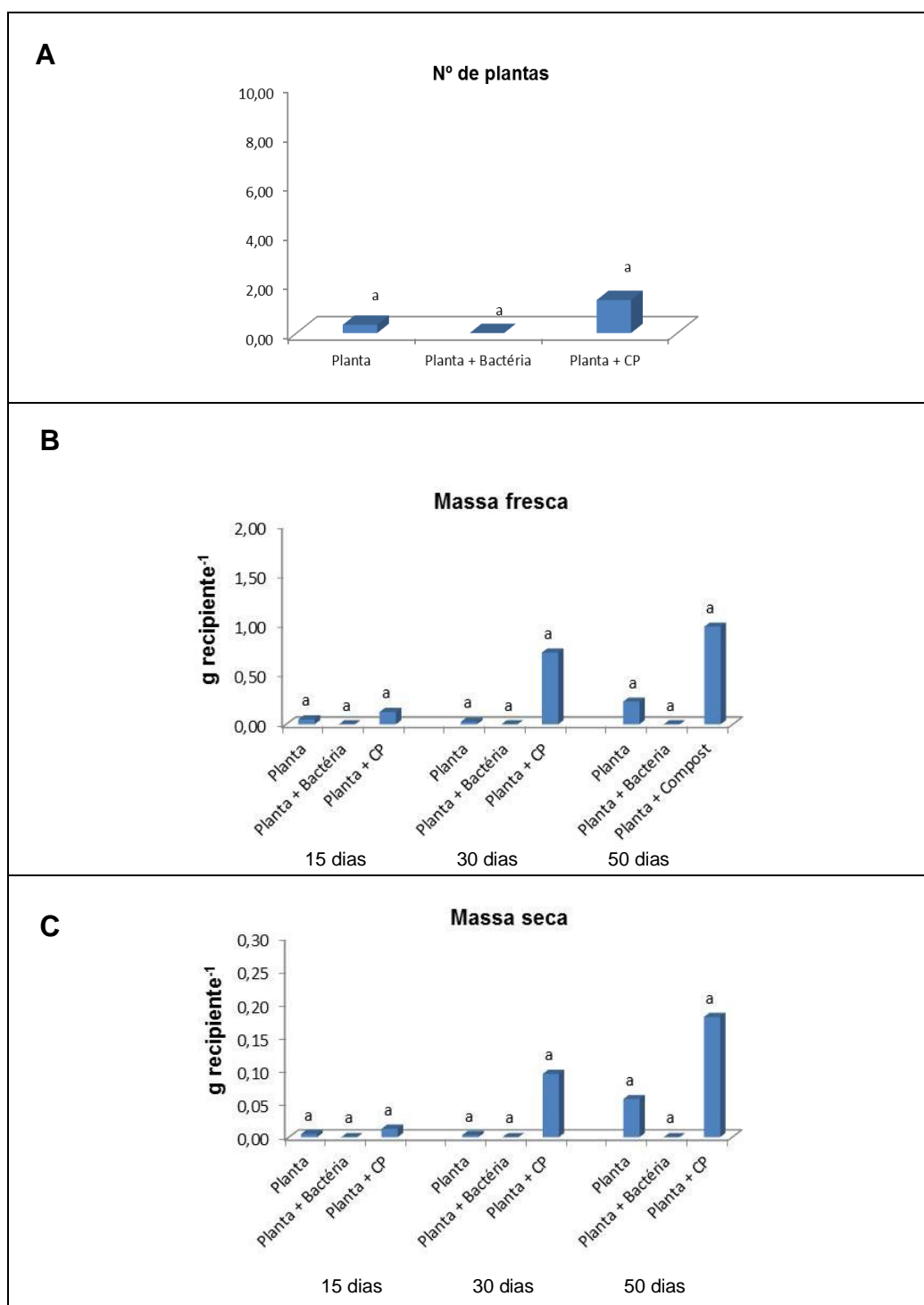


Figura 3. Número de plantas (A), massa fresca (B) e massa seca (C) das plantas tratadas sob diferentes condições em solos contaminados com óleo diesel (2%) aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental, respectivamente. Barras com a mesma letra indicam valores que não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey em nível de $p < 0,05$.

Características físico-químicas do solo

- **Petróleo**

Foi observada variação na resposta entre os tratamentos em função dos tempos de remediação de solos contaminados com petróleo nas características físico-químicas dos solos avaliados (Tabelas 3 e 4). Os maiores valores de pH obtidos foram dos solos controles contaminados e não contaminados, além dos tratamentos de aeração e planta.

A condutividade elétrica foi significativamente maior em tratamentos inoculados com o consórcio bacteriano em relação aos demais tratamentos. Os tratamentos contendo composto orgânico também tiveram aumento na condutividade elétrica em relação aos tratamentos controles, de forma menos expressiva em comparação com os tratamentos inoculados com bactérias. A alta condutividade (Tabela 3) pode estar associada à inibição da germinação e ao crescimento das plantas (Figura 1).

Em relação à quantidade de nitrogênio, carbono total e carbono orgânico no solo, foi observado que a aplicação de composto orgânico no solo favoreceu positivamente o aumento destes componentes no solo. Os solos que continham plantas apresentaram melhores resultados relação à quantidade de nitrogênio, carbono total e carbono orgânico, na maioria dos tempos avaliados, quando comparados ao controle solo contaminado com petróleo em 2% (Tabela 4).

Tabela 3. Valores de pH e condutividade elétrica (CE) em solos contaminados com petróleo sob diferentes condições de tratamento aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental

Tratamentos	pH			CE		
	15 dias	30 dias	50 dias	15 dias	30 dias	50 dias
Controle 0%	9,09 aB	9,38 bC	8,97 bA	0,11 aA	0,08 aA	0,08 aA
Controle 2%	9,08 dA	9,36 bB	9,06 bA	0,10 aA	0,08 aA	0,08 aA
Aeração 2%	9,13 dA	9,36 bB	9,04 bA	0,10 aA	0,07 aA	0,07 aA
CP 2%	8,33 bA	8,37 aAB	8,30 aA	0,74 bB	0,66 bA	0,71 bB
PL 2%	9,00 cA	9,32 bB	8,93 bA	0,11 aA	0,08 aA	0,08 aA
PL + BACT 2%	8,22 aA	8,49 aB	8,26 aA	5,01 cA	6,18 dB	5,64 cAB
PL + CP 2%	8,18 aA	8,50 aB	8,28 aA	0,86 bB	0,65 bA	0,70 bAB
BACT 2%	8,19 aA	8,45 aB	8,25 aAB	5,31 cAB	5,28 cA	5,24 cA
CV %	0,5			22,2		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Solo controle não contaminado, 0% (Controle 0%); Solo controle contaminado, 2% (Controle 0%); Solo tratado com aeração, 2% (Aeração 2%); Solo tratado com composto orgânico, 2% (CP 2%); Solo tratado com plantas, 2% (PL 2%); Solo tratado com plantas e inóculo bacteriano, 2% (PL + BACT 2%); Solo tratado com plantas e composto orgânico, 2% (PL + CP 2%); Solo tratado com inóculo bacteriano, 2% (BACT 2%);

Tabela 4. Nitrogênio, carbono total, carbono orgânico em solos contaminados com petróleo sob diferentes condições de tratamento aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental

Tratamentos	Nitrogênio (g 100g ⁻¹)			Carbono Total (g 100g ⁻¹)			Corg (g 100g ⁻¹)		
	15 dias	30 dias	50 dias	15 dias	30 dias	50 dias	15 dias	30 dias	50 dias
Controle 0%	0,03 abA	0,05 cdA	0,04 aA	9,57 aA	9,74 aB	9,73 aB	0,51 aA	0,52 aA	0,57 aA
Controle 2%	0,03 abA	0,04 bcdA	0,05 aA	10,30 bcA	10,35 bA	10,30 bA	1,32 bB	1,36 bB	1,25 bA
Aeração 2%	0,02 aA	0,02 aA	0,04 aA	10,43 bcdB	10,27 bA	10,47 bcB	1,42 bC	1,31 bB	1,16 bA
CP 2%	0,05 bA	0,05 dA	0,09 dB	10,62 cdA	10,70 bcB	10,68 bcAB	1,75 dC	1,46 bA	1,58 cB
PL 2%	0,03 abA	0,03 abA	0,04 aA	10,18 bA	10,43 bcB	10,37 bB	1,52 bcB	1,43 bB	1,26 bA
PL + BACT 2%	0,03 abA	0,06 deB	0,07 bcB	10,17 bA	10,72 bcC	10,57 bcB	1,70 cdB	1,65 bB	1,53 cA
PL + CP 2%	0,07 cA	0,07 eA	0,08 cdA	10,73 dB	10,83 eB	10,53 bcA	1,77 cB	1,61 bA	1,76 dB
BACT 2%	0,03 abA	0,03 abA	0,06 bcB	10,63 cdA	10,57 bcA	11,00 cB	1,53 bcA	1,45 bA	1,49 cA
CV %	18,6			1,8			7,9		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Solo controle não contaminado, 0% (Controle 0%); Solo controle contaminado, 2% (Controle 0%); Solo tratado com aeração, 2% (Aeração 2%); Solo tratado com composto orgânico, 2% (CP 2%); Solo tratado com plantas, 2% (PL 2%); Solo tratado com plantas e inóculo bacteriano, 2% (PL + BACT 2%); Solo tratado com plantas e composto orgânico, 2% (PL + CP 2%); Solo tratado com inóculo bacteriano, 2% (BACT 2%);

- **Óleo diesel**

Foi observado que houve interação entre os tratamentos e o tempo de remediação de solos contaminados com diesel nos valores de pH obtidos. Com o aumento do tempo, houve aumento do pH dos solos controle contaminados e não contaminados, além dos tratamentos de aeração e planta (Tabela 5).

A condutividade elétrica não foi significativamente influenciada pelo tempo, mas variou de acordo com os tratamentos. Os tratamentos inoculados com o consórcio bacteriano apresentaram maior condutividade elétrica, que os demais tratamentos. Isto pode estar associado ao meio em que as bactérias se encontravam, que eram armazenadas sob condições salinizadas. Os tratamentos contendo composto orgânico também tiveram aumento na condutividade elétrica em relação aos tratamentos controle. Da mesma forma, o carbono total variou de acordo com cada tratamento e a maior quantidade foi observada nos tratamentos controle (0%) (Tabela 5).

Foi observado que os teores de nitrogênio e o carbono orgânico variaram em função do tempo e dos tratamentos (Tabela 6). Os tratamentos contendo composto orgânico (composto orgânico e planta + composto orgânico) apresentaram maior teor de N no solo. Aos 15 e 30 dias, os tratamentos composto orgânico, planta e planta + composto orgânico apresentaram maior quantidade de carbono orgânico no solo contaminado com diesel, ao passo que, aos 50 dias foi observado maior quantidade de carbono orgânico apenas no tratamento composto pela aplicação de composto orgânico no solo.

Tabela 5. Valores de pH, condutividade elétrica (CE) e Carbono total (C) em solos contaminados com diesel sob diferentes condições de tratamento

Tratamentos	pH			CE	Carbono Total
	15 dias	30 dias	50 dias	Média	Média
Controle 0%	9,09 cA	9,38 dB	9,38 bcB	0,09 a	9,68 e
Controle 2%	9,05 cA	9,40 dB	9,42 bcB	0,08 a	10,28 e
Aeração 2%	9,13 cA	9,49 eB	9,52 cB	0,08 a	10,26 e
CP 2%	8,32 bA	8,58 bcB	8,59 aB	0,74 b	10,64 c
PL 2%	9,03 cA	9,28 dB	9,30 bB	0,09 a	10,29 d
PL + BACT 2%	8,06 aA	8,38 aB	8,37 aB	5,16 c	10,40 a
PL + CP 2%	8,34 bA	8,66 cB	8,64 aB	0,70 b	10,64 c
BACT 2%	8,22 bA	8,49 abB	8,49 aAB	5,01 c	10,34 b
CV %	0,6			12,8	1,5

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Solo controle não contaminado, 0% (Controle 0%); Solo controle contaminado, 2% (Controle 0%); Solo tratado com aeração, 2% (Aeração 2%); Solo tratado com composto orgânico, 2% (CP 2%); Solo tratado com plantas, 2% (PL 2%); Solo tratado com plantas e inóculo bacteriano, 2% (PL + BACT 2%); Solo tratado com plantas e composto orgânico, 2% (PL + CP 2%); Solo tratado com inóculo bacteriano, 2% (BACT 2%);

Tabela 6. Nitrogênio (N) e Carbono orgânico (Corg) em solos contaminados com óleo diesel sob diferentes condições de tratamento aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental

Tratamentos	Nitrogênio (g 100g ⁻¹)			Carbono orgânico (g 100g ⁻¹)		
	15 dias	30 dias	50 dias	15 dias	30 dias	50 dias
Controle 0%	0,03 abA	0,05 aA	0,04 aA	0,51 aA	0,52 aA	0,57 aA
Controle 2%	0,03 abA	0,05 aA	0,05 aA	0,97 bA	0,95 bA	0,96 bcA
Aeração 2%	0,04 bA	0,05 aA	0,04 aA	1,10 bA	0,94 bA	0,86 bA
CP 2%	0,08 cA	0,08 bA	0,11 bA	1,41 cA	1,43 cA	1,54 eAB
PL 2%	0,03 bA	0,03 aA	0,05 aAB	1,28 cB	0,90 cA	1,01 bcA
PL + BACT 2%	0,03 abA	0,04 aAB	0,06 aB	1,06 bA	1,24 bB	1,29 dB
PL + CP 2%	0,07 cA	0,08 bA	0,09 bA	1,43 cAB	1,31 cAB	1,19 cdA
BACT 2%	0,01 aA	0,03 aA	0,05 aAB	1,04 bA	0,96 bA	1,03 bcA
C,V,%	16,9			8,7		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Solo controle não contaminado, 0% (Controle 0%); Solo controle contaminado, 2% (Controle 0%); Solo tratado com aeração, 2% (Aeração 2%); Solo tratado com composto orgânico, 2% (CP 2%); Solo tratado com plantas, 2% (PL 2%); Solo tratado com plantas e inóculo bacteriano, 2% (PL + BACT 2%); Solo tratado com plantas e composto orgânico, 2% (PL + CP 2%); Solo tratado com inóculo bacteriano, 2% (BACT 2%);

Características bioquímicas e microbiológicas do solo.

- **Petróleo**

Foi observado que houve interação entre os tratamentos e o tempo de remediação de solos contaminados com diesel nas atividades enzimáticas microbianas β -glicosidase, fosfatase e urease (Figuras 4). De modo geral, os tratamentos: Planta + bactéria, composto orgânico e planta+ composto orgânico apresentaram maior atividade da urease aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental, sendo maior que a atividade do solo controle não contaminado (0%). Os solos tratados com bactérias apresentaram aumento na atividade da fosfatase em relação aos controles contaminados ou não com petróleo. Em contrapartida, a atividade da urease foi reduzida em solos contaminados com petróleo quando tratados com bactérias. A maior atividade urease foi observada no tempo 50 em solos tratados com composto orgânico.

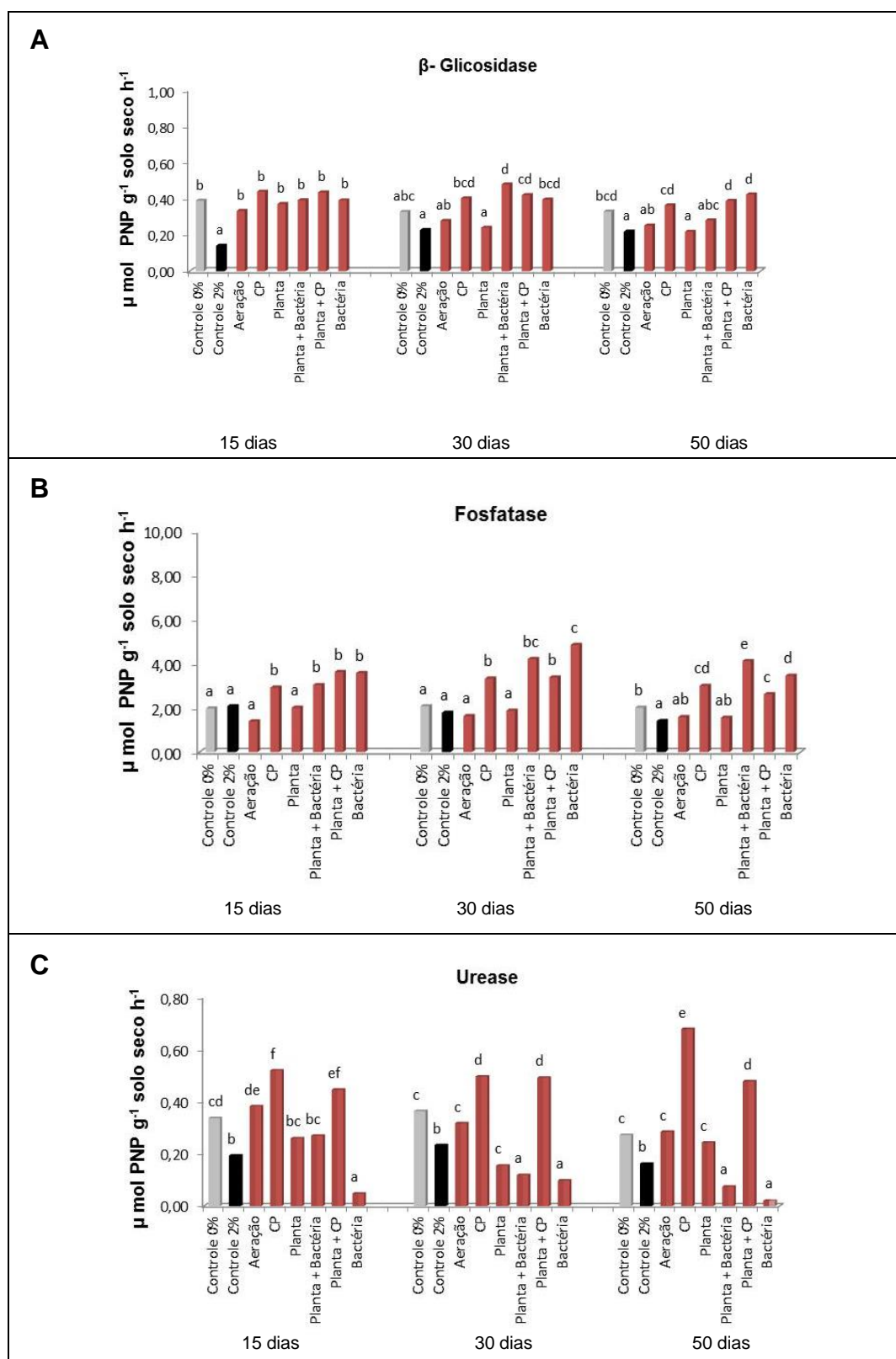


Figura 4. Atividade β -glicosidase (A), fosfatase (B) e urease (C) em solos contaminados com petróleo tratados sob diferentes condições aos 15, 30 e 50 dias, de condução experimental, respectivamente. Barras com a mesma letra indicam valores que não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ao nível de $p < 0,05$ (CV 15,5%, 13,2%, 28,6%, respectivamente).

Os solos tratados com composto orgânico e planta + composto orgânico apresentaram maior taxa de respiração microbiana em relação aos demais tratamentos (Figura 5), podendo estar relacionada com o aumento de nutrientes no solo que tende a estimular os microrganismos no solo e que conseguem sobreviver em condições adversas nos solos contaminados.

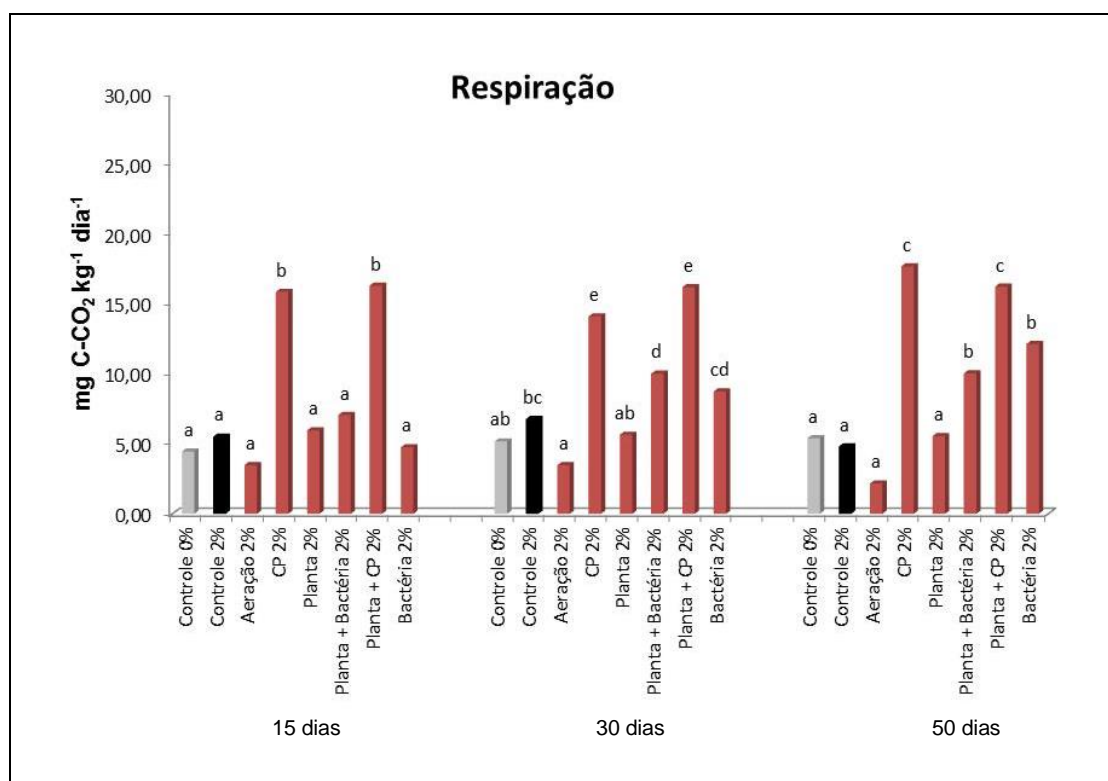


Figura 5. Respiração microbiana em solos contaminados com petróleo, tratados sob diferentes condições aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental. Barras com a mesma letra indicam valores que não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ao nível de $p < 0,05$ (CV 18,2%).

• Óleo diesel

Foi observado que houve interação entre os tratamentos e o tempo de remediação de solos contaminados com diesel nas atividades enzimáticas microbianas β -Glicosidase, fosfatase e urease. Os tratamentos: planta+ bactéria, composto orgânico e planta+ composto orgânico apresentaram maior atividade de β -Glicosidase, em relação aos controles e aos demais tratamentos, em solos contaminados com óleo diesel. No tempo 50, estes tratamentos apresentaram maior atividade (Figura 6A).

Foi observado efeito significativo na atividade fosfatase no tratamento no qual foram inoculadas bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, e esta atividade se manteve durante todos os períodos avaliados (Figura 6B). Os tratamentos contendo composto orgânico e planta+composto orgânico também apresentaram alta atividade em relação aos solos controles contaminados e não contaminados.

A atividade urease dos solos tratados com bactérias aos 15 dias foi estatisticamente igual ao controle contaminado em 2%, ao passo que aos 50 dias foi menor que os solos controle não contaminados e contaminados (0 e 2%) com óleo diesel e os demais solos não tratados com bactéria (Figura 6C).

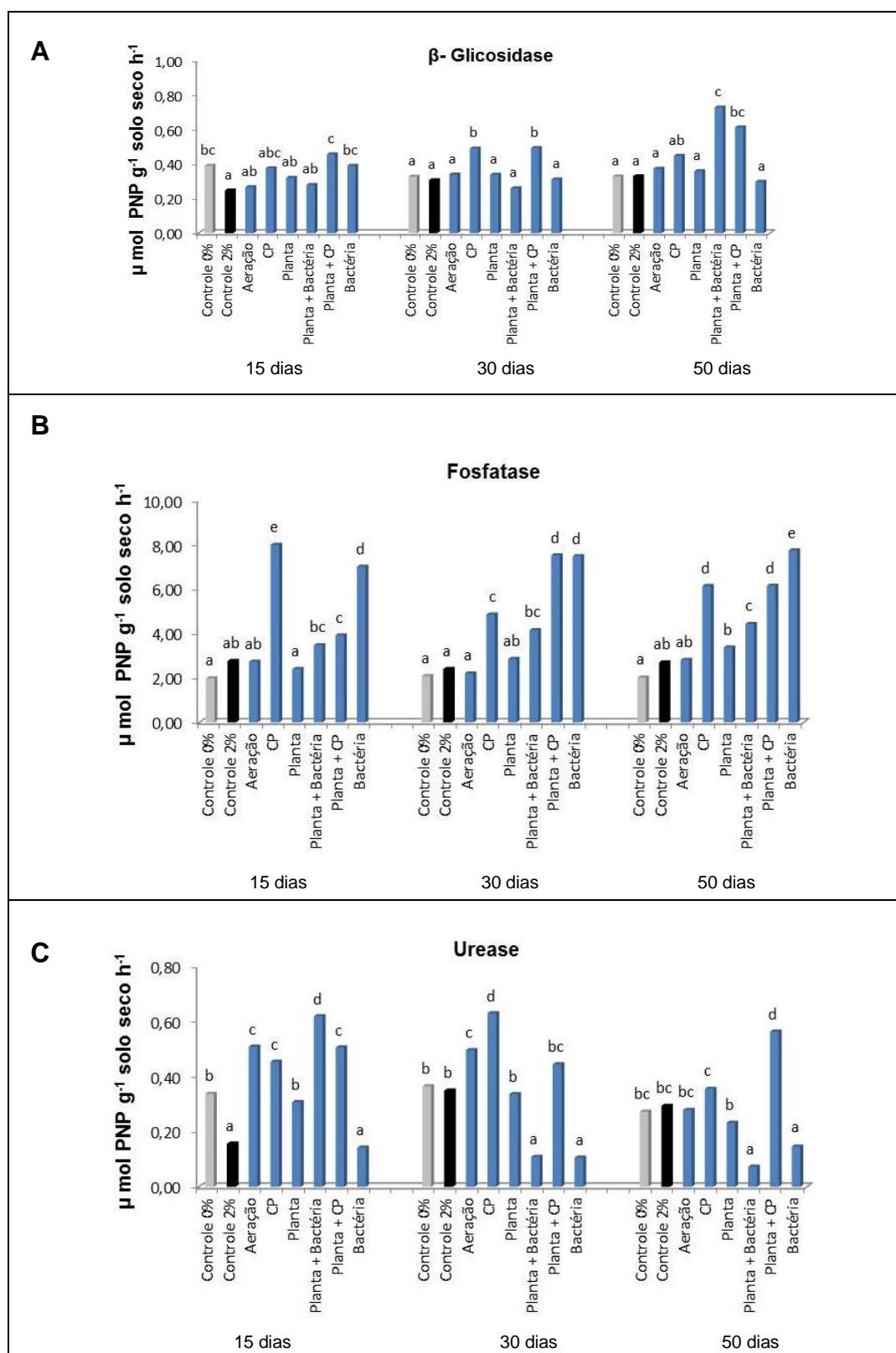


Figura 6. Atividade β -glicosidase (A), fosfatase (B) e Urease (C) em solos contaminados com petróleo tratados sob diferentes condições aos 15, 30 e 50 dias, de condução experimental, respectivamente. Barras com a mesma letra indicam valores que não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ao nível de $p < 0,05$ (CV 15,8%, 10,7%, 12,2%, respectivamente).

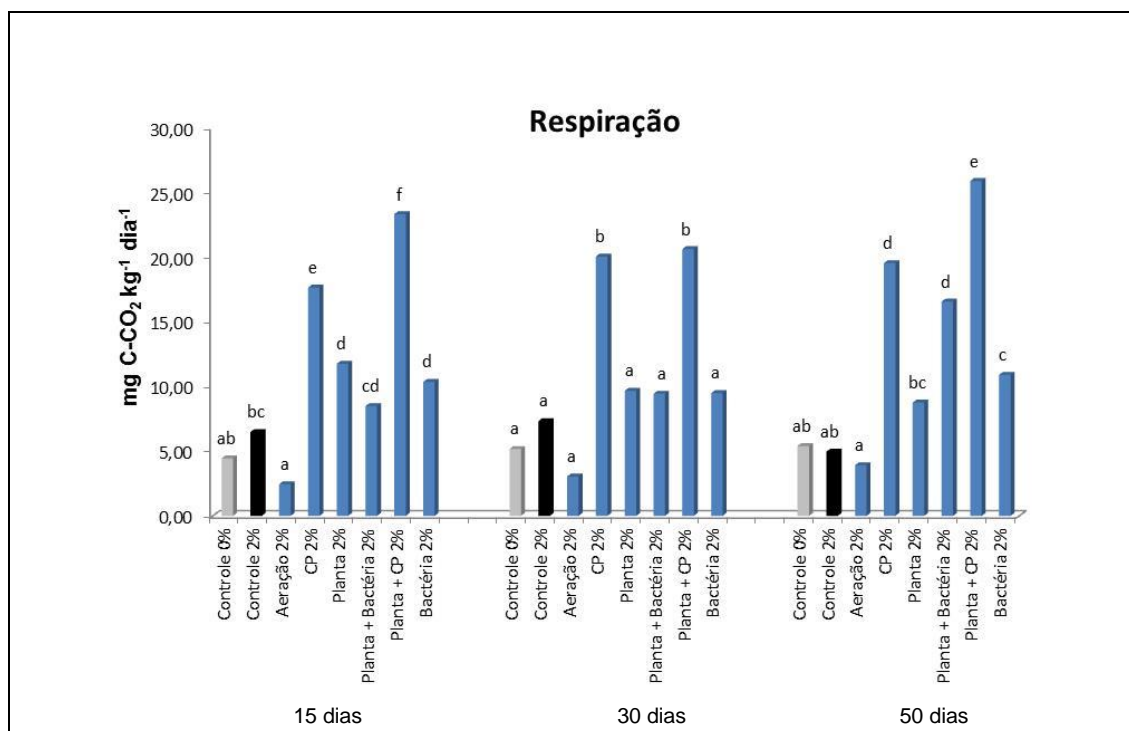


Figura 7. Respiração microbiana em solos contaminados com diesel tratados sob diferentes condições aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental. Barras com a mesma letra indicam valores que não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ao nível de $p < 0,05$ ($CV = 14,4\%$).

4.4. Biodegradação de petróleo no solo

- **Petróleo**

A cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) revelou a concentração total (expressa em ng/g massa seca) de hidrocarbonetos aromáticos, alifáticos (n-alcenos) e o índice de biodegradação que podem ser observados na Tabela 7. A concentração de hidrocarbonetos alifáticos (alcenos de cadeia de 23 a 34 átomos de C) nos solos contaminados com petróleo foi reduzida significativamente nos solos tratados com composto orgânico e composto orgânico+planta, destacando-se em relação aos demais tratamentos e solos controle contaminados com petróleo em 2% aos 50 dias após a condução experimental.

Da mesma forma, o composto orgânico favoreceu a degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Apêndice, tabelas 1, 2, 5 e 6) como: fenantreno, dibenzotiofeno, metilfluorantenos-pirenos, metilfenantrenos-antracenos, dimetilfenantrenos-antracenos, trimetilfenantrenos-antracenos, metildibenzotiofenos, dimetildibenzotiofenos, criseno, metilcrisenos, dimetilcrisenos, trimetilcrisenos, pireno, fluoreno, metilfluoreno, dimetilfluoreno, trimetilfluoreno, metilnaftalenos, dimetilnaftalenos, trimetilnaftalenos, tetrametilnaftalenos, sendo reduzidos a concentrações estatisticamente iguais aos solos controle não contaminados com petróleo (0%). O composto orgânico na presença da planta reduziu a concentração de HPAs no solo em aproximadamente 50% em relação ao solo controle contaminado em 2%, aos 50 dias de condução experimental.

A concentração de hidrocarbonetos alifáticos e HPAs no período inicial (tempo 0) do experimento nos solos controle não contaminados (solo 0%) pode estar associada à presença de compostos orgânicos que ocorrem naturalmente no solo (Tabela 7). Após 50 dias, houve decréscimo significativo nas concentrações de hidrocarbonetos alifáticos e HPAs nos tratamentos com composto orgânico e planta+composto orgânico que pode estar associado ao aumento da atividade microbiana no solo (Figuras 4) e à respiração microbiana (Figura 5). As relações C17/pristano e C18/fitano, obtidas como índices da biodegradação do contaminante corroboram os resultados obtidos (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e alcanos totais (ng/g peso seco) e as relações n-C17 / Pristano* (Pr) e n-C18 / Fitano (F) totais (ng/g peso) aos 50 dias de condução experimental.

Tratamentos	HPAs	Alcanos	C17/Pr	C18/F
Controle 0% T0	380 a	37 a	-	-
Controle 0% T50	32 a	6 a	-	-
Controle 2% T0	5498 bc	447 bc	3,9	2,1
Controle 2% T50	6550 c	521 c	3,6	1,8
CP 2% T50	677 a	140 a	0,7	0,4
PL + CP 2% T50	3289 b	191 ab	0,6	0,4
BACT 2% T50	4030 b	549 c	5,8	3,3
CV %	29	35	-	-

As relações C17/Pristano e C18/Fitano podem ser utilizadas como índices de biodegradação, pois os alcanos (C17 e C18) se degradam mais facilmente que os isoprenoídeos (pristano e fitano), a diminuição deste índice indica uma maior biodegradação.

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Solo controle não contaminado no tempo inicial, 0% (Controle 0% T0); Solo controle não contaminado no tempo 50, 0% (Controle 0% T50); Solo controle contaminado no tempo inicial, 2% (Controle 2% T0); Solo controle contaminado no tempo 50, 2% (Controle 2% T50); Solo tratado com composto orgânico no tempo 50, 2% (CP 2% T50); Solo tratado com plantas e composto orgânico no tempo 50, 2% (PL + CP 2% T50); Solo tratado com inóculo bacteriano no tempo 50, 2% (BACT 2% T50);

- **Óleo diesel**

Na Tabela 8 é possível observar a concentração (expressa em ng/g massa seca) de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e alcanos totais. Além disso, a Tabela 8 mostra as relações C17/ Pristano e C18/Fitano como índice da biodegradação. Não houve diferença estatística entre os tratamentos com relação à degradação de HPAs e alifáticos nos solos contaminados com diesel aos 50 dias de condução experimental. Apesar disto, foi observado que a maior taxa de biodegradação ocorreu nos tratamentos que continham planta e composto orgânico, em comparação com o controle solo 2% aos 50 dias de condução experimental.

Tabela 8. Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e alcanos totais (ng/g peso seco) e as relações n-C17 / Pristano* (Pr) e n-C18 / Fitano (F) totais (ng/g peso)

Tratamentos	HPAs	Alcanos	C17/Pr	C18/F
Controle 0% T0	380 a	37 a	-	-
Controle 0% T50	32 a	6 a	-	-
Controle 2% T0	6268 b	1365 b	5,4	3,8
Controle 2% T50	5248 b	1363 b	3,8	2,5
CP 2% T50	5015 b	1035 b	3,2	1,9
PL + CP 2% T50	6684 b	1238 b	2,2	2,2
BACT 2% T50	7027 b	825 b	4,9	2,9
CV (%)	31	39	-	-

As relações C17/Pristano e C18/Fitano podem ser utilizadas como índices de biodegradação, pois os alcanos (C17 e C18) se degradam mais facilmente que os isoprenoides (pristano e fitano), a diminuição deste índice indica uma maior biodegradação.

*Tratamentos/Concentração do contaminante: Solo controle não contaminado no tempo inicial, 0% (Controle 0% T0); Solo controle não contaminado no tempo 50, 0% (Controle 0% T50); Solo controle contaminado no tempo inicial, 2% (Controle 2% T0); Solo controle contaminado no tempo 50, 2% (Controle 2% T50); Solo tratado com composto orgânico no tempo 50, 2% (CP 2% T50);

Solo tratado com plantas e composto orgânico no tempo 50, 2% (PL + CP 2% T50); Solo tratado com inóculo bacteriano no tempo 50, 2% (BACT 2% T50);

DISCUSSÃO

Um dos segredos para o sucesso da fitorremediação é a alta produção de biomassa. A adição de composto orgânico favoreceu o crescimento da planta e quantidade de nutrientes nos solos contaminados com petróleo. Em contrapartida, nos solos contaminados com diesel, o crescimento e a nutrição das plantas foram prejudicados em todos os tratamentos. Isto evidencia o caráter fitotóxico do contaminante no solo.

A inibição da germinação das sementes nos tratamentos que continham o inóculo bacteriano nos solos contaminados com petróleo e diesel pode estar associada à alta condutividade elétrica nos solos tratados com consórcio bacteriano comercial, indicando que a composição do inóculo era enriquecido em sais que podem ter tornado o ambiente desfavorável à germinação das sementes e ao crescimento das plantas (Tabelas 3 e 5).

O consórcio comercial bacteriano B-350 é um produto específico para participar do processo de biorremediação em solos afetados por hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos e aporta microrganismos selecionados e nutrientes adequados para alcançar a completa degradação destes contaminantes, favorecendo a ação da biomassa sobre a zona contaminada (COMBI, 2014). Entretanto, é importante ressaltar que a eficácia do produto está diretamente ligada às condições edáficas e ambientais do local afetado. Desta forma, estudos envolvendo a aplicação de inóculos bacterianos comerciais e plantas em solos contaminados com petróleo e derivados ou remediados se fazem necessários, além da verificação quanto a sua capacidade de biodegradar os compostos no solo.

A faixa ideal de pH para que os microrganismos tenham atividade máxima é entre 6,5 e 8,5. O pH quase neutro tem sido relatado como ideal para a fitorremediação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Vidali, 2001; Dibble e Bartha 1979), no qual há o predomínio de bactérias e de fungos no local contaminado. Por outro lado, quando ocorre diminuição do valor do pH, por exemplo, em função dos subprodutos ácidos gerados durante a biorremediação, sugere-se que se faça imediatamente a correção do pH do solo, caso contrário, a eficiência do processo poderá ser diminuída consideravelmente. Normalmente, essa correção é feita por meio de “calagem”, processo através do qual se aplica calcário ao solo, objetivando neutralizar a acidez e, então, propiciar condições para o desenvolvimento de plantas e de microrganismos.

O pH do solo é afetado por reações químicas que ocorrem entre as partículas do solo, os exsudatos radiculares de plantas, a atividade de microrganismos e a solução do solo. Além disso, o pH pode ser afetado pela adição de N, o número de plantas e podem ser significativamente mais elevados do que solos sem vegetação. Isto foi observado por Thompson et al. (2008), em solos contaminados com pireno. Aumento da nitrificação em tratamentos que tiveram mais N adicionado contribui para uma diminuição do pH como NH_4^+ que é oxidado a NO_2^- e H^+ são liberados. Outros fatores intrínsecos do solo como pH e temperatura podem influenciar na atividade microbiológica e degradação de contaminantes no solo. O pH do solo afeta diretamente a atividade dos microrganismos no solo, 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.

Alguns trabalhos têm sido realizados envolvendo a fitorremediação de contaminante em solos contaminados por petróleo e derivados e a sua influência sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo, assim como a sua capacidade de degradação (Masakorala et al., 2014). Thompson et al. (2008) observaram a biodegradação com a aplicação de ureia na relação pireno-C:ureia-N (18:1) em solo contaminado com 1% e a taxa de biodegradação de pireno foi de 88%, ao passo que o controle apresentou a taxa de 31%, indicando que o aumento da concentração de N inorgânico no solo, favorece a degradação de pireno nos tratamentos com planta (*Cynodon dactylon* L). Concluíram ainda que a biodegradação de pireno diminuiu com a adição de N no solo nos tratamentos sem vegetação, indicando que a N^- ureia, NH_4^+ ou $\text{N}^- \text{NO}_3^-$ inibiu a degradação do contaminante.

De acordo com Bastida et al. (2012), a adição de composto orgânico pode ter efeito bioquímico positivo na qualidade de solos (não contaminados) semiáridos no período de um ano. A aplicação de doses significativas de composto orgânico aumenta a atividade microbiana, assim como a quantidade de carbono orgânico total e carbono solúvel em água. Isto também foi observado por Masakorala et al. (2014) em solos contaminados com petróleo, e por Diosis et al. (2010) em solos contaminados com óleo diesel e óleo mineral. Isto explica o fato dos solos tratados com composto orgânico e planta + composto orgânico apresentarem maior taxa de respiração microbiana em relação aos demais tratamentos (Figura 5) nos solos contaminados com petróleo e óleo diesel.

A urease, β -glicosidase e fosfatase são importantes enzimas que têm sido utilizadas em estudos em solos contaminados com petróleo, pois a contaminação do solo por hidrocarbonetos, afeta diretamente as atividades enzimáticas envolvidas no ciclo biogeoquímico (Masakorala et al., 2014; Alhama, 2013, Dioses et al., 2003).

A urease é de vital importância na mineralização de N no solo e a atividade desta enzima possui elevada sensibilidade na presença de poluentes no solo em relação a outras enzimas extracelulares do solo. Os contaminantes podem influenciar seletivamente a população microbiana. Em geral, as populações de bactérias nitrificantes microbianas em solo são altamente

suscetíveis à contaminação (Thavamani et al., 2012), e dependendo da concentração de hidrocarbonetos derivados do petróleo pode ocorrer a supressão da população de nitrificantes em solos contaminados e devido à tendência de $N-NO_3$. A urease é uma enzima extracelular que requer uma base de água no meio para desenvolver a sua função. Os resultados indicaram um impacto negativo dependente da concentração de hidrocarbonetos totais, pH e condutividade e estão relacionados com a atividade da urease, $N-NO_3$. A atividade β -glicosidase é uma hidrolase envolvida no ciclo do carbono e atua na hidrólise de β -glicosídeos de grandes cadeias de carboidratos à glicose. A hidrólise destes substratos desempenha um papel importante na produção de energia para microrganismos do solo e pode ser inibida pela presença de compostos tóxicos ou metais pesados (Eivazi e Zacharia, 1993). A fosfatase é uma hidrolase que atua transformando fósforo orgânico em inorgânico, tornando, assim, assimiláveis para as plantas. Por isto, a importância desta enzima no solo. A presença da enzima fosfatase do solo tem uma origem microbiana, embora em muitos casos, é temporária e desaparece rapidamente.

De acordo com Masakorala et al. (2014) a atividade de urease ($N-NO_3$) tem um papel muito mais abrangente do que monitorar propriedades microbiológicas, pois indica o estado geral do metabolismo da microbiota do solo e a disponibilidade de nitrogênio no solo contaminado com petróleo. Isto mostra que as características físico-químicas do solo contaminado com petróleo estão associadas ao desempenho das funções biológicas do solo. A gasolina tem um maior efeito inibidor da atividade hidrolase (envolvidas nos ciclos de N, P ou C), do que hidrocarbonetos mais pesados, como óleo diesel e petróleo bruto, enquanto os dois últimos hidrocarbonetos mostram um efeito fitotóxico na germinação de sementes e crescimento das raízes das plantas (Labud et al., 2007).

Dioses et al. (2003) utilizaram dois solos semiáridos provenientes da Região de Murcia da Espanha com diferentes teores de matéria orgânica, contaminados com dois produtos derivados do petróleo (óleo diesel e óleo mineral) e avaliaram a influência destes poluentes sobre a atividade bioquímica dos solos tais como oxidoredutases (desidrogenase) e hidrolases (protease, β -glicosidase e fosfatase), após 60 dias e utilizando-se diferentes doses (2,5%, 5% e 10% de óleo diesel) e (2,5% e 5% óleo mineral). Estes autores observaram que

as atividades enzimáticas foram maiores nos solos com maior teor de matéria orgânica e um efeito negativo dos hidrocarbonetos sobre a atividade bioquímica de solos. Este efeito foi influenciado pelo tipo de poluente, assim como a dose e o teor de matéria orgânica no solo. Nos solos contendo baixo teor de matéria orgânica, as atividades da fosfatase e da β -glicosidase foram inibidas nos solos contaminados com ambos os hidrocarbonetos, entretanto com o aumento do tempo de permanência dos contaminantes no solo, as atividades de ambas as enzimas fosfatase e glicosidase foram aumentadas nos solos cotaminados com óleo mineral. De acordo com estes autores, depois de um período de aclimação, as populações microbianas podem aceitar como substrato os hidrocarbonetos presentes no ambiente e eles favorecem a síntese destas enzimas. A contaminação influenciou negativamente a atividade enzimática nos solos com elevada quantidade de matéria orgânica nos solos contaminados com óleo diesel apenas na concentração máxima (10%).

Devido às mudanças climáticas, os impactos causados pela perda de carbono orgânico em solos semiáridos são consideravelmente maiores na superfície do solo e estratégias para realizar o sequestro de carbono nestas áreas agrícolas se fazem necessárias (Albaladejo et al., 2013). Nos solos intensamente intemperizados, os contaminantes tendem a migrar para os microporos, que são menos acessíveis ao ataque microbiano (Gogoia et al., 2003). Em geral, a biodisponibilidade de hidrocarbonetos reduz com o aumento do tempo. A taxa de extensão de sequestro, foi medida pelo grau de mineralização de fenantreno por bactérias inoculadas ao solo, demonstrou ser sensível às amostras de solo contendo 2,0% de carbono orgânico (Nam et al., 1998). De acordo com Marusenko et al. (2011), mesmo que o solo apresente baixo conteúdo de matéria orgânica sob condições semiáridas, a matéria orgânica do solo pode ser relacionada com as concentrações HPAs no solo. Da mesma forma, o aumento de carbono orgânico no solo pode interferir o processo de biodegradação de HPAs no solo. Apesar de ter tido maiores teores de carbono orgânico no solo (Tabela 4), os tratamentos contendo planta e composto orgânico apresentaram alta taxa de biodegradação nos solos contaminados com petróleo (Tabela 7).

Os isoprenoides são mais abundantes no petróleo e possuem lenta degradação, sendo ainda mais estáveis do que os alcanos de cadeia linear (parafina) (Pirnik et al., 1974). O estudo da relação entre n-C18/fitano e n-

C17/pristano tem sido utilizado como biomarcadores para estimar a degradação microbiana de alcanos lineares e para avaliar a degradação de hidrocarbonetos em curto prazo (Ortiz et al., 2003) A diminuição deste índice indica uma maior biodegradação do óleo. Como pode ser visto na Tabela 7 estes biomarcadores (concentração de fitano, pristano, n-17 e n-C18) refletem a eficácia das técnicas de bioestimulação (composto orgânico) e fitorremediação (planta + composto orgânico) na degradação de HPAs e n-alcanos nos solos contaminados com petróleo. Em contrapartida, nos solos contaminados com óleo diesel que apresenta grande concentração de compostos HPAs, foi observado baixo índice de biodegradação de HPAs e alcanos totais (Tabela 8).

As atividades enzimáticas mantêm valores muito mais elevados nos solos com alto valor de matéria orgânica e a contaminação com hidrocarbonetos pode afetar negativamente a atividade bioquímica dos solos. De acordo com Hutchinson et al. (2003), o fator principal que influencia o processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo é a atividade microbiana. Alexander (1977) discutiu, em detalhes, os efeitos desses contaminantes sobre os microrganismos, e concluiu que a atividade e a população microbiana estão fortemente associadas com os conteúdos de água e de nutrientes nos solos, com as espécies de plantas e com os tipos de contaminantes.

Embora diferentes contaminantes possam ser metabolizados por microrganismos, alguns são mais facilmente biodegradados do que outros. No caso dos hidrocarbonetos de petróleo, por exemplo, muitas áreas contaminadas possuem uma mistura complexa de compostos orgânicos, sendo que a maioria destas substâncias, certamente, não é metabolizada na mesma velocidade. Por outro lado, as taxas de degradação dos diversos compostos que são metabolizados são diferentes e dependentes de vários fatores. Em especial, a velocidade de degradação é comumente dependente da concentração do contaminante e da quantidade de espécies catalisadoras, como as enzimas geradas pelos microrganismos presentes no solo (Andrade et al., 2010).

Nesse contexto, a quantidade de catalisador presente, de certa forma, representa o número de microrganismos hábeis em metabolizar o contaminante, bem como a quantidade de enzimas produzidas por cada célula. Desta forma, qualquer fator que afeta a concentração do contaminante, o número de

microrganismos presentes ou a quantidade de enzimas específicas presentes no solo, pode aumentar ou diminuir a velocidade da biodegradação do contaminante (Andrade et al., 2010).

Os solos contaminados com petróleo que apresentam plantas possuem maior atividade microbiana, atividade enzimática, em comparação com o solo sem plantas (Jing et al. 2008). Isto pode favorecer o processo de fitorremediação na recuperação destes solos. De acordo com Nie et al. (2011), os estádios de crescimento da planta têm uma maior influência na atividade enzimática do solo do que a concentração de petróleo. As bactérias são mais empregadas no processo de biorremediação, embora participem outros microrganismos, como fungos e algas na degradação de compostos tóxicos no solo (Atlas e Bartha, 2002).

As plantas podem liberar compostos, incluindo monossacarídeos, aminoácidos, enzimas, alifáticos e aromáticos que estimulam comunidades específicas de microrganismos (Crarela et al, 2000). No meio rizosférico, as raízes das plantas também podem potencialmente aumentar os níveis de oxigênio do solo comparados com solo sem plantas por aumentar a permeabilidade do solo contaminado com petróleo (Jing et al. 2008). Desta forma, apesar da hidrofobicidade de solos contaminados com petróleo, a fitorremediação pode aumentar a aeração do solo na presença deste contaminante, pela oxigenação da rizosfera, liberação de exsudados para estimular o processo de degradação e a transpiração elevada pode controlar o transporte de contaminantes orgânicos no solo (Gomez, 2006).

No presente estudo, a cevada apresentou maior taxa de degradação em solos contaminados com petróleo (2%), com a adição de composto orgânico. Alhama (2013) observou que dentre todas as espécies avaliadas em solo semiárido (sudeste da Espanha) contaminado com lodo de refinaria petrolífera (2%), a cevada se destacou com a degradação de 22% sem a adição de composto orgânico. Além disso, foi observado que os solos que continham a planta e o composto orgânico apresentaram maior biomassa e respiração e atividade enzimática microbiana no solo (β -glicosidase, fosfatase e urease).

Os mecanismos de translocação de hidrocarbonetos e a absorção pelas plantas derivados do petróleo não são bem conhecidos, mas estudos apontam que ocorre em função de vários fatores, como a lipofilicidade da planta, a

concentração de compostos orgânicos do solo e o coeficiente octanol-água (K_{ow}) dos compostos. (Watts et al., 2006; Trapp et al., 1990). A solubilidade indica a mobilidade dos compostos no solo, e o K_{ow} indica a propensão de ser absorvido na fase orgânica. O transporte via xilema na planta é mediado por água e em função disto, os compostos menos solúveis em água, possuem maior dificuldade para entrarem nos tecidos vegetais (Watts, et al. 2006, Gao e Zhu, 2004; Kipopoulou et al., 1999).

As plantas podem reduzir as concentrações lábeis de vários HPAs e quando associadas aos microrganismos, podem exsudar compostos que melhoram a disponibilidade destes contaminantes para a degradação (Fava et al. 2004; Makkar e Rochne, 2003; com exceção do fenantreno (Parrisch et al., 2005).

A contaminação do solo com hidrocarbonetos de petróleo tem um efeito negativo sobre o ecossistema do solo e ciclagem de nutrientes. As populações microbianas podem ser inibidas por este tipo de contaminação, mas alguns microrganismos, que usam os hidrocarbonetos como fontes de carbono sobrevivem e aumentam a sua atividade metabólica sobre estas condições de estresse. A dimensão e duração destes efeitos dependerão da natureza do contaminante de hidrocarbonetos e das características do solo. Dentre as principais enzimas oxidases e hidrolases liberadas por plantas e microrganismos que participam do processo de degradação de compostos aromáticos e alifáticos que são produzidas pelos microrganismos, destacam-se: lacase, dioxygenase, nitrolase, nitroreductase, citocromo P450 monooxygenase, peroxidase, dehalogenase, dentre outras. A fosfatase participa na clivagem de grupos de fosfatos de compostos organofosfatos (Gerhardt et al., 2009).

Os danos nos solos causados pela contaminação por hidrocarbonetos do petróleo dependem do tipo e da concentração do contaminante. Entretanto, tem sido geralmente aceito na literatura que a suscetibilidade do ataque microbiano aos hidrocarbonetos do solo diminui na seguinte ordem: n-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de baixo peso molecular > alcanos cíclicos (Obbard et al., 2004). A resposta da remediação tende a ser mais consistente em óleo pesado e médio, quando possui concentrações de frações aromáticas consideravelmente menores que os encontrados na composição do óleo leve, pois estas são as principais responsáveis pela toxicidade aguda nos solos (Dorn et al., 2000).

Dowty et al. (2001) avaliaram o impacto sobre as comunidades microbianas com a contaminação de petróleo sob diferentes concentrações com a adição de substratos orgânicos e inorgânicos, fertilizante e quatro plantas vasculares para aumentar a biorremediação do petróleo no solo. Segundo estes autores, a biodegradação de petróleo no solo requer um longo período de tempo na presença de substrato orgânico e a adição de fertilizante pode estimular a produtividade e resultar no aumento do quociente de respiração microbiana, sugerindo maior atividade microbiana.

Assim como os nutrientes, a aeração é fundamental no processo de degradação dos compostos pelos microrganismos do solo. Porém, os resultados obtidos neste trabalho nos solos contaminados com petróleo e óleo diesel tratados com aeração não foram significativos em relação aos demais tratamentos em relação às características físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas avaliadas. Isto pode estar associado à pouca disponibilidade de nutrientes nos solos tratados com aeração.

A comparação do efeito da aeração, nutrientes (nitrogênio e fósforo) e a inoculação com consórcio microbiano no processo de biorremediação de solo contaminado com petróleo foi observada por Gogoia et al. (2003). Estes autores observaram que o consórcio bacteriano proporcionou a maior capacidade de degradar os hidrocarbonetos, como o hexadecano e as frações BTEX, o HPA fenantreno. Entretanto, nos solos contaminados, a degradação de alcanos pelos microrganismos foram mais prevalente que os aromáticos e os hidrocarbonetos poliaromáticos. Os aromáticos tendem a se acumular no solo e são mais resistentes às biodegradações podendo se acumular por muito tempo no solo.

Apesar de não ter sido observada degradação de óleo diesel nos solos, outros trabalhos mostram que a adição de fertilizantes e consórcio bacteriano pode favorecer o processo de biodegradação. Jatap et al. (2014) avaliaram espécies vegetais capazes de remediar solos contaminados com óleo diesel e para converter sua biomassa em bioetanol. Três espécies de plantas (*Pinus densiflora*, *tomentiglandulosa Populus*, e *Thuya orientalis*) foram cultivadas em uma área de solo contaminado com 6% de óleo diesel para avaliar os efeitos da adição de um consórcio microbiano e fertilizantes sobre a eficácia de remediação. A contaminação com óleo diesel no solo resultou na redução da massa seca vegetal para a maioria das plantas testadas. No entanto, as plantas tratadas em

solos contaminados com óleo diesel e consórcio microbiano apresentaram acúmulo de massa seca da parte aérea maior, do que nos solos controle que continham apenas óleo diesel. Além disso, a aplicação de fertilizantes foi um fator importante para degradação eficiente do óleo diesel e houve aumento da atividade de β -glicosidase, dentre outras enzimas (celobiohidrolase, endoglucanase, endoxilanase, lacase, mananase e peroxidase de lignina).

Os solos contaminados por hidrocarbonetos derivados do petróleo provocam a redução ou inibição do desenvolvimento da cobertura vegetal, mudanças na dinâmica e diversidade populacional da fauna e da biota microbiana, e a contaminação de águas subterrâneas e superficiais. Nas plantas, os hidrocarbonetos podem danificar as membranas celulares e reduzir o transporte metabólico e a velocidade da respiração, assim como reduzir a troca de gases e água em nível radicular e a absorção de nutrientes (Chaineau et al., 1997; Xu e Jonson, 1995). Além deste impacto ambiental, a contaminação com hidrocarbonetos gera impactos do tipo econômico, social e de saúde pública nas zonas próximas à área afetada.

4. CONCLUSÃO

- A adição de composto orgânico no solo favoreceu o desenvolvimento das plantas e o aumento da qualidade dos solos contaminados com petróleo aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental;
- Nos solos contaminados com óleo diesel, a atividade fosfatase foi favorecida com a inoculação com consórcio bacteriano. Entretanto, a atividade urease destes tratamentos foi afetada negativamente;
- A inoculação bacteriana afetou a germinação das plantas e a atividade microbiana nos solos contaminados com petróleo e óleo diesel, assim como a degradação de hidrocarbonetos;
- Após 50 dias de condução experimental, os solos contaminados com petróleo tratados com composto orgânico e planta+composto orgânico foram

remediados, apresentando maior índice de biodegradação e menor quantidade de alcanos, quando comparados com os demais tratamentos;

- As concentrações de HPAs nos solos contaminados com petróleo tratados com composto orgânico aos 50 dias de condução experimental foram estatisticamente iguais ao controle não contaminado. Os solos tratados com planta+ composto orgânico apresentaram redução de 50% de HPAs, em comparação com o solo controle contaminado em 2%;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. *Introduction to Soil Microbiology*. 2nd ed. New York, John Wiley, 1977. p.423-437.
- ALHAMA, I. R. Reciclado en suelos de lodos de refinería: nuevas aproximaciones para la biodegradación de hidrocarburos mediante el manejo de enmiendas orgánicas. *Tesis Doctoral*. Murcia, España 2013. 280 p.
- ALBALADEJO, J.; ORTIZ, R.; GARCIA-FRANCO, N.; NAVARRO, A.R.; ALMAGRO, M.; PINTADO, J.G.; MARTINEZ-MENA, M. Land use and climate change impacts on soil organic carbon stocks in semi-arid Spain. *J Soils Sediments*, 13:265–277, 2013.
- ANDRADE, J. de A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclét. Quím.*[online], 35: 17-43, 2010.
- ATLAS R.B. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Ed. Addison Wesley. Madrid. 2002. 561p
- BASTIDA, K.J., MORENO, J.L., HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Effects of organic amendments on soil carbon fractions, enzyme activity and humuseenzyme complexes under semi-arid conditions. *European Journal of Soil Biology*, 53:94-102., 2012.
- BASTIDA, F., MORENO, J.L., HERNÁNDEZ, T.; García, C.G. Microbiological activity in a soil 15 years after its devegetation, *Soil Biol. Biochem.* 38:2503-2507, 2006.

- BASTIDA, F.; KANDELER, E.; J.L. MORENO, J.L.; MORENO, M.R.; GARCIA, C. HERNÁNDEZ, T. Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate, *Appl. Soil Ecol.* 40:318-329, 2008.
- BREMNER, J.M., MULVANEY, C.S., 1982. Nitrogen-total. En: Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H., Miller and D.R. Keeny, 2nd Edition. *American Society of Agronomy*, Madison, pp. 595-622.
- CANTÓN, Y.; BENET, A.S.; VENDE, J.de; FAYOS, B.C.; CASES, C.A.; ASENSIO, C.; PUIGDEFABREGAS, J. A review of runoff generation and soil erosion across scales in semiarid south-eastern Spain. *Journal of Arid Environments.* 75:125-1261, 2011.
- CHAINEAU, C.H., MOREL, J.L., OUDOT, J., 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality.* 26:1478-1483.
- CRARELA, G.J., PLAZA, C.C.; SOLER, R.P. Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil. Biol. Biochem.* 32: 1907-1913, 2000.
- DIBBLE, J.T., BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 37:729-739, 1979.
- DIOSES, M.Q., HERNÁNDEZ, T.F., IZQUIERDO, C.G. Influencia de la contaminación de suelos con hidrocarburos sobre su calidad bioquímica. *Edafología*, 10: 21-31, 2003.
- DORN, P.B.; SALANITRO, J.P.; TEMPORA L. Ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere*, 40: 419-426, 2000.
- DOWTY, R. A., SHAFFER, G. P., HESTER, M. W., CHILDERS, G. W., CAMPO, F. M., & GREENE, M. C. Phytoremediation of small-scale oil spills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation. *Marine environmental research*, 52:3: 195-211, 2001.
- FAVA, F., BERSELLI, S., CONTE, P., PICCOLO, A., MARCHETTI, L. Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biotechnol. Bioeng.* 88:214-223, 2004.

- GAO, Y., ZHU, L. Plant uptake, accumulation and translocation of Phenanthrene and Pyrene in soils. *Chemosphere*, 55:1169–1178, 2004.
- GARCÍA, C., HERNANDEZ, T., PASCUAL, J., MORENO, J.L. & ROS, M. Microbial activity in soils of SE Spain exposed to degradation and desertification processes. Strategies for their rehabilitation. *In: Research and Perspectives of Soil Enzymology in Spain* (eds C. García and M.T. Hernández), 93–146. CEBAS-CSIC, Murcia, 2003.
- GERHARDT, E.; HUANG, X.D.; GLICK, B.R., GREENBERG, B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*. 176:20–30, 2009.
- GOGOIA, B.K., DUTTA, N.N.; GOSWAMIA, P.; KRISHNA MOHANB, T.R. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Advances in Environmental Research*. 7: 767–782, 2003.
- HUTCHINSON, S.L., BANKS, M.K., SCHWAB, A.P. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizers. *Journal Environmental Quality*, vol.30, 2003.
- KANDELER, E., Palli, S., STEMMER, M. & GERZABEK, M. H. *Soil Biol Biochem*. 31:1253-126, 1999.
- KIPOPOULOU, A.M., MANOLI, E., SAMARA, C. Bioconcentration of PAHs in vegetables grown in an industrial area. *Environ. Pollut*. 106:369–380, 1999.
- JATAP, S.S., WOO, S.M.; KIM, T.S; DHIMAN, S.S; KIM, D.; Lee, J.K. Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass. *Fuel*. 116 :292–298, 2014.
- JING, W.; ZHONGZHI, Z.; YOUMING, S.; WEI, H.; FENG, H.; HONGGUANG, S. Phytoremediation of petroleum polluted soil. *Pet.Sci.*, 5:167-171, 2008.
- LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66: 1863–1871, 2007.
- MAKKAR, R.S., ROCHNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol*. 22:2280-2292, 2003.
- MASAKORALA, K.; YAO, J.; CHANDANKERE, R.; LIU, H.; LI, W. A combined approach of physicochemical and biological methods for the characterization

- of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res*, 21:454–463, 2014.
- MARUSENKO, Y.; HERCKES, P.; HALL, S.J. Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils of an Arid Urban Ecosystem. *Water Air Soil Pollut*, 219:473–487, 2011.
- MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165:195-209, 2005.
- NIE, M.; WANG, Y.; YU, J.; XIAO, M.; JIANG, L.; FANG, C.; CHEN, J.; LI, B. Understanding plant-microbe interactions for phytoremediation of petroleum-polluted Soil. *Plos One*. 6:17961, 2011.
- OBBARD, J.P., NG, K.L., XU, R. Biorremediation of petroleum contaminated beach sediments: use of crude palm oil and fatty acids to enhance indigenous biodegradation. *Water Air Soil Pollut*, 157:149–161, 2004.
- ORTIZ, J.E., GARCÍA, M.J., RODRIGUEZ, J.L. Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo. *Industria y Minería*, 351: 41-45, 2003.
- PARRISH, Z. D., BANKS, M. K., SCHWAB A. P. Assessment of Contaminant Lability During Phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Impacted Soil. *Environmental Pollution*. 137:2, 187-197, 2005.
- PIRNIK, M. P.; ATLAS, RM t; BARTHA, R. Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *Journal of bacteriology*, 119: 3: 868-878, 1974.
- REPSOL. Disponível em https://www.repsol.com/pt_pt/corporacion/conocer-repsol/actividad/downstream/complejo-industrial-cartagena/visita-virtual/. Visualizado em 01 de abril de 2014.
- TABATABAI, M.A., BREMMER, J.M., 1969. “Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity”. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301–307.
- TABATABAI, M.A., 1994. Soil Enzymes. En: Methods of Soils Analisis, Part 2. Microbiological and Biochemical properties. En: Weaver, R.W., Angles, J.S. and Bottomley, P.S. (eds). *Soil Science Society of America*, Madison, pp. 775-833.

- THOMPSON, O. A; WOLF, D.C; MATTICE, J.D.; THOMA, G.J. Influence of Nitrogen Addition and Plant Root Parameters on Phytoremediation of Pyrene-contaminated Soil. *Water Air Soil Pollut*, 189:37-47, 2008.
- THAVAMANI, P.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Biorremediation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAH degrading bacterial consortium. *Biodegradation*, 23, 823-835, 2012.
- TRAPP, S., MATTHIES, M., SCHEUNERTI, TOPP, E. M. Modeling the Bioconcentration of Organic Chemicals in Plants. *Environmental Science and Technology*. 24:1246-1252, 1990.
- WATTS, A. W.; BALLESTERO, T. P; GARDENER, K. H., Uptake of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Salt Marsh Plants *Spartina Alterniflora* Grown in Contaminated Sediments. *Chemosphere*, 62: 1253-1260, 2006.
- VIDALI, M. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, 73:1163-1172, 2001.
- XU, J. G.; JOHNSON, R. L. Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea. *Canadian Journal of Soil Science*, 77:3: 453-458, 1997.
- ZHANG, S.; LIU, J.; JIN, X.; CHAN, D.W.; HE, M. A Prospective Approach for Exploring Potential Biofuel Plants. *Journal of Life Sciences*, 7:1:69-75, 2003.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os experimentos foram realizados no Setor de Microbiologia do Solo em casa de vegetação, no Laboratório de Solos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil e no Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), no Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), em Murcia, Espanha. O trabalho foi dividido em cinco experimentos, sendo conduzidos em câmara de crescimento (I, IV) e em casa de vegetação (II e III). O objetivo do experimento I foi avaliar a capacidade de germinação das sementes de milho (*Zea mays L.*) sob diferentes concentrações de petróleo (0 a 5%), na presença ou ausência de inoculação com FMAs após 7 dias de condução experimental. No experimento II foi analisado o crescimento e estado nutricional da parte aérea e raízes das mudas de milho em solos contaminados em 4% de petróleo, utilizando-se a inoculação de FMAs, e aplicação de NPK e surfactante, de modo combinado ou separado, quanto à colonização de FMAs, após 60 e 120 dias de condução experimental. No experimento III foi observado o potencial de mudas de milho, FMAs, NPK e surfactante quanto à capacidade de degradar hidrocarbonetos no solo e as propriedades químicas do solo contaminado em 4% de petróleo e sua capacidade em extrair e degradar hidrocarbonetos, através das raízes e da parte aérea, após 60 e 120 dias de condução experimental. Durante os experimentos IV, foi determinada em solos semiáridos da Espanha contaminados com petróleo e óleo

diesel em 2%, respectivamente, a eficácia de diferentes tratamentos (composto orgânico, aeração, produto biológico bacteriano e/ou cevada) para acelerar e intensificar os processos de degradação do contaminante e diante de sua capacidade para atuar como catalisadores dos referidos processos, além de avaliar a fitotoxicidade dos solos e as diversas características microbiológicas e bioquímicas, aos 15, 30 e 50 dias de condução experimental.

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

- No experimento I foi observado que o crescimento da *B. brizantha* foi beneficiado pela inoculação com FMAs em solos contaminados em 1%, sendo superiores às mudas não inoculadas. Com o aumento das concentrações de óleo diesel no solo, houve redução no crescimento das mudas de *B. brizantha* e na colonização micorrízica.
- No experimento II, as mudas de milho tratadas com fungos micorrízicos arbusculares, NPK e surfactante químico de forma combinada apresentaram maior crescimento, nutrição nas raízes e parte aérea, e colonização micorrízica, em solos contaminados com petróleo em 4%. As plantas tratadas separadamente com surfactante, FMA e NPK apresentaram menor desempenho em relação aos demais tratamentos e maior resposta ao estresse ambiental. As mudas tratadas com NPK nos solos contaminados foram estatisticamente superiores em comparação com os demais tratamentos, sobretudo aos 120 dias de condução experimental.
- No experimento III, a fitorremediação combinada ao processo de bioaugmentação e bioestimulação favoreceu as propriedades químicas em relação ao solo sob atenuação natural (solos contaminados em 4%). Houve redução da relação C:N e aumento de carbono orgânico aos 120 dias de condução experimental. A maioria dos tratamentos de fitorremediação e biorremediação avaliados não apresentou aumento na degradação de n-alcenos no solo em relação aos solos controle mantidos pelo processo de atenuação natural. Aos 60 dias os solos contaminados

com petróleo tratados com a combinação de milho+FMA+NPK apresentaram melhor resposta em relação aos demais tratamentos no que se refere à degradação de n-alcenos no solo.

- Nos dois experimentos IV foram observados que os solos contaminados com petróleo e óleo diesel, tratados com composto orgânico e composto orgânico+planta apresentaram maiores crescimento das plantas, melhora nas características microbiológicas, bioquímicas e químicas do solo. Houve biodegradação promovida pelo composto orgânico e composto orgânico+ planta nos solos contaminados com petróleo. Entretanto, todos os tratamentos nos solos contaminados com óleo diesel apresentaram baixo índice de biodegradação. A inoculação com o consórcio bacteriano afetou o crescimento das plantas. Além disso, a aeração e a inoculação bacteriana não favoreceram a melhora na qualidade do solo e não promoveram a biodegradação dos contaminantes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tecnologias capazes de remediar solos impactados com petróleo e derivados de uma forma ambientalmente responsável e de baixo custo têm sido constantemente buscadas. Contudo, a aplicação das técnicas da biorremediação e da fitorremediação na recuperação de solos contaminados com petróleo e derivados em áreas contaminadas no Brasil ainda é um grande desafio. Estudos que avaliem a efetividade destas técnicas em diferentes tipos de solos precisam ser desenvolvidos com a perspectiva de serem futuramente utilizados em programas de recuperação ambiental pelas empresas de forma responsável e eficaz. Neste sentido, é importante incentivar o desenvolvimento de pesquisas envolvendo as técnicas de biorremediação e fitorremediação na região Norte Fluminense, uma vez que detém a maior produção de petróleo do Brasil, tornando-a um pólo de referência nesta área de estudo. Para avaliar a capacidade de fitorremediação de solos contaminados com petróleo e a sua capacidade de fitoextração, estão sendo realizadas análises referentes à quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no solo e nos tecidos da parte aérea e raiz das mudas de milho (referente ao experimento do item 3.3), a fim de consolidar os resultados obtidos pelo presente trabalho de forma mais efetiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (2011). *Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural referente a dezembro de 2010*.
- Aguiar, C.R.C. Desempenho de soja e braquiária na fitorremediação de solos contaminados com petróleo. Rio de Janeiro, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2006. 109p. (Dissertação de Mestrado).
- Alarcón, A.; Davies Jr., F.T.; Autenrieth, R.L.; Zuberer, D.A. (2008) Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Int. J. Phytorem*, v.10, p. 251-263.
- Alarcón, A.; Delgadillo-Martínez J.; Franco-Ramírez, A.; Davies Jr., F.T.; Ferrera-Cerrato, R. (2006). Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita*-*Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Rev. Int. Contam. Amb*, v.22, p.39-47.
- Alvarez, J.A., Ramos, E., Fernández B., Nuñez, A. (2001). Gestión de residuos sólidos petrolizados. Petróleo Internacional, EUA.
- Atlas R, Bartha R. (2002) *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Ed. Addison Wesley. Madrid. 561p.
- Atlas, R.M., Pramer, D. (1990) Focus in Biorremediation. ASM news 56:7.

- Atlas, R.M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective, *Microbiol. Rev.*, 45:180-209.
- Bacon, C.W.; White, J.F. (2000) *Microbial Endophytes*. Publicado por CRC Press, 487 p.
- Berbara, R.L.L.; Souza, F.A.; Fonseca, H.M.A.C. (2006). *Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição*. In: Fernandes, M.S. (ed.) Nutrição mineral de plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, p. 74-85.
- Bidleman, T.F. (1988). *Atmos. Processes Environ. Sci. Technol.* 21, 361–367.
- Ogan, B.W., Sullivan, W.R. (2003). Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, v. 52, p.1717-1726.
- Bollag, J.M., Bollag, W.B. (1995). Soil contamination and feasibility of biological remediation. In: *Biorremediation Science and Applications*. H.D. Skipper, R.F. Turco (eds.) Soil Science Society of America Journal. Special publication Nº 43. Madison Wisconsin, USA, p. 1-13.
- Campanella B.F.; Bock, C.; Schröder, P. (2002) Phytoremediation to increase the degradation of PCBs and PCDD/Fs. *Environment Science & Pollution Research*, v.9, p. 73 – 85.
- CETESB. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Acesso em 20 jul. 2005. *Online*. Disponível na Internet <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areascontaminadas/relacaoareas.asp>.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Texto explicativo relação de áreas de áreas contaminadas e reabilitadas no estado de São Paulo. São Paulo, 2010. 14 p.
- CETESB . *Relatório de Emergências Químicas Atendidas pela CETESB em 2010*. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, São Paulo, SP. Acesso em 27 set. 2011. Disponível na Internet: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/artigos/artigos_relatorios.asp>.
- CETEM (2000) Biorremediação de solos contaminados. *Informativo do Centro de Tecnologia Mineral*. v.1, n.3, p.1-2.
- Clark L. (1995) Hydrocarbon pollution control and remediation of groundwater: a brief review. *Quarterly Journal of Engineering Geology*. v.28, p.93-100.

- Chaudhry, Q.; Blom-Zandstra, M.; Gupta, S.; Joner, E. J. (2005) Utilising the Synergy between Plants and Rhizosphere Microorganisms to Enhance Breakdown of Organic Pollutants in the Environment. *Environment Science & Pollutants Research*, v. 12, n.1, p. 34 – 48.
- Colla, L.M.; Costa, J.A.V. (2003) Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, Rio Grande, v.13, p. 85-103.
- Crapez, M.A.C.; Borges, A.L.N.; Bispo, M.G.S.; Pereira, D.C. (2002). Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência hoje*, v.30, p.179.
- Cunha, C.E.S.C.P. da. (2009) Gestão de resíduos perigosos em refinarias de petróleo. *Tese (Mestrado em Engenharia Ambiental)*. Rio de Janeiro – RJ, Universidade Estadual do Rio de Janeiro- UERJ, p. 134.
- Coutinho, H. D. e Barbosa, A. R. (2007) *Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização*. Silva Lusitana. v.15, n.1, p. 103 – 117.
- Daane, L. L., Harjono, I., Zylestra, G. J., Haggbom, M. M. (2001) Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associated With the Rizosphere of Salt Marshe Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 67, p. 2683-2691.
- Debiane, D., Garcon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Shiral, P., Grandmougin-Ferjani, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A.L.H. (2009) Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phytochemistry*, v.70, p. 1421–1427.
- EPA. (2001) *Guia del ciudadano: Tecnología de la Restauración Ambiental*.
- Fava, F., Berselli, S., Conte, P., Piccolo, A., Marchetti, L., (2004) Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biotechnol. Bioeng.* v.88, p.214-223.
- Fernandes, M.S. (2006) Nutrição Mineral de Plantas. *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*. Viçosa, MG. 432p.
- Finlay, R. D. (2004) Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist*, v.18, p.91-96.
- Galdino, C.A.B., Santos, E.M.dos, Pinheiro, J.I. (2004) Marques Júnior, S. Passivo ambiental: revisão teórica de custos na indústria do petróleo. *Revista Produção*, v.14, p.54-63.

- Gao, Y., Zhu, L. (2004) Plant uptake, accumulation and translocation of Phenanthrene and Pyrene in soils. *Chemosphere*, v.55, p.1169–1178.
- Gao Y.Z., C.D. Collins, (2009) Uptake pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons in white clover, *Environ. Sci. Technol.* v.43, p. 6190–6195.
- Gao Y.Z, Ling, W.T. (2006) Comparison for plant uptake of phenanthrene and pyrene from soil and water, *Biol. Fertil. Soils*, v. 42, p. 387–394.
- Gao, Y.Z.; Cheng, Z.X.; Ling, W.T.; Huang, J. (2010) Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots, *Bioresour. Technol.*, v.101, p.6895–6901.
- Germida, J.J.; Frick, C.M.; Farrell, R.E. (2002) Phytoremediation of oil-contaminated soils. *Developments in Soil Science*, v.28, p.169-186.
- Göhre, V.; Paszkowski, U. (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Revista Planta*. v.223, p.1115-1122.
- Greenberg, B.M.; Huang, X.D., Gerhardt, K., Glick, B.; Gurska, J.; Wang, W.; Lampi, M.; Khalid, A.; Isherwood, D., Chang, P.; Wang, H.; Wu, S.S.; Yu, X.M.; Dixon, D. G.; Gerwing, P. (2007). Field and Laboratory Tests of a Multi-Process Phytoremediation System for Decontamination of Petroleum and Salt Impacted Soils. *In: Proceedings of the Ninth International In Situ and On-Site Remediation Symposium*. Batelle Press.
- Frick, C.M.; Farrell, R.E.; Germida, J.J. (1999) *Assessment of Phytoremediation as an In-Situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Site*. Petroleum Technology Alliance of Canada (PTAC), Calgary. 82 p.
- Harms, H.; Schlosser, D; Wick, L.Y. (2011) Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*.
- Hart, M.M., Trevors, J.T. (2005) Microbe management: application of mycorrhizal fungi in sustainable agriculture. *Frontier Ecology Environment*, v. 3, p.533–539.
- Hernández-Ortega, H.A., et al., (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate, *Journal of Environmental Management*, v.10, p.10-16.

- Howsam, M., Jones, K.C., Ineson, P. (2001). PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. II: uptake during a growing season. *Chemosphere*, v.44, p.155–164.
- Houshmandfar, A.; Asli, D. E. (2011) Seed Germination and Seedling Growth of Wheat, Barley, Alfalfa and Clover as Affected by Gasoline and Diesel Fuel Mixture. *Advances in Environmental Biology*, v. 5, p.1250.
- Huang, H., Zhang, Z.; Shan, X.q.; Chen, B.D.; Zhu, Y.G.; Bell, JN.B. (2007).Effect of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus caledonium*) on the accumulation and metabolism of atrazine in maize (*Zea mays L.*) and atrazine dissipation in soil. *Environmental Pollution*. v.146, p.452-457.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) Agents reviewed by the IARC monographs, v.1-98. *Disponível em:* <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ListagentsCASnos.pdf>>. Acesso em: 06 de julho de 2011.
- ITRC—PHYTOTECHNOLOGY Technical and Regulatory Guidance Document, 2001. Technical/Regulatory Guidelines. *Prepared by Interstate Technology and Regulatory*. [<http://www.itrcweb.org/Documents>]. p. 123.
- Jaques, R.J.S.; Bento, F.M.; Antonioli, Z.I.; Camargo, F.A.O. (2007) Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, p.1192-1201.
- Joner, E.J; Johansen, A.; Loibner, A. P.; Cruz, M. A.; Szolar, O. H. J.; Portal, J.M.; Leyval, C. (2001) Rhizosphere Effects on Microbial Community Structure and Dissipation and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Spiked Soil. *Environmental Science Technology*. v.35, p.2773–2777.
- Joner, E.J., Leyval, C. (2001). Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza*, v.10, p.155–159.
- Joner, E.J., Leyval, C., (2003). Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomie*, v.23,p. 495-502.
- Kaimi, E. et al. (2006) Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. *Environmental and Experimental Botany*, Oxford, v.55, p.110-119.

- Kathi, S.; Khan, A.B. (2011) Phytoremediation approaches to PAH contaminated soil. *Indian Journal of Science and Technology*. v. 4, n. 1.
- Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., Hayes, W.J., (2000) Role of plants, mycorrhiza and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, v.41, p.197–207.
- Kipopoulou, A.M., Manoli, E., Samara, C. (1999). Bioconcentration of PAHs in vegetables grown in an industrial area. *Environ. Pollut.* 106, 369–380.
- Lane, D.A., 1988. The fate of polycyclic aromatic compounds in the atmosphere and during sampling. *In: Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds*, Vo-DINH T., Wiley, New York, v.101, p. 31–58.
- Li, H. G. Sheng, C.T. Chiou, O. Xu, (2005) Relation of organic contaminant equilibrium sorption and kinetic uptake in plants, *Environ. Sci. Technol.* v.39, p. 4864–4870.
- Li, Y. A. Yediler, Z. Ou, I. Conrad, A. Kettrup, (2001) Effects of a non-ionic surfactante (Tween80) on the mineralization, metabolism and uptake of phenanthrene in wheat-solutionlava microcosm, *Chemosphere*, v. 45, p.67–75.
- Lamego, F.P.; Vidal, R.A. (2007) Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? Pesticidas: *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 17: 9-18.
- Leyval C.; Binet P. (1998). Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *J. Environ. Qual.*v. 27, p.402-407.
- Liu, S.L.; Luo, Y.M.; Cao, Z.H.; Wu, L.H.; Ding, K.Q.; Christie, P. (2004) Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health*, v. 26, p.285–293.
- Makkar, R.S., Rochne, K.J. (2003). Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol.* v.22, p.2280-2292.
- Marín, J.A., Moreno, J.L., Hernández, T., and García, C. 2006. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. *Biodegradation*, v.17, n.3, p. 251-261.
- Marques, Marcia; Aguiar, Christiane Rosas Chafim; da Silva, Jonatas José Luiz Soares da. (2011) Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*[online]. v.35, n.1, p. 1-11.

- McVeety, B., Hites, R.A. (1967). Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to water surfaces—a mass balance approach. *Atmos. Environ.* v.22, p. 511–536.
- Mendez-Natera, J.R.; Zapata, C.R.; Zapata, K; Otahola-Gomez, V.A. (2004) Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95. *Revista UDO Agrícola*, v.4, p.66-71.
- Michereff, S.J.; Barros, R. (2001) *Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco*, p. 368.
- Merkl, N.; Schultze-Kraft, R.; Arias, M. Influence of fertiliser levels on phytoremediation of crude oil with the tropical pasture grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A.Rich.) Stapf. *Int. J. Phytoremediation*. Impresso, 2005.
- Nie, M.; Wang, Y.; Yu, J.; Xiao, M., Jiang, L.; Fang, C.; Chen, J.; Li, B. (2011) Understanding plant-microbe interactions for phytoremediation of petroleum-polluted Soil. *PLoS ONE*, v.6, p.17961.
- Ogboghodo, A.; Iruaga, E. K.; Osemwota, I.O; Chokor, J. U. (2004) An assement of the effects of crude oil pollution on soil properties, germination and growth of maize (*Zea mays*) usind two crude types – forcados light and escravos light. *Environmental Monitoring and Assessment*, 96:143–152.
- Parrish, Z. D., Banks,, M. K., Schwab A. P., 2005. Assessment of Contaminant Lability During Phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Impacted Soil. *Environ Pollut.* v.137, p. 187-97.
- Park, J; Ball, L.M.; Richardson, S.D.; Zhuand, H.B.; Aitken; Michael D. Aiken (2008) Oxidative mutagenicity of polar fractions from polycyclic aromatic hydrocarbon–contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.27, p. 2207–2215.
- Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, v.56, p.15-39.
- Piquet, R. (2010) A cadeia produtiva do petróleo no Brasil e no Norte Fluminense. *Revista de Desenvolvimento Econômico*. Salvador, Ano XIII Nº 22, p. 19-20.
- Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z. and Cameotra, S.S. (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, v.12, p.633–654.

- Pons-Jiménez, M.; Guerrero-Peña, A.; Zavala-Cruz, J.; Alarcón, A. (2011) Extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo en suelos con características físicas y químicas diferentes. *Universidad y ciencia*, v.27, n.1, p.1-15.
- Qiao, J., Zhang, C.; Luo, S.; Chen, W. (2014) Bioremediation of highly contaminated oilfield soil: Bioaugmentation for enhancing aromatic compounds Removal. *Front. Environ. Sci. Eng.* v.8, p.293–304.
- Quiñones-Aguilar, E.E.; Ferrera-Cerrato, R. F.; Gavi-Reyes, L.; Fernandez-Linares, L., Rodríguez-Vasquez, R.; A. Alarcón. (2003) Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia*, v.37, p. 585-594.
- Reid, B. J.; Jones, K. C.; Semple, K. T. (2000) Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments: a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ. Pollut.* v.108, p.103-112.
- Ribeiro, D.V.; Campos, C.H. (2011) O Transporte de petróleo, gás natural e biocombustíveis. *Revista Direito Energia*, ano III, v. 1.
- Rillig, M.C., Caldwell, B.A., Wosten, H.A.B. & Sollins, P. (2007). Role of proteins in soil carbon and nitrogen storage: controls on persistence. *Biogeochemistry*, v.85, p.25–44.
- Rillig, M. C., Wright, S. F., Nichols, K. A., Schmidt, W. F. and Torn, M. S. (2001) Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil*, v.233, p.167–177.
- Ryan, J.A., Bell, R.M., Davidson, J.M., O'connor, G.A. (1988). Plant uptake of non-ionic organic chemicals from soils. *Chemosphere*, v.17, p. 2299–2323.
- Rosa, G.S. (2006). Avaliação do potencial de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por petróleo – *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Engenharia/ Centro de Tecnologia e Ciências/UERJ, RJ.
- Rubin, E. S. (2005) IPCC Special Report on Carbon Dioxide Capture and Storage. Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA Presentation to the U.S. *Climate Change Science Program Workshop* Washington, 30p.
- Sangabriel W, Ferrara-Cerrato R, Trejo AD, Mendoza LMR, Cruz SJS, López OC, Delgadillo MJ, Alarcón A (2006) Tolerancia y capacidad de fitorremediación de

- combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, v.22, p.63-73.
- Schubler, A.; Schwarzott, D.; Walker, L. A. (2001) A New Fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and Evolution. *Mycological Research*, v.12, p.1413-1421.
- Silva, J.M.C. da (2008) Petróleo e gás na Bacia de Campos (RJ): percepção dos impactos ambientais pela população. *Dissertação de Mestrado em Ecologia*, UFRJ, Rio de Janeiro. 75p.
- Silveira, A. P. D. Micorrizas In: Cardoso, E. J. P. N.; Neves. M. C. P. (1992) (Ed). *Microbiologia de solo*. Campinas-SP; *Sociedade Brasileira de ciência do solo*, cap. 19. p. 257-282.
- Simonich, S.L., Hites, R.A. (1995). Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environ. Sci. Technol.* v.29, p.2095–2103.
- Smith, M.J.; Flowers, T.H.; Duncab, H.J.; Alder, J. (2005) Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil with aged PAHs residues. *Environmental Pollution*, v.28, p.1-7.
- Smith, S. E., Read, D. J (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. 2. ed. San Diego, Academic Press, p. 605.
- Smith, A. F., Grace, E. J., Smith, E. S. (2009) More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 182:347-358.
- Sung, K., Corapcioglu, M.Y., Draw, M.C., Munster, C.L. (2001). Plant contamination by organic pollutants in phytoremediation. *J. Environ. Qual.* v.30, p.2081–2090.
- Tao S. a,b,* , X.C. Jiao a, S.H. Chen a, W.X. Liu a, R.M. Coveney Jr b, Zhu L.Z. c, Y.M. Luo (2006) Accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice (*Oryza sativa*). *Environmental Pollution*, v. 140, p. 406 - 415.
- Tissot, B. P., Welte, D. H. (1984). *Petroleum Formation and Occurrence – A new approach to Oil and Gas Exploration*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 699p.
- TRANSPETRO (PETROBRAS Transporte S.A). Disponível em: http://www.transpetro.com.br/TranspetroSite/appmanager/transpPortal/transplnternet?_nfpb=true&_nfls=false. Acesso em 12 de julho. 2011.

- Trapp S., Matthies, M., Scheunerti., Topp E. M. (1990) Modeling the Bioconcentration of Organic Chemicals in Plants. *Environmental Science and Technology*. v. 24, nº 8., p 1246-1252.
- Treseder, K.K.; Allen, M.F. (2000) Mycorrhizal fungi have a potencial role in soil carbon storage under elevated CO and nitrogen deposition. *New Phytology*, v.147, p.189-200.
- USEPA - UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (2004), Hazardous Waste. Washington, DC. Disponível em: <http://www.epa.gov/region1/superfund/basics/gloss.html#h>, acessado em 23/06/2011.
- Van Aken, B.; Correa, P.A.; Schnoor, J.L. (2010) Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: New trends and promises. *Environment Science Technology*. v.44, p.2767- 2776.
- Vieira, G. E. G.; Silveira, C. R. da; Cutrim, J.; Ribeiro, J. (2011) Avaliação dos principais aspectos da fitorremediação aplicados na redução da poluição do solo e da água. *Engenharia Ambiental* - Espírito Santo do Pinhal. 8: 182-192.
- Volante, A., Lingua, G., Cesaro, P., Cresta, A., Puppo, M., Ariati, L., Berta, G., (2005). Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. *Mycorrhiza* v.16, p.43-50.
- Xiao M., Y.Z. Gao, W.T. Ling, Z.X. Cheng, Y.C. Zeng, (2009) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on enzymes activity in soils contaminated by phenanthrene and pyrene, *China Environ. Sci*. v. 29, p.668–672.
- Watts A. W.; Ballesteros, T. P; Gardener, K. H., (2006). Uptake of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Salt Marsh Plants *Spartina Alterniflora* Grown in Contaminated Sediments. *Chemosphere* v. 62, p 1253-1260.
- Wenzel, W.W. (2009) Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil*, v. 321, p.385–408.
- Wetler-Tonini, R.M.C.; Rezende, C. E. De; Grativol, A.D. (2010). Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão. *Oecologia Australis*, v.14, p.1010-1020.
- Wild, S.R., Jones, K.C., 1992. Polynuclear aromatic hydrocarbons uptake by carrots grown in sludge amended soil. *J. Environ. Qual*. v.21, p.217–225.

- Wild, E., Dent, J., Thomas, G.O., Jones, K.C. (2005). Direct observation of organic contaminant uptake, storage, and metabolism within plant roots. *Environ. Sci. Technol.* v.39, p. 3695-3702.
- Yakubu, M. B. (2007) Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology*, v.6, p.2735-2739.
- Yu, X.Z.; Wu, S.C.; F.Y. Wu, M.H. Wong. (2011) Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, v.186, p. 1206–1217.
- Zílio, E. L.; Pinto, U. B. (2002) Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros. *Boletim Técnico da PETROBRAS*, Rio de Janeiro, v.45, p.21-25.

APÊNDICES

APÊNDICE A

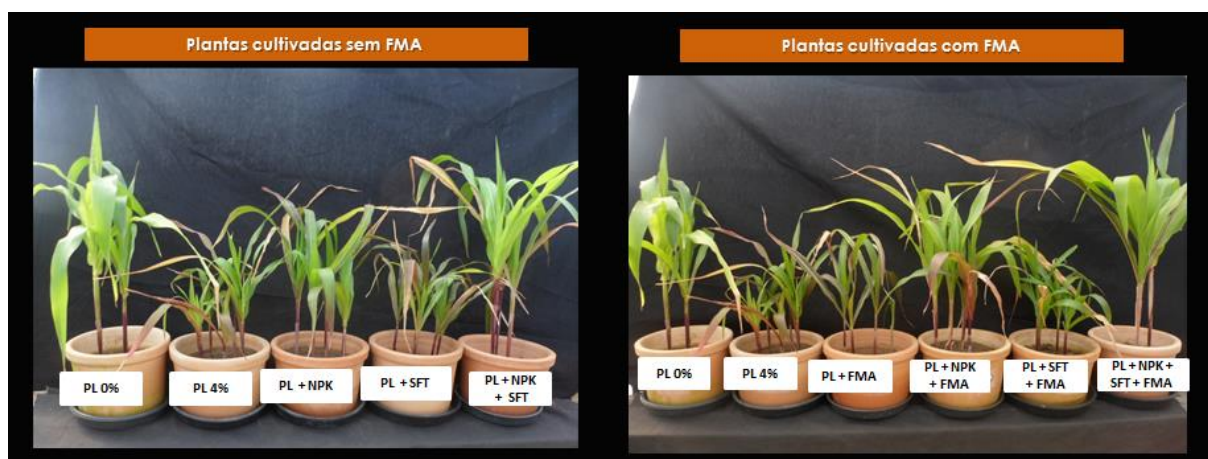


Figura 1. Mudanças de milho aos 60 dias após o transplante e aos 60 dias de condução experimental em função de diferentes tratamentos de fitorremediação na ausência e presença de inoculação com FMAs.

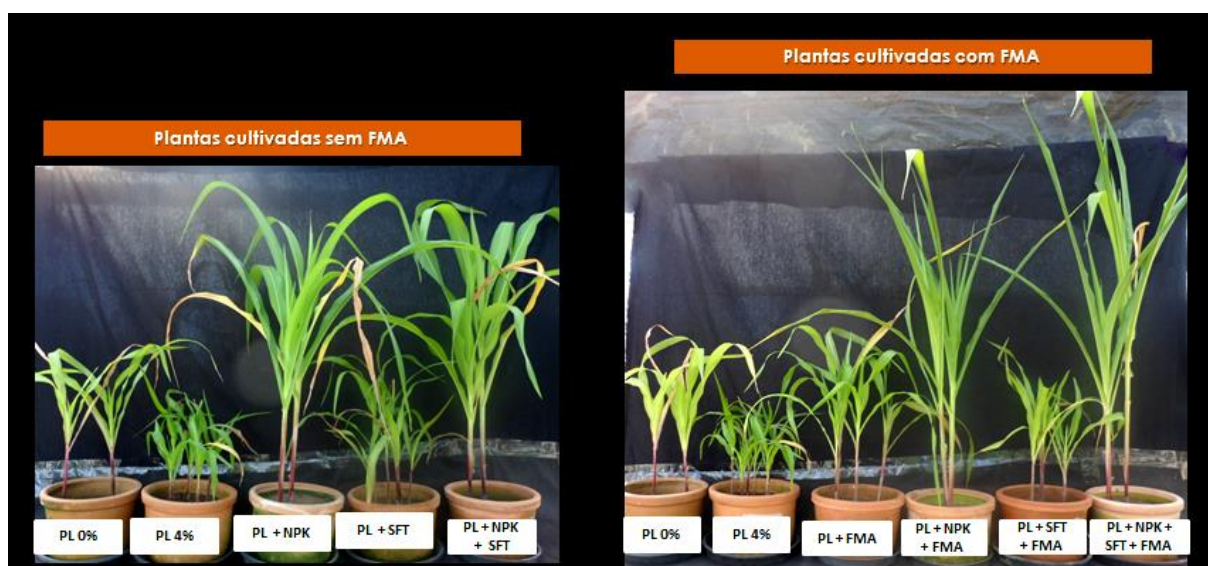


Figura 2. Mudanças de milho aos 60 dias após o transplante e aos 120 dias de condução experimental em função de diferentes tratamentos de fitorremediação na ausência e presença de inoculação com FMAs.

APÊNDICE B

Tabela 1. Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (ng/g peso seco) em solos semiáridos contaminados com petróleo

Tratamentos	P	DBT	C1-FIPyr	C2-FIPyr	C1-P	C2-P	C3-P	C1-DBT	C2-DBT	C*
Controle 0%	11 a	<82 a	<82 a	<82 a	25 a	23 a	<82 a	11 a	<82 a	<3 a
Controle 2%	<82 a	<82 a	<82 a	<82 a	4 a	4 a	<82 a	<82 a	<82 a	<3 a
Aeração 2% T50	87 c	<82 a	82 b	82 b	351 c	572 bc	507 c	497 b	1137 b	11 ab
CP 2% T50	8 a	102 b	101 b	140 c	168 b	831 c	1064 d	585 b	2392 c	26 c
PL 2% T50	<82 a	<82 a	62 b	84 b	<82 a	50 a	182 ab	21 a	93 a	14 b
PL + BACT 2% T50	<82 a	<82 a	56 b	54 b	4 a	222 ab	442 c	35 a	722 b	12 b
PL + CP 2% T50	61 b	37 a	101 b	80 b	284 bc	513 bc	347 bc	236 ab	624 b	<3 a
Médias	24	23	57	63	119	316	363	198	709	9

(P: fenantreno; DBT: dibenzotiofeno; C1-FIPyr: metilfluorantenos-pirenos, C1-P: metilfenantrenos-antracenos, C2: dimetilfenantrenos-antracenos, C3: trimetilfenantrenos-antracenos, C1-DBT: metildibenzotiofenos, C2: dimetildibenzotiofenos, C: Criseno). Limite de quantificação: 82,25 ng/g (*exceto criseno: < 3 ng/g).

Tabela 2. Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (ng/g peso seco) em solos semiáridos contaminados com petróleo

Tratamentos	C1-C	C2-C	C3-C	Pyr	F	C1-F	C2-F	C3-F	C1-N	C2-N	C3-N	C4-N
Controle 0% T0	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	8 a	10 a	14 a	6 a	12 a	6 a	12 a	12 a
Controle 0% T50	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	3 a	<3 a	3 a	<3 a	3 a	3 a
Controle 2% T0	15 ab	14 ab	18 a	27 ab	45 b	103 c	185 b	264 c	104 c	104 c	680 b	514 c
Controle 2% T50	41 c	46 c	30 a	18 ab	12 a	59 b	163 b	253 c	13 a	13 a	496 b	575 c
CP 2% T50	20 abc	24 b	32 a	15 ab	<3 a	<3 a	<3 a	46 a	<3 a	<3 a	<3 a	38 a
PL + CP 2% T50	15 ab	11 ab	<3 a	14 ab	<3 a	<3 a	<3 a	113 b	<3 a	<3 a	27 a	214 b
BACT 2% T50	38 bc	11 b	<3 a	44 c	38 b	97 bc	186 b	247 c	41 b	41 b	475 b	450 c
Médias	18	15	11	17	15	38	79	132	25	23	242	258

(C1-C: metilcrisenos; C2-C: dimetilcrisenos; C3-C: trimetilcrisenos; Pyr: pireno; F: Fluoreno; C1-F: metilfluoreno; C2-F: dimetilfluoreno; C3-F: trietilfluoreno; C1-N: metilnaftalenos, C2-N: dimetilnaftalenos; C3-N: trimetilnaftalenos; C4-N: tetrametilnaftalenos). Limite de quantificação: < 3 ng/g.

Tabela 3. Concentração de hidrocarbonetos alifáticos (alcanos de cadeia de 12 a 22 átomos de C) (ng/g peso seco) em solos semiáridos contaminados com petróleo

Tratamentos		C12	C13	C14	C15	C16	C17	Pristano	C18	Fitano	C19	C20	C21	C22
Controle 0% T0	1	59 a	221 a	444 a	932 a	707 a	614 a	115 a	275 a	102 a	77 a	<3 a	20 a	<3 a
Controle 0% T50	2	4 a	7 a	<3 b a	22 a	16 a	15 a	23 a	11 a	21 a	7 a	<3 a	6 a	5 a
Controle 2% T0	3	542 c	1355 b	2049 b	2860 ab	2618 ab	2595 ab	698 bc	2241 ab	1085 b	1954 ab	1845 abc	1539 ab	1314 b
Controle 2% T50	4	479 bc	1119 b	1583 b	2079 ab	2133 ab	2222 ab	721 bc	2202 ab	1306 b	2119 ab	2064 bc	1700 b	1403 b
*CP 2% T50	5	56 a	87 a	123 a	206 a	213 a	228 a	325 ab	259 a	676 ab	239 a	240 ab	170 a	118 a
PL + *CP 2% T50	6	67 a	104 a	138 a	288 a	282 a	269 a	477 abc	303 a	884 ab	251 a	255 ab	171 a	109 a
Bacteria T50	7	400 b	1131 b	1979 b	4215 b	4306 b	5071 b	819 c	4702 b	1230 b	3114 b	2862 c	2415 b	1973 b
Médias		229	575	902	1514	1468	1573	454	1427	758	1109	1038	860	703

*CP: composto orgânico; NC: valor inferior ao limite de quantificação (<3 ng/g).

Tabela 4. Concentração de hidrocarbonetos alifáticos (alcanos de cadeia de 23 a 34 átomos de C) (ng/g peso seco) em solos semiáridos contaminados com petróleo

Tratamentos	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34
Controle 0% T0	18 a	<3 a	17 a	18 a	35 a	29 a	36 a	<3 a	29 a	33 a	<3 a	<3 a
Controle 0% T50	6 a	5 a	6 a	5 a	19 a	6 a	22 a	19 a	7 a	20 a	6 a	<3 a
Controle 2% T0	1088 b	1003 b	851 b	539 d	450 d	350 d	311 c	416 c	213 b	163 c	108 b	66 c
Controle 2% T50	1160 b	1048 b	831 b	441 c	367 c	289 c	256 c	367 c	180 b	139 c	78 b	48 b
CP 2% T50	94 a	84 a	70 a	30 a	35 a	<3 a	19 a	<3 a	22 a	<3 a	<3 a	<3 a
PL + CP 2% T50	82 a	69 a	65 a	24 a	29 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a
BACT 2% T50	1607 b	1244 b	853 b	248 b	201 b	144 b	142 b	199 b	54 a	95 b	31 a	<3 a
Médias	579	493	384	186	162	117	112	143	72	64	32	16

*CP: composto orgânico; NC: valor inferior ao limite de quantificação (<3 ng/g).

Tabela 5. Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em solos semiáridos contaminados com óleo diesel após 50 dias de condução experimental

Tratamentos	P	DBT	C1-FIPyr	C2-FIPyr	C1-P	C2-P	C3-P	C1-DBT	C2-DBT	C
Controle 0% T0	11 ab	<82 a	<82 a	<82 a	25 a	23 a	<82 a	11 a	<82 a	<3 a
Controle 0% T50	<82 a	<82 a	<82 a	<82 a	4 a	4 a	<82 a	<82 a	<82 a	<3 a
Controle 2% T0	128 d	<82 a	219 c	170 b	533 b	849 b	661 b	107 a	81 a	<3 a
Controle 2% T50	104 d	<82 a	196 bc	141 b	478 b	821 b	628 b	56 a	40 a	<3 a
CP 2% T50	62 bc	<82 a	176 bc	145 b	430 b	872 b	632 b	45 a	43 a	<3 a
PL + CP 2% T50	136 d	<82 a	200 bc	140 b	581 b	983 b	615 b	54 a	46 a	<3 a
BACT 2% T50	99 cd	68 a	133 b	127 b	446 b	874 b	715 b	514 b	1045 b	11 a
Médias	77	10	132	103	357	632	464	112	179	2

(P: fenantreno; DBT:dibenzotiofeno; C1-FIPyr: metilfluorantenos-pireros, C1-P: metilfenantrenos-antracenos, C2: dimetilfenantrenos-antracenos, C3: trimetilfenantrenos-antracenos, C1-DBT: metildibenzotiofenos, C2: dimetildibenzotiofenos, C: Criseno). Limite de quantificação: 82,25 ng/g (*exceto criseno: < 3 ng/g). *CP: composto orgânico; NC: valor inferior ao limite de quantificação (<3 ng/g).

Tabela 6. Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (ng/g peso seco) em solos semiáridos contaminados com óleo diesel

Tratamentos	C1-C	C2-C	C3-C	Pyr	F	C1-F	C2-F	C3-F	C1-N	C2-N	C3-N	C4-N
Controle 0% T0	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	8 a	10 a	14 a	6 a	12 a	6 a	12 a	12 a
Controle 0% T50	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	3 a	<3 a	3 a	<3 a	3 a	3 a
Controle 2% T0	90 c	<3 a	<3 a	123 c	116 c	215 b	379 b	471 b	162 c	162 b	999 ab	807 b
Controle 2% T50	52 bc	<3 a	<3 a	88 bc	83 bc	170 b	295 b	354 b	82 ab	82 ab	806 ab	777 b
CP 2% T50	49 bc	<3 a	<3 a	86 bc	69 bc	169 b	335 b	418 b	31 a	31 a	726 b	703 b
PL + CP 2% T50	24 ab	21 a	<3 a	92 bc	112 c	229 b	412 b	470 b	153 b	153 b	1270 c	998 b
BACT 2% T50	44 abc	19 a	<3 a	54 b	60 b	145 b	278 b	387 b	85 ab	85 ab	804 ab	667 b
Médias	37	6	<3	63	64	134	37	301	75	74	660	566

(C1-C: metilcrisenos; C2-C: dimetilcrisenos; C3-C: trimetilcrisenos; Pyr: pireno; F: Fluoreno; C1-F: metilfluoreno; C2-F: dimetilfluoreno; C3-F: trimetilfluoreno; C1-N: metilnaftalenos, C2-N: dimetilnaftalenos; C3-N: trimetilnaftalenos; C4-N: tetrametilnaftalenos). Limite de quantificação: < 3 ng/g. *CP: composto orgânico; NC: valor inferior ao limite de quantificação (<3 ng/g).

Tabela 7. Concentração de hidrocarbonetos alifáticos (alcanos de cadeia de 12 a 22 átomos de C) (ng/g peso seco) em solos semiáridos contaminados com diesel

Tratamentos	C12	C13	C14	C15	C16	C17	Pristano	C18	Fitano	C19	C20	C21	C22
Controle 0% T0	59 a	221 a	444 a	932 a	707 ab	614 a	115 a	275 a	102 a	77 a	<3 a	20 a	<3 a
Controle 0% T50	4 a	7 bc	<3 a	22 a	16 a	15 a	23 a	11 a	21 a	7 a	<3 a	6 a	5 a
Controle 2% T0	1031 ab	3012 cd	4868 bc	10521 b	10027 c	12146 b	2249 ab	11342 b	2921 bc	7452 b	6846 a	5665 c	4634 c
Controle 2% T50	1558 c	3759 d	5435 c	7751 b	7612 c	8677 b	2350 ab	8661 b	3557 c	6870 b	6962 a	5910 c	4971 c
CP 2% T50	492 ab	1414 ab	2694 b	5732 b	5202 bc	6626 b	2112 ab	6078 b	3178 bc	4345 b	4114 a	3150 b	2509 b
PL + CP 2% T50	1113 ab	2809 bc	4807 bc	7363 b	6745 c	7812 b	5156 b	7476 b	3508 c	5532 b	5587 a	4029 bc	3336 bc
BACT 2% T50	685 b	1839 bc	3127 b	5894 b	5400 bc	6715 b	1300 a	6200 b	1979 b	4525 b	4248 a	3549 bc	3015 bc
Médias	706	37	3054	5459	5101	6086	1900	5720	37	4115	3965	37	37

*CP: composto orgânico; NC: valor inferior ao limite de quantificação (<3 ng/g).

Tabela 8. Concentração de hidrocarbonetos alifáticos (alcanos de cadeia de 23 a 34 átomos de C) (ng/g peso seco) em solos semiáridos contaminados com diesel

Tratamentos	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34
Controle 0% T0	18 a	<3 a	17 a	18 a	35 ab	29 a	36 ab	<3 a	29 a	33 a	<3 a	<3 a
Controle 0% T50	6 a	5 a	6 a	5 a	19 a	6 a	22 ab	19 a	7 a	20 a	6 a	<3 a
Controle 2% T0	3511 cd	2777 bc	1818 c	272 bc	200 c	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a	<3 a
Controle 2% T50	3832 d	3009 c	1893 c	294 bc	187 bc	108 a	112 bc	185 bc	<3 a	95 a	<3 a	<3 a
CP 2% T50	1981 b	1612 b	1091 b	180 b	145 abc	50 a	112 bc	153 b	<3 a	48 a	<3 a	<3 a
PL + CP 2% T50	2588 bcd	1976 bc	1358 bc	199 b	148 abc	47 a	103 b	152 b	<3 a	45 a	<3 a	<3 a
BACT 2% T50	2345 bc	1860 bc	1367 bc	397 c	298 c	162 a	195 c	292 c	95 a	74 a	42 a	28 a
Médias	2040	1605	1078	195	147	57	83	114	19	45	7	4

*CP: composto orgânico; NC: valor inferior ao limite de quantificação (<3 ng/g).