INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA FLUMINENSE

Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica

Ministério da Educação

GOVERNO FEDERAL BRASIL PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

**MESTRADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

**MODALIDADE PROFISSIONAL**

# IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL RIZORREMEDIADOR DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À *Allagoptera arenaria*

**GISELY DE PAULA MENDES**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ**

**2012**

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA FLUMINENSE Câmpus Macaé

A Coordenação agradece a FAPERJ pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisa dos docentes do PPEA, em especial ao concedido através do Edital de Apoio às Engenharias 2011 cuja contribuição foi fundamental para a melhoria de nossas instalações, secretaria, laboratórios e também ofereceu bolsas para alunos.

GISELY DE PAULA MENDES

# IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL RIZORREMEDIADOR DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À *Allagoptera arenaria*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, na área de concentração Meio Ambiente e Materiais, linha de pesquisa Desenvolvimento e Sustentabilidade.

Orientador: Professor D.Sc. Victor Barbosa Saraiva (Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro)

CABO FRIO/RJ
2013

Dissertação intitulada Identificação do Potencial Rizorremediador de Bactérias Associadas à *Allagoptera arenaria*, elaborado por Gisely de Paula Mendes e apresentada publicamente perante a Banca Examinadora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, na área de concentração Meio Ambiente e Materiais, linha de pesquisa Desenvolvimento e Sustentabilidade do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.

Aprovada em 29 DE JANEIRO DE 2013

Banca Examinadora:

Victor Barbosa Saraiva, Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica)/ Universidade Federal do Rio de janeiro/ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense

Luis Felipe Umbelino dos Santos, Doutor em Ecologia/Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense

Daniel Gibaldi, Doutor em Microbiologia e Imunologia/ Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz

Sei o quanto essa conquista significa para meus pais, por isso dedico esse trabalho com muito carinho a eles, Carlos Adão Siqueira Mendes e Josélia de Paula Mendes, meus maiores motivadores.

## AGRADECIMENTOS

Eu não posso deixar de colocar aqui todo o meu contentamento que é a soma da contribuição de toda essa gente. Tenho a agradecer muitas pessoas por ter chegado até aqui. Para muitos não é muito, mas essa conquista tem um significado muito importante na minha vida. É resultado de uma boa educação dada com tanto carinho pelos meus pais, Carlos Adão Siqueira Mendes e Josélia de Paula Mendes, que mesmo com todas as restrições financeiras, nunca me deixaram faltar o mais importante, o amor e o exemplo, e isso fez a diferença na formação do meu caráter. Hoje tudo o que faço é para retribuir e dar orgulho a minha família. É isso que me motiva. Em pensar que fazer um curso de graduação era um sonho tão distante para mim, hoje me deparo a um passo de me tornar mestre e me sinto uma pessoa muito abençoada por isso.

Durante esses dois anos e pouco de curso, muitas coisas boas aconteceram. Hoje vejo que não sou a mesma. Foram muitas as experiências construtivas com os professores e meus colegas de turma que me trouxeram crescimento.

As aulas, os cafezinhos e os almoços eram sempre agradáveis. Agradeço aos meus colegas de turma Carlos André, Cássius, Fernanda, Luizão, Magno, Mário Roberto, Ocimar, Patrícia, Paulo Venícius e Robertinho, que ficou pelo caminho, por fazerem desse ambiente tão prazeroso.

Além do conhecimento e amadurecimento adquirido nesses dois anos, eu recebi dois grandes presentes, a Fernanda e o Ocimar, pessoas que vou levar para a vida inteira. A Fernanda é um tesouro na minha vida. Mulher-menina-moleca batalhadora e com um futuro brilhante, eu posso ver. Nesses últimos meses Deus colocou Fernanda trabalhando ao meu lado diariamente. Isso foi providencial, pois sozinha em uma cidade que não conheço ninguém, passando por toda essa pressão, angústia e medo, ter ela do meu lado foi crucial. Muitas vezes, por causa desse meu jeito fechado, nosso entendimento se dava só no olhar. Ocimar, talvez a pessoa mais ética e sensata que já conheci na minha vida. Um grande servo, pai, amigo, professor, marido, um grande exemplo para mim. Meu companheiro de pesquisa, meu conselheiro, aquele que sempre soube me confortar, muitas vezes só com sua presença ou aquele beijo na testa, e quando cabiam palavras, eram as mais apropriadas. Vocês foram minha força. Fernanda e Ocimar, vocês são essenciais, eu amo vocês.

Preciso aqui também agradecer aos meus professores Dalila, Hélio, Jader, José Augusto, Paulo, Pinedo, Roberta, Rogério e Victor por dividirem conosco um bem tão precioso, o conhecimento. Em especial eu agradeço aos professores Manildo e Maria Inês.

Manildo que me conheceu aos 17 anos ingressando na faculdade, que acompanhou grande parte da minha trajetória acadêmica, pessoa e profissional excepcional na qual eu dedico muita admiração, respeito e um carinho imenso. Maria Inês, pessoa admirável, que foi mais que uma professora, exemplo de mulher guerreira e que eu tive o prazer de conhecer para além da sala de aula.

Agradeço ao meu orientador Victor Barbosa Saraiva por ter me apresentado a biorremediação, pela orientação, pela confiança e pelos conhecimentos transmitidos.

Esse trabalho é resultante de uma grande parceria. Agradeço a todos os colaboradores do Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM) pela força. Mais que especial vai o agradecimento para minhas estagiárias Marianne Nunes e Janaína Barros, meninas de ouro que foram meus olhos e minhas mãos na minha ausência. Obrigada meninas, esse trabalho é nosso!

A minha professora de graduação e pesquisadora do Instituto de Pesquisa do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), Maria Helena Baeta Neves, pelo tempo e ajuda dispensada para fotografar minhas lâminas.

A todos os meus companheiros de trabalho da Tesalab pelo incentivo, pela descontração, pelo crédito. Agradeço ao meu chefe Paulo Venícius por me dar suporte e me dispensar sempre que necessário para que eu pudesse cumprir minhas obrigações acadêmicas.

Não posso deixar de agradecer também as pessoas que no meio desse caminho longo e não muito fácil fizeram parecer tudo tão complicado e quase impossível. Essas pessoas só me mostraram o quanto seria difícil. E isso foi mais que uma motivação pra mim, porque pra chegar até aqui nada, nada mesmo foi fácil, e o prazer de conseguir algo assim é indescritível.

Agora eu faço meu agradecimento mais importante. Por último, porque foi Ele quem colocou no meu caminho todas essas pessoas descritas aí em cima e que me deu inspiração para conseguir transmitir meu contentamento nessas duas páginas. É Ele que conhece meu íntimo, sabe de onde eu vim e aonde posso chegar. É Ele que zela por mim e anda ao meu lado seja qual for a circunstância. Obrigada meu Deus por todo amor dedicado a mim, obrigada por mais essa vitória. A ansiedade, incertezas e angústia acabaram! Agora espero tranquila em Ti pelo meu próximo desafio.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

A biorremediação, que se utiliza do metabolismo de organismos vivos para a degradação de poluentes, é uma técnica que vem se difundindo como solução viável para remediação de áreas contaminadas. Dentre os tipos de biorremediação, a fitorremediação faz uso de vegetais para a degradação total ou parcial de poluentes presentes no ambiente. Essa capacidade é potencializada com a simbiose existente entre micro-organismos encontrados na rizosfera e o vegetal, recebendo o nome então de rizorremediação. O objetivo deste trabalho é estimular a utilização da técnica de biorremediação para descontaminação de solos de ambientes costeiros, como as restingas, contaminados por hidrocarbonetos do petróleo. Esta dissertação é composta por dois artigos, onde o primeiro é uma revisão bibliográfica sobre a utilização de bactérias associadas a raízes de vegetais na degradação de hidrocarbonetos do petróleo e o segundo é resultante dos experimentos realizados ao longo do mestrado a fim de testar a tolerância das bactérias endofíticas e da rizosfera da *Allagoptera arenaria* na presença de tolueno, um hidrocarboneto monoaromático pertencente ao grupo dos BTEX.


Palavras chave: Biorremediação. Fitorremediação. Micro-organismos. Restinga. Tolueno.


## ABSTRACT

The bioremediation, which uses the metabolism of living organisms to degrade pollutant, this is a technique that has been disseminated as a viable solution for remediation of contaminated areas. Among the types of bioremediation, the phytoremediation uses plants to the total or partial degradation of environmental contaminants. This capability is enhanced with the symbiosis between micro-organisms found in the rhizosphere and plant, then getting the name of rhizoremediation. The desired objective of this paper is to stimulate the use of the technique for the bioremediation to decontamination of soil coastal environments, such as sandbanks, contaminated by petroleum hydrocarbons. This dissertation consists of two articles, where the first is a literature review about the use of bacteria associated with plant to degrade petroleum hydrocarbons and the second is the result of experiments conducted over masters in order to test the tolerance of endophytic bacteria in the rhizosphere of the *Allagoptera arenaria*, in the presence of toluene, a hydrocarbon monoaromatic belonging to the BTEX group.


Keywords: Bioremediation. Phytoremediation. Micro-organisms. Sandbank. Toluene

# LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1**
Moléculas de biossurfactantes em interação com água e óleo ..... 15

**FIGURA 2**
Interações das esferas hídricas, atmosféricas, biológicas e geológicas..... 20

**FIGURA 3**
Biorremediação, fitorremediação e rizorremediação..... 29

**FIGURA 4**
Rede de degradação microbiana. Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos são mostradas em verde. Setas sólidas indicam fluxos de materiais, e as setas quebradas indicam interações diretas..... 40

**FIGURA 5**
Via de degradação do tolueno por *Beijerinckia indica*..... 41

**FIGURA 6**
Vias de degradação do tolueno pelas cepas *Burkholderia cepacia* mt-2 (pTOL), *Pseudomonas picke* tti G4, *Pseudomonas putida* F1 respectivamente..... 42

**FIGURA 7**
Fotografia de *A. arenaria* na restinga de Massambaba, Rio de Janeiro-RJ..... 44

**FIGURA 8**
Mapa do Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio..... 45

**FIGURA 9**
Bactérias isoladas da rizosfera da *Allagoptera arenaria.* A e B dois tipos de bastonetes Gram positivos..... 50

**FIGURA 10**
Bactérias isoladas da rizosfera da *Allagoptera arenaria*. Cocos Gram positivos no detalhe ..... 50

**FIGURA 11**
Dois tipos de bastonetes Gram negativos encontrados no interior da raiz da *Allagoptera arenaria*..... 51

**FIGURA 12**
Bastonetes Gram positivos encontrados no interior das raízes da *Allagoptera arenaria*..... 52

**FIGURA 13**
Comparação morfológica dos bastonetes Gram positivos encontrados no interior das raízes (A) e na rizosfera (B) da *Allagoptera arenaria*..... 53

**FIGURA 14**
Curva de crescimento das bactérias da rizosfera da *Allagoptera arenaria* na presença de tolueno..... 54

**FIGURA 15**
Bactéria da rizosfera tolerantes ao tolueno. A – Dois tipos de bastonetes e B – Cocos..... 55

**FIGURA 16**
Comparação morfológica entre *Beijerinckia* e bactéria da Rizosfera da *Allagoptera arenaria* após crescimento com tolueno..... 56

**FIGURA 17**
Bactérias endofíticas tolerantes ao tolueno..... 57

**FIGURA 18**
Curva de crescimento das bactérias endofíticas mistas da *Allagoptera arenaria* na presença de tolueno. ..... 58

# LISTA DE QUADROS

**QUADRO 1**
Vantagens e limitações da biorremediação..... 24

**QUADRO 2**
Gêneros de bactérias indicados para a biorremediação de poluentes..... 25

**QUADRO 3**
Remediação bem sucedida de alguns compostos utilizando bactérias da rizosfera associadas a vegetais..... 31

**QUADRO 4**
Espécies de bactérias endofíticas, associadas a vegetais, degradadoras de poluentes..... 32

# LISTA DE TABELA

**TABELA 1**
Valores orientadores de níveis aceitáveis de metais pesados e substâncias orgânicas para solos no Estado de São Paulo..... 21

# SUMÁRIO

**LISTA DE FIGURAS** ..... ix

**LISTA DE QUADROS** ..... xi

**LISTA DE TABELA**..... xii

**1 APRESENTAÇÃO** ..... 14

**2 ARTIGO 1**

UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS, ASSOCIADAS ÀS RAIZES DE VEGETAIS, NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO ..... 17

**3 ARTIGO 2**

POTENCIAL DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO GURIRI (*Allagoptera arenaria*) NA PRESENÇA DE HIDROCARBONETO DO PETRÓLEO ... 36

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... 65

# 1 APRESENTAÇÃO

Hoje, com a atual organização da nossa sociedade, o petróleo está entre as principais fontes de energia utilizadas pela humanidade. Além de sua importância como fonte de energia, seus derivados assumem um importante papel na fabricação de bens de consumo, sendo assim de suma importância na vida das pessoas (MARIANO, 2001).

"A concepção de um mundo sem as comodidades e benefícios oferecidos pelo petróleo implicaria na necessidade de uma total mudança de mentalidade e hábitos por parte da população, numa total reformulação da maneira como a nossa sociedade funciona" (MARIANO, 2001).

O crescimento elevado e rápido da população e consequente aumento da demanda de produção, fez com que o mercado do petróleo se expandisse, e com isso surgem os riscos de acidentes que podem vir a contaminar ambientes, principalmente os ecossistemas costeiros, entre eles as restingas.

Hoje, a comunidade científica vê claramente a importância das abordagens multidisciplinares que objetivam encontrar soluções para os problemas referentes à poluição causada pelo crescimento desordenado do homem, e isso é especialmente notado nos ecossistemas expostos a crescentes ameaças de hidrocarbonetos do petróleo, aumentado através das atividades de extração e contaminação dos recursos naturais (ROBERTSON *et al.*, 2007).

A conscientização dos efeitos nocivos da poluição para a saúde humana e o meio ambiente vem estimulando estudos voltados para descobertas de novas estratégias para a descontaminação de ambientes poluídos. Os métodos tradicionais para descontaminação são caros e muitas vezes inviáveis dependendo da área a ser tratada (CHAUDHRY *et al.*, 2005; PILON-SMITS, 2006). Para a revitalização de ambientes contaminados com poluentes orgânicos, a biorremediação, que é a utilização de organismos para a remediação de áreas degradadas, é uma área da biotecnologia que está se evidenciando devido à capacidade de muitas espécies de bactérias utilizarem carbono orgânico como fonte de energia, convertendo os contaminantes em $CO_2$ e $H_2O$. Além disso, estas podem produzir compostos de superfície ativos anfipáticos chamados de biossurfactantes. Em se tratando de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo, esses compostos produzidos por bactérias específicas, quando em contado com o substrato contaminado, se posicionam de acordo com suas afinidades, separando a água do óleo, evitando assim interações desfavoráveis. Eles são capazes de emulsificar tanto nas fases aquosa quanto nas não aquosas, otimizando a retirada do óleo e

derivados na coluna d'água, como também os adsorvidos ao sedimento (figura 1) (GOUVEIA *et al*, 2003).

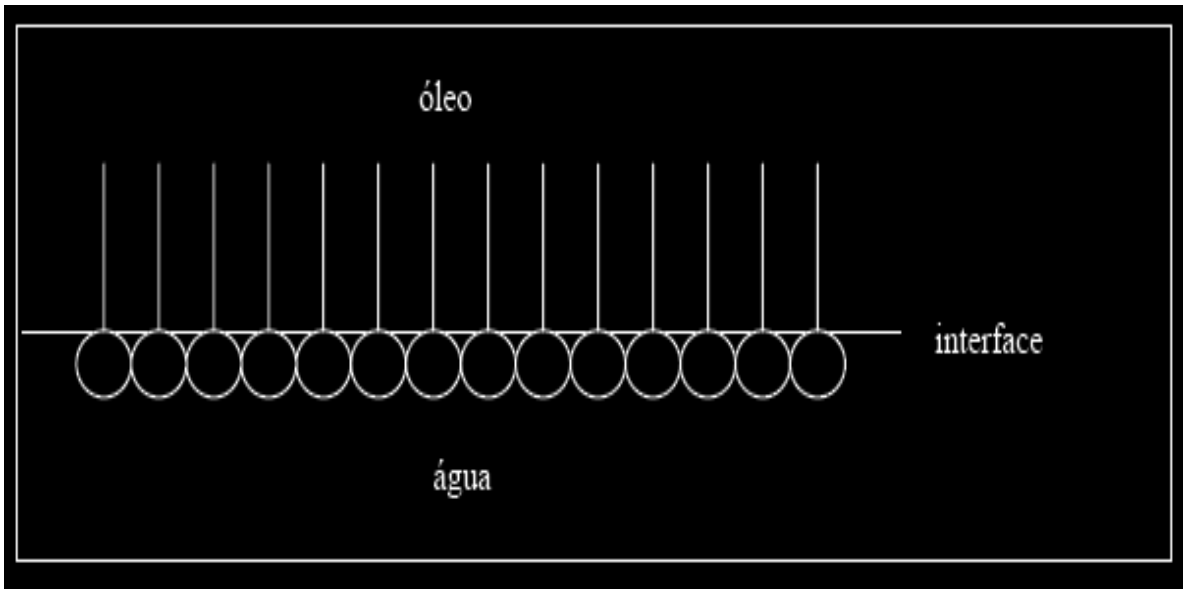


Figura 1 – Moléculas de biossurfactantes em interação com água e óleo. Fonte: Boek *et al*. (2002).

A utilização de sistemas vegetais com a finalidade de remover, capturar ou degradar substâncias tóxicas do ambiente impactado é denominada fitorremediação (DINARDI, 2003). Porém, sua potencialidade é acentuada com a contribuição de micro-organismos simbiontes presentes na rizosfera desses vegetais, para esse processo dá-se o nome de rizorremediação (ANDERSON; GUTHRIE; WALTON, 1993; CHAUDHRY *et al*., 2005; KUIPER *et al*., 2004; MA *et al.*, 2011).

A fitorremediação realizada com os vegetais que compõem o ecossistema de restinga destaca-se como campo de pesquisa inovador na área da biorremediação e consequentemente biotecnologia. São raros os programas de monitoramento das restingas e consequente controle da degradação desse ecossistema pela atividade antropogênica. Existe uma carência de estudos relativos à associação de micro-organismos e vegetais da restinga.

O ecossistema de restinga encontra-se enquadrado na categoria de sistema edáfico de primeira ocupação ou formações precursoras, contíguo com as formações dos manguezais, dos brejos, pântanos e áreas ribeirinhas, sendo tratada especificamente como "vegetação com influência marinha" (VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA, 1991).

Na literatura brasileira o ambiente de "restinga" possui várias definições, sendo caracterizado tanto como depósitos litorâneos, quanto outros aspectos costeiros e até mesmo a vegetação (GOMES *et al*., 2007).

Segundo a definição de Lacerda e colaboradores (1993), restingas são campos arenosos costeiros associados a um complexo de comunidades vegetais que possuem ocorrência em cerca de 79% da costa brasileira.

Sua formação se deu a partir de depósitos marinhos, devido a sucessivas transgressões e regressões do mar no período do quaternário, que consequentemente formaram uma sucessão de cordões arenosos (GOMES *et al*., 2007). As restingas são ambientes marginais ao Bioma Mata Atlântica (SCARANO, 2002), sendo então, imprescindível sua preservação. Em se tratando de diversidade ecológica, as restingas possuem baixa ocorrência de espécies endêmicas em comparação com a Mata Atlântica *sensu stricto*, a diversidade em restingas é menor, além da baixa ocorrência de espécies exclusivas, demonstrando que não houve tempo suficiente para o processo evolutivo das espécies (SCARANO, 2002). Segundo Araujo (2000), as restingas que incidem no estado do Rio de Janeiro são divididas em dez tipos de formações vegetacionais, cada uma delas caracterizadas de acordo com a sua flora e fisionomia.

Em se tratando de sua vegetação, de acordo com a resolução 07 de 23 de Julho de 1996 do CONAMA,

> entende-se por vegetação de restinga o conjunto das comunidades vegetais, fisionomicamente distintas, sob influência marinha e fluvio-marinha. Estas comunidades, distribuídas em mosaico, ocorrem em áreas de grande diversidade ecológica sendo consideradas comunidades edáficas por dependerem mais da natureza do que do clima.

O Estado do Rio de Janeiro possui 1.194,3 $km^2$ de área onde ocorre a vegetação de restinga (ASSUPÇÃO; NASCIMENTO, 2000), constituída de aproximadamente 1.000 espécies vegetais, onde 25% são representadas por ervas e arbustos (PEREIRA; CORDEIRO; ARAÚJO, 2004).

"Os solos sob vegetação de restinga são arenosos, quimicamente pobres, tendo como principal fonte de nutrientes o *spray* marinho" (ARAÚJO; LACERDA, 1987; LEÃO; DOMINGUEZ, 2000 *apud* GOMES *et al*, 2007).

A presença de micro-organismos e a introdução seletiva de micro-organismos específicos com grande capacidade biodegradante na rizosfera de plantas características desse ecossistema podem acelerar a remediação de solos contaminados com produtos químicos orgânicos, entre eles os hidrocarbonetos do petróleo (HYNES *et al*, 2004).

Este estudo tem como objetivo geral avaliar o potencial biorremediador das bactérias associadas à *Allagoptera arenaria,* tendo como objetivos específicos isolar e caracterizar

bactérias endofíticas da raiz e bactérias da rizosfera da *Allagoptera arenaria* e avaliar a capacidade de crescimento destas bactérias na presença de hidrocarboneto do petróleo.

Esta dissertação é constituída de dois artigos, sendo o primeiro uma revisão bibliográfica cujo título é "Utilização de bactérias, associadas às raízes de vegetais, na degradação de hidrocarbonetos do petróleo", onde apresenta o problema da contaminação do solo por hidrocarbonetos do petróleo e incentiva a utilização de bactérias, associadas às raízes de vegetais, na remediação de solos contaminados por estes poluentes. O segundo artigo é resultante dos experimentos realizados ao longo do mestrado, intitulado como "Potencial de crescimento de bactérias isoladas do guriri (*Allagoptera arenaria*) na presença de hidrocarboneto do petróleo". A área de estudo escolhida foi a restinga de Massambaba, no município de Arraial do Cabo, RJ. Foi realizada a caracterização das bactérias isoladas do tecido da raiz e da rizosfera e estas foram testadas quanto sua capacidade de crescer na presença do tolueno, um hidrocarboneto monoaromático pertencente ao grupo dos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos).

## 2 ARTIGO 1

UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS, ASSOCIADAS ÀS RAIZES DE VEGETAIS, NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO

### RESUMO

Dentre os poluentes mais comuns encontrados no solo estão os hidrocarbonetos do petróleo, provenientes principalmente de acidentes com transportes ou tanques de armazenamento de combustíveis. Uma técnica eficiente, menos onerosa e ecologicamente mais adequada para descontaminação desses ambientes é a biorremediação. A biorremediação faz uso de, principalmente, plantas e micro-organismos capazes de degradar compostos contaminantes. Quando plantas são utilizadas para este processo, dá-se o nome de fitorremediação. Mas as plantas por si só podem não apresentar um bom desempenho na remediação de vários contaminantes. Este processo pode ser mais bem-sucedido na presença de bactérias degradadoras presentes na rizosfera desses vegetais. Para este processo, dá-se o nome de rizorremediação. Tem-se conhecimento de várias espécies de bactérias, em associação com

vegetais, que são capazes de degradar compostos poluentes encontrados no ambiente, tornando-os menos nocivos, inócuos ou até mesmo degradando-os totalmente. O objetivo neste artigo é incentivar a utilização dessa técnica na remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo.

Palavras-chave: Biorremediação. Fitorremediação. Rizorremediação. Hidrocarbonetos do petróleo.

## ABSTRACT

Among the most common pollutants in the soil are the hydrocarbon oil, mainly from transport or fuel storage tanks accidents. An efficient technique, less costly and more environmentally suitable for decontamination of these environments is bioremediation. Bioremediation uses mainly plants and micro-organisms capable of degrading compounds contaminants. When plants are used for this process, gives the name of phytoremediation. But the plants themselves cannot perform well the remediation of various contaminants. This process may be most successful in the presence of the degrading bacteria in the rhizosphere of these plants. For this process, gives up the name of rhizoremediation. It has been known for several species of bacteria, in association with plants, which compounds are capable of degrading pollutants found in the environment, making them less hazardous, innocuous or even totally degrading them. The purpose of this article is to encourage the use of this technique in the remediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons.

Keywords: Bioremediation. Phytoremediation. Rhizoremediation. Petroleum Hydrocarbons.

# INTRODUÇÃO

De forma direta ou indireta, os hábitos culturais e o desenvolvimento de novas tecnologias são fatores que influenciam no fenômeno do impacto ambiental. Hoje se vê a produção de quantidades cada vez maiores de resíduos, sejam eles de origem doméstica ou industrial. Sendo a atividade industrial a grande responsável pelo processo de degradação do meio ambiente, através de emissões gasosas não controladas, disponibilização inadequada de rejeitos industriais e diversas outras formas que causam a contaminação do meio ambiente. Preocupações ambientais embrionárias que ocorreram antes da 2ª Guerra Mundial, demonstraram ser de fundamental importância na medida em que sucessivos acidentes ambientais passaram a ocorrer, o que estimulou a pesquisa de forma a reparar ou minimizar esses danos ambientais nos processos produtivos. Além disso, a pressão por parte dos governos e da opinião pública tem forçado essa postura ambientalmente correta das indústrias, estabelecendo leis que regulam o gerenciamento ambiental (MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004).

As características originais de solos, recursos hídricos, relevos e biodiversidade têm se destoado à medida que acontece a exploração dos recursos naturais em diversas atividades como agrícolas, industriais e construção civil. Isso acontece porque as técnicas hoje empregadas na exploração destes recursos, não estão adequadas à manutenção do meio ambiente (CAPECHE *et al.*, 2008; KOBIYAMA; MINELLA; FABRIS, 2001). Problemas como danos à saúde humana, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo, entre outros podem ser ocasionados devido a existência de áreas contaminadas. (MENEGHETI, 2007).

# REVISÃO DA LITERATURA

## Contaminação do solo

Solos são meios porosos formados na superfície da Terra por meio de processos de intemperismo resultantes de fenômenos biológicos, geológicos e hidrológicos. As propriedades físicas, químicas e biológicas do solo são determinadas pelo processo geológico

de sua formação, origem dos minerais, sua evolução de acordo com o clima e o relevo do local, além dos organismos vivos que nele habitam (CETESB, 2001).

De acordo com Kobiyama, Minella e Fabris (2001), o solo é a parte da Listosfera onde há a interação das esferas hidrológicas, biológicas, atmosféricas e geológicas (figura 2), por isso o solo é usado como base para a classificação de área degradada.

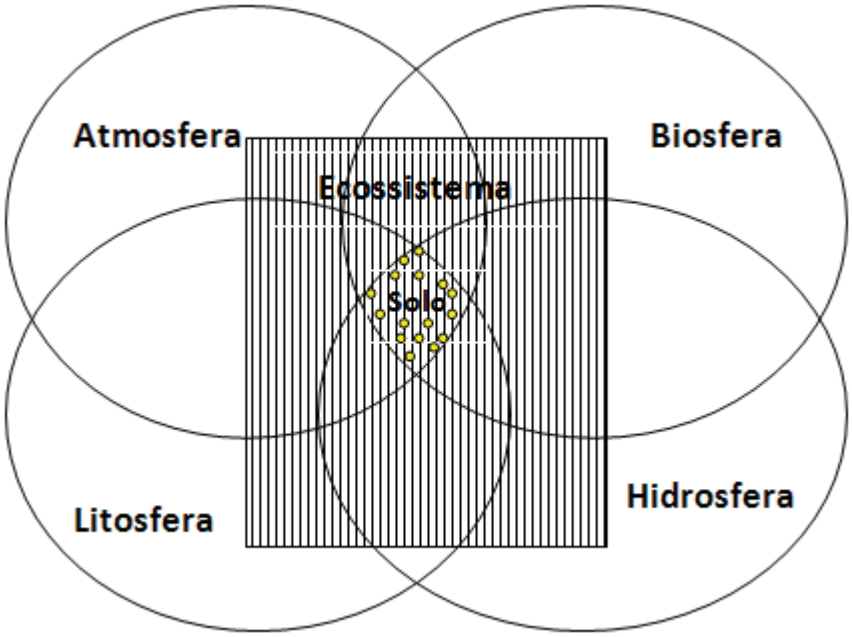


Figura 2 – Interações das esferas hídricas, atmosféricas, biológicas e geológicas. Fonte: Szabolcs (1994) *apud* Kobiyama, Minella e Fabris (2001) (Adaptado).

Bem após os problemas ambientais decorrentes da poluição das águas e da atmosfera terem sido tematizados e tratados, o conceito da proteção dos solos foi o último a ser abordado nas políticas ambientais dos países industrializados (CETESB, 2001).

Apesar de existirem alguns levantamentos dos teores de metais pesados e de contaminantes nos solos, no Brasil ainda não há uma definição dos seus níveis de referência para uma possível avaliação de contaminação. São Paulo foi o primeiro estado brasileiro a dispor de valores próprios de referência para a avaliação dos graus de poluição do solo e das águas subterrâneas. A Companhia de Tecnologia e Saneamento Básico (CETESB) do Estado de São Paulo, com base em pesquisas de campo e testes laboratoriais, elaborou uma lista com critérios, valores e padrões orientadores para a concentração de determinados metais pesados e substâncias orgânicas no solo e nas águas subterrâneas (CETESB, 2011) (tabela 1).

| Substância | VALORES ORIENTDORES | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Solos (mg.Kg-1) | | | | | Águas Subt.(µg.l-1) |
| | Referência | Alerta | Intervenção | | | Intervenção |
| | | | Agrícola APMax | Resid. | Indust. | |
| Alumínio | — | — | — | — | — | 200 |
| Antimônio | <0,5 | 2 | 5 | 10 | 25 | 5 |
| Arsênio | 3,5 | 15 | 25 | 50 | 100 | 10 |
| Bário | 75 | 150 | 300 | 400 | 700 | 700 |
| Cádmio | <0,5 | 3 | 10 | 15 | 40 | 5 |
| Chumbo | 17 | 100 | 200 | 350 | 1200 | 10 |
| Cobalto | 13 | 25 | 40 | 80 | 100 | 30 |
| Cobre | 35 | 60 | 100 | 500 | 700 | 2000 |
| Cromo | 40 | 75 | 300 | 700 | 1000 | 50 |
| Ferro | — | — | — | — | — | 300 |
| Manganês | — | — | — | — | — | 100 |
| Mercúrio | 0,05 | 0,5 | 2,5 | 5 | 25 | 1 |
| Molibdênio | <25 | 30 | 50 | 100 | 120 | 250 |
| Níquel | 13 | 30 | 50 | 200 | 300 | 50 |
| Prata | 0,25 | 2 | 25 | 50 | 100 | 50 |
| Selênio | 0,25 | 5 | — | — | — | 10 |
| Vanádio | 275 | — | — | — | — | — |
| Zinco | 60 | 300 | 500 | 1000 | 1500 | 5000 |
| Benzeno | 0,25 | — | 0,6 | 1,5 | 3 | 5 |
| Tolueno | 0,25 | — | 30 | 40 | 140 | 170 |
| Xilenos | 0,25 | — | 3 | 6 | 15 | 300 |
| Estireno | 0,05 | — | 15 | 35 | 80 | 20 |
| Naftaleno | 0,2 | — | 15 | 60 | 90 | 100 |
| Diclorobenzeno | 0,02 | — | 2 | 7 | 10 | 40 |
| Hexaclorobenzeno | 0,0005 | — | 0,1 | 1 | 1,5 | 1 |
| Tetracloroetileno | 0,1 | — | 1 | 1 | 10 | 40 |
| Tricloroetileno | 0,1 | — | 5 | 1 | 30 | 70 |
| 1,1,1 Tricloroetano | 0,01 | — | 8 | 20 | 50 | 600 |
| 1,2 Dicloroetano | 0,5 | — | 0,5 | 1 | 2 | 10 |
| Cloreto de Vinila | 0,05 | — | 0,1 | 0,2 | 0,7 | 5 |
| Pentaclorofenol | 0,01 | — | 2 | 5 | 15 | 9 |
| 2,4,6 Triclorofenol | 0,2 | — | 1 | 5 | 6 | 200 |
| Fenol | 0,3 | — | 5 | 10 | 15 | 0,1 |
| Aldrin e Dieldrin | 0,00125 | — | 0,5 | 1 | 5 | 0,03 |
| DDT | 0,0025 | — | 0,5 | 1 | 5 | 2 |
| Endrin | 0,00375 | — | 0,5 | 1 | 5 | 0,6 |
| Lindano (δ-BHC) | 0,00125 | — | 0,5 | 1 | 5 | 2 |

Tabela 1 – Valores orientadores de níveis aceitáveis de metais pesados e substâncias orgânicas para solos no Estado de São Paulo. Em destaque, BTX. Fonte: Adaptado de CETESB (2001).

De acordo com dados da CETESB, em São Paulo 79% dos solos contaminados estão localizado nos postos de combustíveis. De um total de 818 registros de regiões contaminadas na cidade de São Paulo, três estão localizadas em áreas comerciais, 83 em industriais, 25 são

de instalações para destinação de resíduos, três surgiram por acidentes desconhecidos e 675 localizam-se em postos de gasolina, demonstrando que um dos principais contaminantes do solo são os produtos que compõem combustíveis.

**Contaminação do solo por Hidrocarbonetos do Petróleo**

O petróleo e seus derivados ocupam lugar de destaque dentre os compostos orgânicos contaminantes do solo. Isso se deve ao fato do grande volume produzido e seus usos diversos na vida moderna (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000; MARIANO, 2006).

O aumento da contaminação do solo por hidrocarbonetos do petróleo tem sido destaque nas últimas décadas, principalmente em função da frequência com que os casos de contaminação são constatados e da gravidade do impacto no meio (SPINELLI, 2005). Embora os grandes vazamentos acidentais de petróleo sejam preocupantes e ocupem grande espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação por derivados de petróleo seja devido a pequenos vazamentos de combustível ocorridos em reservatórios, falhas mecânicas ou humanas ocorridas nas operações de descarga e por acidentes ocorridos no transporte deste produto químico por navios, caminhões ou dutos (CETESB, 2001; SPILBORGHS, 1997).

Nos solos contaminados por petróleo e seus derivados, alguns contaminantes se destacam em comparação aos demais. Os compostos de maior interesse e preocupação ambiental são: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (isômeros: *orto*-, *meta*- e *para*-xileno). Também conhecidos como BTEX, esses compostos são definidos como hidrocarbonetos monoaromáticos, cujas estruturas moleculares possuem como característica principal a presença do anel benzênico. Estes são os constituintes mais solúveis e mais móveis da gasolina. Por essas características, são os contaminantes que primeiro atingirão o lençol freático em caso de derramamento de combustível no solo, comprometendo a qualidade da água e consequentemente a saúde da população, uma vez que estes poluentes são depreciadores do sistema nervoso central e por causarem leucemia em exposições crônicas. O benzeno, dentre os BTEX, é considerado o mais tóxico (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; MARIANO, 2006; SILVA, 2002).

**Tipos de remediação de solo**

Diferentes termos são usados no Brasil para descrever os processos pelos quais uma área contaminada recebe intervenções, objetivando a contenção, ao isolamento, à remoção ou redução das concentrações dos contaminantes, entre eles, “remediação” de áreas

contaminadas, “recuperação” de áreas contaminadas, ou em alguns casos é utilizado o termo “restauração” (CETESB, 2001). Para este trabalho adotou-se o termo remediação.

A partir dos resultados de uma investigação detalhada e avaliação de risco realizado pelo órgão ambiental competente, se uma determinada área contaminada representa um risco para a saúde humana e segurança pública, parte-se para a definição da concepção da remediação, com vistas ao uso pretendido para a área. Não existe um critério fixo para determinar o melhor tipo de tratamento para uma área contaminada. Cada caso deve ser analisado individualmente, avaliando suas particularidades. Geralmente, a viabilidade da utilização de um método de remediação depende de vários fatores, como, por exemplo, as características do meio contaminado, dos contaminantes, objetivos da remediação, localização da área, tempo e recursos disponíveis (CETESB, 2001). A remediação pode ocorrer no próprio local, onde chamamos de remediação *in situ*, ou o material contaminado pode ser removido para ser tratado em estações de tratamento, este é denominado método *ex situ* (TUTIDA; FOGAÇA, 2011; VIDALI, 2001).

São conhecidas diversas técnicas para remediação de solos. De acordo com o Manual de Gerenciamento de Áreas Contaminadas da Cetesb (2001), dentre os métodos de remediação, seja *in situ* ou *ex situ,* aceitos em todo o mundo pelas agências reguladoras estão a remoção e redisposição de solos, a extração de vapores, a atenuação natural monitorada, tratamento térmico, oxidação química, extração por solventes, contenção e a biorremediação.

Este artigo vem estimular a utilização da biorremediação nos processos de descontaminação de solos contaminados. A biorremediação é uma alternativa ecologicamente mais adequada para a descontaminação de ambientes poluídos, uma técnica na qual organismos vivos autóctones (do próprio ambiente) ou introduzidos, normalmente plantas e micro-organismos, são utilizados para remover ou reduzir poluentes. Os poluentes orgânicos de difícil degradação são denominados recalcitrantes, que podem ser de origem natural ou sintética, neste caso são conhecidos por xenobióticos (*xenos*, do grego = estrangeiro) (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005).

Como em toda técnica, existem fatores que a fazem da biorremediação um método vantajoso e outros que são limitantes. O quadro 1 estão representadas algumas vantagens e limitações da técnica da biorremediação.

Quadro 1 – Vantagens e limitações da biorremediação. Fonte:Adaptado de CETESB (2001); Vidali (2001).

| Vantagens | Limitações |
|---|---|
| Biodegrada substâncias perigosas ao invés de apenas transferir o contaminante de um meio para outro | Não é uma solução imediata |
| Baixo custo (até 85%) | Necessidade de maior entendimento de seu funcionamento |
| Possível tratamento *in situ* | Método pouco evoluído no Brasil |
| Produtos utilizados não apresentam risco ao meio ambiente e não são tóxicos | Acompanhamento durante o processo |
| Tratamento de resíduos considerados de difícil degradação | Muitas moléculas não são biodegradáveis |
| Uso em áreas de proteção ambiental, indústria de alimentos, entre outras | Substâncias tóxicas ao micro-organismo inviabiliza o tratamento |

Apesar das inúmeras vantagens que a técnica da biorremediação oferece, esta pode apresentar problemas, dependendo do tipo de biorremediação utilizada.

Em se tratando da inserção de organismos não indígenas em locais contaminados com a finalidade de remediação, pode ocorrer Competição com a microbiota, fauna e flora local, podendo ocasionar um desequilibro ambiental e até mesmo a extinção das espécies.

Outros problemas podem ser ocasionados com a inserção de organismos geneticamente modificados (OGM), como a competição e troca de genes entre OGM e população microbiana indígena que pode levar a degradação genética das espécies autóctones. Uma alternativa para controlar esses fatores indesejáveis é o uso de elementos suicidas, que não permitem a replicação ou causam a destruição do DNA após serem transferidos para outros micro-organismos (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005).

O solo contém um grande número de micro-organismos que, gradualmente, vão se adaptando às fontes de energia e carbono disponíveis, que podem ser açúcares facilmente metabolizáveis ou compostos orgânicos complexos como os BTEX, formado pelos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (MARIANO, 2006). Na superfície do solo podemos encontrar um grande número de micro-organismos, como bactérias aeróbicas ou anaeróbicas, fungos, actinomicetos e protozoários. A maior concentração da microbiota do solo situa-se, de modo geral, na camada de 0 cm a 20 cm de profundidade, devido ao maior acúmulo de matéria orgânica do solo por deposição do

material vegetal da parte superficial. Com isso, os solos sem cobertura vegetal, tendem a ser mais pobres em matéria orgânica. Portanto, estes solos têm uma comunidade biológica menor e menos diversificada. Com isso, quanto mais profunda for a contaminação de um solo, menor a quantidade de micro-organismos indígenas para realizar a descontaminação do local. (SPINELLI, 2005; MARIANO, 2006; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002,). As bactérias são apontadas como sendo os organismos mais aptos a degradarem moléculas recalcitrantes xenobióticas, estas são moléculas orgânicas de difícil degradação produzidas por tecnologias industriais modernas e estranhas ao ambiente natural (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; VIDALI, 2001). O quadro 2 aponta alguns gêneros de bactérias indicados na remediação de determinados contaminantes.

Quadro 2 – Gêneros de bactérias indicados para a biorremediação de poluentes. Fonte: Tutida; Fogaça (2011); Caballero-Mellado *et al.* (2007); Thapa; KC; Ghimire (2012); Jacque *et al* (2007); Reginatto; Colla; Thomé (2011).

| **Contaminante** | **Gêneros de micro-organismos indicados** |
|---|---|
| Anéis aromáticos (combustíveis, resíduos industriais) | *Pseudomonas, Archromobacter, Bacillus, Arthrobacter,* |
| Cádmo (Cd) | *Staphylococcus, Bacillus, Pseudomonas, Citrobacter, Klebsiella, Rhodococcus, ,* |
| Chumbo (Pb) | *Bacillus* |
| Cobre (Cu) | *Escherichia, Pseudomonas, Bacillus* |
| Cromo (Cr) | *Alcaligenes, Pseudomonas* |
| Derivados do petróleo | *Pseudomonas, Aeromonas, Flavobacterium, Moraxella, Beijerinckia, Nocardia, Corynebacteria, Bacillus, Penicillum, Atinetobacter, Paracoccus, Mycobacterium, Burkholderia* |
| Enxofre (S) | *Thiobacillus* |
| Zinco (Zn) | *Rhodococcus, Bacillus* |

Apesar de desempenharem um importante papel na remidiação de poluentes, algumas bactérias dos gêneros citados acima são patogênicas, como as espécies do grupo dos

coliformes *Citrobacter, Klebsiella* e *Escherichia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*, *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis*.

*Citrobacter, Klebsiella* e *Escherichia* são gêneros de bactérias indicadoras de contaminação, pertencentes ao grupo dos coliformes. Estas são largamente utilizadas para avaliar a qualidade da água e são responsáveis pela transmissão de doenças, tais como a febre tifóide, febre paratifóide, disenteria bacilar e cólera (ROMPRÉ et al, 2002).

*Pseudomonas aeruginosa* uma das principais causas de infecções hospitalares. É considerada um patógeno oportunista, uma vez que, raramente, está associada a infecções comunitárias em indivíduos imunocompetentes, acometendo principalmente pacientes imunossuprimidos. Mais de 50% dos casos de infecção hospitalar por *P. aeruginosa* são de pacientes internados em UTIs devido a constante exposição de procedimentos invasivos. Trata-se de uma espécie muito resistente a antibióticos, antissépticos e desinfetantes (FERREIRA; LALA, 2010).

O complexo *Burkholderia cepacia*, abundante no solo e na rizosfera das plantas, faz parte de um grupo composto por nove espécies de bactérias patogênicas oportunistas na fibrose cística e responsáveis pela infecção cruzada entre doentes (CORREIA *et al*, 2008).

O gênero *Bacillus* é constituído em geral por bactérias patogênicas para os seres humanos e demais mamíferos, como *Bacillus anthracis*, causador do antraz e *Bacillus cereus* que causa gastroenterites e outras infecções (MENDES *et al*, 2004; PAVAN *et al*, 2011).

**Principais gêneros de bactérias que degradam Hidrocarbonetos do Petróleo**

Tem-se o conhecimento de diversas espécies de bactérias que estão envolvidas no processo de degradação de poluentes, tais como metais pesados e compostos orgânicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos).

Quando as bactérias estão expostas ao contaminante, elas passam a utilizar o carbono orgânico como fonte de energia, transformando-o em $CO_2$ e $H_2O$. Algumas bactérias possuem a capacidade de produzir biossurfactantes, compostos de superfície ativos, que são capazes de emulsificar tanto nas fases aquosa quanto nas não aquosas, otimizando a retirada do óleo e derivados na coluna d'água como também os adsorvidos ao sedimento (GOUVEIA *et al*, 2003).

> A habilidade de micro-organismos degradarem BTEX é conhecida desde 1908, quando Stormer isolou a bactéria *Bacillus hexabovorum* que apresentou capacidade de crescer aerobiamente em meio contendo tolueno e xileno. A existência de degradadores de BTEX é fato largamente aceito, além disso, estes micro-organismos estão amplamente distribuídos. A capacidade de micro-organismos naturais do solo em degradar BTEX foi primeiro demonstrada por Gray e Thornton em 1928. Estes pesquisadores encontraram, entre 245 espécies de bactérias presentes em amostras de solos não contaminados, 146 capazes de degradar hidrocarbonetos (GIBSON; SUBRAMANIAM, 1984 *apud* MARIANO, 2006).

Dentre micro-organismos que degradam compostos aromáticos, encontram-se as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e outros gêneros associados à biorremediação, tais como as *Sphingomonas* (HYNES *et al*., 2004), *Arthrobacter, Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Ralstonia, Micrococcus*, *Mycobacterium, Bacterium, Bacillus*, *Spirillum*, *Rhodococcus* e *Sphingomonas.* (AGUIAR, 2006; CABALLERO-MELLADO *et al,* 2007; SEO; KEUM; LI ,2009; THAPA; KC; GHIMIRE, 2012; GRAY; THORNTON, 1928 *apud* MARIANO, 2006).

Venkateswaram e Harayama (1995) isolaram uma população bacteriana capaz de degradar petróleo bruto, através da técnica do enriquecimento de culturas, e puderam verificar que 28-51% da fração saturada de petróleo e 0-18% da fração aromática foram biodegradadas por uma cultura mista, onde as espécies isoladas foram *Acinetobacter* sp.*, Pseudomonas vesicularis, Pseudomonas diminuta, Moraxella* sp. *, Sphingobacterium* sp. *e Ochrobactrum* sp..

Dois gêneros que tem apresentado um resultado satisfatório quanto à capacidade de degradação do hidrocarboneto do petróleo são o *Burkholderia* e o *Pseudomonas.* Leite e Cunha (2000) em sua pesquisa sobre a biodegradação da gasolina, composto orgânico rico em compostos aromáticos, obtiveram um resultado satisfatório quanto à degradação do combustível por esses gêneros.

Ridgway e colaboradores em 1990, concluíram em seu estudo que dentre as 121 cepas de bactérias capazes de utilizar a gasolina como fonte de energia, isoladas da água subterrânea, 18,4% era *Pseudomonas putida,* 1,6% era *Pseudomonas alcaligenes* e 0,41% era *Pseudomonas cepacia.* Isso prova que a utilização desse gênero para biorremediação de compostos orgânicos aromáticos é uma técnica viável para a descontaminação de ambientes.

Caballero-Mellado e colaboradores (2007) obtiveram 54 isolados de bactérias do gênero *Burkholderia* na rizosfera de plantas de tomate em seu estudo sobre as espécies de *Burkholderia* fixadoras de nitrogênio encontradas na rizosfera desses vegetais e sua importância na agricultura e biorremediação. Como resultado, além do seu papel como

promotor de fixação de nitrogênio, esses micro-organismos demonstraram alta capacidade de tolerância a compostos químicos orgânicos.

**Fitorremediação**

Para remediação de áreas contaminadas pelas atividades antropogênicas, são conhecidas várias técnicas, entre elas, escavação, incineração, extração com solvente, oxidorredução entre outros que são bastante onerosos, além do risco de contaminação secundária, visto que alguns processos deslocam a matéria contaminada para locais distantes. Com isso, atualmente dá-se preferência para os métodos *in situ*, que além de serem mais baratos, agridem menos o ambiente. No entanto, um resultado satisfatório pode ser demorado. A fitorremediação é um ramo da biotecnologia que oferece um tratamento eficiente e menos dispendioso para a remediação de áreas degradadas, além de desempenhar um papel de ornamentação. (CUNNINGHAM*;* ANDERSON; SHWAB, 1996)

A fitorremediação é um tipo de biorremediação que faz o uso de plantas para a remediação de águas e solos contaminados por poluentes orgânicos ou inorgânicos, não é uma técnica recente, porém seu destaque se deu nas duas últimas décadas quando foi verificada a capacidade de biodegradação de moléculas orgânicas exógenas pela interface raiz-solo (DINARDI, 2003, VIDALI, 2001).

As associações simbióticas micro-organismos-plantas podem desempenhar um papel importante na fitorremediação de solos contaminados com produtos químicos orgânicos ou metais pesados tóxicos (CHAUDHRY *et al.,* 2005; MA *et al.*, 2011). A remediação feita através dessa associação denomina-se rizorremdiação (KUIPER *et al*., 2004).

A figura 3 ilustra a biorremediação, fitorremediação e rizorremediação e a importância das interações de solo-planta-micro-organismos para o sucesso da biorremediação.

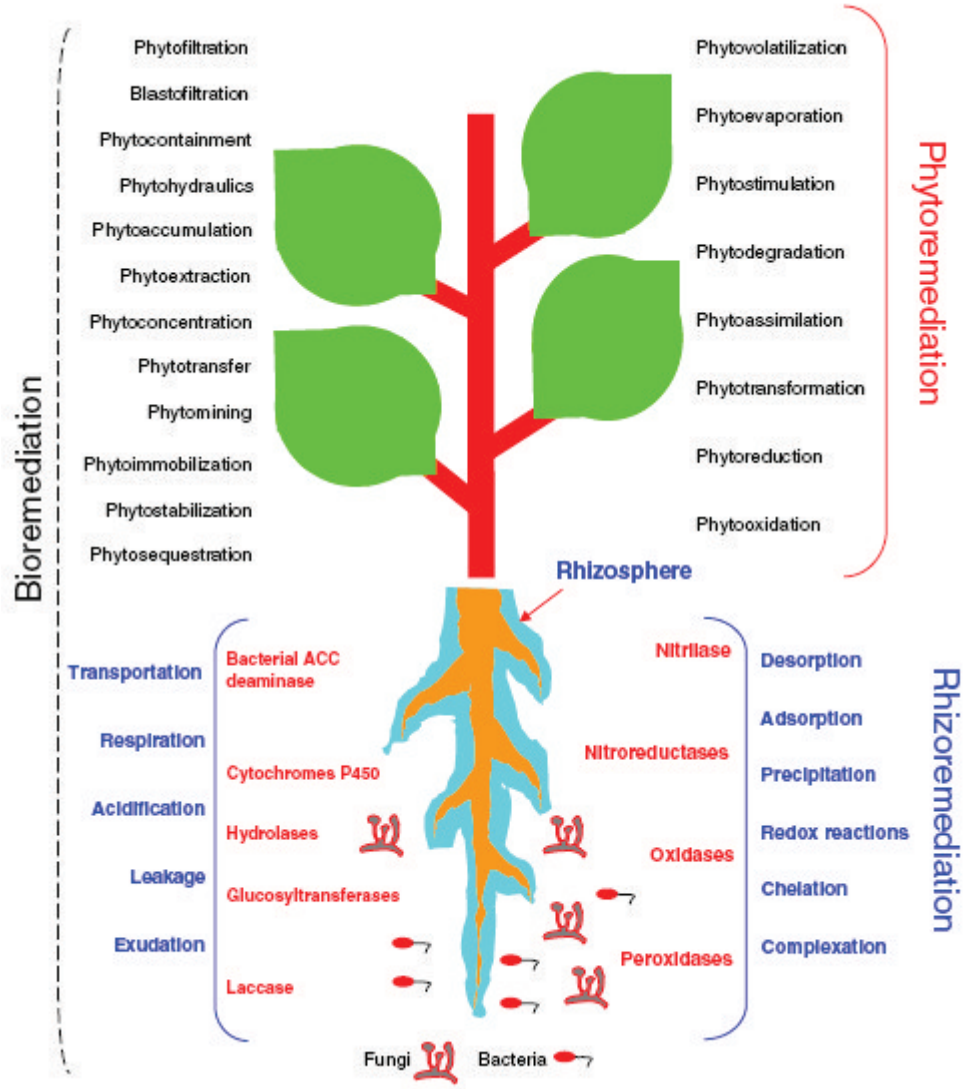


Figura 3 – Biorremediação, fitorremediação e rizorremediação. Fonte: Ma *et al*. (2011)

A rizorremediação é uma forma específica de fitorremediação envolvendo plantas e seus associados micro-organismos rizosféricos (bactérias e fungos). Na rizorremediação o processo de degradação pode ocorrer naturalmente ou pode ser facilitada por meio da inoculação do solo com micro-organismos capazes de degradar os contaminantes ambientais (KUIPER *et al*., 2004).

As raízes das plantas podem estimular a microbiota do solo, a qual pode contribuir para o aumento da eficiência do processo de remediação. Pesquisas mostram que em solos vegetados contaminados por hidrocarbonetos do petróleo há uma estimulação para o crescimento microbioano e por isso, uma maior densidade de micro-organismos é encontrada nesses solos em comparação com solos sadios (NAKATANI *et al.,* 2008)

Essa região do solo que possui atividade microbiana localizada próximo às raízes das plantas é denominada rizosfera. Nessa simbiose, as plantas fornecem exudatos como carbono, energia, nutrientes, enzimas e algumas vezes oxigênio para as populações microbianas presentes na rizosfera e os micro-organismos contribuem promovendo a saúde da planta, estimulando o crescimento radicular, aumentando a captação da água e minerais, e inibindo o crescimento de micróbios patogênicos ou de outros não patogênicos (PILON-SMITS, 2006; KUIPER *et al*., 2004; CUNNINGHAM*;* ANDERSON; SHWAB, 1996; CAMPBELL, 1985; VANCE, 1996).

Os efeitos da rizosfera na comunidade bacteriana no solo são mais benéficos para bactérias Gram-negativas do que para as Gram-positivas, assim como são mais favoráveis para as formas não esporuladas em comparação com as esporuladas. Inúmeros gêneros de bactérias são encontrados na rizosfera, sendo três mais predominantes, que são *Pseudomonas, Achromobacter* e *Agrobacterium.* Como fatores que explicam essa predominância podemos citar a capacidade dessas bactérias em produzir substâncias que inibem a instalação de outras espécies (MCGUINNESS; DOWLING, 2009).

A associação das bactérias da rizosfera com vegetais pode acelerar no processo de remediação de diversos compostos. Uma série de compostos orgânicos tóxicos em solos foram degradados com sucesso por meio de bactérias rizosféricas como mostrado no quadro 3. Entre os compostos, estão os hidrocarbonetos do petróleo, contaminante de interesse desse artigo.

Quadro 3 – Remediação bem sucedida de alguns compostos utilizando bactérias da rizosfera associadas a vegetais. Fonte: adaptado de McGuinness; Dowling (2009) (tradução nossa).

| Composto | Plantas usadas | Bacterias usadas |
|---|---|---|
| PCBs | Alfalfa (*Medicago sativa*), Beterraba sacarina (*Beta vulgaris L.*) | *Pseudomonas fluorescens* |
| | Rockcress (*Arabidopsis*) | *Pseudomonas putida* |
| | Switchgrass (*Panicum virogatum L.*) | Degradadores indígenas |
| Pesticidas | Cevada (*Hordeum sativum L.*) | *Burkholderia cepacia* |
| 2,4-D | Tevo vermelo (*Trifolium pratense*)<br>Azevém (*Lolium perenne L.*) | Degradadores indígenas |
| PCP | Azevém (*Lolium perenne L.*) | Degradadores indígenas |
| VOCs:<br>TCE | Trigo (*Triticum spp.)* | *Pseudomonas fluorescens* |
| Hidrocarbonetos do petróleo | Mostarda branca (*Sinapsis alba L.*) | Degradadores indígenas |
| | Trigo (*Triticum spp.)* | *Azospirillum lipoferum spp* |
| | | *Azospirillum brasilense* |
| | Festuca alta (*Festuca arundinacea*) | *Enterobacter cloacae* |
| | | *Pseudomonas putida* |
| | Azevém italiano (*Lolium multiflorum*) | *Pseudomonas putida* |
| Fenantreno | Cevada (*Hordeum sativum L.*) | Colônias de *Pseudomonas* degradadoras da rizosfera |
| Criseno | Trevo branco (*Trifolium repens L*) | *Rhizobium leguminosarum* tolerante a HPA |

A simbiose entre vegetais e bactérias não ocorre só na rizosfera. Temos também as bactérias endofíticas, que são benéficas e vivem nos tecidos dos vegetais.

O processo de infecção e colonização de plantas por bactérias se caracteriza como sendo um evento dinâmico, que envolve o reconhecimento dos sinais moleculares, seguido do movimento da bactéria em direção a planta hospedeira, sua aderência à superfície do vegetal e finalmente a penetração e multiplicação no interior da planta. Diferentemente dos fungos, as bactérias são estruturas ativas que permitem a penetração nos tecidos vegetais, não exercendo força mecânica ou física para romper a barreira da parede celular e consequentemente

penetrar nas células epidérmicas intactas. Com isso, a grande maioria das bactérias penetra na planta hospedeira passivamente através de aberturas naturais, como os estômatos, hidatódios, glândulas nectaríferas, lenticelas ou pelos ferimentos (REIS; OLIVARES, 2006).

Muitas bactérias endofíticas possuem a capacidade de degradar poluentes, como os hidrocarbonetos do petróleo (MCGUINNESS; DOWLING, 2009). No quadro 4 estão representadas algumas espécies de bactérias endofíticas, em associação com vegetais, capazes de degradar poluentes orgânicos.

Quadro 4 – Espécies de bactérias endofíticas, associadas a vegetais, degradadoras de poluentes. Fonte: adaptado de McGuinness; Dowling (2009) (tradução nossa).

| Composto | Plantas usadas | Bactérias usadas |
|---|---|---|
| PCBs, TCP | Trigo (*Triticum spp.*) | *Herbaspirillum sp.* |
| Ácidos clorobenzóicos | Centeio selvagem (*Elymus dauricus*) | *Pseudomonas aeruginosa*<br>*Pseudomonas savastanoi* |
| Pesticida 2,4-D | Ervilha (*Pisum sativum*) | *Pseudomonas putida* |
| BTEX | Tremoço amarelo (*Lupinus luteus L.*)<br>Álamo (Populus) | *Burkholderia cepacia*<br>*Burkholderia cepacia*<br>*Pseudomonas sp.* |
| Naftaleno | Ervilha (*Pisum sativum*) | *Pseudomonas putida* |
| Explosivos: TNT, RDX, HMX | Álamo negro (*Populus deltoidesnigra*) | *Methylobacterium populi* |

Algumas das vantagens da utilização de bactérias endofíticas em fitorremediação de solo contaminado, quando comparada com a utilização de plantas somente são(i) a expressão genética quantitativa de genes que catabolizam poluentes pode ser usada para avaliar a eficiência do processo de reparação, (ii) a engenharia genética de uma via catabólica bacteriana é mais fácil de manipular do que uma via catabólica de planta, e (iii) os poluentes tóxicos absorvidos pela planta podem ser degradados pelas bactérias endofíticas, reduzindo os efeitos tóxicos dos contaminantes (MCGUINNESS; DOWLING, 2009).

Sem a contribuição microbiana, a fitorremediação por si só pode não ser uma técnica viável para muitos poluentes orgânicos hidrofóbicos (CHAUDHRY *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2011) então, a utilização de populações de rizomicróbios presentes na rizosfera de plantas, e

de bactérias endofíticas para biorremediação, pode ser fundamental. (ANDERSON; GUTHRIE; WALTON, 1993; KUIPER *et al*., 2004).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação Química e Biorremediação do Solo. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Lavras: UFLA, p. 299-352, 2000.

AGUIAR, C. R. C. **Desempenho de soja e braquiária na fitorremediação de solos contaminados com petróleo**. 2006. 126f. Dissertação (Mestrado engenharia ambiental). Universidade do estado do Rio de Janeiro. Rio de janeiro, 2006.

ANDERSON, T. A.; GUTHRIE, E. A.; WALTON, B.T. ***Environmental* Science & *Technology***, v. 27, p. 2630-2636, 1993.

ANDRADE. J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**. v.35, n.3, 2010.

CABALLERO-MELLADO, J. *et al*. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied Environmental Microbiology**. v. 73, p. 5308-5319, 2007.

CAPECHE, C. L. *et al*. Degradação do solo e da água. In: **A Visão da Ciência do Solo no Contexto do Diagnóstico, Manejo, Indicadores de monitoramento e Estratégias de Recuperação.** Rio de Janeiro: Centro de treinamento da Petrobrás, 2008. Capítulo 7, p. 141-169.

CAMPBELL, R. **Plant Microbiology**. Edward Arnold: Baltimore, MD.1985.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL **Relatório de estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo**. Relatório técnico, 2001.

_____. **Conceituação de áreas contaminadas**. Relatório técnico, 2001.

_____. **Investigação para Remediação**. Relatório técnico, 2001.

CHAUDHRY, Q. *et al*. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 12, pág. 34-48, 2005.

CORREIA, S. *et al.* Infecção respiratória por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*: Evolução clínica em doentes com fibrose cística. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. v. XIV, n.1, p. 5 – 26, 2008.

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

DINARDI, A. L. *et al*. Fitorremediação. **III fórum de estudos contábeis 2003**. Rio Claro (SP), 2003.

FERREIRA, H.; LALA, E. Q. P. Pseudomonas aeruginosa: Um alerta aos profissionais de saúde. **Rev. Panam. Infectol**. v.12, n.2, p. 44 – 50, 2010.

GAYLARDE, C. C., BELLINASO, M. L. e MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, ciência & desenvolvimento**. s/v. n. 34, p. 36-43, 2005.

GOUVEIA, E. R. *et al*. Bactérias produtoras de biossurfactantes isoladas de poços de petróleo. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.

HYNES, R. K. *et al*. Plant-Assisted Degradation of Phenanthrene as Assessed by solid-phase microextraction (SPME). **International Journal of Phytoremediation.** v.6, n.3, p. 253-268, 2004.

JACQUE, R. J. S.; *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**. v.37, n.4, p. 1192-1202, 2007.

KOBIYAMA, M., MINELLA, J. P. G. e FABRIS R. Áreas degradadas e sua recuperação. **Informe agropecuário**. Belo horizonte, v. 22, n. 210, p. 10-17, 2001.

KUIPER, I. , LAGENDIJK E. L, BLOEMBERG, G. V & LUGTENBERG, B. J. J. **Mol Plant Microbe Interact** v.17, p. 6-15, 2004.

LEITE, S. G. S.; CUNHA, C. D. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, p. 31-45, 2000.

MA, Y et al. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 248-258, 2011.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006.. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2006, 162p.

MCGUINNESS, M.; DOWLING, D. Plant-associated bacterial degradation of toxic organic compounds in soil. **International Journal of Environmental Research and Public Health.** v. 6, p. 2226-2247, 2009.

MENDES, R. A. *et al*. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. **Revista de nutrição**. v.17, n.2, p.255-261. 2004.

MENEGHETTI, L. **Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel.** Dissertação (Mestrado em Engenharia: área de concentração: Infraestrutura e Meio Ambiente). Faculdade de Engenharia e Arquitetura. Universidade de Passo Fundo, Passo fundo, 2007.112p.

MOLINA-BARAHONA, L. *et al.* Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**. v.27, p.165–175, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002.

NAKATANI, A. S. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de "landfarming" de resíduos petroquímicos. **Rev. Bras. De Ciências do Solo**. v.32, p. 15011512, 2008.

PAVAN, M. E. *et al*. *Bacillus anthracis*: una mirada molecular a un patógeno célebre. *Revista Argentina de Microbiología*. v.43, p.294-310. 2011.

REGINATTO, C.; COLLA, L. M.; THOMÉ, A. Biorremediação de resíduos oleosos em solos. **Revista CIATEC – UPF**. v. 2, p.19-31, 2011.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. Vias de penetração e infecção e plantas por bactérias. **Embrapa**. Seropédica. ISSN 1517-8498, doc. 216, 2006.

RIDGWAY, H. D. *et al*. Identification and Catabolic Activity of Well-Derived Gasoline-Degrading Bacteria from a Contaminated Aquifer. **Applied and environmental microbiology**. v. 56, n. 11, p. 3565-3575, 1990.

ROMPRÉ, A. *et al*. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. **Journal of Microbiological Methods**. v.49, p. 31-54. 2002.

SEO, J. S., KEUM, Y. S. e LI, Q. X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v. 6, p. 278-309, 2009.

SILVA, R. L. B. **Contaminação de poços rasos no bairro Brisamar, Ítaguai, RJ, por derramamento de gasolina: concentração de BTEX e avaliação da qualidade da água consumida pela população**. 2002.. Tese de doutorado, Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2002, 182p.

PILON-SMITS, E. Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerationsAnnual. **Front Ecol Environ**. v. 4, p. 203-210, 2006.

SPILBORGHS, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. 1997. Dissertação de Mestrado, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.

SPINELLI, L. F. **Biorremediação, Toxicidade e Lesão Celular em derrames de gasolina.** Tese (Doutorado em Engenharia/Civil) – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. 218p.

THAPA, B.; KC, A. K.; GHIMIRE, A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. **Journal of Science, Engineering and Technology**. v.8, n. I, p. 164-170, 2012.

TUTIDA, D.; FOGAÇA, R. **Como funciona a contaminação dos solos**. Disponível em < http://ambiente.hsw.uol.com.br/contaminacao-dos-solos1.htm> Acesso em 08 de Julho de 2011.

VANCE, D. B. Phytoremediation: enhancing natural attenuation processes. **National Environmental Journal**. v.6, p.30-31, 1996.

VENKATESWARAM, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. **Can. J. Microbiol**., v. 41, p.767-775, 1995.

VIDALI, M. Bioremediation: An overview. **Pure Applied Chemistry**. v. 73, p. 1163–1172. 2001.

## 3 ARTIGO 2

POTENCIAL DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO GURIRI (*Allagoptera arenaria*) NA PRESENÇA DE HIDROCARBONETO DO PETRÓLEO

### RESUMO

Entre as soluções existentes para eliminação de contaminantes em ambientes, a biorremediação se destaca por ser uma técnica inofensiva à saúde humana, e por ser econômica e ecologicamente mais viável. O petróleo hoje é uma das principais fontes de energia do Brasil e do mundo, e ambientes vêem sendo contaminados com frequência por este poluente. A restinga, apesar de ser um ecossistema de suma importância, é um ambiente negligenciado, e está vulnerável à contaminação por hidrocarbonetos do petróleo, tanto por vazamento no meio marítimo, como pelos dutos que muitas vezes cortam esses ecossistemas. A utilização de plantas como agentes biorremediadores denomina-se fitorremediação, e sua eficiência é potencializada pela ação de micro-organismos que vivem em simbiose na sua rizosfera. Para este processo damos o nome de rizorremediação. Pouco se sabe sobre a interação de micro-organismos com vegetais de restinga. A *Allagoptera arenaria* (guriri), um vegetal resistente ao fogo e muito bem adaptado a ambientes estressados, foi o vegetal objeto deste estudo. Realizou-se a identificação de bactérias encontradas na rizosfera e no tecido da raiz. Foi constatado que existem pelo menos 5 espécies em simbiose com o vegetal e que possivelmente algumas bactérias que colonizam o interior das raizes são as mesmas que estão presentes na rizosfera. Buscando verificar a tolerância das bactérias endofíticas e bactéria da

rizosfera ao tolueno, estas foram submetidas ao crescimento com diferentes concentrações do contaminante, e foi observado que as bactérias Gram positivas são mais resistentes ao tolueno. Através de comparações morfológicas, supõe-se que uma das espécies encontradas na rizosfera seja a *Beijerinckia indica*, espécie encontrada em solos de ambientes tropicais e com conhecida capacidade de degradação de contaminantes, entre eles o tolueno.

Palavras-chave: Fitorremediação. *Allagoptera arenaria*. Tolueno

## ABSTRACT

Among existing solutions for removing contaminants environments, the bioremediation stands out as a technique harmless to human health, and be economically and ecologically viable. Oil today is a major source of energy in Brazil and the world, and environmental have been contaminated with the pollutant per frequently. The sandbank, despite being a very important ecosystem, an environment is neglected, and this is vulnerable to contamination by petroleum hydrocarbons, both by leakage into the marine environment, as the pipelines that often cut these ecosystems. The use of plants as agents degrade called phytoremediation, and its efficiency is enhanced by the action of micro-organisms that living symbiotically in their rhizosphere. For this process we call rhizoremediation. Little is known about the interaction of microorganisms with vegetables of sandbank. The *Allagoptera arenaria* (guriri), a plant that resists the fire and well adapted to environments stressed, this plant was subject of this study. We carried out the identification of bacteria found in the rhizosphere and bacteria of root tissue. It was noted that there are at least 5 species in symbiosis with plant and possibly some bacteria that colonize the interior of roots that are the same are present in the rhizosphere. Seeking to verify the tolerance of endophytic and rhizosphere bacteria to toluene, these were subjected to growth at different concentrations of dopant, and it was observed that Gram positive bacteria are more resistant to toluene. Through Morphological comparisons, it is assumed that one species found in the rhizosphere is the *Beijerinckia indica*, specie found in soils of tropical environments and with known capacity degradation of contaminants, among them toluene.

Keywords: Phytoremediation. *Allagoptera arenaria*. Toluene

# INTRODUÇÃO

O crescimento da civilização industrial e consequente aumento do uso dos combustíveis fósseis como fonte de energia, tem propiciado o aumento da poluição ambiental com altas taxas de compostos de origem não-biológica (OSHIRO; IZUMI, 1999). As indústrias ligadas ao setor petrolífero com sua geração de resíduos tóxicos representam uma fonte poluidora de grande impacto ambiental nos ecossistemas.

Nosso país demonstra hoje uma maior preocupação quanto ao meio ambiente. Há numerosos mecanismos legais que tendem assegurar a proteção ambiental, mas infelizmente esses mecanismos por si só não são capazes de acabar com a degradação descomedida dos recursos naturais. Para que o meio ambiente seja protegido é necessário que o desenvolvimento seja pensado de forma sustentável, que o manejo dos recursos naturais seja feito com responsabilidade e consciência, preservando-o assim para as gerações futuras. Além do manejo adequado, os resíduos originados das atividades antropogênicas devem ser tratados e dispostos de maneira apropriada ambientalmente. Quando isso não acontece é necessário reparar os prejuízos ambientais utilizando de técnicas eficientes e economicamente viáveis. Uma tarefa difícil, visto que os processos de reparação ambiental estão associados a longos períodos e a altos custos. (ABBAS, 2003; SILVEIRA; SPAREMBERGER, 2004).

Devido ao grande volume produzido e seus usos diversos na vida moderna, o petróleo e seus derivados ocupam lugar de destaque dentre os compostos orgânicos contaminantes do solo. (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000). Diversas são as fontes de contaminação do solo por combustíveis, entre elas o transporte de combustíveis por navios, caminhões ou dutos e o crescente número de casos de vazamentos provenientes de tanques de armazenamento subterrâneos, os quais estão sujeitos a fortes processos corrosivos (SPILBORGHS, 1997).

Em solos contaminados por petróleo e seus derivados, alguns contaminantes se destacam em comparação aos demais. Os compostos de maior interesse e preocupação ambiental, normalmente, são os principais a serem identificados e quantificados antes e durante um processo de remediação, são: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (isômeros: *orto*-, *meta*- e *para*-xileno). Esses compostos, conhecidos também como BTEX, são definidos como hidrocarbonetos monoaromáticos, cujas estruturas moleculares possuem como característica principal a presença do anel benzênico. Estes são os constituintes mais solúveis e mais móveis da gasolina. E pelas suas características são os contaminantes que primeiro atingirão o lençol freático em caso de derramamento de combustível, comprometendo a

qualidade da água e consequentemente a saúde da população, uma vez que estes poluentes são depreciadores do sistema nervoso central e causam leucemia em exposições crônicas. O benzeno, dentre os BTEX, é considerado o mais tóxico (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; SILVA, 2002).

De acordo com a portaria 518/2004, do Ministério da Saúde, os valores máximos permitidos para os diferentes hidrocarbonetos monoaromáticos em água para consumo humano, são 5µg/L para o benzeno, 170 µg/L para o tolueno, 200 µg/L para o etilbenzeno e 300 µg/L para o xileno. Porém, não há nenhuma base legal que determine o valor máximo permitido desses contaminantes no solo.

A Companhia de Tecnologia e Saneamento Básico (Cetesb), responsável pelas ações de controle ambiental no Estado de São Paulo, elaborou uma lista com critérios, valores e padrões orientadores para a concentração de determinados metais pesados e substâncias orgânicas no solo e nas águas subterrâneas (TUTIDA; FOGAÇA, 2011). Dentre as substâncias orgânicas contempladas pela Cetesb, estão o benzeno, tolueno e xileno, onde o valor máximo permitido em solo é de 0,25 $mg.kg^{-1}$.

O tolueno, hidrocarboneto utilizado nesta pesquisa, é incolor e de odor característico. Sua fórmula é $C_6H5CH3$, possui peso molecular de 92,15 e sua densidade é 0,867 a 20 °C. Por se tratar de um solvente aromático de alta pureza, o tolueno possui várias aplicações, como na fabricação de esmaltes sintéticos, tintas de fundo (primers), tintas de acabamento de secagem rápida, nas formulações de adesivos a base de borracha e como solvente nas tintas a base de alumínio para repintura de botijões de gás. Também é utilizado como matéria-prima na fabricação de explosivos e para a produção de secantes, aditivos, desinfetantes, ácido benzóico, entre outros (FORSTER; TANNHAUSER; TANNHAUSER, 1994).

Uma técnica que vem sendo utilizada com a finalidade de descontaminação de ambientes impactados é a biorremediação, uma técnica menos onerosa, ecologicamente mais adequada e recomendada para descontaminação de ambientes contaminados por moléculas orgânicas, como os hidrocarbonetos do petróleo.

A biorremediação se utiliza do metabolismo de organismos vivos autóctones (do próprio ambiente) ou introduzidos, entre eles plantas e micro-organismos, para remediação de áreas contaminadas. Estes removem ou reduzem os poluentes existentes no local. Este processo biotecnológico de remediação tem sido bastante pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual para o tratamento de ambientes contaminados, tais como solo, águas subterrâneas e superficiais. Esta biotecnologia pode ser aplicada no próprio ambiente que está impactado, denominado então de método *in situ,* ou pode haver a necessidade da

remoção do material contaminado para tratamento futuro, método *ex situ.* (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005). Sendo que este último envolve modificação do ambiente, tanto na estética quanto nas suas relações bióticas e abióticas, podendo ocasionar um desequilíbrio no ambiente. Na figura 4 está representada uma rede de degradação microbiana. Mostra que os degradadores de petróleo primários interagem com outros componentes biológicos.

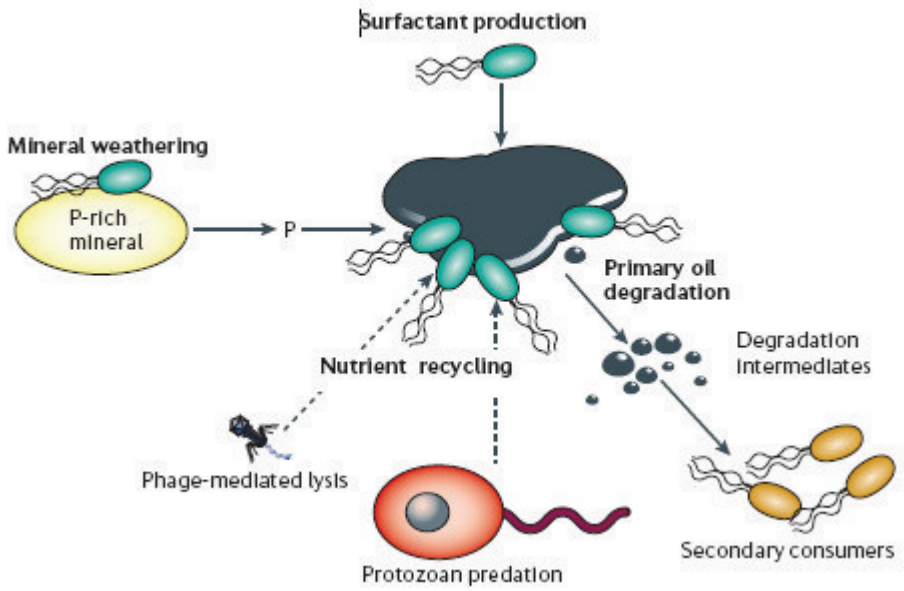


Figura 4 - Rede de degradação microbiana. Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos são mostradas em verde. Setas sólidas indicam fluxos de materiais, e as setas quebradas indicam interações diretas. Fonte: Head; Jones; Röling (2006).

Uma vez que os micro-organismos são responsáveis por reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, estes tem se mostrado eficientes na degradação de moléculas xenobióticas recalcitrantes (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005). Em muitos ecossistemas existe uma comunidade autóctone de micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos (KATAOKA, 2001).

Já são conhecidas 5 vias metabólicas distintas para a degradação aeróbica do tolueno. Suas vias consistem basicamente na inserção de 2 átomos de oxigênio no anel aromático para formar o catecol que é substrato da clivagem do anel benzênico. (ZENG, 2001 *apud* RODRIGUES, 2002). Na figura 5 e 6 estão representadas as vias de degradação do tolueno por *Beijerinckia indica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas picketti* e *Pseudomonas putida*.

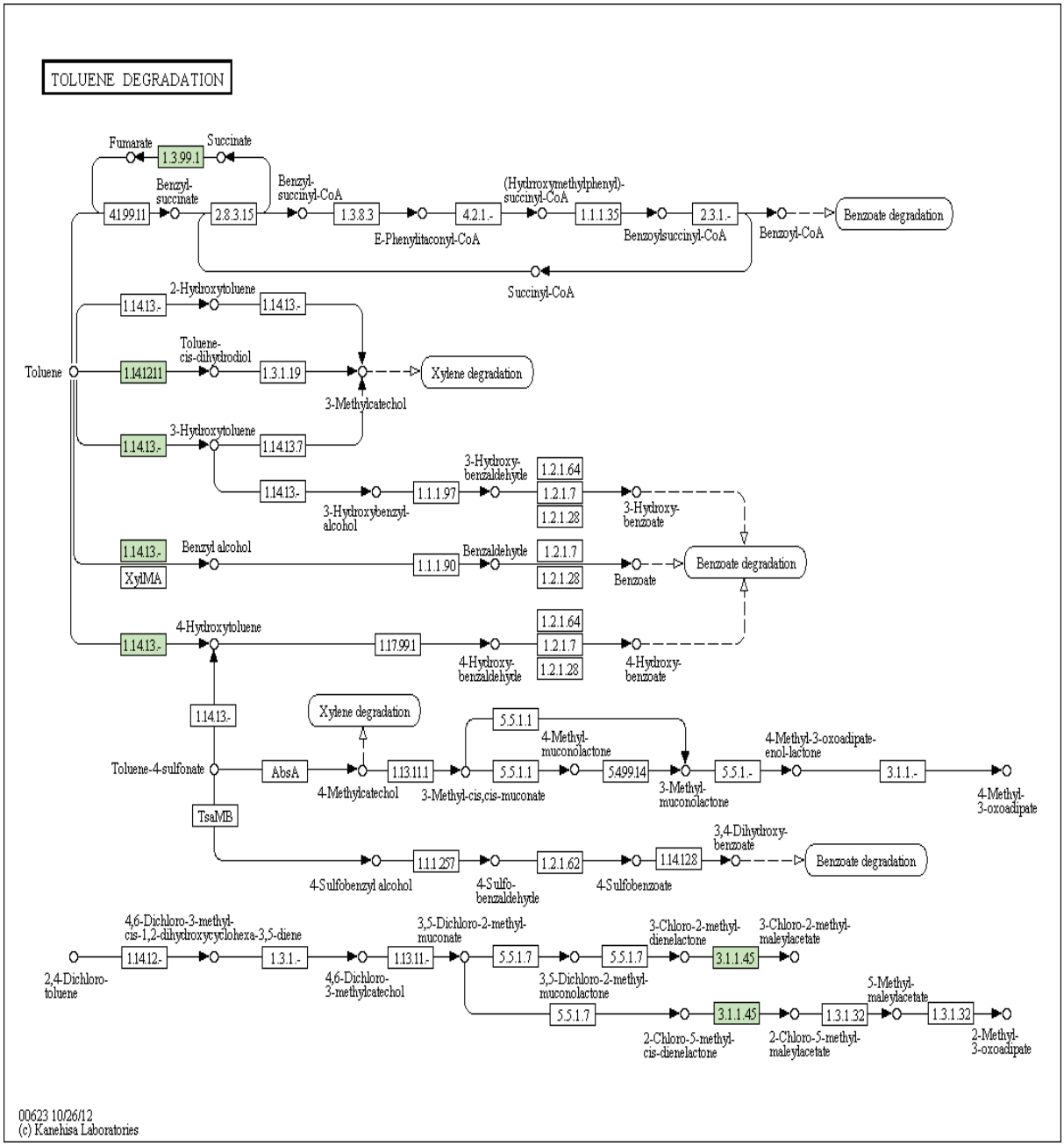


Figura 5 – Via de degradação do tolueno por *Beijerinckia indica*. Fonte: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bid00623

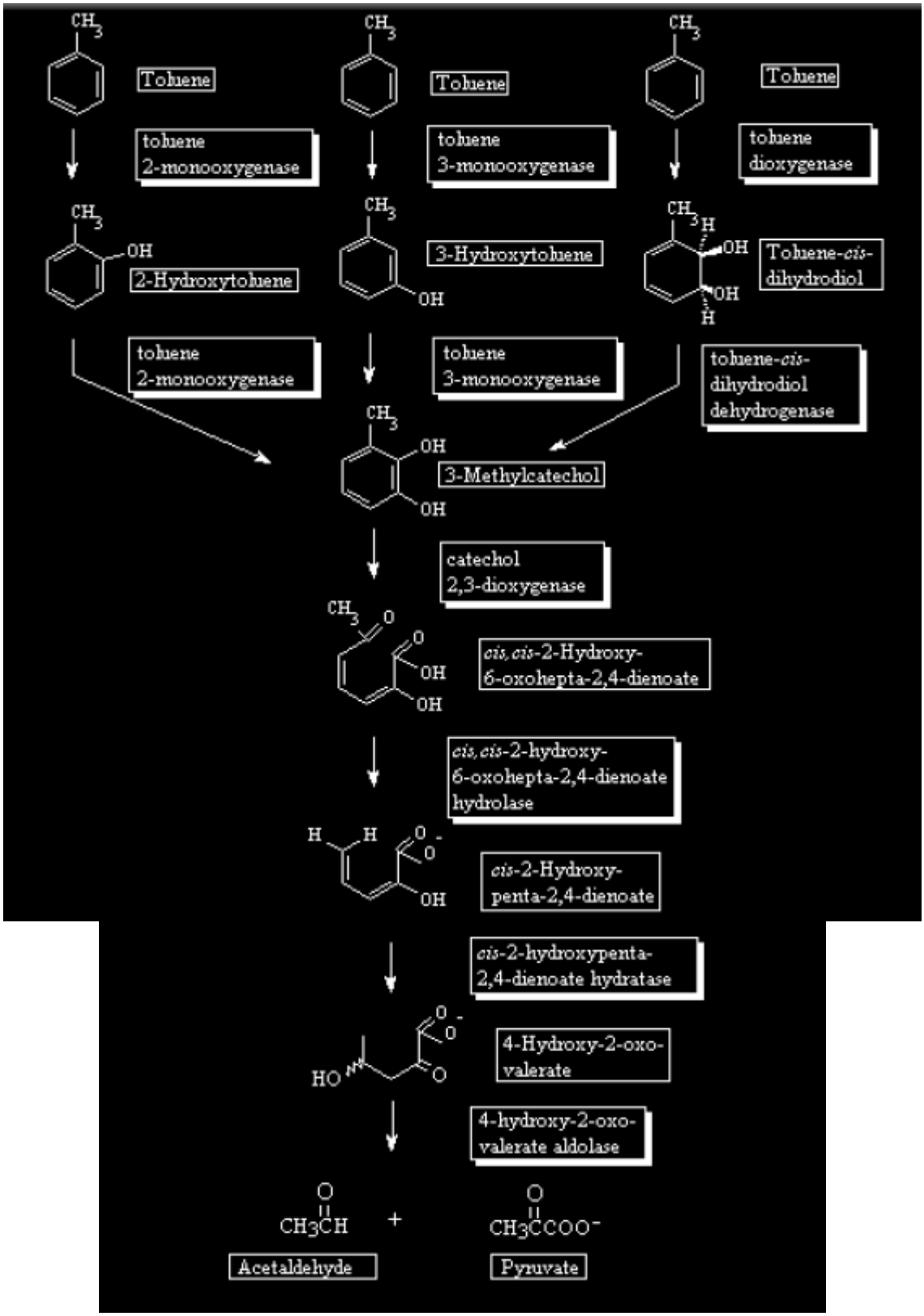


Figura 6 – Vias de degradação do tolueno pelas cepas *Burkholderia cepacia* mt-2 (pTOL), *Pseudomonas picke* tti G4, *Pseudomonas putida* F1 respectivamente (ZENG, 2001 *apud* RODRIGUES, 2002).

A fitorremediação é um tipo de biorremediação que se utiliza de plantas para remover, conter ou inativar os contaminantes presentes no ambiente. Uma das vantagens da utilização desse método é o baixo custo para remediação do solo, sem agredir o ambiente (CUNNINGHAM; ANDERSON; SHWAB, 1996). A fitorremediação tem se mostrado eficiente no tratamento de hidrocarbonetos do petróleo, solventes clorinados, pesticidas e explosivos cujo efeito se deve principalmente às raízes que modificam as condições químicas, físicas e biológicas do solo, estimulando assim a comunidade microbiana e os processos bioquímicos responsáveis pela eficácia da degradação e dissipação dos poluentes (KIRK *et al*., 2004). A cobertura vegetal, além de estimular e contribuir para a biodegradação de poluentes orgânicos do solo reduz problemas de erosão hídrica e eólica, evitando a contaminação de áreas próximas. (PAULA; SOARES; SIQUEIRA, 2006).

Uma vez que os vegetais por si só podem não desempenhar um papel satisfatório na degradação de poluentes orgânicos hidrofóbicos, o processo se torna mais eficaz quando ocorre em associação com micro-organismos presentes na rizosfera, interface raiz-solo. Esse processo é denominado rizorremediação (ANDERSON; GUTHRIE; WALTON, 1993; CHAUDHRY *et al.,* 2005; MA *et al.*, 2011; DINARDI, 2003; KUIPER *et al*., 2004; ROBINSON *et al*., 1998).

A rizosfera é a região de sedimento que possui atividade microbiana localizada próxima às raízes das plantas. Nessa simbiose, as plantas fornecem exudatos como carbono, energia, nutrientes, enzimas e algumas vezes oxigênio para as populações microbianas na rizosfera (CUNNINGHAM; ANDERSON; SHWAB, 1996; CAMPBELL, 1985; VANCE, 1996), e por sua vez os micro-organismos que vivem na rizosfera promovem a saúde da planta estimulando o crescimento radicular, aumentando a captação da água e minerais, e inibem o crescimento de micróbios patogênicos ou de outros não patogênicos (PILON-SMITS, 2006; KUIPER *et al*., 2004).

Um exemplo de ecossistema que está exposto à contaminação por hidrocarboneto do petróleo, seja pela exploração ou transporte, é a restinga. Tendo em vista a escassez de estudos relacionados à atividade dos micro-organismos nesse ambiente e a vulnerabilidade deste ecossistema, tornam-se necessários estudos sobre a capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo por micro-organismos associados a vegetais de restinga.

O vegetal objeto deste estudo foi a *Allagoptera arenaria*, também conhecido como buri, buri-da-praia, buriri, caxandó, coco-da-praia, guriri, pissandó, uma palmeira de caule subterrâneo, nativa das restingas da costa brasileira, tendo ocorrência desde o litoral do Paraná até o litoral de Pernambuco (figura 7). No estado do Rio de Janeiro ocorre em todas as

restingas de norte a sul, desde as mais preservadas até as mais impactadas. Possui uma peculiar capacidade de sobreviver ao fogo, rebrotando a partir dos estipes rizomatosos subterrâneos e é considerado um vegetal facilitador por promover sombra e matéria orgânica para que outras espécies colonizem o ambiente (ARAUJO; PEIXOTO, 1977; BRAGA, 2008; MENEZES, 1996; MENEZES; ARAUJO, 2004; REIS, 2006). Sua capacidade de sobrevivência ao fogo, de adaptação em ambientes estressados e de facilitar a instalação de outras espécies vegetais no ambiente, faz do guriri um potencial vegetal biorremediador. Uma vez que seu caule é subterrâneo e profundo e o lençol freático das restingas é geralmente superficial, pode-se inferir que haverá um benefício no processo de biorremediação do solo, podendo evitar a contaminação de águas subterrâneas.

Figura 7 - Fotografia de *A. arenaria* na restinga de Massambaba, Rio de Janeiro-RJ. Foto: Gisely Mendes.

Os objetivos deste trabalho são:

- Identificar bactérias associadas à *Allagoptera arenaria*;
- Avaliar a capacidade de crescimento destas na presença de tolueno.

# METODOLOGIA

## Caracterização da área de estudo

A área escolhida para o estudo foi a restinga de Massambaba que se localiza no Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio, contemplando os municípios de Saquarema, Araruama e Arraial do Cabo (aproximadamente 22º56´S), possuindo uma área total de 76,3 Km² (ARAUJO, 1997) (Figura 8).

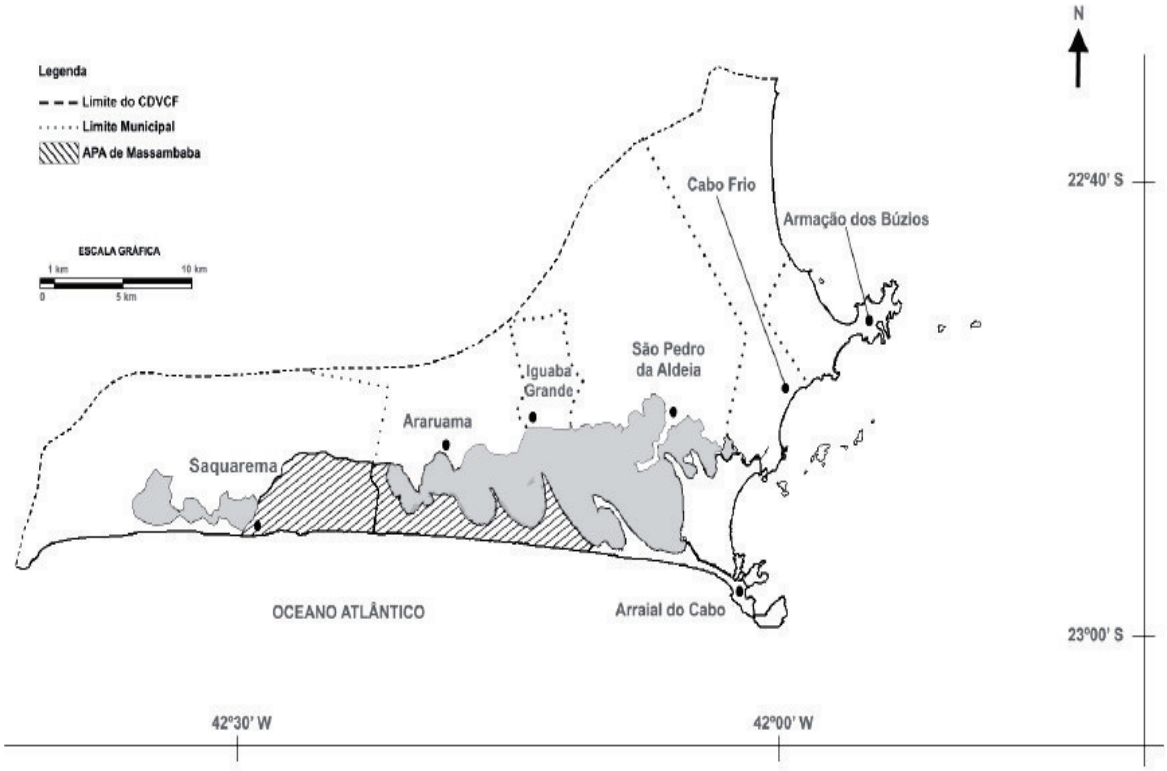


Figura 8 – Mapa do Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio. Fonte: Araújo, D. S. D. *et al*.(2009).

A restinga de Massambaba possui 48 km de extensão, incidindo a partir do município de Saquarema, na barra da Lagoa de Saquarema, até o Morro da Atalaia, no município de Arraial do Cabo (ARAUJO, 2000), sua formação se deu entre 5000 a 7000 anos devido a sucessivas transgressões e regressões do mar (BIGARELLA; BECKER, 1975). A restinga é constituída por um sistema de dois cordões arenosos que separa o mar da laguna de Araruama (MUEHE, 1994 *apud* ARAUJO, 2000), a maior laguna hipersalina do mundo (SOUZA, 2004). Estes cordões possuem diferentes idades e são separados por uma faixa mais baixa de

relevo, onde há a ocorrência de um sistema de lagunas. (MUEHE, 1994 *apud* ARAUJO, 2000).

Antigamente, a restinga de Massambaba era adjacente com as restingas da Praia Seca de Saquarema e margeava a Laguna de Araruama (ARAÚJO, 2000). Devido a alta taxa de exploração e consequente ocupação desordenada do solo, sua ligação com as áreas de restinga adjacentes e com a lagoa de Araruama foi interrompida. Atualmente, a restinga de Massambaba fica restrita à Área de Proteção Ambiental (APA) de Massambaba e poucos fragmentos de vegetação preservados situam-se próximos da localidade de Figueiras em Arraial do Cabo (ROCHA-PESSÔA *et al*, 2008).

As restingas fluminenses apresentam um total de trinta e seis espécies vegetais endêmicas, onde vinte e seis destas são encontradas no Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio, que influenciado pelo clima seco, pela extensa variedade de habitats e pela história geomorfológica, faz deste o mais rico em diversidade de espécies (ARAUJO, *et al.*, 2009; ARAUJO, 1997).

**Obtenção do material biológico em campo**

Foram coletadas em triplicata amostras de raízes de *Allagoptera arenaria* em uma profundidade de aproximadamente 30 cm utilizando ferramentas, como tesouras e pá, e frascos para acondicionamento estéreis. Com o auxílio de um termômetro, em campo verificou-se que a temperatura do solo era de 25ºC.

**Obtenção e manutenção das bactérias da rizosfera**

Para obtenção das bactérias da rizosfera, no Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM) as amostras de raízes foram acondicionadas em tubos Falcon estéreis de 15 ml e centrifugadas com 8ml do meio de cultura LB (Luria Bertani Broth) da Himedia por 15 minutos a uma rotação de 2000 rpm e logo após, foram agitadas por 1 minuto no vortex com o objetivo de se obter as bactérias fortemente aderidas à raiz. Com o auxílio de uma micropipeta, um inoculo de 200 µl da suspensão foi incubado com 8 ml de meio LB a uma temperatura de 25ºC. Após 24 horas de crescimento, observado pela saturação do meio, um inoculo das culturas foi transferido com o auxílio de uma alça de kole para placas de Petri contendo meio de cultura sólido (LB + Ágar 2%) devidamente identificadas e incubadas por 24 horas a uma temperatura de 25ºC. As colônias crescidas no meio de cultura sólido foram isoladas e transferidas para o meio líquido e para manutenção foram feitas repicagens após cada crescimento. Toda manipulação do material biológico foi realizada em

cabine de segurança biológica Classe II A 1 da Filterflux, a fim de eliminar interferências do ambiente e garantir a integridade do material.

**Teste de Coliformes Totais e *Escherichia coli* na rizosfera**

Para controle de contaminação do solo, o teste de Colilert® foi realizado no Laboratório TESALAB – Tecnologia em Serviços Ambientais, visando a determinação de coliformes totais e *Escherichia coli* na rizosfera. Pra isso, as raízes foram lavadas com solução salina 0,9% e o líquido resultante foi incubado com Colilert® por 24 horas em uma temperatura de 35±0,5 ºC, de acordo com a metodologia do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21ª edição. Após o período de incubação, foi observado se ocorreu mudança da coloração para amarelo, nesse caso constata-se a presença de coliformes totais. Para determinação de *Escherichia coli*, o frasco foi observado sob luz ultravioleta em uma câmara escura. Na presença de *Escherichia coli*, o líquido fluoresce.

**Obtenção e manutenção das bactérias endofíticas**

Para aquisição das bactérias endofíticas, as raízes centrifugadas foram submetidas a um banho de hipoclorito 1% por 20 minutos para esterilizar a parte externa da raiz e logo após, lavadas com solução salina estéril 0,9%. A fim de confirmar a esterilização externa das raízes, estas foram encostadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido (LB + Ágar 2%) e incubadas por 24 horas a uma temperatura de 25ºC. Após esterilização, as raízes foram transferidas para um gral de porcelana etéril e com o auxílio de um pistilo, também estéril, foram maceradas com LB e 8 ml do caldo transferido para tubos Falcon estéreis de 15ml que foram centrifugados por 15 minutos a uma rotação de 2000 rpm. Com auxílio de uma micropipeta, um inoculo de 200 µl da suspensão foi incubado com 8 ml de meio LB a uma temperatura de 25ºC. Após 24 horas de crescimento, observado através da saturação do meio, um inoculo das culturas foi transferido com o auxílio de uma alça de kole para placas de Petri contendo meio de cultura sólido (LB + Ágar 2%) devidamente identificadas e incubadas por 24 horas a uma temperatura de 25ºC. As colônias crescidas no meio de cultura sólido foram isoladas e transferidas para o meio líquido e para manutenção, foram feitas repicagens após cada crescimento.

**Coloração de Gram**

Foram feitas lâminas das bactérias endofíticas e da rizosfera a partir do primeiro crescimento em meio líquido e logo em seguida, estas foram submetidas ao teste de coloração de Gram. Para o teste de Gram, foram realizados os seguintes procedimentos: para cada lâmina, foi feito um esfregaço com o material a ser analisado e a fim de fixar as células na lâmina, esta foi passada sobre chama de três a quatro vezes. Após fixação das células, a lâmina foi coberta por solução de Cristal Violeta por um minuto e em seguida, após eliminação do excesso da solução, a lâmina foi coberta por solução de Lugol para Gram por um minuto. Em seguida a lâmina foi descorada com solução de Álcool-Acetona e lavada em água corrente. Para finalizar, a lâmina descorada foi coberta por Fucsina Fenicada de Gram por trinta segundos e lavada em água corrente. O mesmo procedimento foi realizado com as células obtidas a partir do crescimento em meio sólido. A observação das lâminas foi realizada com auxílio de um microscópio óptico na objetiva de imersão, levando em consideração a coloração e morfologia das células. Todas as lâminas coradas foram fotografadas no Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira de Arraial do Cabo com o auxílio de um microscópio óptico Olympus BX51 com uma câmera fotográfica Olympus DP72 acoplada.

**Experimento de tolerância com tolueno**

A partir da cultura líquida, as bactérias da rizosfera foram submetidas a um novo crescimento em tubos de vidro com tampa de rosca contendo tolueno diluído em meio de cultura LB. O tolueno ($C_7H_8$) utilizado no experimento é da marca Vetec, código 140 e possui peso molecular 92,14. A determinação das concentrações de tolueno utilizadas nos experimentos foi de acordo com Nahar; Alauddin; Quilty (2000). Foram utilizadas as seguintes concentrações (tolueno/LB): 2,5 µl/ml, 0,25 µl/ml. Um inóculo de 2,05 x $10^3$ bactérias por ml, obtido através do método do número mais provável com o auxílio da câmara de neubauer, foi incubado em cada diluição. Este método nos permite calcular uma estimativa de quantas células bacterianas existem em um determinado volume de amostra. Este procedimento foi realizado em triplicada para cada diluição. Os tubos foram acondicionados em um agitador horizontal orbital digital IKA HS/KS 260 basic ajustado para rotação de 250rpm e estes foram mantidos dentro de uma incubadora tipo BOD da ACB Labor programada para 25ºC. A leitura do crescimento bacteriano foi obtida a cada 48 horas através de densidade ótica, com o auxílio de um espectrofotômetro UV/V-1600 da Pró-análise

ajustado para 660 nm, com o objetivo de se traçar uma curva de crescimento. O mesmo procedimento foi realizado em dois experimentos feitos com as bactérias endofíticas, onde em um experimento com a cultura mista o inóculo foi de 2,35 x $10^4$ bactérias por ml e no outro, com as bactérias Gram negativas, o inóculo foi de 1,05 x $10^3$ bactérias por ml. Após cada crescimento com tolueno, as culturas foram transferidas para placa de Petri com meio de cultura sólido e após crescimento foram feitas lâminas e estas passaram pelo processo de coloração de Gram. A média e o desvio padrão de cada diluição foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.00.288.

## RESULTADOS

### Caracterização das Bactérias da Rizosfera

As bactérias da rizosfera da *Allagoptera arenaria* tiveram um bom crescimento no período de 24 horas a uma temperatura de 25ºC, temperatura constatada no solo no ato da coleta das raízes. A partir da análise das lâminas que passaram pelo processo de coloração de Gram, foi constatado que a rizosfera da *Allagoptera arenaria* é colonizada por pelo menos três tipos de bactérias. Quanto à coloração, observou-se somente a presença de bactérias Gram positivas. Em análise morfológica, foi verificada a presença de cocos e dois tipos de bastonetes, como podemos observar nas figuras 9 e 10.

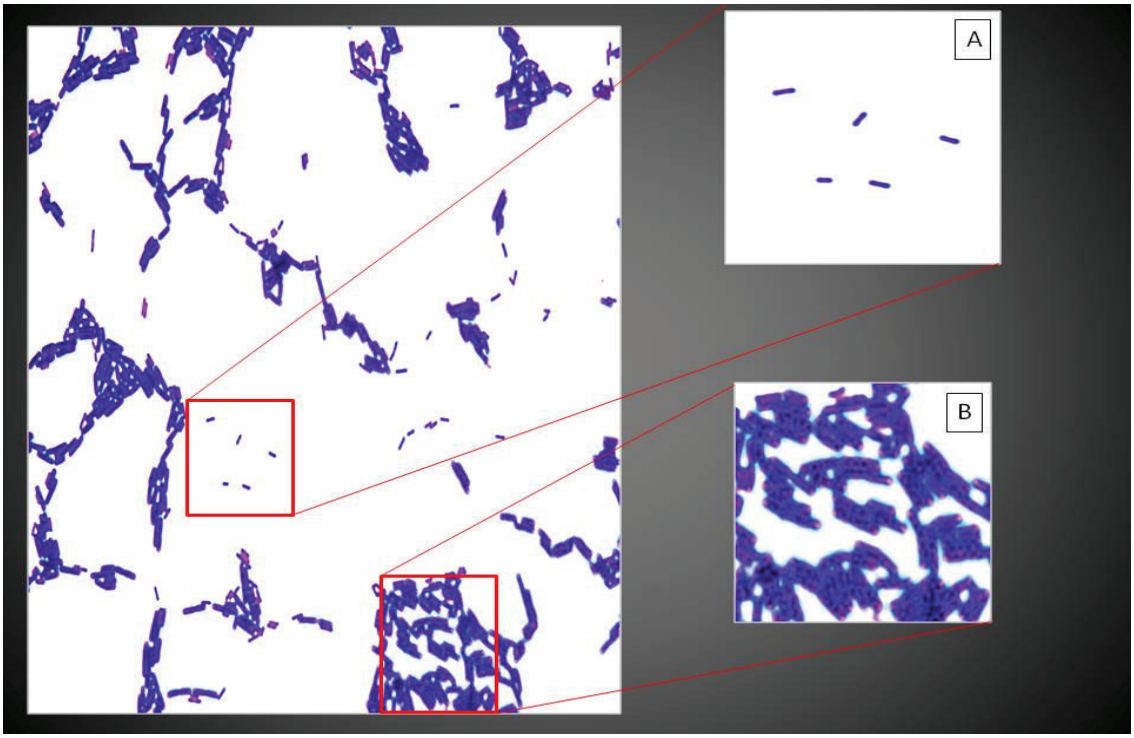


Figura 9 – Bactérias isoladas da rizosfera da *Allagoptera arenaria.* A e B dois tipos de bastonetes Gram positivos. Foto: Gisely Mendes

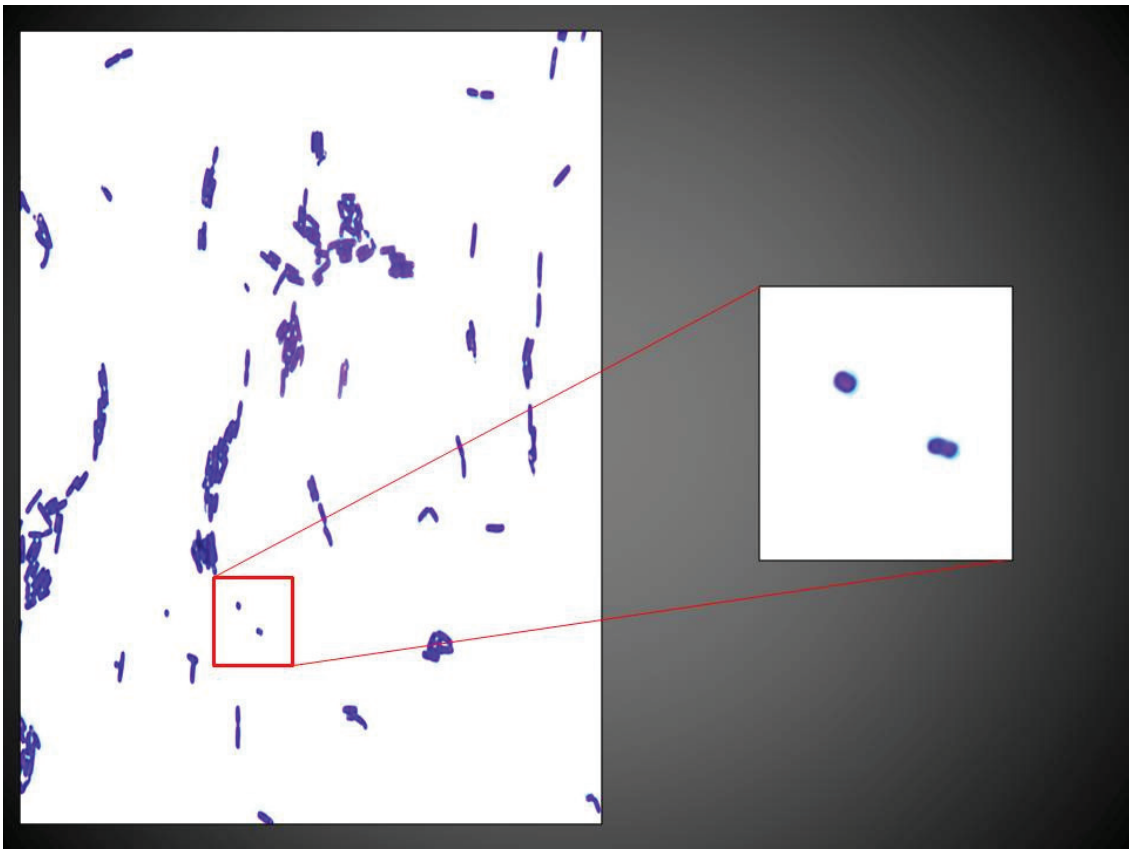

Figura 10 – Bactérias isoladas da rizosfera da *Allagoptera arenaria*. Cocos Gram positivos no detalhe. Foto: Gisely Mendes

A partir do teste de Colilert® foi detectada a presença de coliformes totais na rizosfera, porém a presença de *Escherichia coli* foi descartada. Os principais gêneros do grupo dos coliformes são *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (QUEIROGA; SANTOS; CARNEIRO, 2007). Em análise morfológica, foi observado que nenhuma célula se assemelha com *Citrobacter*, *Enterobacter* ou *Klebsiella,* estas são Gram negativas e as bactérias isoladas da rizosfera são Gram positivas.

**Caracterização das Bactérias Endofíticas**

Com a observação das lâminas das bactérias endofíticas, foi observada a presença de pelo menos três tipos de bactérias, existindo bactérias Gram positivas e Gram negativas. A partir do crescimento em meio sólido em placa de Petri foi possível observar a formação de duas colônias morfologicamente distintas. Estas foram isoladas e obteve-se então o isolamento das bactérias Gram negativas e Gram positivas. Analisando as bactérias Gram negativas, verificou-se a presença de dois tipos de bastonetes (figura 11).

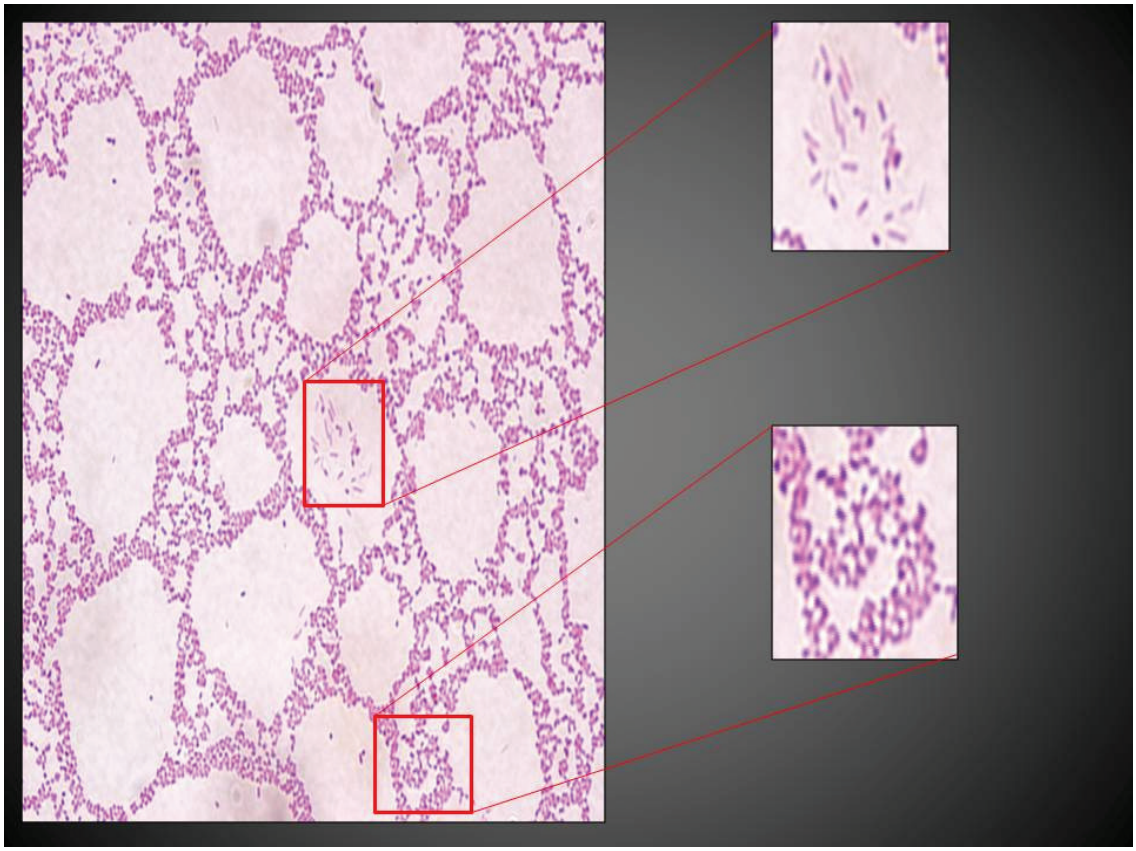

Figura 11 – Dois tipos de bastonetes Gram negativos encontrados no interior da raiz da *Allagoptera arenaria*. Foto: Gisely Mendes.

Visualmente foi verificada a presença de somente um tipo de bastonete Gram positivo (figura 12) que se assemelha morfologicamente com um tipo de bastonete encontrado na rizosfera, podemos então sugerir que as bactérias que vivem em simbiose na rizosfera da *Allagoptera arenaria* podem estar também no interior das raízes (Figura 13).

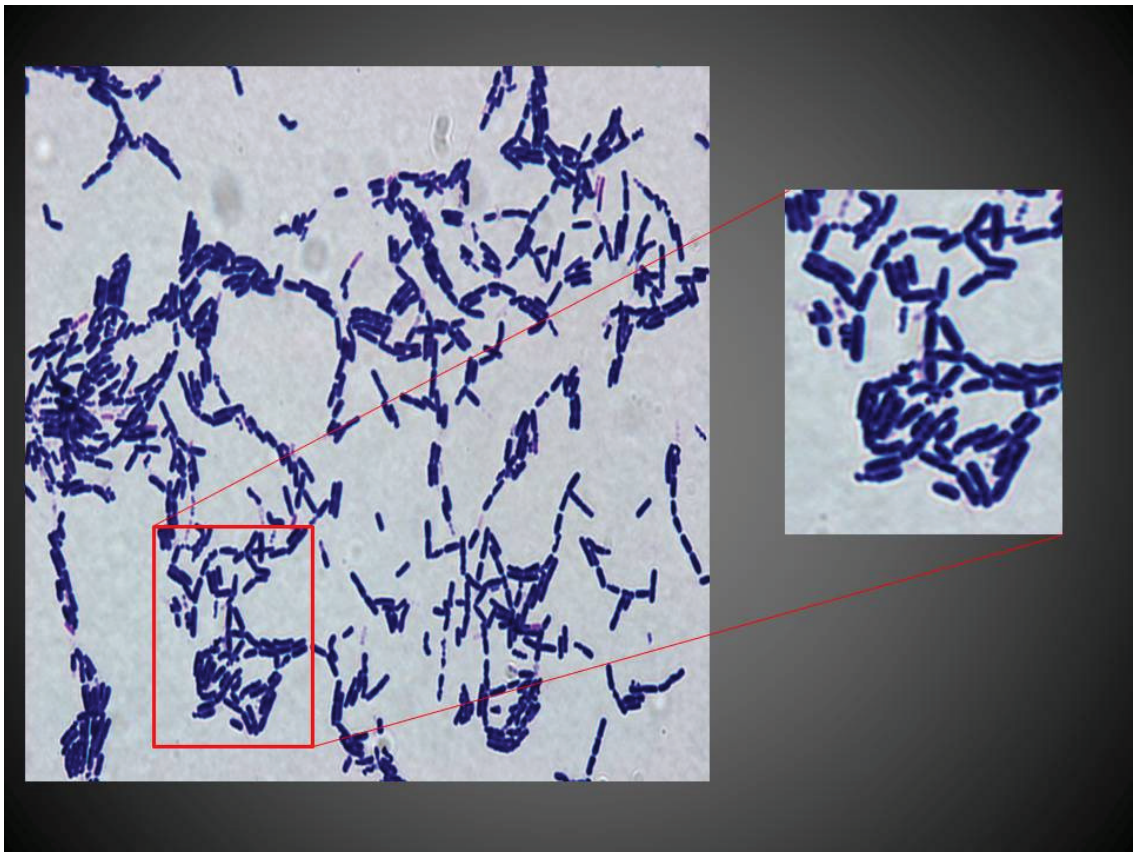

Figura 12 – Bastonetes Gram positivos encontrados no interior das raízes da *Allagoptera arenaria*. Foto: Gisely Mendes.

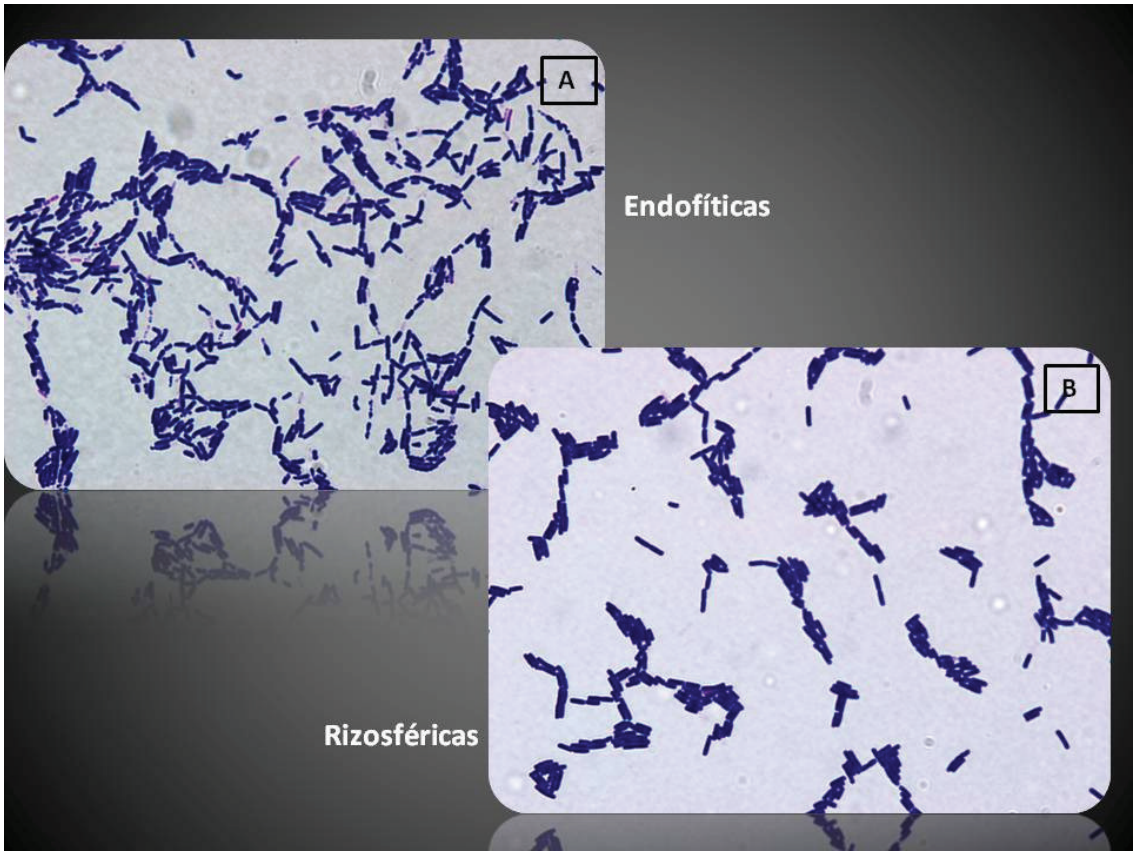


Figura 13 – Comparação morfológica dos bastonetes Gram positivos encontrados no interior das raízes (A) e na rizosfera (B) da *Allagoptera arenaria.* Foto: Gisely Mendes.

## Teste de tolerância com o tolueno

### Bactérias da rizosfera

As bactérias extraídas da rizosfera da *Allagoptera arenaria* e submetidas ao crescimento com o tolueno apresentaram uma resposta satisfatória nas diluições utilizadas, demonstrando que são tolerantes ao contaminante. Na figura 14 está representado o gráfico com as curvas de crescimento obtidas através da leitura por densidade ótica.

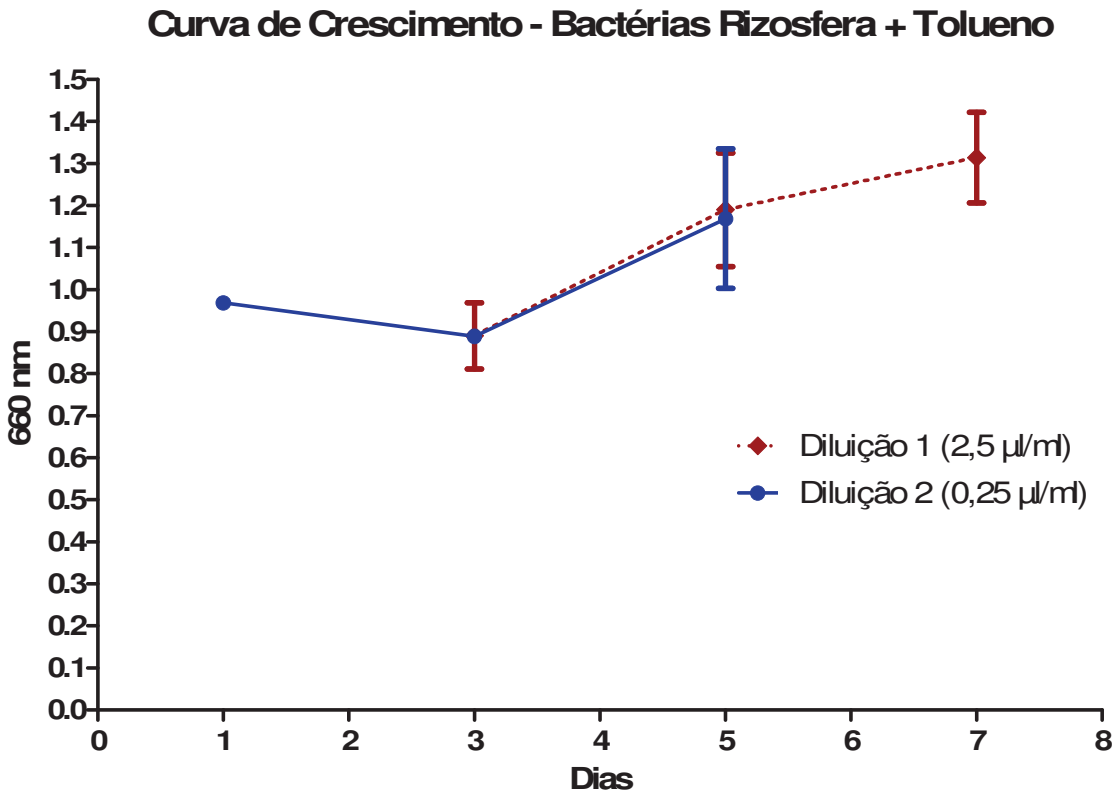


Figura 14 - Gráfico X – Curva de crescimento das bactérias da rizosfera da *Allagoptera arenaria* na presença de tolueno.

Verificou-se que as bactérias submetidas ao crescimento com a diluição 2 (0,25µl/ml) cresceram em 24 horas, o mesmo período de crescimento observado sem o contaminante, demonstrando que a concentração utilizada não interferiu no tempo de crescimento. Na diluição 1 (2,5µl/ml), concentração dez vezes maior que a diluição 2, o crescimento se deu após 72 horas da incubação das bactérias com o tolueno. No terceiro dia de experimento observou-se um pequeno decaimento do crescimento das bactérias da diluição 2. Já na diluição 1 podemos observar um crescimento progressivo da cultura, mostrando que o contaminante não interferiu nas funções metabólicas dos micro-organismos.

Analisando morfologicamente as bactérias que cresceram na presença de tolueno, puderam-se observar pelo menos três espécies de bactérias (figura 15).

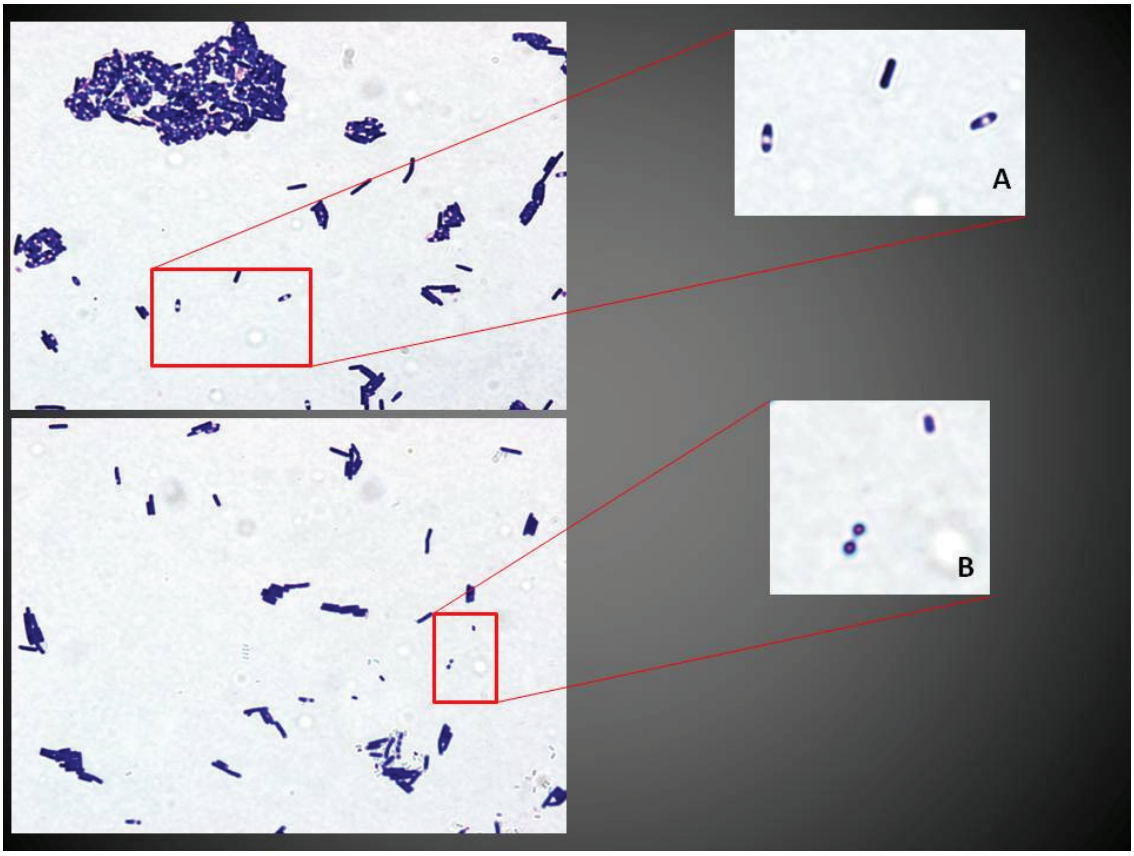


Figura 15 – Bactéria da rizosfera tolerantes ao tolueno. A – Dois tipos de bastonetes e B – Cocos. Foto: Gisely Mendes.

A partir de comparações morfológicas e ecológicas na bibliografia, supõe-se que um dos bastonetes resistentes ao tolueno seja a *Beijerinckia indica,* espécie descoberta por Starkey e De em 1939. *Beijerinckia indica* é uma espécie fixadora de nitrogênio, encontrada na rizosfera de vegetais de solos ácidos tropicais. Dentre as espécies do gênero, a *B. indica* é a espécie mais comumente encontrada e foi isolada de solos tropicais de todos os continentes e, por vezes a partir de regiões não-tropicais. Esta espécie possui temperatura ótima para crescimento entre 10 e 35ºC e cresce em pH entre 3,0 e 10,0. Possui a capacidade de degradação de compostos aromáticos, como o tolueno e é conhecida a via metabólica para degradação deste (KENNEDY, 2005; VANCURA, ABD-EL-MALEK; ZAYED, 1964).

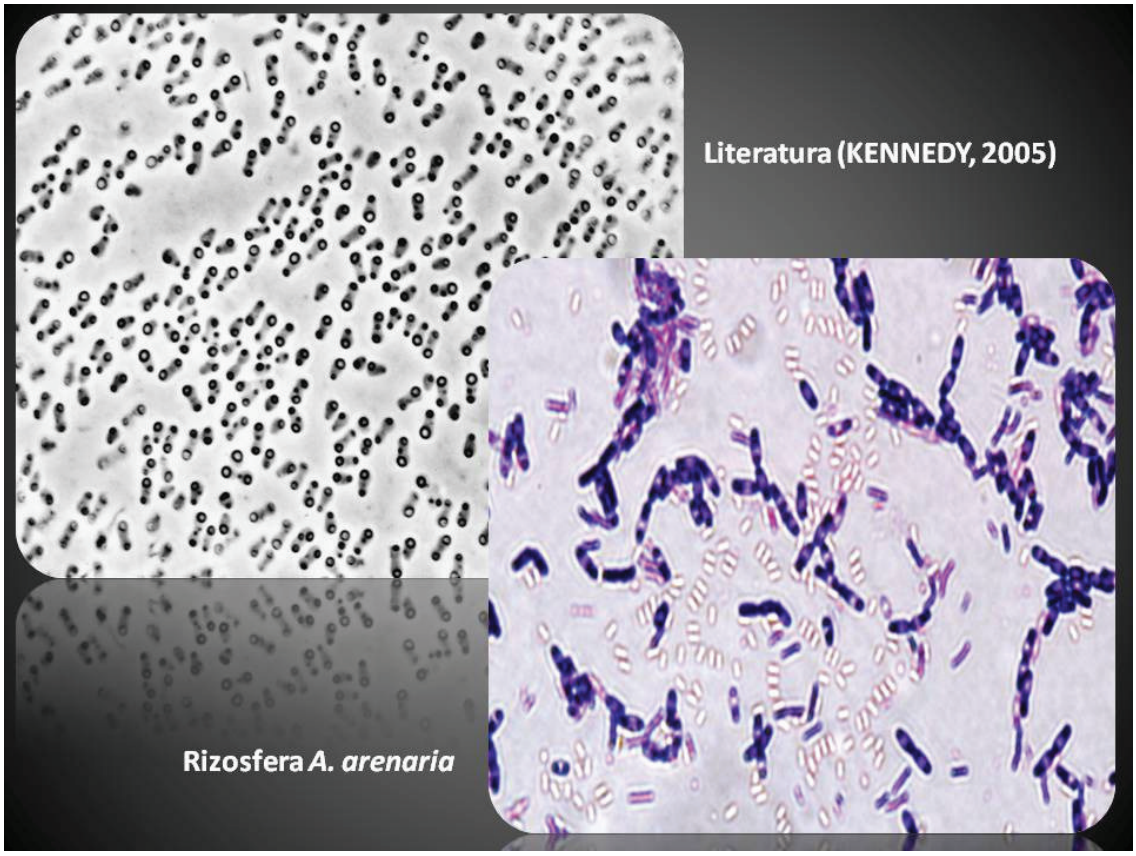


Figura 16 – Comparação morfológica entre *Beijerinckia* e bactéria da Rizosfera da *Allagoptera arenaria* após crescimento com tolueno. Foto: Gisely Mendes.

**Bactérias endofíticas**

Na cultura mista, contendo bactérias Gram negativas e positivas, somente as bactérias Gram positivas conseguiram crescer na presença de tolueno (figura 17).

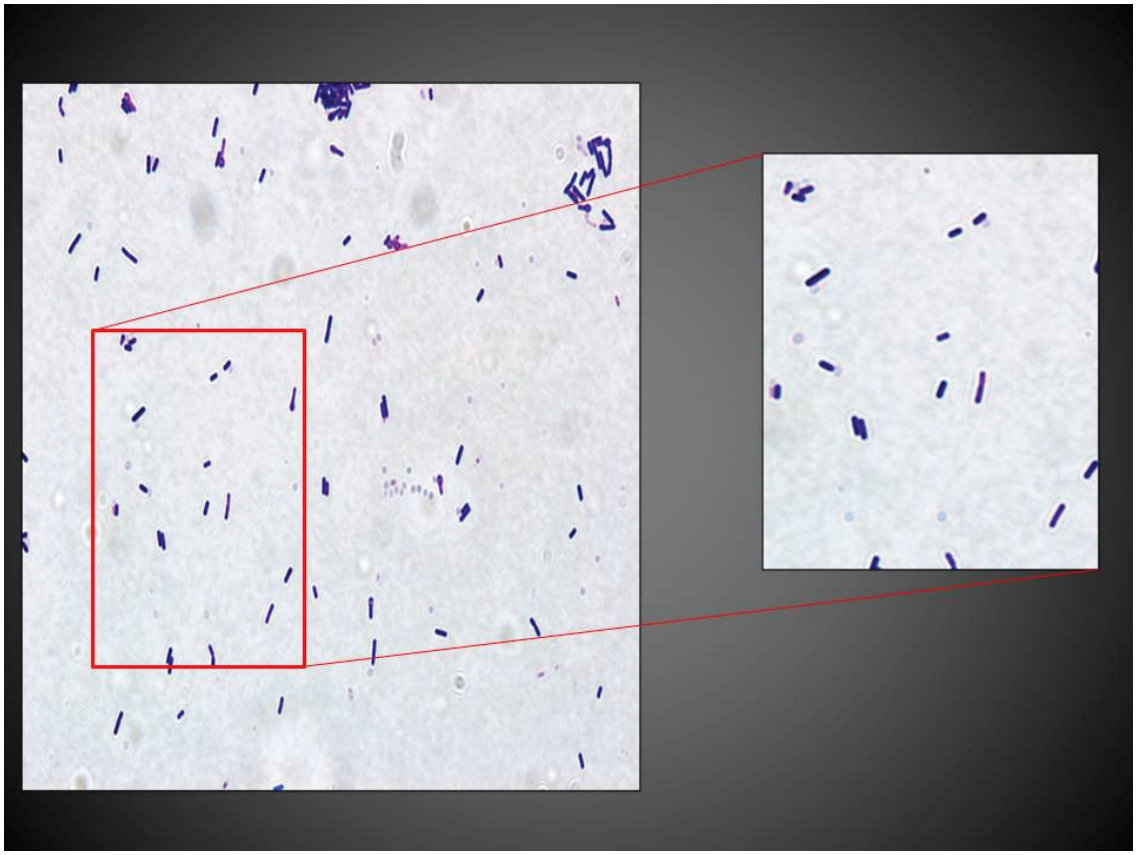

Figura 17 – Bactérias endofíticas tolerantes ao tolueno. Foto: Gisely Mendes.

Nas figuras 18 está representado o gráfico com as curvas de crescimento das bactérias endofíticas mistas na presença de tolueno, obtida através de leitura da densidade ótica.

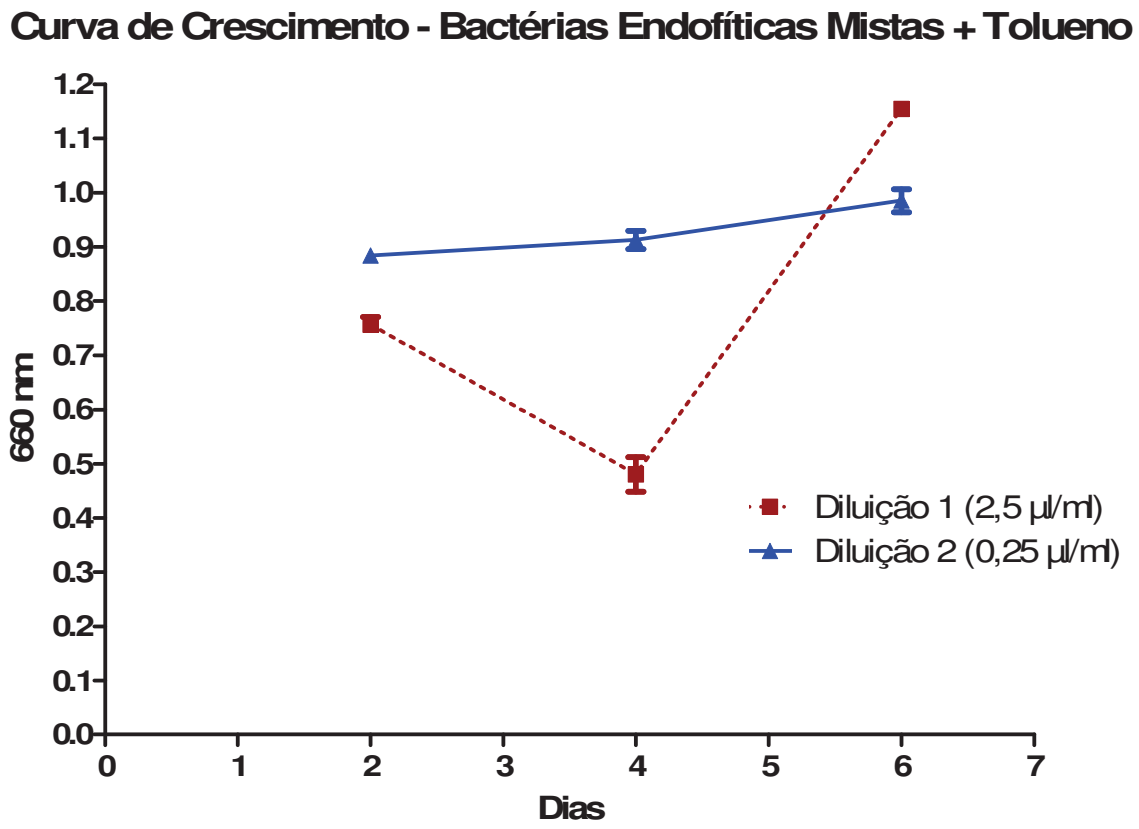


Figura 18 - Curva de crescimento das bactérias endofíticas mistas da *Allagoptera arenaria* na presença de tolueno.

As bactérias endofíticas levaram um tempo maior pra iniciar seu crescimento em comparação com as bactérias da rizosfera, podendo ser mais sensíveis ao poluente. Após 48 horas de incubação, houve crescimento tanto das bactérias submetidas ao crescimento com a diluição 1 (2,5µl/ml), quanto das submetidas com a diluição 2 (0,25µl/ml). As bactérias cultivadas com a menor diluição mantiveram um crescimento suave e uniforme. Já as cultivadas com a maior diluição tiveram uma queda de crescimento no quarto dia, retomando-o significantemente no sexto dia de experimento.

Para comprovar que as bactérias Gram negativas não são tolerantes ao tolueno, o mesmo experimento foi realizado com as bactérias Gram negativas isoladas e não ocorreu crescimento em nenhuma das diluições. Demonstrando que somente as bactérias endofíticas Gram positivas da *Allagoptera arenaria* foram tolerantes ao tolueno.

## DISCUSSÃO

A preocupação com a remediação de ambientes poluídos com hidrocarbonetos do petróleo vem aumentando à medida que cresce o número de áreas contaminadas por estes compostos (JACQUE, 2007). Neste trabalho podemos constatar que as bactérias isoladas da rizosfera e do tecido da raiz da *Allagoptera arenaria,* um vegetal típico das restingas brasileiras, são tolerantes ao tolueno, um hidrocarboneto monoaromático que além de ser um dos constituintes da gasolina, possui um importante papel na indústria (FORSTER; TANNHAUSER; TANNHAUSER, 1994). Uma vez que são tolerantes, estas possuem uma potencial capacidade de degradar este poluente.

McGuinness e Dowling (2009) em revisão bibliográfica sobre a capacidade de bactérias associadas a vegetais em degradar compostos orgânicos presentes no solo, listaram bactérias rizosféricas capazes de degradar BTEX, como *Azospirillum lipoferum spp, Azospirillum brasilense, Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, associadas à mostarda branca (*Sinapsis alba L.*), trigo (*Triticum spp.),* festuca alta (*Festuca arundinacea*) e azevém italiano (*Lolium multiflorum*). Das bactérias endofíticas, as bactérias capazes de degradar esses compostos foram *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas sp* associadas ao tremoço amarelo (*Lupinus luteus L.*) e álamo (*Populus*). Isso fortalece a afirmação de MA e colaboradores (2011) de que associações simbióticas entre micro-organismos e plantas podem desempenhar um papel importante na remediação de solos contaminados com produtos químicos orgânicos.

Nos nossos estudos, somente as bactérias Gram positivas se mostraram tolerantes ao tolueno. A maior sensibilidade ao tolueno pelas bactérias Gram negativas em relação às bactérias Gram positivas pode ser explicada devido à diferença na espessura da camada de peptidoglicano da parede celular. As bactérias Gram positivas possuem uma parede espessa e homogênea ligada diretamente à face externa da membrana plasmática, não havendo assim espaço periplasmático. Já a parede das bactérias Gram negativas é formada por dois folhetos, um interno, constituído por uma delgada camada do complexo de peptidoglicano. Este folheto não possui ligação com a membrana plasmática; e um externo, constituído por lipossacarídios e lipoproteínas. Os dois folhetos são conectados através de lipoproteínas integradas no folheto externo e ligadas por ligações covalentes aos peptidoglicanos. No folheto externo existem canais protéicos que facilitam a passagem de água e diversos metabólitos (LAZAROAIE, 2010). O tolueno, por se tratar de um hidrocarboneto solúvel, possivelmente permeia por estes

canais podendo causar a perturbação da estabilidade da estrutura da membrana, provocando a perda da sua função e em última análise, a morte celular

Apesar das bactérias Gram negativas isoladas da *Allagoptera arenaria* não se mostrarem tolerantes ao tolueno, alguns trabalhos nos mostram a potencialidade das bactérias Gram negativas na biorremediação de compostos orgânicos.

Gouveia e colaboradores em 2003 listam uma grande variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas isoladas de poços de petróleo. Estas são bactérias produtoras de biossurfactantes, que auxiliam na emulsificação do contaminante e consequentemente facilitam sua retirada e a ação de outros micro-organismos no processo de degradação.

Em sua pesquisa sobre respostas múltiplas de bactérias gram-positivas e gram-negativas para mistura de hidrocarbonetos, Lazaroaie (2010) também identificou respostas satisfatórias quanto à tolerância tanto para bactérias Gram positivas quanto para as Gram negativas.

Dentre as bactérias isoladas da rizosfera, uma se assemelha com a *Beijerinckia indica* por se tratar de uma bactéria diazotrófica cosmopolita, típica de solos tropicais, como é caracterizado o solo de restinga. Esta bactéria possui temperatura ótima para crescimento entre 10 e 35ºC e pH entre 3,0 e 10,0. Condições semelhantes em que as bactérias isoladas da rizosfera foram submetidas a crescimento no laboratório. Inúmeros trabalhos citam a eficiência do gênero *Beijerinckia* na degradação de hidrocarbonetos do petróleo (THAPA; KC; GHIMIRE, 2012; JACQUE *et al*, 2007; REGINATTO; COLLA; THOMÉ, 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho nos mostram que as bactérias que foram isoladas das raízes da *Allagoptera arenaria* são tolerantes ao tolueno. O ecossistema de restinga se mostra frágil pela falta de monitoramento como ferramenta para o controle de contaminação do solo. E ao passo que este ecossistema está suscetível a contaminação por hidrocarbonetos do petróleo, seja pelo transporte de combustíveis, desativação de postos de gasolina ou acidentes em meio marítimo, bactérias, em associação com vegetais típicos desse ambiente, podem representar uma solução na remediação desses locais.

## CONCLUSÃO

A rizosfera da *Allagoptera arenaria* é colonizada por pelo menos 3 espécies de bactérias Gram positivas. No interior das raízes observou-se pelo menos 3 espécies de bactérias, onde 2 são Gram negativas e 1 Gram positiva. Há semelhança morfológica entre bastonetes endofíticos e da rizosfera, supondo que as bactérias que estão na rizosfera podem também colonizar o tecido da raiz. Tanto as bactérias endofíticas, quanto as da rizosfera apresentaram um crescimento satisfatório a uma temperatura de 25ºC. No teste de tolerância com o tolueno foi observado que as bactérias endofíticas e da rizosfera foram capazes de crescer na presença do poluente, sendo que somente as bactérias endofíticas Gram positivas são tolerantes ao tolueno. Por meio de comparações na literatura, uma das bactérias encontradas na rizosfera da *Allagoptera arenaria* possivelmente é a *Beijerinckia india* devido suas características morfológicas e ecológicas.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho nos mostram a viabilidade da utilização de vegetais de restinga, associados a bactérias nativas, no processo de remediação do solo desses ambientes. E como continuidade desses estudos, temos como perspectivas futuras:

- Fazer uma caracterização mais detalhada das espécies bacterianas, utilizando, por exemplo, a técnica do PCR;
- Estudar a associação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) com bactérias no processo de biorremediação;
- Observar a capacidade de crescimento das bactérias com outros hidrocarbonetos do petróleo;
- Verificar o produto de degradação através de técnicas como cromatografia gasosa;
- Realizar o mesmo trabalho com outros vegetais típicos de restinga;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ABBAS, M. Z. M. **A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2003.

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação Química e Biorremediação do Solo. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Lavras: UFLA, p. 299-352, 2000.

ANDRADE. J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**. v.35, n.3, 2010.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21th Edition. Washington, DC: APHA, 2005.

ARAÚJO, D. S. D.; PEIXOTO, A. L. 1977. Renovação da comunidade vegetal de restinga após uma queimada. Pp. 1-18. In: **Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1977.

ARAUJO, D.S.D. Cabo Frio Region, south-eastern Brazil. *In*: Davis, S.D.; Heywood, V.H.; Herrera-MacBryde, O.; Villa-Lobos, J. & Hamilton, A.C. (eds.). **Centres of plant diversity: a guide and strategy for their conservation: The Americas,** vol. 3. WWF/IUCN, Oxford. p. 373-375, 1997.

ARAUJO, D.S.D. **Análise florística e fitogeográfica das restingas do estado do Rio de Janeiro**. 2000. 176f. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2000.

ARAUJO, D.S.D *et al*. Área de Proteção Ambiental de Massambaba, Rio de Janeiro: caracterização fitofisionômica e florística. **Rodriguésia**. v. 60, n. 1, p. 67-96, 2009.

BIGARELLA, J. J.; BECKER, R. D. International Symposium on the Quaternary. **Bol. Paranaense de Geociências**. v.33. 370 p. 1975.

BRAGA, T. V. S. **Associações com fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio em *Allagoptera arenaria* (GOMES) O. Kuntze na restinga de Marambaia, RJ**. 2008. 33f. Monografia (graduação em engenharia florestal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde, Portaria 518: Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. 2004.

CAMPBELL, R. **Plant Microbiology**. Edward Arnold: Baltimore, MD.1985.

CHAUDHRY, Q. *et al*. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 12, p. 34-48, 2005.

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

DINARDI, A. L. *et al*. Fitorremediação. **III fórum de estudos contábeis 2003**. Rio Claro, 2003.

FORSTER, L. M. K.; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S. L. Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. **Rev. Saúde Pública**. v.28, n.2, p. 167-172, 1994.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, ciência & desenvolvimento**. s/v. n. 34, p. 36-43, 2005.

HEAD, I. M; JONES, D. M.;. RÖLING, W.F.M. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature Review**. v. 4, p. 173-182, 2006.

JACQUE, R. J. S.; *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**. v.37, n.4, p. 1192-1202, 2007.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de "landfarming"**. 2001. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro. 2001.

KENNEDY, C. Genus I. *Beijerinckia Derx* 1950a, 145$^{AL}$. **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**. v.2. p.-423-432. 2005.

KUIPER, I.; LAGENDIJK E. L.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. **Mol Plant Microbe Interact** v.17, p.6-15, 2004.

KIRK, J. L.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. The effects of perennial ryegrass and alfafa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. **Environmental Pollution.** v.133, n.3, p.455-465, 2004.

LAZAROAIE, M. M. Multiple responses of gram positive and gram negative bacteria to mixture of Hydrocarbons. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p.649 – 667. 2010.

MA, Y *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 248-258, 2011.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162f. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2006.

MCGUINNESS, M.; DOWLING, D. Plant-associated bacterial degradation of toxic organic compounds in soil. **International Journal of Environmental Research and Public Health.** v. 6, p. 2226-2247, 2009.

MENEZES, L. F. T., 1996. 89f. **Caracterização de comunidades vegetais praianas da restinga da Marambaia, RJ**. Tese de mestrado, UFRRJ, Seropédica, 1996.

MENEZES, L. F. T.; ARAUJO, D. S. D. Regeneração e riqueza da formação arbustiva de Palmae em uma cronosequência pós-fogo na Restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta bot. bras**. v.18, n.4, p. 771-780, 2004.

NAHAR, N.; ALAUDDIN. M.; QUILTY; B. Toxic efects of toluene on the growth of activated sludge bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.16, p. 307-311, 2000.

OHSHIRO, T.; IZUMI, Y. Microbial desulfurization of organic sulfur compounds in petroleum. **Biosci Biotechonol Biochem**. v.63, p.1-9, 1999.

PAULA, A. M. de; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de "landfarming" de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.10, n.2, p.448 – 455, 2006.

PILON-SMITS, E. Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerationsAnnual. **Front Ecol Environ**. v. 4, p. 203-210, 2006.

QUEIROGA, I. V.; SANTOS, C. R. A. dos; CARNEIRO, L. C. Ocorrência de Coliformes Totais na Presença de Cloro com Residual Mínimo no Sistema de Distribuição Público de Água Potável da Cidade de Abadia de Goiás. **NewsLab**. Ed. 83, 2007.

REGINATTO, C.; COLLA, L. M.; THOMÉ, A. Biorremediação de resíduos oleosos em solos. **Revista CIATEC – UPF**. v. 2, p.19-31, 2011.

REIS, R. C. C. Palmeiras (Arecaceae) das Restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta bot. bras**. v.20, n. 3, p.501 – 512, 2006.

ROBINSON, B. H.; LEBLANC, M.; PETIT, D.; BROOKS, R.; KIRKMAN, J.; GREGG, P. The potential of some plant hyperaccumulators for phytoremediation of contaminated soils. **In: International Soil Congress**. Montepelier, 1998.

ROCHA-PESSÔA, T. C. *et al*. Species composition of Bromeliaceae and their distribution at the Massambaba restinga in Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Biol**., v.68, n.2, p.251-257, maio 2008.

RODRIGUES, D. F. **Caracterização polifásica da biodiversidade de isolados degradadores de poluentes xenobióticos na Baixada Santista**. 2002. 170f. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas. 2002.

SILVA, R. L. B. **Contaminação de poços rasos no bairro Brisamar, Ítaguai, RJ, por derramamento de gasolina: concentração de BTEX e avaliação da qualidade da água consumida pela população**. 2002. 182f. Tese de doutorado, Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2002.

SILVEIRA, A. C. da; SPAREMBERGER, R. F. L. **A relação homem e meio ambiente e a reparação do dano ambiental: reflexões sobre a crise ambiental e a teoria do risco na sociedade**. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul UCS, 2004.

SOUZA, D. A. **Possíveis alterações no aporte de sedimentos no manguezal do porto do carro após a dragagem do Canal de Itajuru e enseada das Palmeiras na Laguna de Araruama.** 2004. 51 f. Dissertação, programa de pós-graduação em Gestão Ambiental, Faculdade da Região dos Lagos, Cabo Frio, 2004.

SPILBORGHS, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. 1997. Dissertação de Mestrado, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.

THAPA, B.; KC, A. K.; GHIMIRE, A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. **Journal of Science, Engineering and Technology**. v.8, n. I, p. 164-170, 2012.

TUTIDA, D.; FOGAÇA, R. **Como funciona a contaminação dos solos**. Disponível em < http://ambiente.hsw.uol.com.br/contaminacao-dos-solos1.htm> Acesso em 08 de Julho de 2011.

VANCE, D. B. Phytoremediation: enhancing natural attenuation processes. **National Environmental Journal**. v.6, p.30-31, 1996.

VANCURA, V.; ABD-EL-MALEK, Y.; ZAYED, M. N. Azotobacter na Beijerinckia in the soils and rhizosphere oh plants in Egypt. **Micoorganisms in the soil and rhizosphere**. 224 – 229, 1965.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, T. A.; GUTHRIE, E. A.; WALTON, B.T. ***Environmental* Science & *Technology***, v. 27, p. 2630-2636, 1993.

ARAUJO, D.S.D. **Análise florística e fitogeográfica das restingas do estado do Rio de Janeiro**. 2000. 176f. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2000.

ASSUPÇÃO, J.; NASCIMENTO, M. T. Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil**. Acta bot. Bras.**Vol.14(3), pág. 301-315, 2000.

CHAUDHRY, Q. *et al*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 12, p. 34-48, 2005.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 07, 23 de Julho de 1996. < http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res96/res0796.html> Acesso em 01 Out. 2010.

DINARDI, A. L. *et al*. Fitorremediação. **III fórum de estudos contábeis 2003**. Rio Claro (SP), 2003.

GOMES, A. A. *et al*. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.40, n.11, p.1105-1113, nov. 2005.

GOMES, F. H. *et al*. Solos sob vegetação de restinga na Ilha do Cardoso (SP). I - caracterização e classificação. **R. Bras. Ci. Solo**, v.31, p. 1563-1580, 2007.

HYNES, R. K. *et al*. Plant-Assisted Degradation of Phenanthrene as Assessed by solid-phase microextraction (SPME). **International Journal of Phytoremediation.** v.6, n.3, p. 253-268, 2004.

KUIPER, I. , LAGENDIJK E. L, BLOEMBERG, G. V & LUGTENBERG, B. J. J. **Mol Plant Microbe Interact** v.17, p. 6-15, 2004.

LANNA, A. C *et al*. Análise da situação da cultura de arroz de terras altas no meio norte do Mato Grosso. **Embrapa**. Seropédica, ISSN 1678-9644, doc. 151, 2003.

MA, Y et al. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 248-258, 2011.

MARIANO, J. B. **Impactos ambientais do refino de petróleo**. 2001. 289 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Planejamento Energético), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

PEREIRA, M. C. A.; CORDEIRO, S. Z.; ARAÚJO, D. S. D. Estrutura do estrato herbáceo na formação aberta de *Clusia* do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil. **Acta bot. Brasileira.** v. 18(3), p. 677-687, 2004.

PILON-SMITS, E. Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerationsAnnual. **Front Ecol Environ**. v. 4, p. 203-210, 2006.

ROBERTSON, S.J. *et al*. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 82, n. 2, p.213-40, 2007.

SCARANO, F. R. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rain forest. **Annals of Botany**. v. 90, p. 517-524, 2002.

VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada em sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE 1991. 123p.