
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**ANÁLISE DA TOXICIDADE E DA MUTAGENICIDADE
DE SOLO DE LANDFARMING, PROVENIENTE DE
REFINARIA DE PETRÓLEO, ANTES E DEPOIS DE
PROCESSOS QUE VISAM ESTIMULAR A
BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS**

TATIANA DA SILVA SOUZA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Junho - 2010

**ANÁLISE DA TOXICIDADE E DA MUTAGENICIDADE DE UM SOLO DE
LANDFARMING, PROVENIENTE DE UMA REFINARIA DE PETRÓLEO,
ANTES E DEPOIS DE PROCESSOS QUE VISAM ESTIMULAR A
BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS**

TATIANA DA SILVA SOUZA

**Orientadora: Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI
CHRISTOFOLETTI**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Rio Claro para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de
Concentração: Biologia Celular e Molecular).**

**Rio Claro
Estado de São Paulo-Brasil
Maio de 2010**

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser. Não somos o que iremos ser. Mas, graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martin Luther King

À minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio financeiro (Proc. 06/52383-7).

À **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**, campus de Rio Claro.

À Professora Dra. **Carmem Silvia Fontanetti** pela orientação, incentivo, confiança, enriquecimento científico e amizade.

À Professora Dra. **Dejanira de Franceschi de Angelis**, por ter viabilizado a realização desse trabalho, pela disponibilidade, sugestões apresentadas e ensinamentos.

À **Fabiana Aparecida Hencklein**, pelos ensinamentos científicos, pela amizade e por ser tão prestativa.

Ao **Renato de Almeida Machado**, responsável técnico de operação da REPLAN junto à área de Meio Ambiente, por ter fornecido o *landfarming* da refinaria de petróleo.

Ao **Valdenilson José Alves de Oliveira** pelas coletas de solo.

À **Izabela Calligaris** e **Silvia Tamie**, pelas sugestões e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial **Ana Maria Costa Leonardo**, **Doralice Maria Cella**, **Maria Aparecida Marin Morales**, **Patrícia Parise Maltempi** e **Sanae Kasahara**.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia da UNESP, campus de Rio Claro, em especial aos técnicos de laboratório **Antônio Yabuki**, **Gerson Mello**, **Monika Iamonte** e **Sandra Veloso**. À **Cristiane Mileo** pelo auxílio técnico na confecção das fotos.

Ao **Davi Butturi** e **Adriano Pinto-Mariano** pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, **Bárbara Manzano, Bruna Ventura, Cintya Christofolletti, Cristiane Talhiaferro, Dânia Mazzeo, Daniela Leme, Glaucilene Catrole, Guilherme Maziviero, Janaína Pedro, Lívia Loreiro, Jaqueline Bianchi, Márcia Hoshina, Marielli Schneider, Matheus Roberto, Milena De Julio, Nadia Corroque, Reinaldo Campos, Raquel Hara, Renata Caritá, Simone Gruber, Tamaris Gimenez, Thais Fernandes e Thiago Gazoni.** Vocês fazem a diferença!

Aos integrantes do grupo de pesquisa, **Cintya Christofolletti, Cristina Sousa, Danielli Perez, Guilherme Maziviero, Larissa Nogarol, Janaína Pedro, Raphael Souza, Tamaris Gimenez, Tatiane Abe e Vlamir Bozzato,** pelas produtivas discussões.

A todos os amigos da graduação e pós-graduação.

À **Alexandra Di Chiacchio, Bento Manuel, Daiane Alves, Lilian Mariano e Paula Honda,** pela amizade sincera.

À **Adriane Braga, Érika Nunes e José David,** sem palavras...

Ao **Eduardo Fortuna** por tornar a vida mais leve.

À família **Conceição, Jorge** (*in memoriam*) **Karina e Priscila,** pelo incentivo e por acreditarem.

SUMÁRIO		Página
1. RESUMO		1
2. ABSTRACT		3
3. INTRODUÇÃO		5
4. OBJETIVOS		8
5. REVISÃO DE LITERATURA		10
5.1. Biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo em <i>landfarming</i>		10
5.2. Casca de arroz e seu emprego na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.....		13
5.3. Vinhaça e seu emprego na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.....		15
5.4. Teste de anormalidades mitóticas e cromossômicas em <i>Allium cepa</i>		16
5.5. Morfologia do intestino médio e do corpo gorduroso perivisceral de <i>Rhinocricus padbergi</i> e seu emprego na avaliação de solos contaminados.....		23
6. MATERIAL E MÉTODOS		26
6.1. Área de estudo – <i>Landfarming</i> da Refinaria de Petróleo do Planalto (REPLAN/ PETROBRÁS).....		26
6.2. Solos controle.....		29
6.3. Vinhaça.....		29
6.4. Biorremediação.....		30
6.4.1. Adição de casca de arroz à amostras de solo de <i>landfarming</i>		30
6.4.1.2. Ensaio respirométrico em frascos de Bartha & Pramer.....		30
6.4.2. Adição de casca de arroz, vinhaça e casca de arroz associado com vinhaça à amostras de solo de <i>landfarming</i>		30
6.5. Teste de anormalidades mitóticas e cromossômicas em <i>Allium cepa</i>		31
6.6. Bioensaio com <i>Rhinocricus padbergi</i>		32
6.6.1. Histologia		33

6.6.1.1. Inclusão em resina (Histo-resina).....	33
6.6.2. Histoquímica.....	34
6.6.2.1. Técnica do azul de bromofenol para detecção de proteínas totais.....	34
6.6.2.2. Técnica do PAS para detecção de polissacarídeos neutros.....	34
6.6.2.3. Método de von Kossa para a detecção de cálcio.....	34
6.6.2.4. Técnica do sudan black B para detecção de lipídios totais.....	35
7. RESULTADOS	36
7.1. Ecotoxicological assays applied in soils contaminated by petroleum hydrocarbons.....	37
7.2. The <i>Allium cepa</i> bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation.....	61
7.3. The effects of two agricultural residues on the bioremediation and genotoxicity of soil contaminated with petroleum refinery sludge.....	85
7.4. Clastogenicidade de solo de <i>landfarming</i> associado à vinhaça.....	107
7.5. O uso de diplópodos como bioindicadores- uma revisão.....	133
7.6. Morphological biomarkers in the <i>Rhinocricus padbergi</i> midgut exposed to contaminated soil.....	163
7.7. Análise histológica e histoquímica do corpo gorduroso perivisceral de <i>Rhinocricus padbergi</i> , expostos a um solo industrial contaminado.....	190
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	216
9. CONCLUSÕES	220
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	222

1. RESUMO

O sistema de biorremediação denominado *landfarming* tem sido utilizado por refinarias de petróleo para dispor e tratar, em grandes áreas de solo, localizadas na própria indústria, o resíduo sólido final gerado, que é composto por uma emulsão formada por água, diversas frações de hidrocarbonetos e metais. Contudo, em *landfarmings*, a biodegradação de algumas classes de hidrocarbonetos pode levar tempo, meses ou anos. Desse modo, tratamentos complementares podem ser utilizados, visando estimular o metabolismo microbiano, tais como a adição de agentes descompactantes e nutrientes no solo. O progresso da biorremediação pode ser acompanhado por meio de medidas da concentração dos contaminantes de interesse, pela análise do metabolismo microbiano e por meio de ensaios biológicos que mensuram as atividades tóxica, genotóxica e mutagênica das amostras avaliadas. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da adição de dois resíduos agroindustriais, casca de arroz e vinhaça, na biorremediação, na genotoxicidade e na mutagenicidade de um solo de *landfarming* proveniente de uma refinaria de petróleo, por meio de análises químicas, taxa de CO₂ liberado por microrganismos e por meio do teste de anormalidades mitóticas e cromossômicas na espécie vegetal *Allium cepa*. Também foi objetivo desse trabalho avaliar o potencial bioindicador do invertebrado terrestre *Rhinocricus padbergi* após exposição a amostras do *landfarming* desativado. Análises histológicas e histoquímicas no intestino médio e no corpo gorduroso perivisceral do diplópodo foram realizadas. Os resultados do presente trabalho mostraram que a casca de arroz, empregada como agente descompactante do solo, constitui uma alternativa economicamente viável para a biorremediação de resíduos derivados da indústria do petróleo. A adição desse material promoveu um aumento da quantidade de CO₂ liberado, diminuiu a concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs) do solo de *landfarming* e reduziu sua genotoxicidade. Ao contrário, a vinhaça, quando utilizada *in natura*, não foi capaz de estimular o metabolismo

microbiano, visto que a taxa de depleção de TPHs não foi significativa nas amostras de *landfarming* tratadas com esse efluente agroindustrial. Além disso, a vinhaça potencializou a clastogenicidade do solo de *landfarming*. Quando a casca de arroz foi utilizada juntamente com a vinhaça, que atuou como corretora de umidade e aditivo orgânico, uma notável redução da concentração de TPHs do solo de *landfarming* foi observada, contudo uma das amostras avaliadas foi citotóxica para *A. cepa*. Conjuntamente, as respostas obtidas no intestino médio e no corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* foram decorrentes da ativação de processos de destoxificação e de mecanismos de defesa dos animais expostos, numa tentativa de neutralizar e/ou eliminar os resíduos tóxicos ingeridos. Essas repostas podem ser utilizadas como biomarcadores subletais na avaliação de solos contaminados com misturas complexas, como o solo de *landfarming* utilizado. Concluiu-se que *landfarmings* de refinaria de petróleo, mesmo desativados, apresentam perigo do ponto de vista ecotoxicológico e estratégias que visam acelerar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo no solo são bem vistas do ponto vista ambiental, desde que ensaios biológicos, juntamente com análises químicas, sejam realizados para monitorar o progresso da biorremediação.

2. ABSTRACT

The bioremediation system called *landfarming* has been used by petroleum refineries to dispose and treat, in large areas of soil, located in the own industry, the final solid residue generated, which is composed by an emulsion formed by water, several fractions of hydrocarbons and metals. However, in *landfarmings*, the biodegradation of some classes of hydrocarbons can take time, months or years. Thus, complementary treatments can be used in order to stimulate the microbial metabolism, such as addition of uncompressing agents and nutrients in the soil. The bioremediation progress can be monitored by measuring the concentrations of contaminants of interest, by the analysis of the microbial metabolism and by biological assays that measure toxic, genotoxic and mutagenic activities of the assessed samples. The aim of this study was to investigate the effects of adding two agroindustrial residues, rice hull and vinasse, in the bioremediation, genotoxicity and mutagenicity of a soil of *landfarming* from a petroleum refinery by chemical analyses, rate of CO₂ released by microorganisms and by the mitotic and chromosomal abnormalities test in the plant species *Allium cepa*. It was also objective of this study assess the bioindicator potential of the terrestrial invertebrate *Rhinocricus padbergi* after exposure to deactivated *landfarming* samples. Histological and histochemical analyses of the midgut and fat body of this invertebrate were also carried out. The results of this study showed that rice hull, used as an uncompressing agent of the soil, constitutes an economically viable alternative for the bioremediation of residues derived from petroleum industry. The addition of this material promoted an increase in the quantity of CO₂ released, decreased the concentration of total petroleum hydrocarbons (TPHs) of the *landfarming* soil and reduced its genotoxicity. On the contrary, vinasse, when used *in natura*, was not able to stimulate microbial metabolism, since the depletion rate of TPHs was not significative in the samples of *landfarming* treated with this agroindustrial effluent. Moreover, stillage enhanced the clastogenicity of the *landfarming* soil. When the rice hull was

used together with vinasse, which acted as a corrector of humidity and organic additive, it was observed a remarkable reduction in the concentration of TPHs of the *landfarming* soil, however, one of the evaluated samples was cytotoxic for *A. cepa*. Together, the responses obtained in the midgut and in the perivisceral fat body of *R. padbergi* represent an activation of the detoxification processes and defence mechanisms of the exposed animals in an attempt to neutralize and/or eliminate the toxic residues ingested. These responses may be used as sublethal bioindicators in the assessment of soils contaminated by complex mixtures, such as the *landfarming* soil used. It is concluded that *landfarmings* of petroleum refineries, even deactivated, present danger from the ecotoxicological point of view and strategies that aim to accelerate the biodegradation of petroleum hydrocarbons in the soil are good from the environmental point of view, since biological assays, together with chemical analyses, be carried out to monitor the bioremediation progress.

3. INTRODUÇÃO

Biorremediação é o uso de seres vivos na recuperação de áreas degradadas. O processo de biodegradação consiste em decomposição de resíduos, principalmente orgânicos, por ação de seres vivos.

A biorremediação de resíduos e o reaproveitamento de seus nutrientes parecem constituir uma alternativa viável para minimizar os possíveis danos ambientais causados pelos mesmos.

Populações microbianas que possuem a habilidade de biodegradar poluentes ambientais orgânicos são utilizadas na biorremediação de solos contaminados com resíduos de petróleo. O benefício máximo desse processo é a mineralização desses resíduos mesmos, obtendo como produto final CO_2 e H_2O pela via aeróbia, assim como a formação de biomassa (URURAHY et al., 1998).

O sistema de biorremediação denominado *landfarming* tem sido utilizado por refinarias de petróleo para dispor e tratar, em grandes áreas de solo localizadas na própria indústria, o resíduo sólido final gerado, a borra oleosa, que é composto por uma emulsão formada por água, diversas frações de hidrocarbonetos e metais. Contudo, em *landfarmings*, a biodegradação de algumas classes de hidrocarbonetos pode levar muito tempo, como meses ou anos (URURAHY et al., 1998; MARIN et al., 2005).

Metodologias complementares podem ser adotadas para acelerar a biorremediação de solos contaminados com resíduos orgânicos. Assim, a adição de nutrientes que estimulem o metabolismo de microrganismos endógenos, a adição de microrganismos degradadores exógenos, a adição de surfactantes que auxiliam a metabolização de poluentes orgânicos, facilitando o transporte destes para o interior das

células microbianas ou diminuindo as interações superficiais contaminante/solo, a adição de enzimas comerciais que favorecem a oxidação de moléculas de difícil degradação, gerando moléculas de fácil assimilação pelos microrganismos e a adição de materiais estruturantes, tais como casca de arroz, cavaco de madeira, farelo de trigo, serragem e argila, dentre outros, melhora consideravelmente a atividade microbiana, acarretando um aumento na eficácia de remoção do poluente (NELSON et al., 1996; NETO et al., 2005; RAIMUNDO et al., 2004; RAIMUNDO; RIZZO, 2005).

A casca de arroz e a vinhaça são resíduos agroindustriais em crescente produção no Brasil, bem como em outros países do mundo. A disposição final desses resíduos tem gerado preocupações ambientais, visto que, comumente, a casca de arroz tem sido queimada, aumentando a emissão de CO₂ na atmosfera (IRANZO et al., 2004; CAI et al., 2007). No Brasil, por muitos anos a vinhaça foi disposta *in natura* em mananciais superficiais até a proibição dessa prática por seus efeitos nocivos à fauna, flora, microfauna e microflora de águas doces. Porém, nos últimos anos, tornou-se comum o reaproveitamento da vinhaça como fertilizante em solos agrícolas, sobretudo na cultura de cana-de-açúcar. Todavia, são escassos os trabalhos que avaliaram o potencial poluidor da vinhaça no solo (LYRA et al., 2003).

Esses dois resíduos agroindustriais apresentam potencialidade para acelerar a biorremediação de solos contaminados com resíduos de petróleo. A casca de arroz possui a capacidade de descompactar o solo, facilitando a atividade aeróbia microbiana, além de possuir microrganismos capazes de metabolizar hidrocarbonetos (HAMDI et al., 2007). Já a vinhaça pode atuar como fonte de nutrientes importantes para o metabolismo microbiano (CRIVELARO, 2005). Dessa forma, a associação da casca de arroz e da vinhaça ao *landfarming* atenderia a concepção moderna de manejo ambiental que apresenta como base a reciclagem e reutilização de resíduos.

Outra prática recomendada para a preservação da saúde ambiental é o uso de ensaios biológicos para a avaliação de tecnologias de biorremediação (PLAZA et al., 2005a). Ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade em vegetais superiores são capazes de detectar substâncias deletérias presentes na amostra avaliada, mesmo em baixas concentrações (LEME; MARIN-MORALES, 2009). De modo semelhante, alterações morfológicas no intestino médio de invertebrados terrestres que, como os diplópodos, revolvem e ingerem partículas de solo, têm sido utilizadas como biomarcadores de poluição ambiental (TRIEBSKORN; KÜNST, 1990;

TRIEBSKORN et al., 1999; GODOY; FONTANETTI, 2009; NOGAROL; FONTANETTI, 2010).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos de um *landfarming* de refinaria de petróleo e de sua associação com resíduos agroindustriais no material genético de *Allium cepa*. Além disso, foram investigadas possíveis alterações morfológicas no intestino médio e no corpo gorduroso perivisceral do diplópodo *Rhinocricus padbergi*, após exposição a solo de *landfarming*.

4. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos de um *landfarming* de refinaria de petróleo e de sua associação com resíduos agroindustriais em um organismo-teste vegetal e em um invertebrado terrestre.

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

1. Investigar os efeitos da casca de arroz na biodegradação, biorremediação e na genotoxicidade de um solo de *landfarming*, por meio do ensaio respirométrico em frascos de Bartha & Pramer, da análise de hidrocarbonetos totais de petróleo, e de bioensaio com *Allium cepa*, respectivamente;
2. Analisar os efeitos da vinhaça na biorremediação e na genotoxicidade de um solo de *landfarming*, por meio da análise de hidrocarbonetos totais de petróleo e de bioensaio com *A. cepa*, respectivamente;
3. Investigar os efeitos da associação da casca de arroz com a vinhaça na biorremediação e na genotoxicidade de um solo de *landfarming*, por meio da análise de hidrocarbonetos totais de petróleo e de bioensaio com *A. cepa*, respectivamente;
4. Avaliar a sensibilidade potencial do diplópodo *Rhinocricus padbergi* frente à exposição a solo de *landfarming*;
5. Investigar as possíveis alterações morfológicas no intestino médio, local onde ocorre a digestão, promovidas pela exposição de *R. padbergi* ao solo de *landfarming*;
6. Investigar as possíveis alterações morfológicas no corpo gorduroso perivisceral, tecido de intensa atividade metabólica, promovidas pela exposição de *R. padbergi* ao solo de *landfarming*;

7. Comparar a sensibilidade do intestino médio e do corpo gorduroso de *R. padbergi*, em relação ao tipo e intensidade de resposta celular, após exposição ao solo de *landfarming*.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1. Biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo em *landfarming*

A biorremediação tem por finalidade remover ou diminuir, completa ou parcialmente, a concentração de poluentes ambientais, por meio de organismos vivos. Os sistemas biológicos geralmente utilizados nesse processo são plantas (fitorremediação) e microrganismos (fungos e bactérias), sendo esses últimos os mais empregados (MACEDO et al., 2002). A biorremediação apresenta como vantagens: baixo custo operacional, eliminação permanente do resíduo e redução de riscos de contaminação de outras áreas (DEL'ARCO; FRANÇA, 1999; SABATÉ et al., 2004).

Basicamente, os microrganismos utilizam os compostos orgânicos, presentes nos contaminantes, como substrato para o crescimento e geração de energia, convertendo-os em CO₂, H₂O e biomassa (URURAHY et al., 1998; BOOPATHY, 2003).

A eficiência da biorremediação de uma área pode ser avaliada pela contagem de microrganismos heterotróficos totais, pela contagem de microrganismos degradadores de um ou de vários substratos específicos, por medidas da taxa de respiração microbiana (consumo de oxigênio e/ou produção de dióxido de carbono) e a determinação das taxas de degradação (desaparecimento de poluentes individuais e/ou na totalidade) (BALBA et al., 1998; OH et al., 2000).

Os métodos respirométricos (consumo de oxigênio e/ou produção de dióxido de carbono) podem ser utilizados como um primeiro teste para se avaliar a pronta ou inerente biodegradabilidade de poluentes em solo ou água. Estes testes são geralmente conduzidos sob condições ótimas com respeito à umidade, temperatura, nutrientes minerais, inoculação microbiana e aeração. O ensaio respirométrico, em frascos de Bartha & Pramer, é um dos métodos mais utilizados para a análise da eficácia da

biorremediação de solos contaminados com resíduos orgânicos. Nesse processo, o CO₂ liberado por microrganismos é proporcional a porcentagem de substrato biodegradado. Estudos de mineralização envolvendo a mensuração da produção total de CO₂ podem fornecer informações importantes a respeito do potencial de biodegradabilidade de hidrocarbonetos (BALBA et al., 1998).

Análises químicas constituem o método primário para o monitoramento da biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. As análises das concentrações dos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs) (MARIN et al., 2005; SARKAR et al., 2005; HUANG et al., 2005; SOUZA et al., 2009) e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são as mais comuns (MORELLI et al., 2005; PLAZA et al., 2005a, b). O termo TPHs é definido como a quantidade de hidrocarbonetos de petróleo mensurável no meio ambiente, compreendendo centenas de compostos químicos originalmente presentes no óleo cru. Essa análise, portanto, quantifica o total de hidrocarbonetos presentes no meio. Os HPAs apresentam grande persistência ambiental e apresentam propriedades mutagênicas e carcinogênicas (USEPA, 2008).

Landfarming é uma tecnologia de biorremediação que visa reduzir a concentração de resíduos orgânicos sólidos dispostos no solo, por meio de processos associados à biorremediação (USEPA, 1998). A técnica tem sido utilizada para tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos há 100 anos e pela indústria do petróleo a mais de 25 (RISER-ROBERTS, 1998), ganhando popularidade na década de 70, principalmente nas refinarias de petróleo da América do Norte e da Europa (HEJAZI et al., 2003). Atualmente, indústrias de diferentes atividades têm por ele optado, como as indústrias químicas, têxteis, alimentícias e de tratamento de efluentes (QUINTEIRO, 2004).

No Brasil, a história deste sistema teve início no final dos anos 70 por meio do tratamento de resíduos oleosos em refinarias de petróleo. Contudo, mesmo com o aumento no número de unidades de *landfarmings* poucos dados disponíveis estão disponíveis relativos a eficiência destes sistemas, não permitindo uma avaliação mais conclusiva sobre as condições operacionais em uso e seus efeitos sobre o ambiente (QUINTEIRO, 2004).

Em *landfarmings*, microrganismos do próprio solo são utilizados para tratamento dos resíduos industriais orgânicos biodegradáveis. O solo é então processado com máquinas agrícolas (arado e grade), momento em que nutrientes são adicionados.

De acordo com Harmsen (1991) o solo deve ser misturado para aumentar o contato entre as substâncias orgânicas e os microrganismos e para fornecer oxigênio requerido para a degradação aeróbia. A atividade aeróbia dos microrganismos é também estimulada por meio da adição de água para a manutenção da umidade do solo (USEPA, 1998). Bactérias capazes de quebrar hidrocarbonetos são frequentemente adicionadas ao solo para acelerar as taxas de degradação dos mesmos. O aumento da atividade metabólica dos microrganismos aumenta a degradação de produtos de petróleo adsorvidos no solo (RISER-ROBERTS, 1998). A base de toda a área de tratamento deve ser impermeabilizada com geomanta e argila compactada para evitar contaminação da água subterrânea (BERGER, 2005).

O período de vida útil de um *landfarming* varia de 6 a 10 anos, dependendo da taxa de aplicação do resíduo oleoso no solo. Após esse período o proprietário ou o operador do sistema deve então apresentar ao órgão de fiscalização ambiental um plano de desativação do *landfarming* onde as etapas deverão estar descritas, levando-se em consideração o tipo, a quantidade de resíduos aplicados e os registros de monitoramento, inclusive do lençol freático de toda área do *landfarming* (QUINTEIRO, 2004).

Os resíduos dispostos em *landfarmings* de refinaria de petróleo são oriundos das unidades de tratamento de despejos industriais, da estação de tratamento de água, da limpeza do fundo de tanques de petróleo e do fundo de tanques da estação de tratamento de despejos líquidos industriais, de material flotante das lagoas de estabilização de efluentes e de água de drenagem contaminada com óleo (GUARRACHO, 2005). Desse modo, o resíduo sólido final, denominado borra oleosa, é composto por diversas frações de hidrocarbonetos, água, sólidos sedimentados e metais, tais como zinco, chumbo, cromo, níquel e vanádio (URURAHY et al., 1998; MARIN et al., 2005). A borra oleosa é classificada como resíduo tóxico classe I (perigoso) pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT - NBR 10004) (2004).

Em *landfarmings*, hidrocarbonetos leves, incluindo os constituintes da gasolina, tendem a ser degradados rapidamente (USEPA, 1994; 1998; HEJAZI, et al. 2003). Entretanto, hidrocarbonetos que possuem alto peso molecular, tais como aqueles encontrados em óleos lubrificantes, óleo diesel e querosene, requerem maiores períodos de tempo para que ocorra a degradação (KHAN et al., 2004).

A eficácia do tratamento biológico de resíduos oleosos em *landfarmings* depende de vários fatores, tais como pH, umidade, temperatura, concentração de contaminantes, etc. (USEPA, 1994) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros que afetam a eficácia do sistema de biorremediação *landfarming*

	Eficácia do <i>landfarming</i>
Total de bactérias heterotróficas	> 1000 UFC/grama de solo seco
pH do solo	$6 \leq \text{pH} \leq 8$
Umidade do solo	$40\% \leq \text{capacidade de campo} \leq 85\%$
Temperatura do solo	$10 \text{ }^\circ\text{C} \leq \text{temperatura} \leq 45 \text{ }^\circ\text{C}$
Concentração de TPHs	$10000 \text{ ppm} \leq \text{TPHs} \leq 50000 \text{ ppm}$
Concentração de metais	< 2500 ppm

USEPA (1994)

Ainda, a concentração de nutrientes do solo deve ser levada em consideração, assim como a textura do mesmo (USEPA, 1994). Para obter melhor desempenho no *landfarming*, a toxicidade do solo deve ser avaliada, além do nível de metais presentes no solo (ALMEIDA; CARVALHO, 1994, USEPA, 1994), que não são decompostos (GUARRACHO, 2005).

5.2. Casca de arroz e seu emprego na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo

O sucesso na biodegradação de compostos derivados do petróleo tem relação direta com a quantidade de oxigênio presente no processo, pois sua degradação acontece principalmente por via aeróbia. Desta forma, é importante garantir sua presença dentro do processo, proporcionando a aeração por meios físicos ou adicionando materiais descompactantes que garantam a entrada de ar no sistema (VASUDEVAN; RAJARAM 2001).

Os materiais estruturantes apresentam baixa densidade e quando são incorporados ao solo são responsáveis pela melhoria de algumas características físico-químicas do mesmo. Os materiais adicionados reduzem a densidade do solo, aumentando a sua porosidade e facilitando a difusão de oxigênio por entre as partículas

sólidas. Adicionalmente, pode ocorrer alteração da capacidade de retenção de água no solo (RHYKERD et al., 1999; VASUDEVAN; RAJARAM, 2001).

Os materiais estruturantes empregados como auxiliares nos processos de biorremediação de solos podem ser de origem orgânica ou inorgânica. Dentre os materiais de origem inorgânica pode-se citar a argila calcinada, vermiculita, areia, perlita e cascalho (CHO et al., 1997). Já os de origem orgânica incluem casca de coco, casca de arroz, palha, cavaco de madeira, serragem e farelo de trigo (STRAUBE et al., 2003), que são os mais empregados nos processos de biorremediação de solos contaminados por petróleo, seja em escala laboratorial, seja em escala ampliada (ALEXANDER, 1994; MEYSAMI; BAHERI, 2003; RAIMUNDO et al., 2004).

A casca de arroz é um subproduto resultante do beneficiamento do arroz. O Brasil é um dos 10 maiores produtores mundiais desse grão e anualmente cerca de 2 milhões de toneladas de cascas de arroz são geradas no país (SILVA et al., 2007).

A grande quantidade produzida tem gerado preocupações ambientais, visto que, em muitos países, inclusive no Brasil, a casca de arroz tem sido queimada, prática que tem aumentado a emissão de CO₂ na atmosfera (IRANZO et al., 2004; CAI et al., 2007). Comumente, as cinzas geradas têm sido incorporadas ao solo ou ao cimento na construção civil. Em menor escala, a casca de arroz tem sido utilizada na produção de papel, como fonte de energia e na alimentação de animais (HAUG, 1993; CAI et al., 2007). Atualmente, parte desta casca está sendo utilizada na fabricação de blocos empregados na construção civil, onde substitui a fibra de madeira comumente utilizada. A casca de arroz, devido ao seu alto poder calorífico (aproximadamente 16720 KJ/Kg), também tem sido largamente utilizada na substituição da lenha empregada na geração de calor e vapor, necessários para os processos de secagem e parbolização dos grãos (DELLA et al., 2001).

A casca de arroz é insolúvel em água, rica em matéria orgânica (80%), em carbono orgânico oxidável (34%) e apresenta alta relação C/N (que varia de 50 a 150) (IRANZO et al., 2007). Também, apresenta baixa densidade (0,73 g/mL) e grande quantidade de biopolímeros (32,24% de celulose, 21,44% de lignina e 21,34% de hemicelulose) (GLISSMAN; CONRAD, 2000).

Fungos filamentosos, como basidiomicetos, estão entre os maiores decompositores de biopolímeros. Esses fungos possuem mecanismos não-específicos de degradação, que ocorre no meio extracelular. A maquinaria protéica envolvida nesse mecanismo pode degradar hidrocarbonetos que apresentam baixa disponibilidade no

solo, bem como uma grande variedade de poluentes orgânicos presentes em solos contaminados (POINTIG, 2001).

Devido a essas características, diversas pesquisas têm sido realizadas visando à utilização da casca de arroz como material estruturante para melhorar as taxas de biodegradação de resíduos orgânicos dispostos no solo (IRANZO et al., 2004; HAMDI et al., 2007). Nesse sentido, o potencial de um sistema de biorremediação (biopilhas) em degradar resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo foi estudado por Morais (2005), assim como a possibilidade de otimizar o processo por meio da adição de fertilizantes e de casca de arroz. As biopilhas contendo casca de arroz demonstraram uma degradação mais rápida do resíduo.

5.3. Vinhaça e seu emprego na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo

A vinhaça é um subproduto do processo de fabricação de etanol a partir da destilação do caldo fermentado da cana-de-açúcar. No Brasil, cerca de 170 bilhões de litros de vinhaça são produzidos anualmente (NAKAMAE, 2004). Esse efluente apresenta coloração escura e é constituída basicamente por água (93%) e por sólidos orgânicos e minerais (7%) (RAMALHO, 2001).

Até a década de 70, volumes crescentes de vinhaça eram lançados nos mananciais de superfície, principalmente nos cursos d'água como rios e ribeirões das proximidades das usinas de açúcar e álcool. Entretanto, a vinhaça foi considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas doces, além de afugentar a fauna marinha que vem às costas brasileiras para procriação, por apresentar alto poder poluente, cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, devido sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e elevada temperatura na saída dos destiladores (FREIRE; CORTEZ, 2000). Desse modo, a partir da safra de 78/79 ficou interdito o despejo da vinhaça no meio aquático, incorrendo em multa para a usina que violasse tal proibição (CORAZZA, 1999).

Devido à expansão da produção de álcool no Brasil e o aumento do controle sobre a disposição de vinhaça em mananciais superficiais, surgiram diversas iniciativas para o tratamento e reaproveitamento do efluente, dentre eles, a reciclagem da vinhaça na fermentação, a combustão do efluente, o aproveitamento do mesmo na produção de levedura e a adição de vinhaça no cimento utilizado na construção civil. Nos últimos

anos, a utilização da vinhaça como fertilizante em solos agrícolas, sobretudo na cultura de cana-de-açúcar, tornou-se comum. Essa prática tem substituído total ou parcialmente o uso de fertilizantes químicos, principalmente à base de fósforo (CORAZZA, 1999). Todavia, de acordo com Lyra et al. (2003) não há muitos trabalhos que avaliam o potencial poluidor da vinhaça sobre o solo e o lençol freático.

A adição de vinhaça ao solo promove o aumento da disponibilidade de alguns íons, aumento da capacidade de troca catiônica (CTC), aumento da capacidade de retenção de água, melhoria da estrutura física do solo e aumento da atividade e biomassa microbiana (GLÓRIA; ORLANDO FILHO, 1983), os quais são fatores importantes nos processos de biodegradação. De acordo com Prata et al. (2001), a matéria orgânica da vinhaça constitui numa fonte de carbono solúvel (energia), na forma de glicerol, prontamente disponível aos microrganismos.

Devido às características da vinhaça acima citadas, Prata et al. (2001) avaliaram se a vinhaça seria capaz de contribuir para acelerar a degradação do herbicida ametrina no solo e encontraram respostas positivas nos experimentos de biodegradação realizados.

Uma vez que na biodegradação do petróleo, há necessidade de se introduzir nutrientes no processo, entre eles N e P, além de S, Fe, Mg, Ca e Na, tem-se cogitado a utilização da vinhaça como fonte de nutrientes para microrganismos na biodegradação de resíduos de petróleo presentes no solo. Desse modo, Crivelaro (2005) associou borra oleosa e vinhaça, visando acelerar a biodegradação do resíduo petroquímico. O autor observou um aumento na população microbiana, principalmente de fungos, e um aumento na eficiência de biodegradação. Mais tarde, Pinto-Mariano et al. (2006) utilizaram a vinhaça na biorremediação de solos contaminados com óleo diesel. Por meio do ensaio respirométrico em frascos de Bartha & Pramer (1965), os autores verificaram aumento na população microbiana, porém concluíram que o efluente não foi adequado para aumentar a eficiência de biorremediação dos solos contaminados, uma vez que a vinhaça foi preferencialmente biodegradada nos primeiros 20 dias do experimento, havendo um notável decréscimo na produção de CO₂ dos solos após o consumo do efluente da cana-de-açúcar.

5.4. Teste de anormalidades mitóticas e cromossômicas em *A. cepa*

Durante as últimas três décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica e agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle sobre

os agentes genotóxicos e mutagênicos ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas (DA SILVA; FONSECA, 2003). Este interesse foi intensificado com o constante crescimento da população mundial, com o aumento da industrialização, com a utilização inadequada de recursos naturais e com o acúmulo de dados que sugerem que a mutagenicidade é um prognóstico razoável para a carcinogenicidade (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Segundo Pilot e Dragan (1996) e Mídio e Martins (2000), agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, promovendo lesões. Essa lesão pode ser reparada pelo próprio organismo ou a célula pode ser eliminada. Caso a lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é denominado mutagênico.

A exposição ambiental a agentes genotóxicos e mutagênicos causa preocupação, pois proporciona o aumento da carga mutagênica do organismo, assim, o risco necessita ser avaliado e, se possível, minimizado (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Atualmente, um grande número de testes biológicos está disponível para avaliação do perigo desses agentes. Houk (1992) comentou a importância dos testes genotóxicos e mutagênicos nos estudos de monitoramento ambiental e para a saúde humana. Nesses testes, têm sido utilizados diversos organismos, como microrganismos, plantas, insetos e outros animais. Os testes podem ser divididos em grupos, com base no sistema biológico empregado e na localização genética detectada. Bioensaios em procariotos detectam agentes que induzem mutações gênicas e danos primários no DNA. Incluída nesta categoria está a análise de mutagenicidade em *Salmonella*, ou teste de Ames. Análises em eucariotos detectam uma amplitude maior de danos, incluindo mutações gênicas, danos e reparo do DNA, danos cromossômicos e aneuploidias.

A seleção do ensaio apropriado para um determinado estudo depende das características da amostra a ser testada, da validade do bioindicador (organismo exposto ao poluente), de sua base de dados acumulados, da utilidade do ensaio para amostras ambientais complexas, de seu custo relativo e de sua simplicidade (HOUK, 1992).

Biomarcadores podem ser definidos como respostas biológicas aos poluentes ambientais que podem ser mensurados indicando a presença, os efeitos e, em alguns casos, o grau de contaminação. Uma questão que pode ser respondida por biomarcadores é se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos fisiológicos. Se a resposta for positiva, justifica-se a aplicação de investigações adicionais para determinar a natureza e o grau de contaminação. Por esta razão, a

indução significativa de um biomarcador pode ser considerada como um sinal de alerta à contaminação ambiental (WALKER et al., 1996 *apud* KLEMZ, 2002). Dentre os biomarcadores mais utilizados nos estudos de Mutagênese Ambiental, destacam-se a indução de cometas, micronúcleos e aberrações cromossômicas.

O teste de aberrações cromossômicas (AC) é considerado rápido e eficaz na análise de diversos parâmetros tais como alterações cromossômicas e cromatídicas, trocas entre cromátides-irmãs e micronúcleos (MIGID et al., 2007). Além disso, o teste de AC permite o entendimento dos mecanismos de ação dos químicos testados ou amostras ambientais avaliadas (FISKESJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1997).

Aberrações cromossômicas podem ser definidas como mudanças cromossômicas, estruturais ou numéricas, que ocorrem espontaneamente ou como resultado da exposição a agentes físicos, químicos ou biológicos (RUSSEL, 2002). As AC estruturais podem ser induzidas por quebra direta do DNA, por erros na replicação do DNA, pela inibição de sua síntese ou ainda por outros mecanismos. Essas aberrações podem envolver ambas as cromátides de um ou vários cromossomos ou somente uma das duas cromátides de um cromossomo ou de vários cromossomos (ALBERTINI et al., 2000). Fragmentos cromossômicos observados em vários estágios no ciclo celular são resultado da ação direta de agentes clastogênicos sobre o material genético (TÜRKOĞLU, 2006).

Aberrações cromossômicas numéricas são decorrentes de alterações no número normal de cromossomos da célula. Distinguem-se dois tipos de aberrações cromossômicas numéricas: aneuploidia e poliploidia. Aneuploidia corresponde a uma mudança no número cromossômico, resultando em ganho ou perda cromossômica durante a divisão celular. Poliploidia é definida como um aumento no número cromossômico por um múltiplo exato do número cromossômico haplóide (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

Segundo Kirsch-Volders et al. (2002), os dois principais processos que levam à aneuploidia são:

- Não-disjunção: ocorre quando uma segregação aberrante produz células-filhas, nas quais uma ganha um cromossomo e a outra perde um cromossomo;
- Perda cromossômica: problemas no fuso mitótico fazem com que um ou mais cromossomos não se liguem à fibra do fuso no decorrer da anáfase. Tais cromossomos permanecem, portanto, na placa metafásica.

Em adição a esses dois mecanismos (não-disjunção e perda cromossômica), outros mecanismos podem levar à aneuploidia: não-conjunção (quando cromossomos homólogos falham em estabelecer um estado pareado), falha na divisão do centrômero (erro na separação das cromátides irmãs na primeira divisão meiótica) e replicação extra de cromossomos (erros na replicação cromossômica durante a meiose, em que cópias extras do cromossomo são geradas) (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

Poliploidia pode ser induzida pela ausência do fuso mitótico funcional, que leva à falha da migração das cromátides para os pólos. Re-replicação do DNA na ausência do fuso leva à endoreduplicação, em que os cromossomos mitóticos apresentam duas cromátides duplicadas ao invés de duas cromátides únicas. Nesse processo, mais que um ciclo de síntese de DNA acontece sem que a células se dividam. O tipo menos freqüente de poliploidia é a endomitose, observada espontaneamente em ratos, no qual os cromossomos sofrem uma condensação e um ciclo de divisão como na mitose, entretanto, esse processo ocorre dentro da membrana nuclear, sem a formação do fuso ou dos movimentos da anáfase e da telófase. Outros mecanismos de poliploidia são a falha na citocinese ou fusão nuclear em células binucleadas (KIRSCH-VOLDERS et al., 1998).

Segundo Kirsch-Volders et al. (2002) as aberrações cromossômicas numéricas podem ser originadas espontaneamente, em células somáticas ou germinativas, ou como resultado de um tratamento aneugênico. Possíveis alvos de agentes aneugênicos são moléculas:

- envolvidas na ligação e separação de cromátides (por exemplo, proteínas relacionadas com a condensação cromossômica, *crossing-over*, cinetócoros);
- envolvidas no controle do ciclo celular (ciclina, cdk's, p53, fator promotor de anáfase);
- que fazem parte da estrutura do DNA (proteínas centroméricas e teloméricas);
- que fazem parte do aparato mitótico (tubulinas, proteínas dos centríolos);
- que estão indiretamente envolvidas no ciclo celular (calmodulina, proteínas das membranas celulares e nucleares).

Juntamente com as AC estruturais e numéricas já citadas, outras anormalidades do ciclo mitótico também podem ser consideradas no teste de AC, tais como aderências, pontes cromossômicas, anáfases multipolares e C-metáfases.

Aderências cromossômicas indicam o potencial tóxico do agente testado para a célula. Geralmente, essa anormalidade é irreversível e leva à morte celular (FISKESJÖ, 1985; TÜRKÖĞLU, 2006). Adicionalmente, aderências cromossômicas podem originar pontes cromossômicas e, conseqüentemente, quebras cromossômicas (MARCANO et al., 2004).

Pontes cromossômicas podem ser formadas como resultado de quebras cromossômicas, devido à característica pegajosa que os cromossomos adquirem quando perdem porções teloméricas de suas estruturas (RANK, 2003). Pontes cromossômicas podem também ser induzidas a partir de aderência e incompleta separação de cromossomos no decorrer da anáfase, como resultado de ligações cruzadas entre cromossomos e proteínas (KONG; Ma, 1999). Matsumoto et al. (2006) reportou a presença de pontes formadas por aderência e inferiu que tal anormalidade levou a rearranjos em que os cromossomos apresentaram quebras cromatídicas. A indução significativa de pontes indica que o agente avaliado possui ação clastogênica (RANK, 2003), uma vez que proporcionará a indução de quebras, no decorrer da divisão celular (MARCANO et al., 2004).

Segundo Rank e Nielsen (1998), anáfases multipolares são decorrentes do mau funcionamento do fuso mitótico, que distribui os cromossomos de forma irregular, encaminhando-os para mais de dois pólos nas células. Fernandes et al. (2007) inferiram que a formação de núcleos lobulados em *Allium cepa*, era decorrente de anáfases multipolares portadoras de pontes cromossômicas. De acordo com os autores, o envoltório nuclear acompanharia a distribuição irregular do material genético na célula e daria origem a núcleos disformes. Leme et al. (2008), inferiram que a presença de núcleos lobulados levaria à morte celular, uma vez que tal anormalidade foi observada em células meristemáticas de *A. cepa*, mas não em células F1. Anáfases multipolares podem também originar células multinucleadas (MIGID et al., 2007).

Células portadoras de C-metáfases apresentam os cromossomos condensados aleatoriamente distribuídos e ausência de fuso mitótico (KIRSCH-VOLDERS et al, 2002). Os fusos são inativados quando nenhuma placa equatorial é organizada, o que pode acarretar em um impedimento da divisão dos centrômeros. A indução significativa de C-metáfases evidencia a ação aneugênica de uma substância, uma vez que proporciona a completa inativação do fuso mitótico das células (FISKESJÖ, 1985). Essa anormalidade mitótica, que foi originalmente observada após tratamento com altas

doses de colchicina, pode levar à formação de núcleos poliplóides, embora o resultado mais frequente seja a formação de micronúcleos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

Micronúcleos e brotos nucleares podem ser contabilizados concomitantemente às AC. Micronúcleos são resultantes de quebras cromossômicas e de distúrbios no processo mitótico, devido ao mau funcionamento do fuso. Apresentam estrutura similar ao núcleo principal, tendo o seu DNA recoberto pelo envoltório nuclear (WALKER et al., 1996; FRIEAUFF et al., 1998; RIBEIRO, 2003).

Crott et al. (2001), estudando cultura de linfócitos humanos com deficiência de ácido fólico, validaram o uso de brotos nucleares como biomarcadores de dano genético. O broto nuclear é uma estrutura semelhante ao micronúcleo, mas que permanece ligado ao núcleo principal. De acordo com Shimizu et al. (1998), os brotos nucleares corresponderiam a DNA amplificado que estaria sendo eliminado do núcleo por um processo ativo, durante a fase S do ciclo celular. Segundo Serrano-Garcia e Montero-Montoya (2001), brotos nucleares seriam originados durante a divisão celular. Cromossomos perdidos seriam envolvidos pelo envelope nuclear, formando uma estrutura atípica. Para Gisselsson et al. (2001), o material nucleoplasmático dos brotos nucleares resultariam de pontes anafásicas que sofreram ruptura. Em *A. cepa*, Fernandes et al. (2007) estudaram um agente aneugênico e propuseram que os brotos nucleares observados eram decorrentes de material genético poliploidizado.

Recentemente, Lindberg et al. (2007) combinaram diferentes teorias para explicar a origem de brotos nucleares. Por meio da aplicação de sondas centroméricas e teloméricas em cultura de linfócitos humanos, os autores verificaram que os brotos nucleares são predominantemente formados por fragmentos cromossômicos acêntricos, intersticiais ou terminais, mas também, em menor proporção, por cromossomos inteiros. Assim, propuseram que cromossomos, fragmentos cromossômicos oriundos de pontes anafásicas, assim como material genético amplificado na fase S do ciclo celular seriam separados no citoplasma durante a mitose e encapsulados pelo envoltório nuclear ao final da telófase formando micronúcleos, ou encapsulados posteriormente pela lamina B durante a reconstituição do envelope nuclear, formando um broto nuclear.

O material genético contido em brotos nucleares pode ser eliminado, dando origem a células micronucleadas. Entretanto, a maneira pela qual esse processo ocorre ainda não está totalmente esclarecida (FENECH; CROTT, 2002; LINDBERG et al., 2007).

Os vegetais superiores apresentam características que os tornam excelentes modelos genéticos para avaliação de poluentes ambientais, sendo utilizados com muita frequência em estudos de monitoramento. Contudo, este destaque não se deve, apenas, à sensibilidade de detecção de mutágenos em diferentes ambientes, mas também pela possibilidade de avaliação de diversos biomarcadores genéticos, os quais abrangem desde mutações pontuais até as aberrações cromossômicas em células de diferentes órgãos como folhas, pólen e endospermas (GRANT, 1994).

A espécie *A. cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e genotoxicidade, devido às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (FISKEJÖ, 1985; QUINZANI-JORDÃO, 1987).

O primeiro autor a utilizar *A. cepa* como sistema-teste foi Levan (1938). Desde então, adaptações na metodologia do teste têm sido realizadas a fim de possibilitar uma avaliação mais abrangente de químicos, sendo eles misturas complexas, como é o caso de grande parte das amostras ambientais, ou substâncias puras (FISKESJÖ, 1985; RANK et al., 1993; MA et al., 1995; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

As primeiras adaptações do teste de *A. cepa* foram realizadas por FISKESJÖ (1985) para torná-lo modelo-teste de estudos de monitoramento ambiental. Desse modo, o autor propôs modificações que possibilitaram desde a avaliação de compostos solúveis em água até a avaliação de efeitos de misturas complexas. Mais tarde, Rank e Nielsen (1993) propuseram novas modificações no teste, tornando-o ainda mais eficiente para a análise de misturas complexas.

Segundo Rank e Nielsen (1997), o teste de aberrações cromossômicas em *A. cepa* não é apenas válido para a detecção do potencial genotóxico, mas também para a investigação dos mecanismos de ação dos agentes testados, sejam estes, substâncias puras ou misturas complexas. Assim, de acordo com o tipo e frequência de aberrações e anormalidades mitóticas encontradas é possível determinar se o agente em estudo é clastogênico ou aneugênico.

Atualmente, novos testes de mutagenicidade utilizando microorganismos, linhagens celulares de mamíferos e outros sistemas biológicos têm sido desenvolvidos, mas os testes com vegetais ainda são utilizados, rotineiramente, em muitos laboratórios

em todo mundo, como indicadores de potencial genotóxico e mutagênico de diversos agentes.

5.5. Morfologia do intestino médio e do corpo gorduroso perivisceral de *Rhinocricus padbergi* e seu emprego na avaliação de solos contaminados

Diplópodos são invertebrados terrestres de hábito noturno, que habitam ambientes úmidos, sendo encontrados sob troncos e folhas caídas no solo. Segundo Kime e Golovatch (2000), estão presentes em todas as regiões zoogeográficas, sendo mais comuns nas faixas tropicais. Alimentam-se de matéria orgânica em decomposição e colonizam diferentes extratos no solo, promovendo a aeração do mesmo. Ao revolverem o solo, esses animais consomem terra e assimilam matéria orgânica; depois, devolvem ao solo excretas nitrogenadas. O solo é humificado no trato gastrointestinal do animal, que contém uma grande quantidade de fungos e bactérias. Dessa forma, os excrementos dos diplópodos acabam ficando com mais húmus do que a terra ingerida (BANO et al., 1976; HOPKIN; READ, 1992).

O trato digestório de diplópodos é descrito como um tubo reto e cilíndrico que se estende da boca até o ânus, não acompanhando a segmentação corporal. É dividido em três regiões: anterior, média e posterior. Os intestinos anterior e posterior têm origem ectodérmica e suas células secretam uma cutícula, semelhante àquela que recobre a superfície externa corpórea. Esta cutícula, conhecida como íntima cuticular, não aparece no intestino médio onde ocorre a digestão. Entre o intestino médio e o posterior está a válvula pilórica. As estruturas anexas do trato digestório de dipópodos constituem: (1) um par de glândulas salivares recobrando as laterais do intestino anterior e (2) um par de túbulos de Malpighi inserido na válvula pilórica, no local de transição entre os intestinos médio e posterior (HOPKIN; READ, 1992; FANTAZZINI et al., 1998; 2002).

Em *Rhinocricus padbergi*, o intestino médio representa cerca de 39% do comprimento total de seu trato digestório, sendo constituído por um epitélio pseudoestratificado. As células principais, que apresentam bordo em escova bem desenvolvido, parecem estar envolvidas com o mecanismo de absorção de nutrientes da alimentação e também no transporte de elementos a partir da hemolinfa. As células regenerativas ocupam a região basal do epitélio. Células secretoras, cuja secreção auxilia na absorção e/ou na lubrificação da superfície epitelial, podem ser observadas

inseridas entre as células principais (FANTAZZINI et al., 2002; CAMARGO-MATHIAS et al., 2004).

Testes histoquímicos realizados no intestino médio de *R. padbergi* revelaram uma forte presença de proteínas no epitélio, na camada de corpo gorduroso, nas células hepáticas e nas secreções. Essas secreções possivelmente, também estão envolvidas na liberação de enzimas digestivas no lúmen. Os polissacarídeos neutros estão presentes apenas nas células secretoras. Os polissacarídeos ácidos foram observados nos microvilos, devido à presença de substância amorfa formada de glicosaminoglicanas. As células principais apresentaram grande quantidade de lipídios na porção média superior. Foi encontrado cálcio na porção apical das células principais do epitélio, nos microvilos, sugerindo que este epitélio possa atuar no transporte deste elemento. Esse elemento também foi encontrado na camada de corpo gorduroso (FANTAZZINI et al., 2002).

O corpo gorduroso é um órgão difuso que preenche a cavidade corpórea dos diplópodos. Apresenta como função primária o armazenamento de lipídios, glicogênio, proteínas e ácido úrico. Outra função do corpo gorduroso é estocar resíduos que serão posteriormente excretados (HOPKIN; READ, 1992).

Em diplópodos diferenciamos duas porções de corpo gorduroso: o parietal e o perivisceral. O corpo gorduroso parietal encontra-se firmemente aderido ao tegumento do animal, enquanto que o corpo gorduroso perivisceral envolve vários órgãos, como o trato digestório e as gônadas (FONTANETTI et al., 2004).

Os principais tipos celulares que constituem o corpo gorduroso de diplópodos são adipócitos e enócitos (CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 2000). Os adipócitos são células grandes dispostas em fileiras. Apresentam núcleo esférico e citoplasma com grande quantidade de esferas organizadas em camadas concêntricas. Estudos ultra-estruturais revelaram que estas estruturas assemelham-se a esferocristais, que apresentam como função o acúmulo de metais em excesso, para a manutenção da homeostase do organismo (FONTANETTI et al., 2006). Os enócitos são células menores, associadas aos adipócitos, com citoplasma repleto de grânulos (FONTANETTI et al., 2004). Em *R. padbergi*, os enócitos parecem estar envolvidos mais na síntese e armazenamento de proteínas e do que de lipídios (CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 2000).

Análises ultra-estruturais e histológicas são métodos de diagnose bastante utilizados em humanos e outros vertebrados, para o estudo de determinadas patologias.

Baseado nesse parâmetro passou-se a fazer uso destas técnicas em invertebrados, com a finalidade de identificar os danos celulares e tissulares decorrentes de contaminação ambiental (TRIEBSKORN; KÜNAST, 1990; TRIEBSKORN et al., 1991; 1999).

Em invertebrados terrestres, órgãos relacionados com a absorção e assimilação de nutrientes essenciais tais como lipídios, carboidratos e proteínas têm sido preferencialmente utilizados na avaliação de alterações tissulares e celulares decorrentes de contaminação ambiental (HOPKIN, 1989; PIGINO, 2005). Em diplópodos, o intestino médio tem sido o órgão alvo, pois funciona como uma barreira, impedindo que compostos tóxicos ou não essenciais, alcancem o restante do corpo. Possui, portanto, importante papel nos processos de destoxificação e excreção de xenobióticos. Todavia, ao ingerirem solo ou alimentos altamente contaminados, compostos indesejáveis podem entrar ativamente nas células epiteliais, promovendo alterações (HOPKIN et al., 1985; TRIEBSKORN et al., 1991; KÖHLER; ALBERTI, 1992; KÖHLER et al., 1995; KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998; GODOY; FONTANETTI, 2009; NOGAROL; FONTANETTI, 2010).

Recentemente, alterações morfológicas no corpo gorduroso parietal e perivisceral foram utilizadas por Souza (2009) para avaliar os efeitos da exposição de exemplares de *R. padbergi* a lodo de esgoto. O autor concluiu que apenas o corpo gorduroso perivisceral pode ser utilizado como órgão alvo em estudos ecotoxicológicos, visto que o corpo gorduroso parietal não apresentou alterações morfológicas após a exposição dos animais.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Área de estudo – *Landfarming* da Refinaria de Petróleo do Planalto (REPLAN/ PETROBRÁS)

A construção do *landfarming* da REPLAN foi autorizada em 11/10/1985 pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) (Carta CETESB 713/85/GURCA). Desse modo, o *landfarming* entrou em operação em novembro de 1988. Segundo o Parecer Técnico da Coordenadoria de Licenciamento Ambiental e de Proteção de Recursos Naturais CPRN/DAIA 387/2006 – Anexo 6, o *landfarming* da REPLAN era composto por um conjunto de oito células. Cada célula possuía uma área de 5.000 m² com capacidade para tratar cerca de 100 m³ de borra oleosa por mês (área total = 40.000 m² e capacidade total para tratamento de 800 m³ de borra oleosa por mês). O fundo de cada célula possuía uma camada de argila compactada e o líquido percolado era enviado para a ETDI (Estação de Tratamento de Despejos Industriais) (Figura 1).

Em 2004, órgãos ambientais exigiram a desativação do *landfarming* da refinaria de petróleo.

Em novembro de 2006, quando a REPLAN apresentou um plano de modernização da refinaria, “Otimização da Produção da Refinaria de Paulínia-REPLAN”, o Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA), em sua 229ª Reunião Plenária Ordinária, e a CETESB, deliberaram favoravelmente sobre a viabilidade ambiental do empreendimento, com base no Parecer Técnico CPRN/DAIA 387/2006 sobre o respectivo EIA/RIMA (Proc. SMA 13.550/2004), mas obrigaram a refinaria a cumprir exigências, recomendações, medidas mitigadoras e de compensação,

dentre elas, a redução do prazo de desativação do *landfarming* em seis meses. Após 19 anos de atividade, o *landfarming* foi desativado em 29/06/2007.

Segundo Renato de Almeida Gonçalves, responsável técnico de operação da REPLAN junto à área de Meio Ambiente, atualmente, o resíduo oleoso da refinaria está sendo enviado para co-processamento em fornos de fábrica de cimento (Holcim) (comunicação pessoal).

Amostras de solo de *landfarming* da REPLAN foram coletadas em diferentes células, em 2005, 2007 e 2008, conforme a Norma Técnica 10.007 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (2004). Após a coleta, o *landfarming* foi transportado para o Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, onde foi mantido a 4°C, até o início dos experimentos.

A caracterização físico-química do *landfarming* foi realizada em relação a: pH, quantidade de matéria orgânica, concentração de nutrientes (K, Ca, Mg, Al, S, Na, Fe, Mn, Cu e Zn) e metais (Ba, Cd, Cr, Ni e Pb), no Instituto Campineiro de Análises do Solo LTDA (ICASA), Campinas, estado de São Paulo, Brasil.

As análises dos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs) e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram realizadas segundo os métodos USEPA – SW 846 - 015B e USEPA 8100, respectivamente, pelo Laboratório São Lucas – Análises Ambientais, Rio Claro, São Paulo, Brasil e pela empresa *Analytical Technology*, São Paulo, Brasil.



Figura 1. *Landfarming* da REPLAN (Fonte: Morais, 2005)

6.2. Solos controle

No presente trabalho, dois solos foram utilizados como solo controle:

1) Solo proveniente da Estação Ecológica de Itirapina, São Paulo, pertencente ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo. Amostras desse solo foram coletadas em 2005 e 2007, conforme a Norma Técnica 6.457 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (1986). A área da reserva é de cerca de 2.300 hectares de vegetação natural bastante preservada.

A caracterização físico-química desse solo foi realizada em relação a: pH, quantidade de matéria orgânica, concentração de nutrientes (K, Ca, Mg, Al, S, Na, Fe, Mn, Cu e Zn) e metais (Ba, Cd, Cr, Ni e Pb) Instituto Campineiro de Análises do Solo LTDA (ICASA), Campinas, Estado de São Paulo, Brasil.

A análise de TPHs foi realizada pelo ASL Análises Ambientais, Rio Claro, Estado de São Paulo, Brasil e pela empresa *Analytical Technology*, São Paulo, Brasil, de acordo com USEPA – SW 846 método 8015B (USEPA, 1996).

2) Solo oriundo da Universidade Estadual Paulista, UNESP, campus de Rio Claro, São Paulo. Amostras desse solo foram coletadas em 2008, conforme a Norma Técnica 6.457 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (1986).

As concentrações de Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn, presentes nesse solo, foram determinada de acordo com o método USEPA 6010B. A análise dos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs) e dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HPAs) foi realizada segundo os métodos USEPA – SW 846 - 015B e USEPA 8100, respectivamente. Todas as análises foram realizadas pelo Laboratório São Lucas – Análises Ambientais, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

Os solos foram mantidos a 4°C no Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, até o início dos experimentos biológicos.

6.3. Vinhaça

A vinhaça foi coletada na Usina Santa Lucia, localizada na cidade de Araras, São Paulo, de acordo com a Norma Técnica P4.231 da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) (2006). O efluente foi mantido a 4°C no Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, até o início dos experimentos.

A vinhaça foi caracterizada quanto ao pH, P total, N, concentração de nutrientes (K, Ca, Al, S, Na, Fe, Mn, Cu, Zn e B) e concentração de metais (Ba, Cd, Cr, Ni e Pb)

em espectrômetro de emissão por plasma (ICP). Essas análises foram realizadas no Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo LTDA (ICASA), Campinas, São Paulo, Brasil.

6.4. Biorremediação

6.4.1. Adição de casca de arroz à amostra de solo de *landfarming*

Após as coletas, a umidade do *landfarming* e do solo controle foi ajustada para 70% da capacidade de campo. Então, três tratamentos foram gerados:

- SC: 50 g de solo controle;
- L: 50 g de *landfarming*;
- LCA: 50 g de *landfarming* e 10 g de casca de arroz.

6.4.1.2. Ensaio respirométrico em frascos de Bartha & Pramer

Os tratamentos gerados foram submetidos ao ensaio respirométrico em frascos de Bartha & Pramer (BARTHA; PRAMER, 1965), de acordo com a norma técnica NBR- 14283 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (1999). Os níveis de CO₂ foram monitorados por 108 dias e quantificados. Para cada condição experimental, os frascos de Bartha foram preparados em triplicatas (3x50g de solo) e incubados a 27°C no escuro. O CO₂ produzido foi coletado numa solução de 10 mL de KOH (0.2N). Essa solução foi periodicamente retirada com uma seringa, e a quantidade de CO₂ absorvido foi então mensurada titulando-se o KOH residual (depois da adição de uma solução de BaCl (1 mL; 1N), utilizado para precipitar os íons carbonato) com uma solução padrão de HCl (0.1N). Durante esse procedimento, os frascos de Bartha foram aerados durante 1.5 min por meio de um ascarito.

$$\text{CO}_2 \text{ liberado (mmol)} = (\text{VB} - \text{VA}) \times 50 \times f_{\text{HCl}};$$

VB é o volume (mL) de HCl 0.1N utilizado para titular o frasco de Bartha controle. VA é o volume (mL) de HCl 0.1N utilizado para titular o *landfarming* e o *landfarming* tratado com casca de arroz. f_{HCl} é o fator de correção de normalidade do HCl.

A quantidade de CO₂ liberado foi representada como média \pm desvio-padrão. O teste ANOVA ($p < 0.05$) foi utilizado para determinar as diferenças entre os tratamentos.

6.4.2. Adição de casca de arroz, vinhaça e casca de arroz associado com vinhaça à amostras de solo de *landfarming*

Os solos foram secos e peneirados em peneira com gramatura de 1.62 mm. Baldes, com capacidade para 20 L, foram preenchidos com 10 L de solo (controle ou *landfarming*), alcançando uma coluna de solo de 30 cm. Cada experimento foi montado em triplicada. A umidade dos solos foi ajustada para 70% da capacidade de campo. Desse modo, água ou vinhaça foram adicionadas aos baldes, de acordo com o tratamento. A umidade dos tratamentos foi reajustada a cada dois dias, pois tratava-se de um sistema aberto, sujeito a perdas por evaporação. Nos tratamentos em que a casca de arroz foi utilizada, foram adicionados 5% desse material, em relação ao volume total de solo contido nos baldes. Assim, os seguintes tratamentos foram gerados:

- SC: solo controle;
- L: *landfarming*;
- LCA: *landfarming* e casca de arroz;
- LV: *landfarming* e vinhaça;
- LCAV: *landfarming*, casca de arroz e vinhaça.

Durante o experimento, que teve duração de 33 dias, a temperatura oscilou de 26 °C a 36 °C.

6.5. Teste de anormalidades mitóticas e cromossômicas em *Allium cepa*

Antes e após os experimentos de biorremediação, extratos aquosos dos solos foram preparados de acordo com Cotelle et al. (1999). Cerca de 50 g de solo, de cada uma das réplicas, foi adicionada a 300 mL de água ultrapura. As misturas foram agitadas por 24 horas e permaneceram em repouso em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por mais 24 horas. Após a decantação dos solos, os sobrenadantes foram imediatamente utilizados para a germinação de sementes de *A. cepa*.

As sementes foram germinadas em placas de Petri, com papel filtro embebido nos extratos aquosos. Adicionalmente, as sementes foram germinadas diretamente nas amostras de solo (contato direto). Três placas de Petri foram utilizadas por tratamento.

O controle positivo foi realizado com o herbicida trifluralina (0.84 ppm), conhecido por ser um potente indutor de anormalidades mitóticas e cromossômicas em *A. cepa* (FERNANDES et al., 2007).

Os experimentos foram realizados em 2 etapas:

1) Experimento contínuo: Após cinco dias, quando as radículas de *A. cepa* atingiram cerca de 1 a 2 cm, aproximadamente metade dos exemplares foram coletados e fixados em Carnoy I (metanol + ácido acético na proporção 3:1).

2) Experimento de recuperação: As radículas restantes foram transferidas para outra placa de Petri, contendo água ultrapura, para o experimento de recuperação de 48 horas.

Desse modo, os seguintes experimentos foram conduzidos:

- Experimento contínuo, com raízes de *A. cepa* germinadas nos extratos aquosos;
- Experimento contínuo, com raízes de *A. cepa* germinadas diretamente no solo;
- Experimento de recuperação, com raízes de *A. cepa* germinadas nos extratos aquosos;
- Experimento de recuperação, com raízes de *A. cepa* germinadas diretamente nas amostras de solo.

Depois de fixadas, as radículas foram hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 10 minutos e, posteriormente, submetidas ao reativo de Schiff por 2 horas, no escuro escuro. As pontas das raízes foram seccionadas em lâmina, recobertas por lamínula e maceradas. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em Permount. O material foi analisado em microscópio de luz com aumento de 400 x. Por tratamento, 7500 células foram contadas (500 células em cada uma das 15 lâminas).

Foi realizada a contagem de anáfases multipolares, C-metáfases, células poliplóides, aderências, perdas, quebras e pontes cromossômicas. Adicionalmente, micronúcleos (MN) e brotos nucleares (BN) foram quantificados. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

6.6. Bioensaio com *Rhinocricus padbergi*

Exemplares adultos de *R. padbergi* foram coletados no campus da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil. Após a coleta, os espécimens foram aclimatados em laboratório por 2 semanas, em terrário contendo substrato de terra, tubérculos e troncos de árvores em processo de decomposição, provenientes das mesmas áreas de captura.

Após o período de aclimação, quatro terrários (20 cm de largura x 25 cm de comprimento x 45 cm de altura) foram preenchidos com diferentes concentrações de solo de *landfarming*, como segue:

- *Landfarming* 100%: 5 Kg de *landfarming*;
- *Landfarming* 70%: 1.5 Kg de solo controle + 3.5 Kg de *landfarming*;
- *Landfarming* 50%: 2.5 Kg de solo controle + 2.5 Kg de *landfarming*;
- *Landfarming* 30%: 3.5 Kg de solo controle + 1.5 Kg de *landfarming*.

Um quinto aquário foi preenchido com 5 Kg de solo controle. Vinte diplópodos foram colocados em cada terrário.

Os animais foram monitorados por 90 dias. Diariamente, os diplópodos mortos eram retirados dos terrários e contabilizados para posterior análise.

A temperatura da sala foi controlada, 21 ± 2 °C, assim como o fotoperíodo, 12 horas claro/12 horas escuro.

Após 7 e 21 dias de exposição, três diplópodos por bioensaio foram anestesiados com éter etílico ou clorofórmio e dissecados com auxílio de estereomicroscópio em placas de Petri contendo solução fisiológica. O intestino médio e o corpo gorduroso perivisceral foram removidos e, posteriormente, fixados para a realização das técnicas de histologia e de histoquímica.

6.6.1. Histologia

6.6.1.1. Inclusão em resina (Historesina)

O intestino médio e o corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e NaCl a 0.9% em tampão fosfato 10% (0.1M - pH 7.5) durante 24 horas. A seguir, os materiais foram desidratados em soluções crescentes de etanol a 70, 80, 90 e 95% durante 15 minutos cada banho e transferidos para solução de Resina (JB-4 Polaron Instruments/Bio Rad) na ausência de catalisador. Posteriormente, as amostras foram transferidas para moldes plásticos previamente preenchidos com resina contendo catalisador. Depois de polimerizados os blocos foram seccionados com o auxílio de Micrótomo Sorvall JB-4/Bio Rad. Os cortes de 4 µm de espessura foram hidratados e recolhidos em lâminas de vidro. Depois de secas, as lâminas foram submetidas à coloração pela Hematoxilina e Eosina durante 10 e 5

minutos, respectivamente. Em seguida foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá ou Permount.

6.6.2. Histoquímica

As técnicas histoquímicas foram realizadas em secções histológicas, sendo que, o material, após ser dissecado, foi submetido a diferentes fixadores específicos para preservação de proteínas, polissacarídeos, cálcio e lipídios.

6.6.2.1 Técnica do azul de bromofenol para detecção de proteínas totais (PEARSE, 1985)

O material foi retirado e fixado em paraformaldeído a 4% e NaCl a 0.9% em tampão fosfato 10% (0,1M - pH 7.5) por aproximadamente 24 horas. Os cortes foram recolhidos em lâminas de vidro e corados com solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente durante 1 hora, sendo em seguida lavados em solução aquosa de ácido acético 0.5%, durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram secos, diafanizados em xilol e as lâminas montadas em bálsamo do Canadá ou Permount.

6.6.2.2. Técnica do PAS para detecção de polissacarídeos neutros (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

O intestino médio e o corpo gorduroso perivisceral foram retirados e fixados em Carnoy (álcool absoluto, clorofórmio e ácido acético) por 24 horas. As lâminas contendo as secções foram lavadas ácido periódico 0.4% por 10 minutos e depois em água destilada durante 5 minutos. Posteriormente, foram submetidas ao reativo de Schiff, no escuro, por 1 hora, lavadas em água corrente por 30 minutos. Posteriormente, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá

6.6.2.3. Método de von Kossa para detecção de cálcio (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

O intestino médio e o corpo gorduroso perivisceral foram fixados em paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas. As secções foram imersas em nitrato de prata por 20 minutos, lavadas em água corrente e transferidas para revelador D-72 por 2 horas, imersas em tiosulfato de sódio 5 % ou fixador F-5 por 30 minutos, lavadas em água destilada e contracoradas com vermelho neutro a 1% por 1 minuto.

Depois de lavadas em água corrente, as lâminas foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá

6.6.2.4. Técnica do sudan black B para detecção de lipídios totais (PEARSE, 1985)

O material foi retirado e fixado em formol cálcio 10%. Depois de seccionado foi passado rapidamente em álcool 30%, corado com sudan black B durante 20 minutos, passado novamente no álcool 70% durante 2 minutos e, em seguida, lavado em água destilada durante 5 minutos para retirar o excesso da solução corante. Posteriormente, as secções foram submetidas à coloração pelo vermelho neutro 1% por 2 minutos, para contrastação do núcleo. Em seguida, as lâminas contendo as secções foram lavadas em água corrente, secas e montadas em glicerina gélica.

7. RESULTADOS

Os resultados obtidos foram apresentados na forma de artigos científicos, visando a submissão dos mesmos em periódicos especializadas. Os artigos já publicados seguem a formatação estipulada pelas revistas a que foram submetidos.

7.1. Ecotoxicological assays applied in soils contaminated by petroleum hydrocarbons

Esse artigo foi aceito como capítulo do livro **“Oil Shale: Extraction, Applications and Economics”**. Nova Science Publishers, Inc, New York, USA.

Ecotoxicological assays applied in soils contaminated by petroleum hydrocarbons

Tatiana da Silva Souza, Cintya Aparecida Christofolletti, Carmem Silvia Fontanetti, C.S.

Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP),
Rio Claro, Brazil.

Correspondence to: Carmem Silvia Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Av. 24A, nº 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil

Phone: (55) 19 3526-4156, FAX: (55) 19 3526-4136

e-mail: fontanet@rc.unesp.br

Abstract

Soil is the final destination of several types of residues of anthropic origin, discharged intentionally or accidentally. The environmental impacts resulted from the petroleum industry in the terrestrial ecosystem are a growing problem. Hydrocarbons of low molecular weight, small aliphatics and BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene) present considerable hydrosolubility. BTEX have great mobility in the soil and can reach easily the water table. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are formed as by-products or incomplete combustion of organic matter. Several PAHs present genotoxic and carcinogenic properties. In the soil, these compounds and the metabolites resulted from their degradation can affect directly the terrestrial biota and indirectly the aquatic ecosystem by percolation; besides presenting potential to affect negatively the human health. Thus, biological assays (bioassays), which consist in the assessment of the exposure effects of live organisms in contaminated soil, have been required. Bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons is an indispensable alternative for the recovery of the quality of the terrestrial ecosystem, through the removal or reduction, complete or partial, of the concentration of these compounds. In this process, microorganisms use the organic compounds present as substrate for the growth and energy generation and convert them into CO₂, H₂O and biomass. However, it has been documented that the reduction in the concentration of hydrocarbons is not always followed by decrease in the toxicity of the soil; incomplete degradation and the formation of intermediary metabolites may lead to an increase of the toxicity. Due to the complexity of the bioremediation of soils contaminated with petroleum residues, bioassays are indispensable in the evaluation of the success of this process. In this context, it is here presented a review of the principal ecotoxicological assays with microorganisms, plants and invertebrates used in the monitoring of soils contaminated with petroleum hydrocarbons and/or bioremediated. In a complementation to conventional chemical tests, biological assays can be used with success to identify soils contaminated with petroleum residues, assess the efficacy of a bioremediation technology and, finally, monitor sites already restored.

Keys-words: Soil ecotoxicology, genotoxicity, bioassays, oil, bioremediation.

1. Introduction

Soil is the final destination of several types of residues of anthropic origin, discharged in this environment intentionally or accidentally. Soil contamination is a growing problem that presents consequences not only for the terrestrial communities but also to the aquatic species, due to the lateral and vertical transference of contaminants (Békaert et al., 1999).

The dominant classes of hydrocarbons present in petroleum and in the refined products are alkanes, alkenes, iso-alkanes, cycloalkanes, monoaromatic, polyaromatic and heterocyclic compounds (Balba et al., 1998; Salanitro, 2000).

Petroleum hydrocarbons contaminate the surface and sub-surface of the soil by accidental spills of crude oil through leaks in oil pipes. In such accidents, the hydrocarbons most soluble in water, mainly the monoaromatic, benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX), may leach and reach the groundwater. However, most part of the oil remains in the soil matrix. Accidents at gas stations constitute another source of contamination of the terrestrial environment and of the freatic water table (Salanitro, 2000). Soils are also contaminated by the inadequate discharge of domestic and industrial solid residues, vehicular emissions and atmospheric emissions that reach the terrestrial environment via precipitation (Trapido, 1999).

Bioremediation technologies are attractive. However, inadequate information about the toxicity of the residue to be treated, the lack of knowledge of their behaviour after disposition in the soil, as well as inadequate planning and management of the bioremediation, have also contributed seriously to the contamination of the terrestrial environment (White and Claxton, 2004).

Traditionally, chemical analyses constitute the primary method for the assessment of the toxicity of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. The term TPHs is defined as the quantity of petroleum hydrocarbons measurable in the environment, comprising hundreds of chemical compounds originally present in the crude oil. This analysis, therefore, quantify the total hydrocarbons present in the environment. Now, the analyses of BTEX and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), for example, are critic when it is desired to know the concentration of specific contaminants (USEPA, 2008).

However, it is impossible to quantify all the compounds present in a complex mixture of environmental contaminants. Nowadays it has increased the interest in

alternative tools for the monitoring of contaminated soils. The use of bioassays to assess the quality of the soils has shown to be promising for making decisions and corrective actions (Claxton et al., 1998; Plaza et al., 2005a).

A great number of bioassays are available for the assessment of soils. Bioindicators provide information that are direct, cheap and integrated on the bioavailability and toxicity of complex mixtures of contaminants. Microorganisms, plants and invertebrates are among the bioindicators most used in the evaluation of soils contaminated by petroleum hydrocarbons (Maila and Cloete, 2005) and the several biomarkers used can indicate the presence, the effects and, in some cases, the contamination degree of an area, being, therefore, a warning sign for the environmental contamination.

This text presents a review on the main bioassays of toxicity and genotoxicity, carried out with microorganism, plants and invertebrates in the assessment of soils contaminated with petroleum hydrocarbons and/or bioremediated.

2. Bioassays applied in soils contaminated by petroleum hydrocarbons

2.1. Bioassays with bacteria

Microtox[®] test is a bioassay of acute toxicity largely used in the assessment of soils contaminated by petroleum hydrocarbons. It is based on the inhibition of the bioluminescence of *Vibrio fischeri* in stress conditions (Bispo et al., 1999; Mendonça and Picado, 2002; Plaza et al., 2005a; Eom et al., 2007). As an advantage of this test we can highlight the sensitivity, rapidity and possibility of real time monitoring (Paton et al., 2005).

Bioassays in prokaryotes also detect agents that induce genic mutations and primary lesions in the DNA. The mutagenicity test with strains of *Salmonella typhimurium*, also known as the *Salmonella*/microsome or Ames test, is, nowadays, the most used methodology to detect dangerous substances from the genetic point of view (Umbuzeiro and Vargas, 2003). The procedures of the test were described by Dr. Bruce Ames' group (Ames, 1971; Ames et al., 1973; Maron and Ames, 1983). Relationships between the results of the Ames test and carcinogenicity are well established, due to the association of the metabolization system of mammals *in vitro* (Ames et al., 1973; Malling and Frantz, 1973; McCann et al., 1975). This system is important for PAHs which are relatively inert, but after metabolic activation, their electrophilic derivatives

react covalently with nucleophilic centers of the DNA, forming adducts and inducing frameshift mutations, deletions, strand breaks in the DNA and chromosome abnormalities (Aina et al., 2006).

Currently, the Ames test is validated on a large scale by several laboratories and detects the displacement of the reading frame or substitution of base pairs of the DNA (Umbuzeiro and Vargas, 2003).

Békaert et al. (1999) and Eom et al. (2007), studying soils contaminated by PAHs, reported that the Ames test developed in hydric environment is more sensitive than the developed in agar, due to the increase in the bioavailability of contaminants. This procedure also provides a great advantage in relation to the traditional method in agar, since there is no need to concentrate the sample for the detection of the mutagenicity.

Positive responses in the strains of *Salmonella* TA100 and TA98, with and without the metabolic activation, have been reported (Malachova et al., 1997; Monarca et al., 1997). Eom et al. (2007) indicated that the mutagenicity in TA98 and TA100, after exposure to extracts of soils contaminated with PAHs was higher after the metabolic activation. The strain TA100 gave a positive response without metabolic activation, indicating that besides the PAHs, other fractions of hydrocarbons or direct mutagens present in the samples may be the responsible for the observed mutagenic effects. The strain TA100 has showed to be more sensitive in the detection of petroleum hydrocarbons in comparison with TA98 (Békaert et al., 1999; Eom et al., 2007). Nonetheless, other strains such as *Salmonella* YG1041 and YG1042 have also shown efficiency in the detection of these compounds (Brooks et al., 1998).

The chromotest (SOS chromotest) and the umu-test were developed as alternatives for the Ames test by Quillardet et al. (1982) and Oda et al. (1985), respectively. A strain of *Escherichia coli* PQ37 or *S. typhimurium* TA1535/pSK1002, containing a fusion of the genes of the β -galactosidase (*lacZ*) and a gene of the SOS repair system, are employed in these assays, so that the production of β -galactosidase depends on the activation of the SOS repair system by the genotoxic compounds. Another test with bacterium commonly used is the Mutatox[®] test in *Vibrio fischeri* M169. As this mutant does not emit light, the reversion of this characteristic indicates damages in the DNA (Bispo et al., 1999).

In bioassays with bacteria, several methods of extracting petroleum hydrocarbons from the soil have been employed. Generally, the bioassays are carried

out with polyaromatic fractions of contaminated soils, extracted by organic solvents (Bispo et al., 1999; White; Claxton, 2004). However, a study of Zemanek et al. (1997) showed that the chemical characterization of polar fractions, besides the polyaromatics, are required for a better assessment of the potential risk to health and ecological risk of soils contaminated by petroleum hydrocarbons. In this study, the Microtox[®] test showed acute toxicity of the polar fractions of the oil, derived from soils contaminated with petroleum and creosote. Now, Eom et al. (2007) showed the mutagenic potential of aqueous extracts of soils contaminated with PAHs by the Ames test and the Mutatox[®] test, in a lesser extent, with and without the metabolic activation. In this study, the umu test showed to be less sensitive, giving negative responses. The authors attribute this fact to the reduced bioavailability of contaminants in the medium of the umu test, which contains high concentrations of peptones and proteins capable of adsorbing contaminants. The use of aqueous extracts provides information about the deleterious potential of the fractions of petroleum hydrocarbons soluble in water to the terrestrial fauna and flora, surface waters and water table (Bispo et al., 1999).

3.2. Bioassays with plants

The analyses of the seeds germination and the root growth rates are the most used bioassays of toxicity with plants in terrestrial ecotoxicology. Economically important species and of rapid growth, such as *Lactuca sativa* (lettuce), *Zea mays* (maize), *Lepidium sativum* (cress) and *Triticum vulgare* (wheat), among others, have been used in the assessment of soils contaminated with petroleum hydrocarbons (Potter et al., 1999; Mendonça and Picado, 2002; Maila and Cloete, 2005; Plaza et al., 2005a; Smith et al., 2006; Hamdi et al., 2007; Eom et al., 2007). Several authors have reported that the root growth is a more sensitive biomarker than the seeds germination for the detection of organic residues in the soil, possibly due to its chronic mode of action (Sverdrup et al., 2003; Paton et al., 2005).

Although the phytotoxicity is a parameter largely employed, more specialized tests are required.

Soil is the medium of growth and development of most plant species, therefore, according to White and Claxton (2004), it is not a surprise that these bioindicators have been used in the assessment of the mutagenic activity of the terrestrial environment as much as *Salmonella* (White and Claxton, 2004). Among the main advantages of

bioassays with higher plants it is highlighted the high genetic sensitivity to several classes of environmental contaminants (Grant, 1994).

The main plant species used in the genotoxic and mutagenic evaluation of contaminated soils are *Allium cepa*, *Tradescantia* and *Vicia faba*. Several genetic biomarkers have been employed in different organs such as leaves, pollen and endosperm; since point mutations until mitotic and chromosome abnormalities, besides micronuclei (Grant, 1994, White and Claxton, 2004).

The species *A. cepa* presents few chromosomes ($2n=16$), of large size, which facilitates the evaluation of chromosome damages and/or mitotic abnormalities (Grant, 1982; Leme et al., 2008). Also, there are evidences of the correlation between *A. cepa* and other test systems. Fiskesjö (1985) showed that the test with *A. cepa* presents sensitivity similar to algae and human lymphocytes. Rank and Nielsen (1994) showed a correlation of 82% between the test with *A. cepa* and carcinogenicity studies in rodents. The counting of mitotic abnormalities and chromosome aberrations in *A. cepa* allows the analysis of the genotoxic potential and the understanding of the mechanisms of action of an environmental sample or chemical assessed, indicating whether it is clastogenic or aneugenic (Fiskesjö, 1985, Rank and Nielsen, 1997).

The genus *Tradescantia* presents six pairs of chromosomes, large and easily observed. The assay of staminal hair mutation (Trad-SHM) is based on point mutation in which it is suppressed the expression of the blue dominant character in flowers of heterozygous plants, resulting in the appearance of the recessive colour pink. Another test widely used in the assessment of soils is the micronucleus test (Trad-MCN), structure resulted from the chromosome break in the meiotic cells that generate pollen (Ma, 1982).

The main biomarkers applied in *V. faba* are sister chromatid exchanges, mitotic and chromosome abnormalities and micronucleus (White and Claxton, 2004).

In these bioassays, different methods of exposure have been employed in the evaluation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons, such as aqueous extracts (Baud-Grasset et al., 1993; Cotelle et al. 1999; Souza et al., 2009), direct contact (Lower et al. 1983; Souza et al., 2009) and organic extracts (Chroust et al. 1997). According to White and Claxton (2004), in higher plants, the direct contact constitutes the most effective method in the assessment of contaminated soils, allowing the interaction of these organisms with all the toxicants adsorbed in the solid particles, as well as with its water-soluble fraction. Souza et al. (2009) confirmed this fact by comparing the method

of direct contact with the use of aqueous extracts in soil contaminated with TPHs. Possible reasons for this effect are the increase in the efficiency in the metabolic activation of environmental contaminants in the radicular system of plants by microorganisms of the soil (Rodrigues, 1999).

Plants present the capacity to accumulate any type of PAHs of the soil (Fismes et al., 2002; Watts et al., 2006). However, the mechanisms of the metabolic activation of the PAHs by these organisms are not yet fully enlightened. Nevertheless, Fiskesjö (1985) showed that root cells of *A. cepa* have an important enzymatic system (oxygenases of mixed function), which was able to metabolize the benzo[a]pyrene, a potent clastogen to humans (IARC, 2008). Later, Baud-Grasset et al. (1993) demonstrated the clastogenic activity of soils contaminated with creosote (more than 5,000 mg/Kg of PAHs) by the micronucleus test in *Tradescantia*. Now, Cotelle et al. (1999) reported that the micronucleus test in *A. cepa*, *Tradescantia* and *V. faba* was equally sensitive in the detection of PAHs present in contaminated soils.

3.3. Bioassays with invertebrates

Some species of terrestrial invertebrates have been used as bioindicators due to their important role in essential ecological processes of the soil, such as nutrients cycling and decomposition (Ingham et al., 1985; Beare et al., 1992; Blakely et al., 2002; Erstfeld and Snow-Ashbrook, 1999).

The deleterious effects of petroleum hydrocarbons in terrestrial invertebrates have been described. Thus, Sjursten et al. (2001) and Sorensen and Holmstrup (2005) verified that the pyrene and fluorene interfere in the mechanisms of osmoregulation of *Folsomia candida* (Collembola). Now, Blakely et al. (2002) reported that PAHs may alter the structure of the microhabitat and the food availability for the soil invertebrates.

Regarding the analysis of the toxic potential of contaminated soils, species of earthworms and springtails have been widely used. Lethal and sub-lethal bioassays, involving the analysis of the mortality and reproduction rates have shown to be efficient in the assessment of soils contaminated with petroleum hydrocarbons (Huang et al., 2005; Eom et al., 2007), being reproduction a more sensitive parameter (Hubalek et al., 2007; Geissen et al., 2008).

The sensitivity of earthworms and springtails has been proved in studies where a battery of tests is used. Dorn et al. (1998) verified that earthworms were from 1.4 to 14 times more sensitive than bioluminescent bacteria and from 1.3 to > 77 times more

sensitive than the seeds germination test in the evaluation of a soil contaminated with petroleum. Also, Dorn and Salanitro (2000) reported that earthworms presented more sensitivity than plants to petroleum hydrocarbons.

Eom et al. (2007) used different terrestrial bioindicators to assess samples from an industrial soil contaminated with PAHs. The bioassays of survival and reproduction in the springtail *F. candida* and in the earthworm *E. fetida* were highly more sensitive than the bioassays of root germination and root growth in species of plants. The toxicity observed in the invertebrates was attributed to the concentrations of fluorene, phenanthrene, pyrene and fluoranthrene. Still in this study, *F. candida* showed to be more sensitive than *E. fetida* and the analysis of the reproduction rates was considered a more accurate parameter than survival for the evaluation of the soil quality.

Besides the traditional springtails and annelids, studies with other terrestrial invertebrates have also been developed for the assessment of soil quality. Since they are part of the edaphic fauna, diplopods are continuously exposed to contaminants present in the soil. In these animals, histopathological biomarkers have been applied (Triebkorn et al., 1991; Godoy and Fontanetti, 2010; Nogarol and Fontanetti, 2010). Tissular alterations in the midgut and in the perivisceral fat body of the diplopod *Rhinocricus padbergi* were studied, after exposure to a soil from a petroleum refinery. Chemical analyses showed the presence of high concentrations of PAHs and metals. The obtained responses showed histological and physiological alterations and activation of the defence mechanisms of the exposed animals, in an attempt to neutralize and/or eliminate the intake of toxic residues (Souza, unpublished data).

3. Monitoring of the bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons

Bioremediation of contaminated soils is determined by the metabolic potential of the microorganisms that use organic compounds as substrate for the growth and generation of energy and convert them into CO₂, H₂O and biomass. This process is highly dependent on the concentration, bioavailability and biodegradability of the contaminants, as well as environmental factors such as humidity, temperature, pH, soil type and availability of oxygen and nutrients as C, N and P. The bioremediation presents low operational cost, stimulates natural process, may result in the complete destruction of hazardous compounds transforming them into inert products and reduces

the risk of contamination of other areas, compared to traditional physical and chemical processes (Balba et al., 1998; Sarkar et al., 2005; Plaza et al., 2005a).

There is a variety of bioremediation technologies applied in soils contaminated with petroleum hydrocarbons, such as biopiles, bioreactors, composting, phytoremediation and *landfarming* (Khan et al., 2004; White and Claxton, 2004). Microorganisms, especially bacteria, present the capacity to degrade rapidly petroleum hydrocarbons, mainly the saturated and unsaturated alkanes, monoaromatics and PAHs of low weight. Also, a part of these compounds may be removed from the soil by volatilization. However, PAHs of high molecular weight, resins and asphaltenes are more recalcitrant, and can be adsorbed on the solid particles (Trapido, 1999; Ward et al., 2003; Khan et al., 2004). The half life of PAHs in the soil, for example, vary from 2 months to 2 years (Sverdrup, et al., 2003). Thus, different strategies are used to optimize the bioremediation of soils contaminated with these compounds.

Two processes can be used to enhance the microbial activity during the bioremediation: biostimulation and bioaugmentation. The biostimulation consists in the addition of nutrients and/or uncompressing agents in the contaminated soil, increasing the population of endogenous microorganisms. They may, or may not, use the hydrocarbons as primary source of carbon. However, it is assumed that the hydrocarbons will be degraded more rapidly in comparison to the natural attenuation due to the increase in the number of microorganisms. The bioaugmentation involves the addition of endogenous or exogenous microorganisms that are able to degrade toxic target molecules (Sarkar et al., 2005; Hamdi et al., 2007). These two processes may occur simultaneously when organic residues that contain microorganisms able to metabolize pollutants are added into the soil (Hamdi et al., 2007).

Recently, the supplementation of the contaminated soil with nutrients or uncompressing agents has been investigated by the addition of several residues of organic origin, such as animal faeces (Potter et al., 1999; Adesodun et al., 2008), biosolids (Sarkar et al., 2005) and rice hull (Hamdi et al., 2007; Souza et al., 2009), instead of specific nutrients. These experiments measure the effects of a combination of various sources of nutrients, being the C one of them. Together, the results of the above cited studies indicate that these residues are more efficient in the bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons.

The assessment of the effectiveness of a bioremediation technology may be verified by the determination of the decrease of the concentration of total or partial

environmental pollutants, for example, TPHs (Sarkar et al., 2005; Huang et al., 2005; Souza et al., 2009) and PAHs (Morelli et al., 2005), respectively. Additionally, respirometric methods (consumption of oxygen and/or carbon dioxide) may be used for the evaluation of the ready or inherent biodegradability of the pollutants (Balba et al., 1998; Souza et al., 2009). The count of total heterotrophic microorganisms and of degrading microorganisms of one or several specific substrates has also been widely applied (Balba et al., 1998; Oh et al., 2000).

In the last years, a great variety of bioassays have been used as a complement to the above described methods. Several studies have associated the decline of the concentration of petroleum hydrocarbons with the decrease of the toxicity, genotoxicity and mutagenicity of the soils.

Picado et al. (2001) reported the depletion of 63% in the total PAHs, mainly of 2, 3 and 4 aromatic rings (79%). Concomitantly, a change in the composition of the microbial population was observed with significant increase of heterotrophic colonies able to degrade PAHs. After the three months of bioremediation, no ecotoxicological and genotoxic effects were observed in the treated samples. Now, Mendonça and Picado (2002) applied the Mutatox[®] test to assess a soil highly polluted with PAHs (1141 mg/Kg of soil) and its treatment in *landfarming*. After 5 months of bioremediation, the concentration of PAHs was reduced in 60% (447 mg/Kg of soil) and the soil samples were not genotoxic. Plaza et al. (2005b) used the *SOS cromotest* and the *umu test* to evaluate samples of two biopiles from a petroleum refinery. After four years of bioremediation, there was depletion in the PAHs of 81% and it was not detected genotoxicity in the soil samples. According to the authors, the *umu test* presented more sensitivity than the *SOS cromotest*.

Bioassays with plants have shown to be important tools in the genotoxic and mutagenic assessment of soils contaminated with petroleum hydrocarbons after bioremediation. Soils contaminated with PAHs were incubated with the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, for eight weeks. Aqueous extracts of the soils pre-incubated were highly clastogenic by the Trad-MCN test. After the treatment there was depletion in the PAHs and reduction in the mutagenicity of the extracts (Baud-Grasset et al., 1993).

Pottter et al. (1999) reported that a soil contaminated with PAHs had little effect on the germination of seeds, both before and after the bioremediation. However, the untreated soil exhibited significant inhibition of the root growth in *Lactuca sativa* and

Avena sativa (EC₅₀ 95% and 77%, respectively). Significant induction of mitotic and chromosome abnormalities in *Allium cepa* before the bioremediation were reported. After the treatment, such abnormalities showed to be insignificant. The reduction in the genotoxicity of the soil was followed by the decline in the PAHs concentration.

Song et al. (2007) used the micronucleus test (MN) in *V. faba* to evaluate the mutagenic activity of three soils contaminated with PAHs, before and after bioremediation. Now, Souza et al. (2009) concluded that the bioassay in *A. cepa* was adequate to assess the biodegradation of petroleum hydrocarbons (13.5 g/Kg of TPHs) present in samples of a *landfarming*. The authors concluded that the bioassay could be routinely required to evaluate the detoxification of hydrocarbons present in bioremediated soils.

Bioremediation of soils contaminated with petroleum resulted in a progressive decline of the acute toxicity in earthworms (Salanitro et al., 1997). The same effect was observed by Hund and Transpurger (1994) for earthworms in a soil contaminated with PAHs. The decline in the toxicity of a soil contaminated with PAHs, after bioremediation, was demonstrated by Potter et al. (1999), through the analysis of lethality in two species of earthworm, *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris*. The biological results were consistent with the decline in the concentration of PAHs of the soil. Dorn and Salanitro (2000) concluded that the bioremediation was effective in reducing the toxicity of soils contaminated with oil, assessed by the toxicity tests using bacteria, earthworms and plants.

Wang et al. (1990) demonstrated that supplementation with nutrients in soil contaminated with oil promoted a rapid decline of the soil mutagenicity within 12 weeks. Now, Souza et al. (2009) verified that the biostimulation and bioaugmentation, by adding rice hull, accelerated the bioremediation in a *landfarming* from a petroleum refinery. This fact was also confirmed by the increase in the significative rate of CO₂ released by microorganisms present in the *landfarming* treated with rice hull compared with the untreated sample.

The biological responses after bioremediation depends on the bioavailability of petroleum hydrocarbons present in the soil. Salanitro et al. (2007) reported that light oil was more toxic to plants than medium and heavy oils; however the toxicity of all oils was reduced after bioremediation.

Also, not always the decline of petroleum hydrocarbons results in the decrease of the toxic, genotoxic and mutagenic activity of the soils (Alexander et al., 2002). For

example, Philips et al. (2000) reported that although the total concentration of TPHs in the soil decreased after bioremediation, there was an increase in the soil toxicity in earthworms and plants. Now, Brooks et al. (1998) detected increase in the mutagenicity in soil extracts submitted to the Ames test, after two of the four bioremediation technologies evaluated. These authors attribute this fact to the presence of azaarene (PAHS where a carbon is substituted by nitrogen in the aromatic ring structure) and nitroarenes (PAHs with a nitro group associated) in the extracts. Azaarenes are mutagens that require metabolic activation, unlike nitroarines. Still, Lundstedt et al. (2003) reported that the bioremediation of soils contaminated with PAHs may result in the formation of PAHs containing oxygen. Some of these compounds, such as ortho-quinones and ketones are potent direct mutagens for some organisms (Flowers-Geary et al., 1996).

Nevertheless, most of the times the intermediary metabolites formed during the biodegradation of PAHs, responsible for the increase in the mutagenic activity of extracts or samples of soil, are only detected by the bioassays since the traditional chemical analyses cover a limited number of specific compounds. Thus, this has been considered one of the greater advantages of the use of bioassays in the evaluation of the bioremediation of soils contaminated with petroleum residues (Plaza et al., 2005a).

4. Conclusion

Petroleum hydrocarbons may affect the terrestrial biota as well as other organisms at different biological organization levels. In complement to the conventional chemical tests, biological assays may be used successfully to identify soils contaminated with these compounds, to evaluate the effectiveness of a bioremediation technology and, finally, monitor sites already restored.

Bioassays with bacteria, plants and terrestrial invertebrates are among the most used in the assessment of the terrestrial environment. The responses obtained with these bioindicators may vary according to the physico-chemical parameters of the soil, pollutants extraction method as well as their bioavailability.

The combination of organisms belonging to different trophic levels, the use of different extraction methods of petroleum hydrocarbons and of different biomarkers may provide a better understanding of the toxicity and bioavailability of contaminants present in soils contaminated with petroleum and direct the implementation of bioremediation technologies if necessary.

Acknowledgments

The authors thanks to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

References

Adesodun, J.K.; Mbagwu, J.S.C. (2008). Biodegradation of waste-lubricating petroleum oil in a tropical alfisol as mediated by animal droppings. **Bioresource Technology**, v.99, p.5659–5665.

Aina, R.; Palin, L.; Citterio, S. (2006). Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. **Chemosphere**, v. 65, p.666–673.

Alexander, R.R.; Tang, J.; Alexander, M. (2002). Genotoxicity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.150-154, 2002.

Ames, B.N. (1971). The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: Hollaender, A. (Ed.). **Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection**. Plenum Press, New York, v.1 p.267-282.

Ames, B.N.; Dursten, W.E.; Yamasaki, E; Lee, F.D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, 2281.

Ames, B.N.; Lee, F.D.; Durston, W.E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, p.782-786.

Balba, M.T.; Al-Awadhi, N.; Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v.32, p.155–164.

Baud-Grasset, S.; Baud-Grasset, F.; Bifulco, J.M.; Meier, J.R.; Ma, T.H. (1993). Reduction of genotoxicity of a creosote-contaminated soil after fungal treatment determined by the Tradescantia-micronucleus test. **Mutation Research**, v.303, p.77–82.

Beare, M.H.; Parmelee, R.W.; Hendrix, P.F.; Cheng, W.; Coleman, D.C.; Crossley, D.A. (1992). Microbial and faunal interactions and effects on litter nitrogen and decomposition in agroecosystems. **Ecological Monographs**, v.62, p.569–591.

Békaert, C.; Rast, C.; Ferrier, V.; Bispo, A.; Jourdain, M.J.; Vasseur, P. (1999). Use of in vitro (Ames and Mutatox test) and in vivo (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. **Organic Geochemistry**, v.30, p.953-962.

Bispo, A.; Jourdain, M.J.; Jauzein, M. (1999). Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Organic Geochemistry**, v.30, p.947-952.

Blakely, J.K.; Neher, D.A.; Spongberg, A.L. (2002). Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. **Applied Soil Ecology**, v.21, p.71-88.

Brooks, L.R.; Hughes, T.J.; Claxton, L.D.; Austern, B.; Brenner, R.; Kremer, F. (1998). Bioassay-directed fractionation and chemical identification of mutagens in bioremediated soils. **Environmental Health Perspectives**, v.106, p.1435-1440.

Chroust, K.; Kuglik, P.; Relichova, J.; Holoubek, I.; Caslavsky, J.; Veselska, R.; M. Ryskova, M.; Benedik, J. (1997). *Drosophila melanogaster*, *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* short-term bioassays in genotoxicity evaluation of air and soil samples from

sites surrounding two industrial factories in the Czech Republic. **Folia Biológica Praha**, v.43, p.71–78.

Claxton, L.D.; Houk, V.S., Hughes, T.J. (1998). Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v.410, p.237-243.

Cotelle, S.; Masfaraud, J.F.; Féraud, J.F. (1999). Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research**, v.426, p.167–171.

Dorn, P.B.; Vipond, T.E.; Salanitro, J.P.; Wisniewskie, H.L. (1998). Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox and plants. **Chemosphere**, v.37, p.845-860.

Dorn, P.B. and Salanitro, J.P. (2000). Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. **Chemosphere**, v.40, p.419-426.

Eom, I.M.; Rast, C.; Veber, A.M.; Vasseus, P. (2007). Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.67, p.190-205.

Fiskejö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p.99-112.

Fismes, J.; Perrin-Ganier, C.; Empereur-Bissonnet, P. ; Morel, J.L. (2002). Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.1647-1646.

Flowers-Geary, L.; Bleczinski, W.; Harvey, R.G.; Penning, T.M. (1996). Cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones produced by dihydrodiol dehydrogenase. **Chemico-Biological Interactions**, v.99, p.55–72.

Gass, F. ; Gillet, S. ; Ponge, J.-F. (2006). The use of directional traps for the assessment of short-term phenanthrene effects upon soil springtail communities **Environmental Pollution**, v. 140, p. 364-370.

Geissen, V.; Gomez-Rivera P.; Lwanga, E.H.; Mendoza R.B.; Narcías, A.T.; Marcías, E.B. (2008). Using earthworms to test the efficiency of remediation of oil-polluted soil in tropical Mexico. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, p.638– 642.

Godoy, J.A.P.; Fontanetti, C.S. (2010). Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substratum containing sewage sludge. **Water, Air and Soil Pollution**, in press.

Grant, W.F. (1982). Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v.99, p.273-291.

Grant, W.F. (1994). The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v.310, p.175-185.

Hamdi, H.; Benzarti, S.; Manusadzianas, L.; Aoyama, I.; Jeddid, N. (2007). Soil bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.1926–1935.

Huang, X.D.; El-Alawi, Y.; Gurska, J.; Glick, B.R.; Greenberg, B.M. (2005). A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. **Microchemical Journal**, v.81, p.139–147.

Hund, K.; Transpurger, W. Ecotox-evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. **Chemosphere**, v. 29, p. 371-390.

IARC – International Agency for Research on Cancer (2008). Complete list of agents evaluated and their classification. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France, v.1 to 99.

Ingham, R.E.; Trofymow, J.A.; Ingham, E.R.; Coleman, D.C. (1985). Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. **Ecological Monographs**, v.55, n.1, p. 119-140.

Jager, T.; Sanchez, F.A.A.; Muijs, B.; van der Velde, E.G.; Posthuma, L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.19, p.953- 961.

Khan, F.I.; Husain, T.; Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, v.71, p.95-122.

Leme, D.M.; Angelis, D.F. ; Marin-Morales, M.A. (2008). Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v.88, p.214-219.

Lower, W.R.; Drobney, V.K.; Aholt, B.J.; R. Politte, R. (1983). Mutagenicity of the environments in the vicinity of an oil refinery and a petrochemical complex, **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v.3, p.65–73.

Lundstedt, S.; Haglund, P.; Oberg, L. (2003). Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an aged gasworks soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.22, p.1413–1420.

Ma, T.H. (1982). *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis). A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v.99, p.293-302.

Maila, M.P. and Cloete, T.E. (2005). The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.55, p.1-8.

Malachova, K. (1997). Estimating the mutagenicity of soils after their biological decontamination. **Mutation Research**, v.379, S118.

Malling, H. and Frantz, C.N. (1973). In vitro versus in vivo metabolic activation mutagens. *Environmental Health Perspectives*, v.6, 71.

Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, p.173-215.

McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; B.N. Ames, B.N. (1975). Detecting carcinogens in *Salmonella*/microsome test. Assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.72, p.5135-5139.

Mendonça, E. and Picado, A. (2002). Ecotoxicological monitoring of remediation in a coke oven Soil. Ecotoxicological monitoring of remediation. **Environmental Toxicology**, v.17, p.74-79.

Monarca, S.; Zanardini, A.; Feretti, D.; Resola, S.; Marchetti, R.; Manfredi, S.; Nardi, G. (1997). Evaluation of mutagens in contaminated soils using bacterial and plant assays. **Mutation Research**, v.379, S101.

Morelli, I.S.; Del Panno, M.T.; De Antoni, G.L.; Paineira, M.T. (2005). Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.55, p.271–278.

Nogarol, L.R.; Fontanetti, C.S. 2010. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissular responses of the midgut. **Micron**, v.41, p.239-246.

Oda, Y.; Nakamura, S.; Oki, J.; Kato, T.; Shinagawa, H. (1985). Evaluation of the new system (umu test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. **Mutation Research**, v.147, p.219–229.

Oh, Y.S.; Choi, W.Y.; Lee, Y.H.; Choi, S.C.; Kim, S.J. (2000). Biological treatment of oil contaminated sand: comparison of oil degradation based on thin-layer chromatography/flameionization detector and respirometric analysis. **Biotechnology Letters**, v.22, p.595-598.

Paton, G.I.; Killham, K.; Weitx, H.J.; Semple, K.T. (2006). Biological tools for the assessment of contaminated land: applied soil ecotoxicology. **Soil use and Management**, v. 21, p. 487-499.

Picado, A.; Nogueira, A.; Baeta-Hall, L.; Mendonça, E.; de Fátima Rodrigues, M.; do Céu Sàágua, M.; Martins, A.; Anselmo, A.M. (2001). Landfarming in a PAH-contaminated soil.

Journal of Environmental Science and Health, v.36, n.9, p.1579-88.

Plaza, G. and Nalecz-Jawecki, G. (2005a). The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v.59, p.289-296.

Plaza, G.; Nalecz-Jawecki, G.; Ulfig, K.; Brigmon, R.L. (2005b). Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil Grazyňa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.62, p.415–420.

Phillips, T.M.; Liu, D.; Seech, A.G.; Lee, H.; Trevors, J.T. (2000). Monitoring bioremediation in creosote-contaminates soils using chemical analysis and toxicity tests. **Journal of Industrial Microbioloy and Biotechnology**, v.24, p.132-139.

Potter, C.; Glasser, J.A.; Chang, L.W.; Meirer, J.R.; Dosani, M.A.; Herrmann, R.F. (1999). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons under bench-scale compost conditions. **Environmental Science and Technology**, v.33, p.1717-1725.

Quillardet, P.; Huisman, O.; D'Ari, R.; Hofnung, M. (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.79, p.5971–5975.

Rank, J. and Nielsen, M.H. (1994). Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v.312, p.17-24.

Rank, J. and Nielsen, M.H. (1997). *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v.390, p.121-127.

Rodrigues, G.S. (1999). Bioensaios de toxicidade genética com *Tradescantia*. **Jagariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 56p. (Embrapa Meio Ambiente, Documentos 14).

Salanitro, J.P.; Dorn, P.B.; Huesemann, M.H.; Moore, K.O.; Rhodes, I.A.; Jackson, L.M.R.; Vipond, T.E.; Western, M.M.; Wisniewski, H.L. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicology assessment. **Environ. Sci. Technol.**, v. 31, p. 1769-1776.

Salanitro, J.P. (2000). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil. In: Sparks, D.L. (Ed.), **Advances in Agronomy**, v. 72, p. 53-105.

Sarkar, D.; Ferguson, M.; Datta, R.; Birnbaum, S. (2005). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v.136, p.187-195.

Saterback, A.; Toy, R.J.; Wong, D.C.L.; McMains, B.J.; Williams, M.P.; Dorn, P.B.; Brzusy, L.P.; Chai, E.Y.; Salanitro, J.P. (1999). Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecotoxicological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.18, p.1591-1607.

Sjursen, H.; Sverdrup, L.E.; Krogh, P.H. (2001). Effects of polycyclic aromatic compounds on the drought tolerance of *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.20, p.2899-2902.

Song, Y.F.; Gong, P.; Wilke, B.M.; Zhang, W.; Song, X.Y.; Sun, T.H.; Ackland, M.L. Genotoxicity assessment of soils from wastewater irrigation areas and bioremediation sites using the *Vicia faba* root tip micronucleus assay. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 9, p. 182-186, 2007.

Sorensen, T.S. and Holmstrup, M. (2005). A comparative analysis of the toxicity of eight common soil contaminants and their effects on drought tolerance in the collembolan *Folsomia candida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, p.132-139.

Souza, T.S.; Hencklein, F.A.; Angelis, D.F.; Gonçalves, R.A.; Fontanetti, C.S. (2009). The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1363-1368.

Song, Y.F.; Gong, P.; Wilke, B.M.; Zhang, W.; Song, X.Y.; Sun, T.H.; Ackland, M.L. (2007). Genotoxicity assessment of soils from wastewater irrigation areas and bioremediation sites using the *Vicia faba* root tip micronucleus assay. **Journal of Environmental Monitoring**, v.9, p.182-186.

Trapido, M. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon in Estonian soil: contamination and profiles. **Environmental Pollution**, v.105, p.67-74.

Triebkorn, R.; Köhler, H.R.; Zanh, T.; Vogt, G.; Ludwig, M.; Rumpf, S.; Kratzmann, M.; Alberti, G.; Storch, V. (1991). Invertebrate cells as targets for Hazardous substances. **Zeitschrift für Angewandte Zoologie.**, v. 78, p. 277-287.

Umbuzeiro, G.A. and Vargas, V.M.F. (2003). Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Maarques, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra, p. 21-26.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (2008). Using TPH in risk – based corrective action. Shell Development Company.

Wang, X.; Yu, X.; Bartha, R. (1990). Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil. **Environmental Science and Technology**, v.24, p.1086–1089.

Ward, O.; Singh, A.; Hamme, J.V. (2003). Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.260-270.

Watts, A.W.; Ballesteros, T.; Gardner, K.H. (2006). Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in salt marsh plants *Spartina alterniflora* grown in contaminated sediments. **Chemosphere**, v.62, p.1253-1260.

White, P.A. and Claxton, L.D. (2004). Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research**, v.567, p.227-345.

Zemanek, M.G.; Pollard, S.J.; Kenefick, S.L.; Hrudey, S.E. (1997). Soil toxicity and mutagenicity of component classes of oils isolated from soils at petroleum-and creosote-contaminated sites. **Journal of Air and Waste Management Association**, v.47, p.1250-1258.

7.2. The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation

Esse artigo foi publicado no periódico “**Ecotoxicology and Environmental Safety**”, v. 72, p. 1363-1368, 2009.

The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation

Souza, Tatiana da Silva Souza¹; Fabiana Aparecida Hencklein²; Dejanira de Franceschi de Angelis³, Renato de Almeida Gonçalves⁴, Carmem Silvia Fontanetti⁵

^{1,5}Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, Brazil;

^{2,3}Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, Brazil;

⁴Paulínia Oil Refinery, Paulínia, São Paulo State, Brazil.

Correspondence to: Carmem Silvia Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, nº 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil

Phone: (55) 19 3526-4156, FAX: (55) 19 3526-4136

e-mail: fontanet@rc.unesp.br

Abstract

Landfarming is a soil bioremediation technology practiced by oil refineries in order to reduce or eliminate hydrocarbons from petroleum sludge. The goal of the current study was use *Allium cepa* bioassay to assess landfarming and landfarming with rice hulls amendment before and after hydrocarbons biodegradation assay in the laboratory. Three cytogenetic endpoints were used: mitotic and chromosome abnormalities (MCA), micronucleus (MN) and nuclear buds (NB). Landfarming presented 13.5 g/Kg of Total Petroleum Hydrocarbons (TPHs) and caused strong clastogenic and mutagenic effects ($p < 0.05$) in *A. cepa*. After 108 days of biodegradation, the landfarming reached the rate of 26.30 mmol of CO₂ released, the concentration of TPHs decreased by 27% and there was significant reduction in MCA, MN and NB. Landfarming treated with rice hulls had the highest release of CO₂, 110.9 mmol, associated with a remarkable reduction in TPHs concentration, 59%, and had the highest decrease in MCA, MN and NB ($p > 0.05$). Our findings showed that the use of rice hulls accelerated the biodegradation efficacy of landfarming and reduced their clastogenicity, indicating that supplementary treatments are important to improve the efficiency of bioremediation processes.

Keywords: petroleum sludge, oil refinery, bioremediation, genotoxicity tests

1. Introduction

Petroleum sludge resulting from oil refining consists mainly of an emulsion composed of water, sedimented material, hydrocarbons and heavy metals, such as barium, chromium, nickel and lead (Ururahy, 1998). Bioremediation of organic pollutants is the most important clean-up mechanism of petroleum sludge from the environment (Leahy, 1990). Thus, oil refineries worldwide have practiced landfarming to treat oil sludge (Riser-Roberts, 1998). In this system, microorganisms use organic compounds in the residue deposited in the upper layers of the soil as a substrate for growth and energy production, converting the contaminants to CO₂, H₂O, and biomass. The aerobic activity of microorganisms is constantly stimulated through soil aeration and/or by adding nutrients, minerals, and water (Harmsen, 1991).

In landfarmings, petroleum hydrocarbons are largely removed through volatilization and biodegradation (Hejazi et al., 2003). Lighter petroleum hydrocarbons, including the constituents of gasoline, tend to be removed by volatilization process and degraded by microbial respiration (USEPA, 1994). However, heavier petroleum hydrocarbons do not evaporate during aeration but are broken down by microorganisms present in the soil at the treatment site. These higher molecular weight petroleum constituents, such as those found in heating and lubricating oils and to a lesser extent in diesel fuel and kerosene, require long periods of time to degrade (Khan et al., 2004).

In addition, heavy metals are not biodegraded in landfarmings, are accumulated in the soil and may reduce the degradation of hydrocarbons. In general, soil concentrations of heavy metals exceeding 2.5 g/Kg, can be toxic or inhibit the growth and reproduction of microorganisms responsible for biodegradation (USEPA, 1994).

Several strategies may be used to accelerate the biodegradation of hydrocarbons in landfarming applications. One technique involves the addition of bulking agents to the soil which improves some of its physico-chemical characteristics, reducing its density, increasing porosity and facilitating oxygen diffusion among solid particles. In addition, the capacity of water retention in the soil may be altered (Vasudevan and Rajaram, 2001). Rice hulls are an active organic residue that contain microbial strains capable of metabolizing pollutants and may be used in the bioremediation of oil-contaminated soils (Hamdi et al., 2007).

The effectiveness of a technology of bioremediation can be measured by testing of biodegradation in the laboratory. In this case, two of the parameters examined are: the rate of microbial respiration (consumption of O₂ and / or CO₂) and the disappearance rate of total pollutants, such as TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) in sites contaminated with petroleum hydrocarbons (OH et al., 2000). TPH is defined as the measurable amount of petroleum-based hydrocarbon in an environmental media and, thus, TPH itself is not a direct indicator of the risk (i.e., mobility, toxicity, and exposure to human and environmental receptors). Thus, other analysis or information in addition to a single TPH number must be used to relate TPH concentrations to risk (Plaza et al., 2005 and USEPA, 2008).

In recent years, bioassays have been used to monitor contaminated and/or bioremediated soils and are promising tools for risk-based corrective action (Plaza et al., 2005). Since soil is the growth medium for most plants, it seems logical that these assays should be amenable to the assessment of soil genotoxicity (White and Claxton 2004). Among higher plants, *Allium cepa* is commonly used to evaluate the genotoxic and mutagenic potential of contaminated soils. This species has large and few chromosomes (2n = 16) what facilitates the evaluation of chromosome damages and/or mitotic abnormalities (Grant, 1982 and Leme et al., 2008). Also, there are evidences of the correlation between *A. cepa* and others test system. Fiskejö (1985) showed that *A. cepa* test presents a similar sensitivity to that algal and human lymphocyte test system. Rank and Nielsen (1994) showed a correlation of 82% between *A. cepa* test and carcinogenicity assays in rodents.

The goal of the current study was use *A. cepa* bioassay to evaluate landfarming and the conjunction of landfarming with rice hulls amendment before and after the hydrocarbons biodegradation assay in the laboratory. Seeds of *A. cepa* were exposed directly to soil samples and in aqueous extracts in order to evaluate the fraction of water soluble pollutants and less soluble and soil-bound pollutants.

2. Materials and Methods

2.1. Landfarming soil

Soil from a landfarming facility at an oil refinery was collected in 2005 according to the technical procedure NBR 10.007 of the Brazilian Association of

Technical Standards (ABNT) (2004). According to Crivelaro (2005), the biodegradation on landfarming of this refinery is not efficient due high concentration of organic compounds and heavy metals (1.41%). Soil concentrations of TPHs in the range of 10 to 50 g/Kg, can inhibit the microbial activity (USEPA, 1994).

2.2. Control soil

Soil of the Itirapina Ecological Station – São Paulo State, Brazil, managed by the Forestry Institute of São Paulo State - Brazil, was used as control soil (CS). The area of the reserve comprises approximately 2.300 hectares of well-preserved native grassland. The collection was carried out according to technical procedure NBR 6.457 of the Brazilian Association of Technical Standards (ABNT) (1986).

2.3. Physical and chemical analysis

Landfarming and control soil were examined for the following physico-chemical parameters: texture, pH, organic matter content, nutrients concentrations and heavy metals concentration (Ba, Cd, Cr, Ni and Pb). The metal analyses were performed by inductively coupled plasma emission spectrometry (ICP). All the analyses described above were performed by Institute of Campinas of Soil and Fertilizer Analysis LTDA (ICASA), Campinas, São Paulo State, Brazil.

The analyses of TPHs in soil samples were conducted by the ASL Environmental Analysis, Rio Claro, São Paulo State, Brazil. The TPHs analyses were performed according to the USEPA – SW 846 method 8015B (USEPA, 1996). This method detects aliphatic and aromatics hydrocarbons that represent the readily degradable organic fraction of petroleum (USEPA, 1996).

2.4. Biodegradation of hydrocarbons

After collection of the soils, water was added to 70% of the holding capacity. Then three treatments were generated: control soil (CS - 50g), landfarming (L - 50g) and landfarming associated with rice hulls (LRH - 50g of soil and 10g of rice hull).

These treatments were subjected to respirometric method (Bartha and Pramer, 1965), according to the technical procedure NBR 14.283 of Brazilian Association of Technical Standards (ABNT) (1999). In this process the CO₂ released by

microorganisms is proportional to the percentage of substrate biodegraded. Mineralization studies involving measurements of total CO₂ production can provide excellent information on the biodegradability potential of hydrocarbons (Balba et al., 1998). In this work, the levels of CO₂ was monitored for 108 days and quantified. For each experimental condition, the biometer flasks were prepared in triplicates (3 x 50 g of soil) and incubated at 27°C in the dark. Produced CO₂ was trapped in a 10.0 mL solution of KOH (0.2 N), located in the side-arm of the biometer. This solution was periodically withdrawn by syringe, and the amount of CO₂ absorbed was then measured by titrating the residual KOH (after the addition of barium chloride solution (1 mL; 1.0 N) used to precipitate the carbonate ions) with a standard solution of HCl (0.1 N). During this procedure, the biometers were aerated during 1.5 minutes through the ascarite.

$$\text{CO}_2 \text{ released (mmol)} = (\text{VB} - \text{VA}) \times 50 \times \text{fHCl}$$

where: VB = volume (mL) of HCl 0.1 N used to titrate the control biometer flask (landfarming without rice hulls addition); VA = volume (mL) of HCl 0.1 N used to titrate the landfarming with rice hulls; fHCl = correction factor of the normality of HCl.

The amount of CO₂ released was represented as mean ± standard deviation. ANOVA (p<0.05) was used to determined the differences between the treatments.

2.5. Preparation of aqueous soil extracts

Aqueous soil extracts of each replicate (CS, L and LRH) were prepared according to Cotelle et al. (1999). Approximately 50 g of soil were added to 300 mL of ultrapure water. The mixture was stirred for 24 hours and then let sit for another 24 hours at room temperature (25 ± 2 °C). Supernatant was collected and the aqueous extracts without any further filtration process were used for the *A. cepa* seeds germination.

2.6. The *A. cepa* bioassay

Seeds of *A. cepa* were allowed to germinate at room temperature (25 ± 2 °C) in Petri dishes lined with filter paper moistened with aqueous soil extracts.

Simultaneously, seeds were planted directly in soils. Three dishes were used per treatment. The positive control contained the herbicide trifluraline at a concentration of

0.84 mg/Kg. This herbicide is known to be a potent inducer of chromosome aberrations in *A. cepa* (Fernandes et al., 2007).

The bioassay in *A. cepa* was performed according to Grant (1982). After five days, when radicles of *A. cepa* reached approximately 1 to 2 cm, some specimens were collected and fixed in Carnoy I (3:1 methanol/acetic acid) (continuous treatment). The remaining radicles were transferred to a Petri dish containing ultrapure water for a 48-hour recovery treatment. After fixation, radicles were hydrolyzed in 1N HCl at 60°C for 10 minutes and later stained with Schiff Reagent for 2 hours in the dark. The roots tips were sectioned, placed on slides, coverslipped and smashed. Cover slips were removed in liquid nitrogen and the slides were mounted with Entellan or Permount. The material was analyzed under light microscope at magnification of 400x. Five slides were prepared for treatment and a total of 7500 cells were counted (500 cells/ slides). Several types of mitotic and chromosome abnormalities within different cell division stages (metaphase, anaphase and telophase) were considered: chromosomal breaks, losses and bridges, adherences, multipolar anaphases, polyploid cells and C-metaphases. The micronucleus (MN) and nuclear buds (NB) induction in the meristematic cells of *A. cepa* was regarded, apart from mitotic and chromosome abnormalities. The non-parametric test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) was used. The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD of three replicate).

3. Results

3.1. Physical and chemical analyses

The soil analyses results are show in the Table 1. The control soil was classified as sandy, pH 4.0, low amount of organic matter and low concentration of heavy metals when compared to landfarming. The landfarming was classified as clay, pH 5.0 and large amount of organic matter and heavy metals, particularly Ba, Ni and Cr. Were recorded high concentrations of the elements Ca, Mg, S, Na and Fe in this sample. Nevertheless the differences between the control soil and the landfarming, soil of the Itirapina Ecological Station was used because it is represents the typical soil of São Paulo State, the “cerrado” soil.

According to Figure 1, TPHs concentration of L was 13.5 g/kg. After the biodegradation, TPHs concentration decreased by 27%, 9.8 g/kg, whereas in LRH TPHs concentration decreased by 59%, 5.5 g/kg.

3.2. Biodegradation of hydrocarbons

The Figure 2 shows the results of biodegradation assay. Lighter hydrocarbons were preferentially biodegraded in approximately 10 days. After this time, the degradation rate slowed down. In control soil, the release of CO₂ was the lowest when compared with the other soils due the low amount of organic matter. After 108 days, the amount of CO₂ released was larger in LRH treatment (110.9 mmol CO₂) than L treatment (26.3 mmol CO₂). The values were statistically significant (ANOVA, $p < 0.05$).

3.3. The *A. cepa* bioassay before biodegradation

The mitotic and chromosome abnormalities results are shown in Table 2. In continuous and recovery treatments, the frequencies of mitotic and chromosome abnormalities of landfarming site were significantly higher ($p < 0.05$) compared to the control soil. Only the frequencies of adherences, chromosome bridges and chromosome breaks showed statistically significant differences to the control soil (Table 3).

The micronucleus results are shown in Table 4. The induction of micronucleus was significantly different ($p < 0.05$), when compared with control soil, except for recovery treatment/extract aqueous.

The induction of cells with nuclear buds was significantly higher ($p < 0.05$) for seeds germinated in aqueous soil extract/continuous treatment and direct contact/recovery treatment (Table 5).

3.4. The *A. cepa* bioassay after biodegradation

In continuous and recovery treatments, the induction of mitotic and chromosome abnormalities (Table 2), micronuclei (Table 4), and nuclear buds (Table 5) in *A. cepa* exposed to landfarming soil and landfarming soil and rice hulls, did not differ from that of the control soil. However, L was less toxic than CS and LRH after biodegradation for aqueous extract/ continuous treatment (Table 5) and induction of bridges was higher in LRH after biodegradation (Table 6).

Among the abnormalities observed, bridges and breaks were the more frequent (Table 6). Seeds germinated in landfarming soil and rice hulls had the highest decrease in genetic damage when compared to samples germinated in landfarming soil only (Tables 2, 4 and 5).

3.5. Exposure methods of *A. cepa* seeds

Although the induction of MCA, MN and NB had been higher when seeds of *A. cepa* germinated directly in soil samples, compared to aqueous extract, no statistical differences were observed between the exposure methods.

4. Discussion

Chromosomal adherence, bridges and breaks were the major types abnormality observed in *A. cepa* root cells. According to Türkoglu (2007), adherence is a common sign of toxic effects on the genetic material and may cause irreversible effects on the cell. However, in this study, the presence of this abnormality can explain the significant induction of chromosomal bridges and breaks. The bridges observed were probably formed from adherence, as they were not accompanied by fragments (Kong and Ma, 1999). Throughout anaphase, these bridges may break and form laggards (Gömürgen, 2005). The mutagenic activity of landfarming was also assessed by induction micronuclei and nuclear buds. Micronuclei are a result of chromosome breaks and disturbances in the mitotic process due to a malfunctioning of the fuse (Grover and Kaur, 1999). Also micronucleated cells can be arising from nuclear buds, which are eliminated from the nucleus through an active process during the S phase of the cell cycle (Shimizu et al., 1998).

The *A. cepa* bioassay allows the understanding the action mechanisms of tested chemical or environmental sample evaluated. Thus, the incidence significant of bridges and breaks can indicate that the landfarming presents clastogenic potential due action of hydrocarbons and heavy metals. Leme et al. (2008) showed that petroleum hydrocarbons can induce clastogenic and aneugenic effects, as well as induce cell death process on genetic material of *A. cepa*. However, probably hydrocarbons and heavy metals have synergistic effects in *A. cepa* and the combined application of two methods

of exposure showed that both soluble pollutants and less soluble and soil-bound pollutants can be dangerous to organisms exposed to landfarming.

The data of biodegradation assay showed that the amount of CO₂ released was larger in LRH treatment than L. The most labile fractions of hydrocarbons were preferentially biodegraded in approximately 10 days. After this time, the degradation rate slowed down, indicating that the microorganisms need more time to degrade more complex hydrocarbons.

The increase in CO₂ release associated with depletion TPHs demonstrated that rice hulls accelerated the hydrocarbons biodegradation. Rice hulls improve soil aeration and permeability, thereby promoting microbial activity (Vasudevam and Najaram (2001). According to Pointing (2001), microorganisms that degrade biopolymers have ligninolytic enzyme machinery (e.g., laccase, lignin peroxidase and Mn-dependent peroxidase) that can reach and deplete hydrocarbons with low availability as well as a wide range of organic pollutants in contaminated soils. Rice hull is rich in biopolymers (cellulose and lignin). Thus, Hamdi et al. (2007) demonstrated that rice hull addition in PAH-spiked soil promoted significant enhance of the activity extracellular ligninolytic enzymes and PAH depletion. These authors concluded that addition of rice hulls in soil supplied more active aerobic cellulose decomposers with higher degrading capabilities for PAHs of four or less rings. The same might have occurred in this study.

The *A. cepa* bioassay was used to evaluate the rice hulls effects on landfarming after biodegradation assay. There was significant reduction of genotoxicity. However, the induction of nuclear buds and bridges was higher in LRH than L in aqueous extract/continuous treatment. Probably, toxic metabolites were formed after biodegradation in LRH treatment. Nevertheless, the induction of buds and bridges was not significant. Alexander et al. (2002) showed that genotoxicity of hydrocarbons-contaminated soils can enhance due new mutagens formed during biological treatment.

In present work, rice hulls promoted the decrease of clastogenicity and mutagenicity of landfarming, indicating that supplemental treatments are important to improve the efficiency of bioremediation processes.

5. Conclusions

The addition of rice hulls in landfarming may constitute a cost-effective alternative for hydrocarbon bioremediation. The *A. cepa* bioassay was suitable to evaluate the biodegradation process in soils contaminated with petroleum sludge and could be routinely required to evaluate the pollutants detoxification in bioremediated soils.

Acknowledgements

We would like to thank Valdenilson José Alves de Oliveira for collection of soils and Foundation of Support the Research of São Paulo State (FAPESP) and Foundation for the Development of UNESP (FUNDUNESP) for the financial support.

References

Alexander, R.R., Tang, J., Alexander, M., 2002. Genotoxicity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment. *J. Environ. Qual.* 31, 150-154.

Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR – 6.457: Amostras de solo – Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização. Rio de Janeiro, 1986, 9p.

Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR – 14.283: Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro, 1999.

Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR - 10.007: Amostragem de resíduos. Rio de Janeiro, 2004.

Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R., 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Meth.* 32, 155–164.

Bartha, R., Pramer, D., 1965. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Sci.* 100, 68-70.

Cotelle, S., Masfarau, J.F., Féraud, J.F., 1999. Assessment of genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* – micronucleus and the *Tradescantia* – micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426, 67-171.

Crivelaro, S.H.R. Associação de borra oleosa de refinaria de petróleo e vinhaça visando a biodegradação. 2005. 62f. Monografia (Graduação em Ecologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP.

Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicid. *Pestic. Biochem. Phys.* 88, 252-259.

Fiskejö, G., 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102, 99-112.

Gömürgen, A.N., 2005. Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. *Cytologia* 70, 119-128.

Grant, W.F., 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. *Mutat. Res.* 99, 273-291.

Grover, I.S., Kaur, S., 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426, 183-188.

Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadžianas, L., Aoyama, I., Jedidid, N., 2007. Soil Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1926–1935.

Harmsen, J., 1991. Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated sites. In: Hinchee, R.E., Olfenbittel, R.F. (Eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*, Butterworth-Heinemann, London.

Hejazi, R.F., Husain, T., Khan, F.I., 2003. Landfarming operation of oily sludge in arid region—human health risk assessment. *J. Hazard. Mater.* 99, 287-302.

Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* 71, 95-122.

Kong, M.S., Ma, T.H., 1999. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. *Mutat. Res.* 426, 221-228.

Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54, 305-315.

Leme, D.M., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A., 2008. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquat. Toxicol.* 88, 214-219.

Oh, Y.S., Choi, W.Y.; Lee, Y.H.; Choi, S.C.; Kim, S.J., 2000. Biological treatment of oil contaminated sand: comparison of oil degradation based on thin-layer chromatography/flameionization detector and respirometric analysis. *Biotechnol. Lett.* 22, 595-598.

Plaza, G., Nalecz-Jawecki, G., Ulfig, k., Brigmon, R.L., 2005. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59, 289-296.

Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 20–33.

Rank, J., Nielsen, M.H., 1994. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat. Res.* 312, 17-24.

Riser-Roberts, E., 1998. Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Shimizu, N., Itoh, N, Utiyama, H., Wahl, G.M., 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase, J. Cell. Biol. 140, 1307-1320.

Türkoglu, S., 2007. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. Mutat. Res. 71, 127-131.

United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1994. Landfarming In: How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A guide for Corrective Action Plan reviews (EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007).

United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1996. Method 8015B. Nonhalogenated organics using GC/FID.

United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2008. Using TPH in risk – based corrective action. Shell Development Company.

Ururahy, A.F.P., Marins, M.D.M., Vital, R.L., Gabardo, I.T., Pereira Jr., N., 1998. Efeito da aeração na biodegradação de resíduo de petróleo. Rev. Microbiol. 29, 254-258.

Vasudevan, N., Rajaram, P., 2001. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. Environ. Int. 26, 409-411.

White, P.A., Claxton, L.D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. Mutat. Res. 567, 227-345.

Table 1. Physical and chemical characterization of the landfarming and control soil

Treatments	Texture			pH	OM	Nutrients					Heavy metals										
	Sand	Clay	Silt			Gravel	K	Ca	Mg	Al	S	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	Ba	Cd	Cr	Ni	Pb
CS	186.0	9.9	4.1	0.0	4.0	80.0	0.6	1.0	1.0	6.0	10.0	3.0	25.0	0.6	0.9	0.9	14.4	<0.01	11.9	<0.01	<0.01
L	39.5	41.1	19.4	0.0	5.0	115.0	1.8	75.0	27.0	1.0	760.0	195.0	112.0	13.8	3.2	84.8	493.4	<0.01	400.2	104.5	18.8

CS: Control soil

L: Landfarming

Texture: %; OM (Organic Matter): g/dm³; Nutrients: mmol/dm³; Heavy metals: mg/dm³

Table 2. Mitotic and chromosome abnormalities (MCA) in root meristem cells of *A. cepa* exposed to landfarming, before and after biodegradation

Treatments	MCA- continuous treatment			MCA- recovery treatment		
	Before biodegradation	After biodegradation	Reduction (%)	Before biodegradation	After biodegradation	Reduction (%)
Aqueous extract						
CS	2.00 ± 1.00	1.80 ± 2.10	-	1.26 ± 1.13	1.14 ± 0.99	-
L	6.66 ± 3.96 ^a	2.86 ± 2.30	57.06	5.00 ± 1.52 ^a	1.94 ± 1.52	61.20
LRH	6.00 ± 1.00 ^a	1.76 ± 1.78	70.66	5.00 ± 3.46 ^a	1.00 ± 0.53	80.00
Direct contact						
CS	1.54 ± 0.84	2.00 ± 1.00	-	1.80 ± 0.56	1.74 ± 0.30	-
L	9.33 ± 3.24 ^a	3.66 ± 2.26	60.77	5.73 ± 3.06 ^a	2.66 ± 0.72	53.57
LRH	10.00 ± 1.20 ^a	1.86 ± 1.60	80.40	6.00 ± 0.52 ^a	0.86 ± 0.51	85.66
Trifluraline	10.73 ± 4.25 ^a	11.00 ± 2.01 ^a	-	8.60 ± 1.10 ^a	12 ± 1.01	-

CS: control soil; L: landfarming; LRH: landfarming and rice hulls

^a Significant compared to the control soil using the statistical test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Values were expressed as mean ± standard deviation. Data obtained from 7500 cells observed per treatment.

Table 3. Types of mitotic and chromosome abnormalities (MCA) in root meristem cells of *A. cepa*, exposed to landfarming, before biodegradation

Treatments	Adherence	Break	Bridge	Others MCA
Continuous / Aqueous extract				
CS	0.06 ± 0.25	0.13 ± 0.35	0.40 ± 0.5	1.40 ± 0.82
L	1.46 ± 0.51 ^a	0.66 ± 0.48	2.33 ± 0.61 ^a	2.20 ± 1.20
LRH	0.46 ± 0.51	3.06 ± 1.16 ^a	1.73 ± 0.59 ^a	0.73 ± 0.59
Continuous / Direct contact				
CS	0 ± 0	0 ± 0	0.26 ± 0.45	1.26 ± 0.88
L	2.00 ± 1 ^a	2.40 ± 0.82 ^a	2.80 ± 0.67 ^a	2.13 ± 1.24
LRH	2.00 ± 0.92 ^a	2.73 ± 0.59 ^a	3.00 ± 0.75 ^a	2.27 ± 1.09
Trifluraline	0.33 ± 0.48	0.06 ± 0.25	1.13 ± 0.35	9.20 ± 1.65 ^a
Recovery / Aqueous extract				
CS	0.26 ± 0.45	0.06 ± 0.36	0.33 ± 0.61	0.60 ± 0.73
L	0 ± 0	3.00 ± 0.75 ^a	2.00 ± 1 ^a	0 ± 0
LRH	1.00 ± 0 ^a	2.00 ± 0.92 ^a	2.00 ± 1.19 ^a	0 ± 0
Recovery / Direct contact				
CS	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1.80 ± 0.67
L	1.00 ± 0 ^a	1.73 ± 0.59 ^a	3.00 ± 0.75 ^a	0 ± 0
LRH	0.33 ± 0.61	2.33 ± 1.39 ^a	2.00 ± 1.00 ^a	1.33 ± 0.89
Trifluraline	2.00 ± 0.92 ^a	0 ± 0	2.00 ± 1.00 ^a	4.60 ± 1.84 ^a

CS: control soil; L: landfarming; LRH: landfarming and rice hulls

^a Significant compared to the control soil using the statistical test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Others MCA: C-metaphase, multipolar anaphase, chromosome loss and polyploid cell

Values were expressed as mean ± standard deviation. Data obtained from 7500 cells observed per treatment

Table 4. Micronucleus (MN) in root meristem cells of *A. cepa* exposed to landfarming, before and after biodegradation

Treatments	MN- continuous treatment			MN- recovery treatment		
	Before biodegradation	After biodegradation	Reduction (%)	Before biodegradation	After biodegradation	Reduction (%)
Aqueous extract						
CS	0.93 ± 0.89	0.86 ± 0.10	-	0.93 ± 1.12	1.00 ± 0.9	-
L	3.00 ± 1.02 ^a	1.14 ± 0.51	62.00	1.13 ± 1.38	1.20 ± 1.34	-
LRH	4.26 ± 1.09 ^a	1.00 ± 1.4	76.52	2.00 ± 1.19	1.14 ± 1.38	43.00
Direct contact						
CS	0.86 ± 0.74	0.86 ± 0.40	-	0.86 ± 0.4	1.02 ± 0.92	-
L	4.00 ± 1.00 ^a	2.00 ± 0.96	50.00	2.26 ± 1.03 ^a	1.60 ± 3.5	29.20
LRH	4.86 ± 1.18 ^a	0.86 ± 0.10	82.30	2.60 ± 1.05 ^a	1.00 ± 0.0	61.53
Trifluraline	5.00 ± 1.13 ^a	8.86 ± 3.78 ^a	-	3.80 ± 3.01 ^a	7.46 ± 2.79 ^a	-

CS: control soil; L: landfarming; LRH: landfarming and rice hulls

^a Significant compared to the control soil using the statistical test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Values were expressed as mean ± standard deviation. Data obtained from 7500 cells observed per treatment

Table 5. Nuclear buds (NB) in root meristem cells of *A. cepa* exposed to landfarming, before and after biodegradation

Treatments	NB- continuous treatment			NB- recovery treatment		
	Before biodegradation	After biodegradation	Reduction (%)	Before biodegradation	After biodegradation	Reduction (%)
Aqueous extract						
CS	0.60 ± 0.90	0.86 ± 0.42	-	0.80 ± 1.4	0.96 ± 0.76	-
L	3.00 ± 3.68 ^a	0.64 ± 1.08	78.66	1.94 ± 2.24	1.46 ± 2.16	24.74
LRH	4.60 ± 1.84 ^a	0.70 ± 1.12	84.78	1.20 ± 1.5	0.70 ± 1.12	41.66
Direct contact						
CS	0.53 ± 0.45	0.93 ± 0.45	-	0.93 ± 0.96	0.66 ± 0.56	-
L	2.00 ± 1.52	0.26 ± 0.48	87.00	3.06 ± 5.92 ^a	1.00 ± 0.53	67.32
LRH	1.53 ± 2.68	0.13 ± 0.35	91.50	3.00 ± 1.02 ^a	0.82 ± 1.4	73.2
Trifluraline	3.46 ± 5.36 ^a	4.00 ± 2.68 ^a	-	3.00 ± 1.02 ^a	3.00 ± 2.88 ^a	-

CS: control soil; L: landfarming; LRH: landfarming and rice hulls

^a Significant compared to the control soil using the statistical test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Values were expressed as mean ± standard deviation. Data obtained from 7500 cells observed per treatment

Table 6. Types of mitotic and chromosome abnormalities (MCA) in root meristem cells of *A. cepa*, exposed to landfarming, after biodegradation

Treatments	Adherence	Break	Bridge	Others MCA
Continuous / Aqueous extract				
CS	0.06 ± 0.25	0.0 ± 0.0	0.20 ± 0.41	1.54 ± 0.99
L	0.94 ± 0.79	1.00 ± 0.0 ^a	0.13 ± 0.35	0.74 ± 0.45
LRH	0.33 ± 0.72	0.06 ± 0.25	0.80 ± 0.94	0.57 ± 0.63
Continuous / Direct contact				
CS	0.47 ± 0.51	0.06 ± 0.25	0.0 ± 0.0	1.47 ± 0.83
L	0.0 ± 0.0	2.00 ± 0.92 ^a	0.66 ± 0.48	0.0 ± 0.0
LRH	0.53 ± 0.83	0.60 ± 0.5	0.53 ± 0.63	0.20 ± 0.41
Trifluraline	0.34 ± 0.72	0.06 ± 0.25	1.27 ± 0.88 ^a	9.33 ± 1.17 ^a
Recovery / Aqueous extract				
CS	0.26 ± 0.45	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.86 ± 0.83
L	0.0 ± 0.0	1.00 ± 0.37 ^a	0.94 ± 0.79	0.0 ± 0.0
LRH	0.53 ± 0.63	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.46 ± 0.51
Recovery / Direct contact				
CS	0.33 ± 0.6	0.54 ± 0.63	0.0 ± 0.0	0.86 ± 0.74
L	0.0 ± 0.0	1.06 ± 0.45 ^a	1.00 ± 0.37 ^a	0.60 ± 0.63
LRH	0.26 ± 0.45	0.06 ± 0.25	0.13 ± 0.35	1.07 ± 0.59
Trifluraline	0.60 ± 0.74	0.06 ± 0.25	1.27 ± 0.88 ^a	10.07 ± 3.03 ^a

CS: control soil; L: landfarming; LRH: landfarming and rice hulls

^a Significant compared to the control soil using the statistical test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Others MCA: C-metaphase, multipolar anaphase, chromosome loss and polyploid cell

Values were expressed as mean ± standard deviation. Data obtained from 7500 cells observed per treatment

LEGEND

Figure 1. Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) (g/Kg) presents in landfarming (L), before biodegradation and in landfarming and landfarming in conjunction with rice hulls (LRH), after biodegradation.

Detection limit (g/Kg): 2.90

Quantification limit (g/kg): 8.70

Figure 2. Release of CO₂ (mmol/g soil) in landfarming soil (L) and landfarming soil and rice hulls (LRH). Values are means of triplicate measurements.

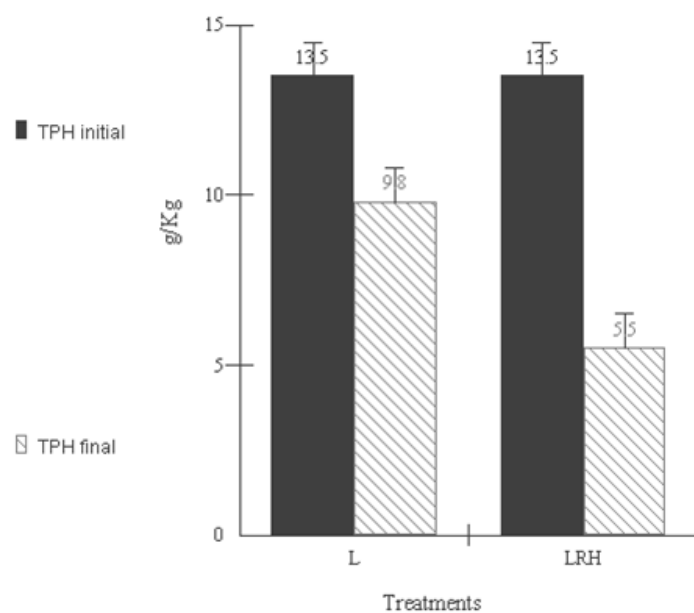


FIGURE 1

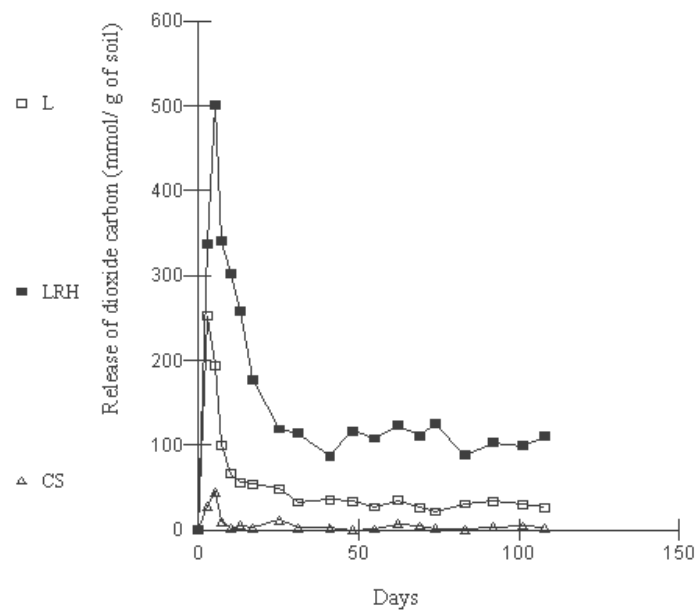


FIGURE 2

7.3. The effects of two agricultural residues on the bioremediation and genotoxicity of soil contaminated with petroleum refinery sludge

Esse artigo foi submetido ao periódico **Water, Air and Soil Pollution**.

The effects of two agricultural residues on the bioremediation and genotoxicity of soil contaminated with petroleum refinery sludge

Tatiana da Silva Souza^a, Fabiana Aparecida Hencklein^b, Dejanira de Franceschi de Angelis^b, Carmem Silvia Fontanetti^a

^aDepartment of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Av. 24A, no. 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

Rio Claro, Brazil

^bDepartment of Biochemistry and Microbiology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Av. 24A, no. 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

Rio Claro, Brazil

Correspondence to: Carmem Silvia Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, nº 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil

Phone: (55) 19 3526-4156, FAX: (55) 19 3526-4136

e-mail: fontanet@rc.unesp.br

Abstract

Landfarming is a bioremediation technology designed to reduce the concentration of organic contaminants in the soil. It has been widely used by refineries to treat the sludge produced during oil refinement. Supplementary treatments, such as adding bulking agents and nutrients to the soil, can be used to accelerate this process. In this study, rice hulls and vinasse were used for this purpose. The total petroleum hydrocarbon (TPH) concentration was measured at the beginning and end of the experiments, as well as the genotoxic activity of the soil using *Allium cepa* bioassays. At the beginning of the experiments, a high TPH concentration, 17.28 g/kg, and a high genotoxic activity ($p < 0.05$) were detected in soil samples from a landfarming site. After 33 days, the TPH concentration in the untreated landfarming soil sample was reduced by 8.77%, but genotoxic levels remained unaltered. In the landfarming soil sample treated with vinasse, the TPH concentration decreased by 12.96%, while genotoxic and mutagenic activities were enhanced ($p < 0.05$). In the landfarming soil sample treated with rice hulls alone or rice hulls combined with vinasse, there were significant reductions in the TPH concentration, 46.56% and 51.01%, respectively, and in genotoxicity ($p < 0.05$). Based upon these results, rice hulls combined with vinasse or rice hulls alone or may be routinely used in the bioremediation of soils contaminated with petroleum sludge. On the other hand, vinasse was not sufficient to accelerate the bioremediation and decrease the genotoxicity of landfarming.

Keywords: landfarming, oil refinery, vinasse, rice hull, *Allium cepa*

1. Introduction

Industrial and agricultural activities produce large quantities of residues that are often discarded into the soil and may contain polluting substances. Bioremediation and the recycling of wastes are alternative techniques that are used to minimize the possible environmental effects caused by improper disposal and ineffective treatments of these residues.

In petroleum refineries, oily sludge produced during the refining process is spread on the upper layers of soil, in a system termed landfarming. Through aerobic respiration, microorganisms use the organic compounds present in the residues as substrates for growth and energy production. Thus, contaminants are converted into CO₂, H₂O and biomass (Harmsen 1991).

Although very common, landfarming can be inefficient, as organic residues may require long periods of time to be completely biodegraded (Khan et al. 2004). However, several strategies can be used to optimize this process, including the addition of bulking materials and nutrients to the soil (Hamdi et al. 2007).

Rice hulls are organic residues derived from rice milling. Brazil is among the world's ten largest rice producers and currently, nearly 12 million tons of rice hulls are produced in the country (Della et al. 2001). Rice hulls are rich in organic material (80%) and oxidizable organic carbon (34%), and have a high carbon to nitrogen ratio (ranging from 50 to 150) and high water retention capacity (Iranzo et al. 2004). Addition of rice hulls to the soil can decrease soil compaction, increase porosity, and consequently, can increase the diffusion of oxygen between solid particles, thus accelerating microbial activity (Vasudevan and Rajaram 2001). Because of these characteristics, the addition of rice hulls into soils contaminated with petroleum sludge and its by-products may be an environmentally viable recycling alternative. Some studies have demonstrated the effectiveness of this procedure. Hamdi et al. (2007) showed that rice hulls considerably decreased polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) concentrations and increased microbial activity in a contaminated soil.

Vinasse is an effluent of ethanol production from sugarcane. In Brazil, the annual production of vinasse is about 170 billion liters. This effluent has been widely recycled as fertilizer in agricultural soils because it is rich in nitrogen (N), phosphorous (P), sulfur (S), iron (Fe), magnesium (Mg), calcium (Ca), and sodium (Na). Minihoni et al. (1987) demonstrated that vinasse, when added to soil, modifies some of the chemical

and biological characteristics of the soil, increasing the soil pH and promoting microbial activity. To examine the effects of vinasse on the bioremediation of organic pollutants, Prata et al. (2001) used this effluent to accelerate the degradation of the herbicide ametryn in the soil. Crivelaro (2005) combined vinasse with petroleum sludge and observed an increase in the quantity of microorganisms, especially fungi, and an increase in the efficiency of bioremediation. Pinto-Mariano et al. (2006), however, obtained unsatisfactory results when using vinasse to bioremediate diesel-contaminated soils.

The efficacy of bioremediation of soils contaminated with petroleum sludge has been most commonly evaluated through the rate of disappearance of total contaminants, such as the analysis of total petroleum hydrocarbons (TPH levels) (Marin et al. 2005; Huang et al. 2005). These analyses, however, do not provide information on the toxicity of sites after bioremediation (Plaza et al. 2005). Thus, complementary information, such as that obtained from biological assays, has been increasingly required for the accurate evaluation of the bioremediated soil.

The assessment of mitotic and chromosomal abnormalities and micronuclear induction in *Allium cepa* cells is considered an efficient method to evaluate environmental quality. This species has few chromosomes ($2n = 16$), making observation of genetic damage easier (Grant 1982; Leme et al. 2008). In addition, *A. cepa* is one of the plant species most sensitive to genotoxic and mutagenic agents, due to the size of its chromosomes and the large quantity of metacentric chromosomes (Ma et al. 1995).

This study was aimed at investigating the effects of two agricultural residues, rice hulls and vinasse, on the bioremediation and genotoxicity of soil from a landfarming site of a petroleum refinery, using TPH levels and the *A. cepa* bioassay.

2. Materials and methods

2.1. Soil samples

Soil samples from a landfarming facility at an oil refinery were collected in 2007 according to the technical procedure NBR-10.007 of the Brazilian Association of Technical Standards (ABNT, 2004). The total landfarming area of the oil refinery is 40,000 m² with a capacity to treat 800 m³ of petroleum sludge monthly.

Soil samples from the Itirapina Ecological Station, managed by the Forest Institute of São Paulo State, Brazil, were used as control soil (CS). The area of this preserve comprises approximately 2300 hectares of natural vegetation. Soil sampling was carried out according to the Technical Procedure NBR-6.457 of the Brazilian Association of Technical Standards (ABNT, 1986).

After collection, soil samples were maintained at 4°C until use.

2.2. Vinasse

Vinasse was collected at the Santa Lucia Mill, located in the city of Araras, São Paulo State, Brazil, according to the Technical Procedure P4.231 of the Company of Environmental Sanitation Technology (CETESB 2006). The effluent was maintained at 4°C until use.

2.3. Physical and chemical analysis

The landfarming and control soil samples were examined for the following physical and chemical parameters: texture, pH, organic matter content, nutrient concentration (K, Ca, Mg, Al, S, Na, Fe, Mn, Cu, and Zn), metal concentrations (Ba, Cd, Cr, Ni, and Pb) and TPH concentration.

Vinasse was characterized based on pH, total P and N concentrations, nutrient concentration (K, Ca, Al, S, Na, Fe, Mn, Cu, Zn, and B), and metal concentration (Ba, Cd, Cr, Ni, and Pb).

The metal analyses were conducted using a plasma emission spectrometer (ICP). These analyses were carried out at the Institute of Soil and Fertilizer Analysis of Campinas (ICASA), Campinas, São Paulo State, Brazil.

The concentration of TPH was determined according to the method USEPA 8015B, by the Analytical Technology Company, São Paulo, Brazil.

2.4. Bioremediation

Soil samples were dried and passed through a 1.62-mm sieve. Twenty-liter buckets were filled with 10 L of soil (control or landfarming), yielding 30-cm soil columns. Each experiment was conducted in triplicate. For effective bioremediation, soil moisture should be between 40% and 85% of field capacity. Thus, soil moisture was adjusted to 70% of field capacity (USEPA 1994). Water or vinasse was then added

to soil samples, depending on the treatment. In the treatments using rice hulls, hulls were added to a concentration of 5% of the total volume of soil in buckets. Thus, the following treatments were set up: control soil (CS); landfarming (L); landfarming and rice hulls (LRH); landfarming and vinasse (LV); landfarming, rice hulls, and vinasse (LRHV). The ideal range of temperature for bioremediation of petroleum sludge through landfarming is between 10 °C and 45 °C (USEPA 1994). During the experiment, the temperature ranged from 26 °C to 36 °C.

The effects of rice hulls and vinasse on the bioremediation of landfarming soil were measured through analysis of TPH concentration in each treatment sample after 33 days. Concentrations were expressed using mean values and standard deviation of independent measurements carried out on replicates of control soil and landfarming treated samples. The analyses were conducted by the Analytical Technology Company, São Paulo, Brazil according to the USEPA 8015B method.

2.5. The *A. cepa* bioassay

Aqueous soil extracts were prepared according to Cotelle et al. (1999). Approximately 50 g of soil for each replicate (CS, L, LRH and LRHV) were added to 300 mL of ultrapure water. The mixture was stirred for 24 h and then stored for another 24 h at room temperature (25±2 °C). The supernatant was collected and the aqueous extracts without any further filtration process were used for the germination of *A. cepa* seeds.

Seeds of *A. cepa* were allowed to germinate in Petri dishes lined with filter paper that were moistened with aqueous soil extracts or with samples of the soils (direct contact). Three Petri dishes were used per treatment.

The positive control contained the herbicide trifluraline at a concentration of 0.84 mg/Kg. This herbicide is known to be a potent inducer of chromosome aberrations in *A. cepa* (Fernandes et al. 2007).

The bioassay in *A. cepa* was performed according to Grant (1982). For the continuous treatment, after 5 days, when radicles of *A. cepa* reached approximately 1-2 cm, some radicles were collected and fixed in Carnoy I (3:1 methanol/acetic acid). The remaining radicles were transferred to a Petri dish containing ultrapure water for a 48 h recovery treatment. After fixation, radicles were hydrolyzed in 1N HCl at 60°C for 10 min and later stained with Schiff Reagent for 2 h in the dark. The roots tips were

sectioned, placed on slides, cover-slipped, and smashed. Cover slips were removed in liquid nitrogen and the slides were mounted with Entellan or Permount. Fifteen slides were prepared for each treatment and a total of 7500 cells were counted (500 cells/slides). The slides were analyzed under a light microscope at a magnification of 400x.

Several types of abnormalities within different cell division stages (metaphase, anaphase, and telophase) were considered: chromosomal breaks, losses and bridges, adherences, multipolar anaphases, polyploidy, and C-metaphases. All of these abnormalities were classified as mitotic and chromosome abnormalities. The micronuclei (MN) and nuclear buds (NB) induction in the meristematic cells of *A. cepa* was evaluated separately from mitotic and chromosome abnormalities. Treatments were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). The results were expressed as the mean \pm standard deviation of three replicates.

3. Results

3.1. Physical and chemical analysis

The control soil was classified as sandy with pH 4, and contained low organic matter content (8.00 g/kg), and low metal concentrations. The concentration of TPH was below the detection limit (Table 1).

Landfarming soil was classified as clay with pH 5, and contained high organic material content (160.00 g/kg) and high concentration of metals, mainly Cr (731.79 mg/kg) and Ba (658.19 mg/kg). The TPH concentration was also high, at 17.28 g/kg (Table 1).

Despite the differences between the soil samples from the landfarming site and the Itirapina Ecological Station site, the latter was used as a control as it represents the typical soil of São Paulo State, the “cerrado” (Brazilian savanna) soil.

The vinasse-treated soil sample had a pH 3.85, a low organic matter content (3.96 g/kg), 0.22% N, a large amount of nutrients, mainly S, Ca, Mg, Na, Fe, and P, and low metal concentrations (Table 1).

3.2. Bioremediation

After bioremediation, in the LRH treatment, the concentrations of K, Ca, Mg, S, Na, Fe, and Mn increased. The LV treatment promoted an increase mainly in the concentrations of K, S, and Zn. In the LRHV treatment, a pronounced increase in the concentration of K was observed, as well as increases in Na, Mg, and B concentrations. The LV treatment promoted an increase in Cd concentration (Table 2).

After bioremediation, the TPH concentration in the control soil sample was below the detection limit, while in the landfarming soil sample, the TPH concentration decreased by 8.77% (15.76 g/kg) compared to the initial concentration (17.28 g/kg). In the LV treatment, the TPH concentration was 15.04 g/kg, a reduction of 12.96%. The LRH and LRHV treatments had the lowest TPH concentrations, 9.23 g/kg and 8.46 g/kg respectively, and consequently, the largest magnitude of hydrocarbon reduction compared to the initial landfarming sample, 46.56% and 51.01% reductions (Figure 1).

3.3. *Allium cepa* bioassay

Compared to the control soil, all treatments induced significant levels ($p < 0.05$) of mitotic and chromosomal abnormalities (Table 3), micronuclei (Table 4), and nuclear bud formation (Table 5) in *A. cepa*.

After bioremediation, the genotoxicity and mutagenicity levels of the LRHV treated soil samples were reduced considerably in the continuous/direct contact, recovery/aqueous extract, and recovery/direct contact experiments (Tables 3, 4 and 5).

The LRH soil treatment reduced the genotoxicity and mutagenicity in *A. cepa* in the continuous experiment as well as in the recovery experiment (Tables 3, 4 and 5).

The L and LV treatments showed the lowest index of reduction of genotoxicity and mutagenicity (Tables 3, 4, and 5). In the LV treatment, the micronuclear induction increased in the continuous/aqueous extract, continuous/direct contact recovery/aqueous extract, and recovery/contact direct experiments.

4. Discussion

The physical and chemical characteristics of a soil before bioremediation directly influence microbial activity. The ideal pH range for bacterial and fungal growth is between 6 and 8 (USEPA 1994). Thus, in more acidic soils, biodegradation of hydrocarbons can be negatively affected (Marin et al. 2005). Clay soils have low

permeability and are very compact, characteristics that make aeration and even distribution of nutrients difficult (USEPA 1994). Soils with a high content of organic material tend to adsorb high molecular weight hydrocarbons, decreasing the concentration of these contaminants in the aqueous and gas phases of the soil (Labud et al. 2007), as well as decreasing access to the microorganisms that degrade these hydrocarbons. Soils with TPH concentration between 10 and 50 g/kg can be toxic to most organisms. In landfarming sites, metals accumulate in the upper layers of soil, as they are not biodegraded by microorganisms. High concentrations of these compounds may inhibit bacterial growth and development (USEPA 1994).

Researchers agree that chemical analyses alone are not capable of predicting the risks associated with contaminated environmental samples. Therefore, biological assays have been recommended (Plaza et al. 2005). The results of the chemical analyses for the landfarming soil samples examined in this study were associated with a significant induction of mitotic and chromosomal abnormalities and nuclear buds in *A. cepa*, seen in both continuous and recovery experiments. The two methods of exposure used, aqueous extract and direct contact, demonstrated that fractions of water-soluble and insoluble contaminants could be dangerous to organisms exposed to landfarming soil (Souza et al. 2009).

The increase in mitotic and chromosomal abnormalities is a warning signal in environmental monitoring studies, as these abnormalities often lead to the formation of micronucleated cells during the cell cycle. The presence of micronuclei demonstrated the mutagenic potential of the landfarming soil, as micronuclei are believed to form during cell division, as a result of chromosomal breaks and/or disturbances during the mitotic process due to spindle abnormalities (Lindberg et al. 2007).

Recently, Crott et al. (2001) studied folic acid deficiency in human lymphocytes and confirmed that the presence of nuclear buds may be used as biomarkers of genetic damage. The formation of micronucleated cells, through the elimination of genetic material in nuclear buds has also been suggested (Fenech and Crott 2002, Lindberg et al. 2007). However, the mechanism is not yet fully understood (Lindberg et al. 2007).

To improve the landfarming techniques of the oil refinery, the effects of vinasse and rice hulls in the bioremediation and toxicity of the soil were examined.

Landfarming soil without treatment had the lowest reduction of TPH levels, indicating that the fraction of lighter hydrocarbons was rapidly biodegraded and that longer periods of time are required for the biodegradation of more complex

hydrocarbons. Marin et al. (2005) showed that 80% of the TPH in landfarming soil were eliminated in 11 months.

The treatments with rice hulls and/or vinasse promoted an increase in the concentration of essential nutrients for microbial metabolism, including S, Ca, Mg, and Fe, among others (Jacques et al. 2007).

However, with the addition of vinasse, the TPH concentration was reduced by only 12.96%. Pinto-Mariano et al. (2006) reported that this effluent was not efficient in the bioremediation of soils contaminated with petroleum sludge. In their study, vinasse was biodegraded primarily during the first 20 days of the experiment, with a striking decrease in the microbial activity after the consumption of this effluent. In the present work, significant levels of mitotic and chromosomal abnormalities and micronuclei, after bioremediation, showed that the vinasse increased the genotoxic and mutagenic activity of landfarming soil.

When vinasse was used in combination with rice hulls, a striking decrease in the TPH concentration and genotoxicity and mutagenicity in *A. cepa* was observed.

Rice hulls were efficient in the bioremediation and reduction of genotoxicity of landfarming soil. This agricultural residue acts as bulking agent in the soil, promoting aeration and distribution of nutrients and, consequently, microbial activity (Hamdi et al. 2007). In landfarming soil treated with rice hulls, the rate of CO₂ released by microorganisms was 4.21 times higher than in untreated landfarming soil, indicating that rice hulls accelerated the bioremediation of hydrocarbon oil (Souza et al. 2009). Rice hulls are rich in biopolymers (32.24% cellulose, 21.44% hemicelluloses and 21.44% lignin) (Iranzo et al. 2004). According to Nakamura et al. (2003) and Hamdi et al. (2007), the addition of this material to the soil increases active decomposition of cellulose and also increases the degradation hydrocarbons of four or fewer aromatic rings.

6. Conclusion

Rice hulls may be recommended for routine use in the bioremediation of soils contaminated with petroleum sludge. On the other hand, vinasse was not sufficient to accelerate the bioremediation and to decrease the genotoxicity of landfarming soil. Therefore, the biological effects of vinasse need to be further investigated, especially

regarding the toxicity and genotoxicity of this effluent. The *A. cepa* assay should be required by regulatory agencies to adequately evaluate the quality bioremediated soils.

Acknowledgements

We would like to thank the Foundation of Support the Research of São Paulo State (FAPESP) and the Foundation for the Development of UNESP (FUNDUNESP) for financial support, Valdenilson José Alves de Oliveira for collection of soils, and Sandra Veloso for technical support.

References

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR - 6457: Amostras de solo – Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização. Rio de Janeiro, 1986. 9p.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR - 10.007: Amostragem de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004. 25p.

Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Norma Técnica P4.231: Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação em solo agrícola. São Paulo, 2006, 17p.

Cotelle, S., Masfaraud, J.F., Féraud, J.F. (1999). Assessment of genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* – micronucleus and the *Tradescantia* – micronucleus assays. *Mutation Research*, 426, 67-171.

Crivelaro, S.H.R. (2005). Associação de borra oleosa de refinaria de petróleo e vinhaça visando a biodegradação. Monograph, Universidade Estadual Paulista.

Crott, J.W., Mashiyama, S.T., Ames, B.N., Fenech, M. (2001). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism does not alter folic acid deficiency-induced uracil incorporation into primary human lymphocyte DNA in vitro. *Carcinogenesis*, 22, 1019-1025.

Della, V.P., Kuhn, I., Hotza, D. (2001). Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica. *Química Nova*, 24, 778-782.

Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 252-259.

Fenech, M., Crott, J.W. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*, 504, 131-136.

Grant, W.F. (1982). Chromosome aberration assays in *Allium*. *Mutation Research*, 99, 273-291.

Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadžianas, L., Aoyama, I., Jeddid, N. (2007). Soil bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 1926-1935.

Harmsen, J. (1991). Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated sites. In: Hinchee RE, Olfenbuttel RF (ed). *On-Site bioreclamation: processes for xenobiotic and hydrocarbon treatment*. Butterworth-Heinemann, London.

Huang, X.-D., El-Alawi, Y., Gurska, J., Glick, B.R., Greenber, B.M. (2005). A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal*, 81, 139-147.

Iranzo, M., Cañizares, J.V., Roca-Perez, L., Sainz-Pardo, I., Mormeneo, S., Boluda, R. (2004). Characteristics of rice straw and sewage sludge as composting materials in Valencia (Spain). *Bioresource Technology*, 95, 107-112.

Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Antonioli, Z.I., Camargo, F.A.O. (2007). Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, 37, 1192-1201.

Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal Environmental Management*, 71, 95-122.

Labud, V., Garcia, C., Hernandez, T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66, 1863–1871.

Leme, D.M., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A. (2008). Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquatic Toxicology*, 88, 214-219.

Lindberg, H.K., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G.C.-M., Norppa, H., Fenech, M. (2007). Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research*, 617, 33-45.

Ma, T.-H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H. (1995). The improve *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, 334, 185-195.

Marin, J.A., Hernandez, T., Garcia, C. (2005). Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: influence on soil microbial activity. *Environmental Research*, 98, 185-195.

Minhoni, M.T.A., & Cerri, C.C. (1987). Decomposição de vinhaça em solo sob diferentes níveis de umidade: liberação de CO₂, formação de biomassa microbiana e imobilização do nitrogênio adicionado. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 11, 25-30.

Nakamura, A., Tun, C.C., Asakawa, S., Kimura, M. (2003). Microbial community responsible for the decomposition of rice straw in a paddy field: estimation by phospholipid fatty acid analysis. *Biology and Fertility of Soils*, 38, 288–295.

Pinto-Mariano, A., Crivelaro, S.H.R., Angelis, D.F., Bonoto, D.M. (2006). Use of vinasse, an ethanol distillery waste, as an amendment to bioremediation of diesel oil contaminated soils. In: Proceedings of XXII Interamerican Confederation of Chemical Engineering, Buenos Aires, Argentina.

Plaza, G., Nalecz-Jawecki, G., Ulfig, K., Brigmon, R. (2005). The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*, 59, 289-296.

Prata, F., Lavorenti, A., Reginato, J.B., Tornisielo, V.L. (2001). Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36, 975-981.

Souza, T.S., Hencklein, F.A., Angelis, D.F., Gonçalves, R.A., Fontanetti, C.S. (2009). The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 72, 1363-1368.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1994). Landfarming. In: How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan reviews (EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007)

Vasudevan, N. & Rajaram, P. (2001). Bioremediation of oil sludge contaminated soil. *Environment International*, 26, 409-411.

Table 1. Physical and chemical characterization of the soils and of the vinasse

Parameters	Control soil	Landfarming	Vinasse
% Clay (< 0.02 mm)	9.90	47.90	x
% Silt (0.002 – 0.06 mm)	4.10	21.90	x
% Sand (0.06 – 2 mm)	86.00	30.20	x
% Gravel (2 – 60 mm)	0.0	0.0	x
pH (CaCl ₂)	4	5	3.85
Organic matter (g/Kg)	8.00	106.00	3.96
P total (ppm)	x	x	65.00
N (%)	x	x	0.22
K (mmolc/dm ³)	0.60	2.80	0.32
Ca (mmolc/dm ³)	1.00	66.00	740.00
Mg (mmolc/dm ³)	1.00	27.00	210.00
Al (mmolc/dm ³)	6.00	1.00	72.00
S (mmolc/dm ³)	10.00	852.00	835.00
Na (mmolc/dm ³)	3.00	320.00	113.00
Fe (mmolc/dm ³)	25.00	54.00	97.50
Mn (mmolc/dm ³)	0.60	7.80	-
Cu (mmolc/dm ³)	0.90	1.50	-
Zn (mmolc/dm ³)	0.90	39.0	7.50
B (mmolc/dm ³)	0.20	2.70	5.00
TPHs (g/Kg)	-	17.20	x
Ba (mg/Kg)	14.40	658.10	0.50
Cd (mg/Kg)	< 0.01	1.40	1.06
Cr (mg/Kg)	11.90	731.70	0.15
Ni (mg/Kg)	< 0.01	69.69	0.26
Pb (mg/Kg)	< 0.01	94.38	<0.01

- Result below the detection limit

x Analysis not requested

Table 2. Physical and chemical characterization of the landfarming treatments after 33 days of bioremediation

Parameters	L	LRH	LV	LRHV
pH (CaCl ₂)	5.0	5.1	5.1	5.1
K (mmolc/dm ³)	2.10	4.00	9.50	19.00
Ca (mmolc/dm ³)	63.00	88.00	80.00	61.00
Mg (mmolc/dm ³)	28.00	41.00	36.00	29.00
Al (mmolc/dm ³)	1.00	1.00	1.00	-
S (mmolc/dm ³)	878.00	998.00	1056.00	904.00
Na (mmolc/dm ³)	200.00	370.00	260.00	400.00
Fe (mmolc/dm ³)	46.00	58.00	38.00	55.00
Mn (mmolc/dm ³)	7.40	9.70	7.70	10.70
Cu (mmolc/dm ³)	1.20	1.70	1.20	1.60
Zn (mmolc/dm ³)	33.00	39.00	56.10	32.00
B (mmolc/dm ³)	2.50	2.60	2.40	3.20
Ba (mg/Kg)	514.90	532.00	511.50	563.00
Cd (mg/Kg)	1.40	1.60	3.83	1.20
Cr (mg/Kg)	345.00	390.40	380.10	390.70
Ni (mg/Kg)	68.60	71.90	62.70	68.80
Pb (mg/Kg)	70.20	77.40	78.20	86.40

L: landfarming; LRH: landfarming and rice hulls; LV: landfarming and vinasse; LRHV: landfarming, rice hulls and vinasse

- Result below the detection limit

Table 3. Mitotic and chromosome abnormalities (MCA) in root meristem cells of *A. cepa* exposed to landfarming treatments, before and after bioremediation

Treatments	MCA – continuous treatment			MCA – recovery treatment		
	Before bioremediation	After bioremediation	Reduction (%)	Before bioremediation	After bioremediation	Reduction (%)
Aqueous extract						
CS	1.06 ± 1.43	0.86 ± 0.51	-	1.20 ± 1.01	0.89 ± 0.77	-
L	4.04 ± 1.86 ^a	2.00 ± 1.13	50.49	4.06 ± 1.75 ^a	2.33 ± 1.75	42.61
LRH	4.33 ± 3.26 ^a	1.26 ± 1.33	70.90	4.89 ± 2.16 ^a	2.00 ± 1.88	59.10
LV	4.13 ± 1.88 ^a	2.33 ± 1.17 ^a	43.58	4.13 ± 2.99 ^a	2.20 ± 2.11	46.73
LRHV	4.73 ± 1.16 ^a	0.46 ± 0.74	90.27*	4.06 ± 1.43 ^a	1.06 ± 1.53	73.89
Direct contact						
CS	1.00 ± 1.06	0.86 ± 0.99	-	1.03 ± 0.98	1.00 ± 1.06	-
L	5.26 ± 2.43 ^a	5.26 ± 3.08 ^a	-	7.73 ± 2.54 ^a	2.80 ± 1.47	63.77
LRH	6.13 ± 3.35 ^a	2.00 ± 1.13	67.37	7.13 ± 1.59 ^a	2.73 ± 1.90	61.71
LV	6.06 ± 2.93 ^a	5.46 ± 3.87 ^a	9.90	6.00 ± 2.47 ^a	5.00 ± 0.0 ^a	16.66
LRHV	7.20 ± 2.75 ^a	2.13 ± 1.40	70.41	7.20 ± 2.24 ^a	1.06 ± 1.09	85.27
Trifluraline	6.73 ± 4.36 ^a	6.40 ± 3.13 ^a	-	10.66 ± 1.98 ^a	9.00 ± 2.64 ^a	-

CS: control soil; L: landfarming; LRH: landfarming and rice hulls; LV: landfarming and vinasse; LRHV: landfarming, rice hulls and vinasse

^a Significant compared to the control soil using the statistical test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Values were expressed as mean ± standard deviation. Data obtained from 7500 cells observed per treatment

* Reducing the frequency of AMC can not be considered because this treatment was cytotoxic to *A. cepa* root cells

Table 4. Micronucleus (MN) in root meristem cells of *A. cepa* exposed to landfarming treatments, before and after bioremediation

Treatments	MN – continuous treatment			MN – recovery treatment		
	Before bioremediation	After bioremediation	Reduction (%)	Before bioremediation	After bioremediation	Reduction (%)
Aqueous extract						
CS	0.73 ± 1.09	1.00 ± 1.30	-	0.80 ± 0.77	1.00 ± 0.37	-
L	5.40 ± 4.32 ^a	3.80 ± 3.36	29.62	3.66 ± 1.04 ^a	4.33 ± 4.63 ^a	-
LRH	3.33 ± 2.63 ^a	1.00 ± 1.36	69.69	3.86 ± 1.40 ^a	1.86 ± 1.12	51.81
LV	3.33 ± 1.01 ^a	4.93 ± 0.968 ^a	-	4.00 ± 1.00 ^a	5.20 ± 0.94	-
LRHV	3.13 ± 1.24 ^a	0.60 ± 0.98	80.83*	3.80 ± 1.74 ^a	1.46 ± 0.83	61.57
Direct contact						
CS	0.71 ± 0.95	0.88 ± 0.65	-	0.91 ± 1.00	0.80 ± 0.77	-
L	5.13 ± 2.19 ^a	2.46 ± 2.23	52.04	4.73 ± 2.12 ^a	2.46 ± 0.63	38.50
LRH	6.86 ± 1.92 ^a	1.80 ± 0.94	73.76	4.00 ± 1.06 ^a	1.60 ± 1.05	60.00
LV	4.20 ± 1.14 ^a	5.00 ± 0.84	-	5.00 ± 1.81 ^a	6.00 ± 1.00 ^a	-
LRHV	4.26 ± 1.27 ^a	0.26 ± 0.45	92.63	4.06 ± 2.89 ^a	1.06 ± 0.79	73.89
Trifluraline	6.33 ± 2.09 ^a	4.73 ± 5.14 ^a	-	6.73 ± 1.98 ^a	7.66 ± 2.19	-

CS: control soil; L: landfarming; LRH: landfarming and rice hulls; LV: landfarming and vinasse; LRHV: landfarming, rice hulls and vinasse

^a Significant compared to the control soil using the statistical test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Values were expressed as mean ± standard deviation. Data obtained from 7500 cells observed per treatment

* Reducing the frequency of MN can not be considered because this treatment was cytotoxic to *A. cepa* root cells

Table 5. Nuclear buds (NB) in root meristem cells of *A. cepa* exposed to landfarming treatments, before and after bioremediation

Treatments	NB – continuous treatment			NB – recovery treatment		
	Before bioremediation	After bioremediation	Reduction (%)	Before bioremediation	After bioremediation	Reduction (%)
Aqueous extract						
CS	0.53 ± 0.91	0.86 ± 1.06	-	0.86 ± 0.56	1.20 ± 0.67	-
L	3.00 ± 1.69 ^a	2.00 ± 1.36	33.33	2.06 ± 1.38 ^a	1.53 ± 0.74	25.72
LRH	3.60 ± 2.06 ^a	1.26 ± 0.96	65.00	3.00 ± 1.41 ^a	1.93 ± 0.88	35.66
LV	3.20 ± 2.04 ^a	2.40 ± 2.77	25.00	3.46 ± 1.24 ^a	2.60 ± 0.98	24.85
LRHV	3.46 ± 3.50 ^a	0.40 ± 0.90	88.43*	2.80 ± 1.01 ^a	1.46 ± 0.63	35.00
Direct contact						
CS	0.80 ± 0.77	0.91 ± 1.00	-	0.71 ± 0.95	1.06 ± 0.59	-
L	6.46 ± 1.68 ^a	1.86 ± 0.74	71.20	7.53 ± 1.92 ^a	5.13 ± 1.64 ^a	31.87
LRH	3.40 ± 3.60 ^a	0.53 ± 0.63	84.41	3.46 ± 1.24 ^a	1.00 ± 0.75	71.09
LV	4.00 ± 1.46 ^a	1.06 ± 0.88	73.50	4.40 ± 1.29 ^a	2.40 ± 1.30	45.45
LRHV	4.00 ± 2.77 ^a	0.40 ± 0.50	90.00	3.06 ± 1.79 ^a	0.53 ± 0.63	82.67
Trifluraline	4.20 ± 1.08 ^a	4.66 ± 1.75 ^a	-	10.86 ± 3.33 ^a	9.86 ± 1.33 ^a	-

CS: control soil; L: landfarming; LRH: landfarming and rice hulls; LV: landfarming and vinasse; LRHV: landfarming, rice hulls and vinasse

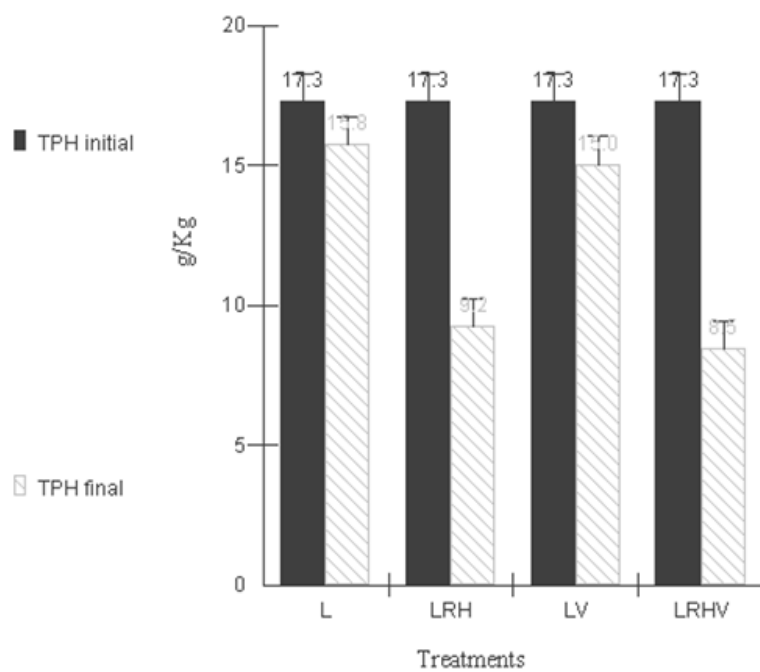
^a Significant compared to the control soil using the statistical test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Values were expressed as mean ± standard deviation. Data obtained from 7500 cells observed per treatment

Reducing the frequency of NB can not be considered because this treatment was cytotoxic to *A. cepa* root cells

LEGEND

Figure 1. Total petroleum hydrocarbons (TPHs) (g/Kg) in landfarming soil, before and after addition of rice hulls and vinasse. Landfarming soil (L); landfarming and rice hulls (LRH); landfarming and vinasse (LV); landfarming, rice hulls and vinasse (LRHV).

**FIGURE 1**

7.4. Clastogenicidade de solo de *landfarming* associado com vinhaça

Esse artigo será submetido ao periódico “**Environmental Research**”

Clastogenicidade de solo de *landfarming* associado com vinhaça

Tatiana da Silva Souza¹, Fabiana Aparecida Hencklein², Dejanira de Franceschi de Angelis², Carmem Silvia Fontanetti¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP - SP)

²Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP - SP)

Resumo

A adição de nutrientes e/ou de agentes descompactantes em solos contaminados com resíduos orgânicos é uma estratégia que visa aumentar a atividade microbiana e acelerar a biorremediação de poluentes. Alguns pesquisadores têm estudado a viabilidade do uso da vinhaça na biorremediação de resíduos orgânicos no solo. No presente trabalho, um *landfarming* de refinaria de petróleo foi tratado com vinhaça e o teste de anormalidades mitóticas e cromossômicas em *Allium cepa* foi realizado tanto nas amostras tratadas quanto nas amostras não tratadas. Os dados obtidos mostraram que a vinhaça potencializou a clastogenicidade do *landfarming* da refinaria de petróleo. O aumento da atividade clastogênica das amostras avaliadas pode ser decorrente de metabólitos intermediários, formados durante a biodegradação dos hidrocarbonetos. Também, no decorrer do experimento, o pH baixo da vinhaça pode ter disponibilizado metais que antes encontravam-se fortemente adsorvidos na matéria orgânica do solo. Esses metais podem ter interagido sinergisticamente com os hidrocarbonetos de petróleo presentes no *landfarming* tratado com o efluente agroindustrial. Sugerimos que os efeitos biológicos da vinhaça sejam melhor investigados, principalmente no que se refere à sua toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

Palavras-chave: *Allium cepa*, aberrações cromossômicas, quebras cromossômicas, biorremediação.

1. Introdução

Na biorremediação de solos contaminados com compostos orgânicos, a adição de nutrientes e/ou de agentes descompactantes constitui uma estratégia que visa aumentar a atividade microbiana. Outra estratégia envolve a adição de microrganismos endógenos ou exógenos capazes de degradar moléculas tóxicas alvo (SARKAR et al., 2005; HAMDI et al., 2007). Esses processos podem ocorrer simultaneamente quando resíduos orgânicos que contém microrganismos capazes de metabolizar poluentes são incorporados ao solo (HAMDI et al., 2007).

A vinhaça é um subproduto da indústria sucroalcooleira, cuja produção corresponde a mais de 1000 L de efluente líquido para cada tonelada de cana de açúcar plantada. No Brasil, a vinhaça *in natura* tem sido comumente reaproveitada como fertilizante em solos agrícolas (SEGURA-MUÑOZ et al., 2006). Tem sido documentado que a incorporação da vinhaça pode aumentar a composição natural de macro e micronutrientes do solo, aumentar a disponibilidade de alguns íons e a capacidade de troca catiônica (CTC) e de retenção de água, promover a elevação do pH do solo, melhorar sua estrutura física e aumentar a atividade e biomassa microbiana (GLÓRIA; ORLANDO FILHO, 1983; RAMALHO; SOBRINHO, 2001), fatores considerados importantes na biorremediação de compostos orgânicos.

De acordo com Prata et al. (2001), a matéria orgânica da vinhaça constitui uma fonte de carbono solúvel (energia), na forma de glicerol, e prontamente disponível aos microrganismos. Os autores mostraram que o efluente foi eficaz em acelerar a degradação do herbicida ametrina no solo. Já Crivelaro (2005) associou a vinhaça com resíduo oleoso de refinaria de petróleo e verificou aumento da quantidade de microrganismos, sobretudo de fungos, e aumento da eficiência de biorremediação do resíduo petrolífero. Porém, Pinto-Mariano et al. (2006) utilizaram a vinhaça para biorremediar solos contaminados com óleo diesel, mas não obtiveram resultados satisfatórios. A vinhaça foi preferencialmente biodegradada nos primeiros 20 dias de experimento, havendo um notável decréscimo da atividade microbiana após o consumo do efluente.

O uso de ensaios biológicos é uma prática recomendada para a avaliação da biorremediação (PLAZA et al., 2005). Contudo, não há dados na literatura, referentes aos efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos da vinhaça em associação com outros resíduos sólidos de natureza orgânica e inorgânica, destinados à biorremediação no solo.

O teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa* detecta mudanças cromossômicas estruturais ou numéricas, decorrentes da exposição a agentes físicos, químicos ou biológicos. Também, o teste é eficaz na detecção de anormalidades do ciclo mitótico, como aderências cromossômicas, C-metáfases e anáfases e telófases multipolares. A identificação de anormalidades mitóticas e cromossômicas em *A. cepa* fornece informações sobre os mecanismos de ação de diversas classes de compostos químicos e amostras ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial clastogênico e/ou aneugênico de um solo de *landfarming* de refinaria de petróleo antes e após a suplementação do mesmo com vinhaça.

2. Material e métodos

2.1. Solos

O solo avaliado nesse estudo provém de um *landfarming* localizado numa refinaria de petróleo do Estado de São Paulo, Brasil. Nesse sistema de biorremediação, o resíduo oleoso, proveniente do refino, é depositado nas camadas superiores do solo, para que seja biodegradado. A atividade aeróbia microbiana é constantemente estimulada por meio da aeração do solo e/ou por meio da adição de nutrientes, minerais e água (HARMSSEN, 1991).

O *landfarming* avaliado possui área total de 40.000 m² e capacidade para disposição e tratamento de 800 m³ de resíduo oleoso por mês. O solo foi coletado em 2007, de acordo com a Norma Técnica 10.007 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (2004).

O solo controle (CS) utilizado nesse trabalho é proveniente da Estação Ecológica de Itirapina, pertencente ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo. A área da reserva é de cerca de 2.300 hectares de vegetação natural pouco impactada, sendo o solo típico do Estado de São Paulo. A coleta foi realizada de acordo com a Norma Técnica 6.457 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (1986).

Após as coletas, os solos foram transportados para o Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, onde foram mantidos a 4°C, até o início dos experimentos.

2.2. Vinhaça

A vinhaça foi coletada na Usina Santa Lucia, localizada na cidade de Araras, São Paulo, de acordo com a Norma Técnica P4.231 da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) (2006). Após a coleta, o efluente foi transportado para o Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, onde foi mantido a 4°C, até o início dos experimentos.

2.3. Análises físico-químicas

As amostras de solo foram caracterizadas de acordo com a textura, pH, quantidade de matéria orgânica, concentração de nutrientes (K, Ca, Mg, Al, S, Na, Fe, Mn, Cu e Zn), concentração de metais (Ba, Cd, Cr, Ni e Pb) e de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs).

A vinhaça foi caracterizada quanto ao pH, P total, N, concentração de nutrientes (K, Ca, Al, S, Na, Fe, Mn, Cu, Zn e B) e concentração de metais (Ba, Cd, Cr, Ni e Pb).

A análise dos metais foi realizada em espectrômetro de emissão por plasma (ICP) no Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo LTDA (ICASA), Campinas, São Paulo, Brasil.

A concentração de TPHs foi determinada de acordo com o método USEPA 8015B, pela empresa *Analytical Technology*, São Paulo, Brasil.

2.4. Biorremediação

2.4.1. Adição de vinhaça ao solo de *landfarming*

Os solos foram secos e peneirados em peneira com gramatura de 1.62 mm. Baldes, com capacidade para 20 L, foram preenchidos com 10 L de solo (controle ou *landfarming*), alcançando uma coluna de solo de 30 cm. Cada experimento foi montado em triplicada. A umidade dos solos foi ajustada para 70% da capacidade de campo e reajustada quando necessário. Desse modo, foram adicionados água ou vinhaça aos baldes, de acordo com o tratamento: SC (solo controle); L (*landfarming*) e LV (*landfarming* e vinhaça). A temperatura foi monitorada diariamente, tendo oscilado de 26 °C a 36 °C durante o experimento.

A concentração de TPHs de cada tratamento foi mensurada, de acordo com o método USEPA 8015B, pela empresa *Analytical Technology*, São Paulo, Brasil,

imediatamente após a montagem do experimento de biorremediação (T0) e 33 dias depois (T33).

2.5. Bioensaio com *A. cepa*

Extratos aquosos dos solos foram preparados de acordo com Cotelle et al. (1999). Cerca de 50 g de solo, de cada uma das réplicas, foi adicionada a 300 mL de água ultrapura. As misturas foram agitadas por 24 horas e permaneceram em repouso em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por mais 24 horas. Após a decantação dos solos, os sobrenadantes foram imediatamente utilizados para a germinação de sementes de *A. cepa*.

As sementes foram germinadas em placas de Petri, com papel filtro embebido nos extratos aquosos. Adicionalmente, as sementes foram germinadas diretamente nas amostras de solo (contato direto). Três placas de Petri foram utilizadas por tratamento.

O controle positivo foi realizado com o herbicida trifluralina (0.84 ppm), conhecido por ser um potente indutor de anormalidades mitóticas e cromossômicas em *A. cepa* (FERNANDES et al., 2007).

Os experimentos foram realizados em duas etapas:

1. Experimento contínuo: após cinco dias, quando as radículas de *A. cepa* atingiram cerca de 1 a 2 cm, aproximadamente metade dos exemplares foram coletados e fixados em Carnoy I (metanol + ácido acético na proporção 3:1).

2. Experimento de recuperação: as radículas restantes foram transferidas para outra placa de Petri, contendo água ultrapura, para o experimento de recuperação de 48 horas.

Desse modo, os seguintes experimentos foram conduzidos:

- Experimento contínuo, com raízes de *A. cepa* germinadas nos extratos aquosos;
- Experimento contínuo, com raízes de *A. cepa* germinadas diretamente no solo;
- Experimento de recuperação, com raízes de *A. cepa* germinadas nos extratos aquosos;
- Experimento de recuperação, com raízes de *A. cepa* germinadas diretamente nas amostras de solo.

Depois de fixadas, as radículas foram hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 10 minutos e, posteriormente, submetidas ao reativo de Schiff por 2 horas, no escuro. As pontas das raízes foram seccionadas em lâmina, recobertas por lamínula e maceradas. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em Permunt. O material foi analisado em microscópio de luz com aumento de 400 x. Por tratamento, 7500 células foram contadas (500 células em cada uma das 15 lâminas).

Foi realizada a contagem de anáfases multipolares, C-metáfases, células poliplóides, aderências, perdas, quebras e pontes cromossômicas. Adicionalmente, micronúcleos (MN) foram quantificados. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Todo o procedimento acima descrito foi realizado em dois momentos: imediatamente após a montagem do experimento de biorremediação (T0) e 33 dias depois (T33).

3. Resultados

3.1. Análises físico-químicas

O solo controle apresentou pH 4.0, 8.0 g/Kg de matéria orgânica e pouca quantidade de metais. A concentração de TPHs mostrou-se abaixo do limite de detecção.

O *landfarming* apresentou pH 5.0 e 106.0 g/Kg de matéria orgânica. Dentre os nutrientes, apresentou 2.8 mmolc/dm³ de K, 66.0 mmolc/dm³ de Ca, 27.0 mmolc/dm³ de Mg, 1.0 mmolc/dm³ de Al, 852.0 mmolc/dm³ de S, 320.0 mmolc/dm³ de Na, 54.0 mmolc/dm³ de Fe e 39.0 mmolc/dm³ de Zn. O *landfarming* apresentou ainda elevadas concentrações de metais, principalmente de Ni (731.79 mg/Kg) e Ba (658.19 mg/Kg) e de TPHs, 17.28 g/Kg.

A vinhaça apresentou pH 3.85, 3.96 g/Kg de matéria orgânica, 0.22% de N, grande quantidade de nutrientes, principalmente S (835.00 mmolc/dm³), Ca (740.0 mmolc/dm³), Mg (210.0 mmolc/dm³), Na (113.0 mmolc/dm³), Fe (97.5 mmolc/dm³) e P (65.0 ppm) e baixa concentração de metais.

Em T33, a concentração de TPHs do solo controle permaneceu abaixo do limite de detecção e as concentrações de macro, micronutrientes e de metais pouco se alteraram.

O *landfarming* apresentou 15.76 g/Kg de TPHs e o *landfarming* tratado com vinhaça apresentou 15.04 g/Kg de TPHs. Este, apresentou ainda pH 5.1 e ligeiro aumento das concentrações de K (9.5 mmolc/dm³), Ca (80 mmolc/dm³), Mg (36 mmolc/dm³), S (1056 mmolc/dm³), Mn (7.7 mmolc/dm³), Zn (56.1 mmolc/dm³), Cd (3.83 mg/Kg) e Cr (380.1 mg/Kg) e Pb (78.2 mg/Kg), em comparação com o *landfarming* não tratado.

As características físico-químicas iniciais do solo controle, do *landfarming* e da vinhaça bem como dos tratamentos em T33, são mostradas na Tabela 1.

3.3. Bioensaio com *A. cepa*

Em T0, o *landfarming* não tratado apresentou frequências estatisticamente significativas de pontes cromossômicas em todos os experimentos realizados, contínuo/extrato aquoso, contínuo/contato direto, recuperação/extrato aquoso e recuperação/contato direto. A indução de aderência e de quebras cromossômicas foi significativa apenas nos experimentos de recuperação. Perdas cromossômicas foram frequentemente observadas apenas no experimento de recuperação/contato direto (Tabela 2).

O *landfarming* tratado com vinhaça apresentou frequências estatisticamente significativas de pontes e quebras cromossômicas em todos os experimentos realizados. A indução de aderência cromossômica foi significativa apenas nos experimentos contínuo/contato direto e de recuperação/contato direto (Tabela 2).

Em T33, o *landfarming* não tratado não induziu frequência significativa de nenhuma anormalidade mitótica ou cromossômica específica nos experimentos contínuo/extrato aquoso e contínuo contato direto. Já no experimento de recuperação/extrato aquoso, apenas a frequência de aderência cromossômica foi significativa e no experimento de recuperação/contato direto apenas as frequências de aderências e pontes cromossômicas mostraram-se significativas (Tabela 3).

O tratamento LV apresentou frequências estatisticamente significativas de pontes cromossômicas nos experimentos contínuo/contato direto, recuperação/extrato aquoso e recuperação/contato direto. Quebras cromossômicas foram frequentemente observadas em todos os experimentos realizados (Tabela 3). Peculiarmente, essas

quebras diferiram das induzidas pelo *landfarming* não tratado, pois foram frequentemente observados cromossomos com múltiplas quebras cromossômicas (Tabela 4).

Tanto em T0 quanto em T33, as anormalidades mitóticas C-metáfases, poliploidia e multipolaridade foram raramente observadas em todos os experimentos realizados (Tabelas 3 e 4).

As anormalidades mitóticas e cromossômicas observadas no presente trabalho são mostradas na Figura 1. Células com múltiplas quebras cromossômicas, após exposição ao *landfarming* tratado com a vinhaça, são mostradas na Figura 2.

4. Discussão

A literatura não apresenta resultados conclusivos em relação aos efeitos da vinhaça sobre os organismos vivos. Freire e Cortez (2000) comentaram que a vinhaça é extremamente tóxica para a fauna e flora de águas superficiais. Algur e Kadioglu (1992) documentaram os efeitos tóxicos desse efluente no crescimento, biomassa e produtividade primária de *Pisum sativum* e *Helianthus annuus*. De acordo com Freire e Cortez (2000) a toxicidade da vinhaça deve-se a seu baixo pH, elevada corrosividade, altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e elevada temperatura na saída dos destiladores. Já Yesilada (1999) concluiu que a vinhaça não foi mutagênica para *Drosophila melanogaster*, por meio do teste de mutação e recombinação somática (SMART).

Apesar dos problemas relacionados com a vinhaça *in natura* alguns autores têm reportado que seus nutrientes possam auxiliar na biorremediação de outros resíduos orgânicos no solo (PRATA et al., 2001; CRIVELARO, 2005). Porém, os autores citados não apresentaram dados a respeito da toxicidade das amostras avaliadas, nem antes nem após a adição do efluente. Também, não há dados na literatura, referentes aos efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos da vinhaça em associação com outros resíduos de natureza orgânica e inorgânica, embora esse efluente seja comumente disposto *in natura* em solos agrícolas, juntamente com lodo de esgoto (SEGURA-MUÑOZ et al., 2006).

No presente trabalho, as frequências e os tipos de anormalidades mitóticas e cromossômicas induzidas em *A. cepa*, após exposição a amostras de um *landfarming* e a um *landfarming* suplementado com vinhaça, foram comparados, em dois momentos: tempo 0 (T0) e após 33 dias (T33).

Em T0, pontes cromossômicas foram frequentemente observadas no *landfarming* não tratado. As frequências de aderências, quebras e perdas cromossômicas também foram significativas.

Pontes cromossômicas podem ser formadas como resultado de quebras cromossômicas, devido à característica pegajosa que os cromossomos adquirem quando perdem porções teloméricas de suas estruturas. Quando isso ocorre, as pontes são geralmente acompanhadas de fragmentos cromossômicos (RANK, 2003).

Aderências cromossômicas indicam o potencial tóxico do agente testado para a célula. Geralmente, essa anormalidade é irreversível e leva à morte celular (FISKESJÖ, 1985; TÜRKÖGLU, 2006). Adicionalmente, aderências cromossômicas podem originar pontes cromossômicas a partir de aderência e incompleta separação de cromossomos no decorrer da anáfase, como resultado de ligações cruzadas entre cromossomos e proteínas (KONG; MA, 1999). Matsumoto (2006) reportou a presença de pontes formadas por aderência e inferiu que tal anormalidade levou à rearranjos em que os cromossomos apresentaram-se com quebras cromatídicas.

A indução significativa de pontes indica que o agente avaliado possui ação clastogênica (RANK, 1993), uma vez que proporcionará a indução de quebras, no decorrer da divisão celular (RANK, 1993; BORBOA; DE LA TORRE, 1996; MARCANO et al., 2004).

Perdas cromossômicas estão relacionadas a problemas no fuso mitótico, fazendo com que um ou mais cromossomos não se liguem à fibra do fuso no decorrer da anáfase. Tais cromossomos permanecem, portanto, na placa metafásica (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

Inicialmente, quando a vinhaça foi adicionada ao *landfarming*, pontes e quebras cromossômicas foram frequentemente observadas em todos os experimentos realizados, seguidas de aderências cromossômicas. Decorrido os 33 dias de experimento, a associação da vinhaça com o *landfarming* promoveu um efeito drástico, caracterizado pela presença de cromossomos com múltiplas quebras cromossômicas. Esses dados indicam que a vinhaça potencializou a clastogenicidade do *landfarming*.

A análise de TPHs indicou que esses compostos foram biodegradados no *landfarming* tratado com vinhaça, porém de maneira não significativa em relação ao *landfarming* não tratado. Durante esse processo, metabólitos intermediários, formados durante a biodegradação dos compostos orgânicos presentes, podem ter contribuído

para o aumento da atividade clastogênica das amostras contendo vinhaça (ALEXANDER et al., 2002).

Outra explicação para o aumento da clastogenicidade das amostras de *landfarming* poderia ser dada com base nos metais presentes no solo. Metais presentes em resíduos domésticos e industriais acumulam-se nas camadas superficiais do solo. A quantidade de matéria orgânica presente no solo pode minimizar a mobilidade e os efeitos biológicos dos metais, por meio da formação de compostos organo-metálicos insolúveis (McBRIDE, 1995). Udom et al. (2004) demonstraram que com o aumento da matéria orgânica, aumenta a adsorção de Zn, Cd, Cu e Pb, reduzindo assim a fitotoxicidade desses metais e a mobilidade dos mesmos no solo. Todavia, em solos com baixo pH, à medida que a matéria orgânica é degradada, esses metais tendem a ser liberados. Como Pb e Cu estão fortemente associados à matéria orgânica, são liberados lentamente, ao contrário de Cd e Zn, que são prontamente liberados (VAN ERP; VAN LUNE, 1991).

No decorrer do experimento, o pH baixo da vinhaça pode ter disponibilizado metais que antes encontravam-se fortemente adsorvidos na matéria orgânica. Em T33, a análise química do *landfarming* tratado com vinhaça revelou um aumento das concentrações de Cd e de Zn, em comparação com o *landfarming* não tratado.

Borboa e De La Torre (1996) mostraram que o Cd e o Zn são clastógenos indiretos para *A. cepa*, uma vez que primeiramente foi observada a indução significativa de pontes cromossômicas anafásicas e telofásicas, mas não de quebras cromossômicas. Por outro lado, o Cd e Zn potencializaram, na ordem de 6 e 11 vezes respectivamente, o efeito clastogênico direto da radiação β produzida pela incorporação de timinina H^3 ao DNA.

Desse modo, o Cd e o Zn e, possivelmente outros metais, podem ter interagido sinergisticamente com os hidrocarbonetos de petróleo presentes no *landfarming* tratado com vinhaça, gerando inúmeros fragmentos cromossômicos em *A. cepa*. Também, compostos tóxicos do próprio efluente agroindustrial podem ter atuado.

É possível então, que no presente trabalho, todos esses fatores tenham contribuído para o aumento da clastogenicidade das amostras de *landfarming* tratadas com vinhaça.

6. Conclusão

Os dados do presente trabalho mostraram que a vinhaça potencializa a clastogenicidade do *landfarming* de refinaria de petróleo. Sugerimos que os efeitos biológicos da vinhaça sejam melhor investigados, principalmente no que se refere à toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade desse efluente.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, a Renato de Almeida Gonçalves, da Refinaria de Petróleo do Planalto (REPLAN), por ter cedido o solo de *landfarming*, ao Valdenilson José Alves de Oliveira, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro, pela coleta do *landfarming* e a Sandra Veloso pelo suporte técnico.

7. Referências bibliográficas

ALEXANDER, R.R.; TANG, J.; ALEXANDER, M. Genotoxicity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.150-154, 2002.

ALGUR, Ö.F.; KADIOGLU, A. The effects of vinasse on the growth, biomass and primary productivity in pea (*Pisum sativum*) and sunflower (*Helianthus annuus*). **Agriculture Ecosystems & Environment.**, v. 39, p. 139-144, 1992.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR - 6457: Amostras de solo – Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização.** Rio de Janeiro, 1986. 9p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR - 10.007: Amostragem de resíduos sólidos.** Rio de Janeiro, 2004. 25p.

BORBOA, L.; DE LA TORRE, C. The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. **New Phytologist.**, v. 134, p. 481-486, 1996.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma Técnica P4.231: Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação em solo agrícola.** São Paulo, 2006, 17p.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F.; FÉRARD, J.F. Assessment of genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* – micronucleus and the *Tradescantia* – micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p. 167-171, 1999.

CRIVELARO, S.H.R. **Associação de borra oleosa de refinaria de petróleo e vinhaça visando a biodegradação.** 2005. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP.

FERNANDES, T.C.C; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar.** Guaíba: Agropecuária, 2000. 203p.

GLÓRIA, N.A.; ORLANDO FILHO, J. **Aplicação de vinhaça como fertilizante.** São Paulo: Coopersucar, 1983. 38p.

HAMDI, H.; BENZARTI, S.; IANASC, L.M.; AOYAMAA, I.; JEDIDID, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 1926–1935, 2007.

HARMSSEN, J. Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated sites. In: Hinchee, R.E., Olfenbittel, R.F. (Eds.), **On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment**, Butterworth-Heinemann, London, 1991.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M. DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KONG, M.S.; MA, T.H. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p. 221-228, 1999.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221-226, 2004.

MATSUMOTO, ST.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTII, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148–158, 2006.

McBRIDE, M.B. Toxic metal accumulation from agricultural use of sewage sludge. Are USEPA regulations protective? **Journal of Environmental Quality**, v. 24, p. 5-18, 1995.

PINTO-MARIANO, A.; CRIVELARO, S.H.R.; ANGELIS, D.F.; BONOTO, D.M. Use of vinasse, an ethanol distillery waste, as an amendment to bioremediation of diesel oil contaminated soils. In: XXII INTERAMERICAN CONFEDERATION OF CHEMICAL ENGINEERING, 2006, Buenos Aires, **Anais do XXII Interamerican Confederation of Chemical Engineering**. Disponível em:

http://dpi.ep.ufrj.br/ciaq_22/CD/formCrCongresso/papers/11b/11b_335.pdf. Acesso em: 19 de abril de 2008.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v. 59, p. 289-296, 2005.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 975-981, 2001.

RAMALHO, J.F.G.P.; SOBRINHO, N.M.B.A. Metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso de resíduos agroindustriais. **Revista Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1. p. 120-129, 2001.

RANK J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium cepa* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**. 1993; 118: 49-53.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v.136, p.187-195, 2005.

SEGURA, MUÑOZ, S.I.; SILVA OLIVEIRA, A.; NIKAIDO, M.; TREVILATO, T.M.B.; BOCIO, A.; TAKAYANAGUI, A.M.M., DOMINGO, J.L. Metal levels in sugar cane (*Saccharum* spp.) samples from an area under the influence of a municipal landfill and a medical waste treatment system in Brazil. **Environment International**, v. 32, p. 52-57, 2006.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa*. **Mutation Research**, v.626, p. 4-14, 2006

UDOM, B.E.; MBAGWU, J.S.C.; ADESODUN, J.K.; AGBIM, N.N. Distributions of zinc, copper, cadmium and lead in a tropical ultisol after long term disposal of sewage sludge. **Environmental International**, v. 30, p. 467-470, 2004.

VAN ERP, P.J.; VAN LUNE, P. Long-term heavy metal leaching from soils, sewage sludge and soil/sewage mixtures. **Environmental Science Technology** v., 25, p. 706-711, 1991.

YESILADA, E. Genotoxic Activity of Vinasse and Its Effect on Fecundity and Longevity of *Drosophila melanogaster*. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 63, p.560-566, 1999.

Tabela 1. Características físico-química do solo controle (SC), do *landfarming* (L) e da vinhaça em T0 e do solo controle (SC), do *landfarming* (L) e do *landfarming* tratado com vinhaça (LV) em T33

	T0			T33		
	SC	L	Vinhaça	SC	L	LV
pH (CaCl ₂)	4.0	5.0	3.85	4.0	5.0	5.1
Matéria orgânica (g/Kg)	8.0	106.0	3.96	8.0	104.0	101.0
P total (ppm)	x	x	65.00	x	x	x
N (%)	x	x	0.22	x	x	x
K (mmolc/dm ³)	0.6	2.8	0.32	0.8	2.1	9.50
Ca (mmolc/dm ³)	1.0	66.0	740.00	1.0	63.0	80.0
Mg (mmolc/dm ³)	1.0	27.0	210.00	1.0	28.0	36.0
Al (mmolc/dm ³)	6.0	1.0	72.00	6.0	1.0	1.0
S (mmolc/dm ³)	10.0	852.0	835.00	10.0	878.0	1056.0
Na (mmolc/dm ³)	3.0	320.0	113.00	3.0	200.0	260.0
Fe (mmolc/dm ³)	25.0	54.0	97.50	20.0	46.0	38.0
Mn (mmolc/dm ³)	0.6	7.8	-	0.7	7.4	7.7
Cu (mmolc/dm ³)	0.9	1.5	-	0.9	1.2	1.2
Zn (mmolc/dm ³)	0.9	39.0	7.50	0.7	33.0	56.1
B (mmolc/dm ³)	0.2	2.7	5.00	0.2	2.5	2.4
Ba (mg/Kg)	14.4	658.1	0.50	14.4	514.9	511.5
Cd (mg/Kg)	< 0.01	1.4	1.06	< 0.01	1.4	3.83
Cr (mg/Kg)	11.9	731.7	0.15	10.0	345.0	380.1
Ni (mg/Kg)	< 0.01	69.69	0.26	< 0.01	68.6	62.7
Pb (mg/Kg)	< 0.01	94.38	<0.01	< 0.01	70.2	78.2
TPHs (g/Kg)	-	17.2	x	-	15.76	15.04

x Análise não solicitada

- Resultado abaixo do limite de detecção

Tabela 2. Anormalidades mitóticas e cromossômicas (AMC) observadas em *A. cepa*, em T0

	A	C-M	AM	PC	PP	PTC	QC
Contínuo/extrato aquoso							
SC	0.26 ± 0.45	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.40 ± 0.50	0.40 ± 0.63	0.0 ± 0.0
L	0.60 ± 0.50	0.40 ± 0.63	0.0 ± 0.0	0.60 ± 0.73	0.46 ± 0.83	1.66 ± 0.81 ^a	0.33 ± 0.61
LV	0.26 ± 0.59	0.33 ± 0.48	0.0 ± 0.0	0.20 ± 0.56	0.0 ± 0.0	1.46 ± 1.03 ^a	1.86 ± 0.94 ^a
Contínuo/contato direto							
SC	0.26 ± 0.59	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.33 ± 0.61	0.40 ± 0.50	0.0 ± 0.0
L	0.80 ± 0.67	0.40 ± 0.50	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.93 ± 0.70	2.80 ± 0.94 ^a	0.33 ± 0.48
LV	1.13 ± 0.74 ^a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.40 ± 0.50	0.40 ± 0.50	2.66 ± 1.39 ^a	1.46 ± 0.74 ^a
Trifluralina	1.60 ± 0.63 ^a	0.86 ± 0.83	2.26 ± 1.09 ^a	1.26 ± 1.03 ^a	0.33 ± 0.61	0.0 ± 0.0	0.40 ± 0.63
Recuperação/extrato aquoso							
SC	0.33 ± 0.61	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.46 ± 0.83	0.26 ± 0.70	0.13 ± 0.51
L	1.06 ± 0.88 ^a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.06 ± 0.25	0.0 ± 0.0	1.66 ± 1.29 ^a	1.26 ± 1.08 ^a
LV	0.80 ± 0.67	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.20 ± 1.20 ^a	1.13 ± 0.91 ^a
Recuperação/contato direto							
SC	0.0 ± 0.0	0.33 ± 0.50	0.26 ± 0.45	0.06 ± 0.25	0.26 ± 0.59	0.13 ± 0.35	0.0 ± 0.0
L	1.33 ± 0.97 ^a	0.93 ± 1.03	0.0 ± 0.0	1.13 ± 0.91 ^a	0.0 ± 0.0	3.00 ± 1.41 ^a	1.33 ± 0.72 ^a
LV	1.40 ± 0.73 ^a	0.0 ± 0.0	0.13 ± 0.51	0.20 ± 0.56	0.0 ± 0.0	2.00 ± 1.06 ^a	2.26 ± 0.79 ^a
Trifluralina	3.86 ± 1.59 ^a	2.66 ± 0.88 ^a	0.27 ± 0.70	2.26 ± 0.88 ^a	0.66 ± 0.51	0.0 ± 0.0	0.93 ± 0.70

SC: solo controle; L: *landfarming*; LV: *landfarming* tratado com vinhaça

AC: aderência cromossômica; C-M: C-metáfase; AM: anáfase multipolar; PC: perda cromossômica; PP: poliploidia;

PTC: ponte cromossômica; QC: quebra cromossômica

^a Significativo em relação ao solo controle, pelo teste estatístico Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Valores expressos como média das 3 replicatas \pm desvio padrão

Dados obtidos a partir de 7500 células observadas por tratamento

Tabela 3. Anormalidades mitóticas e cromossômicas (AMC) observadas em *A. cepa*, após 33 dias (T33)

	A	C-M	AM	PC	PP	PTC	QC
Contínuo/extrato aquoso							
SC	0.13 ± 0.51	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.13 ± 0.35	0.13 ± 0.35	0.46 ± 0.91	0.0 ± 0.0
L	0.20 ± 0.56	0.93 ± 0.70	0.0 ± 0.0	0.73 ± 0.79	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.13 ± 0.51
LV	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.33 ± 0.61	2.00 ± 1.06 ^a
Contínuo/contato direto							
SC	0.33 ± 0.61	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.26 ± 0.59	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
L	0.0 ± 0.0	0.86 ± 0.83	0.0 ± 0.0	0.13 ± 0.35	0.40 ± 0.73	0.06 ± 0.25	0.86 ± 0.83
LV	0.40 ± 0.73	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.80 ± 0.67	1.80 ± 0.88 ^a	2.46 ± 1.06 ^a
Trifluralina	1.46 ± 0.74 ^a	2.00 ± 1.06 ^a	1.73 ± 0.96 ^a	0.74 ± 0.79	0.33 ± 0.61	0.0 ± 0.0	0.13 ± 0.35
Recuperação/extrato aquoso							
SC	0.20 ± 0.56	0.0 ± 0.0	0.06 ± 0.25	0.40 ± 0.73	0.0 ± 0.0	0.20 ± 0.41	0.0 ± 0.0
L	1.40 ± 0.98 ^a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.86 ± 0.83	0.06 ± 0.25	0.0 ± 0.0
LV	0.0 ± 0.0	0.13 ± 0.51	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.00 ± 0.53 ^a	1.06 ± 0.88 ^a
Recuperação/contato direto							
SC	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.40 ± 0.73	0.60 ± 0.98	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
L	1.20 ± 0.86 ^a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.20 ± 0.41	1.20 ± 0.86 ^a	0.20 ± 0.56
LV	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.40 ± 0.74 ^a	2.60 ± 0.91 ^a
Trifluralina	1.00 ± 0.0	3.00 ± 1.41 ^a	2.060 ± 0.96 ^a	2.66 ± 0.51 ^a	0.0 ± 0.0	0.86 ± 0.83	0.0 ± 0.0

SC: solo controle; L: *landfarming*; LV: *landfarming* tratado com vinhaça

AC: aderência cromossômica; C-M: c-metáfase; AM: anáfase multipolar; PC: perda cromossômica; PP: poliploidia ;

PTC: ponte cromossômica; QC: quebra cromossômica

^a Significativo em relação ao solo controle, pelo teste estatístico Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Valores expressos como média das 3 replicatas \pm desvio padrão

Dados obtidos a partir de 7500 células observadas por tratamento

Tabela 4. Porcentagem de células com quebras cromossômicas observadas em *A. cepa*, em T0 e T33

Tratamentos	Antes da biorremediação (T0)		Após biorremediação (T33)	
	Quebra única	Quebras múltiplas	Quebra única	Quebras múltiplas
Contínuo/Extrato aquoso				
SC	0%	0%	0%	0%
L	100%	0%	100%	0%
LV	100%	0%	33.33%	66.66%
Contínuo/Contato direto				
SC	0%	0%	0%	0%
L	100%	0%	100%	0%
LV	100%	0%	8.10%	91.89%
Trifluralina	100%	0%	100%	100%
Recuperação/Extrato aquoso				
SC	100%	0%	0%	0%
L	100%	0%	100%	0%
LV	100%	0%	31.25%	68.75%
Recuperação/ Contato direto				
SC	0%	0%	0%	0%
L	100%	0%	100%	0%
LV	100%	0%	17.94%	82.05%
Trifluralina	100%	0%	0%	0%

SC: solo controle; L: *landfarming*; LV: *landfarming* e vinhaça

LEGENDA

Figura 1. Principais tipos de anormalidades mitóticas e cromossômicas observados em *A. cepa*, após exposição ao solo de *landfarming* e ao solo de *landfarming* tratado com vinhaça. A. Anáfase com perda cromossômica (seta) e micronúcleos (cabeças de seta). B. Anáfase com perda cromossômica (seta) e fragmento cromossômico (cabeça de seta). C. Anáfase com fragmento cromossômico (cabeça de seta). D. Anáfase com perdas cromossômicas (setas). E. Poliploidia e aderência cromossômica. F. Anáfase multipolar. G. Metáfase com quebra cromossômica (cabeça de seta). H. Anáfase com uma ponte cromossômica. I. Anáfase com duas pontes cromossômicas. J. Metáfase poliplóide com aderência cromossômica. K. Anáfase com fragmentos cromossômicos. L. Anáfase com ponte cromossômica e fragmentos cromossômicos. M. Anáfase com ponte cromossômica e perdas cromossômicas (setas).

Figura 2. Fragmentos cromossômicos induzidos em *A. cepa*, após exposição a solo de *landfarming* tratado com vinhaça. A-F. Metáfases com vários fragmentos cromossômicos. G-L Anáfases com vários fragmentos cromossômicos. Setas em G e H: cromossomos com a porção telomérica duplicada.

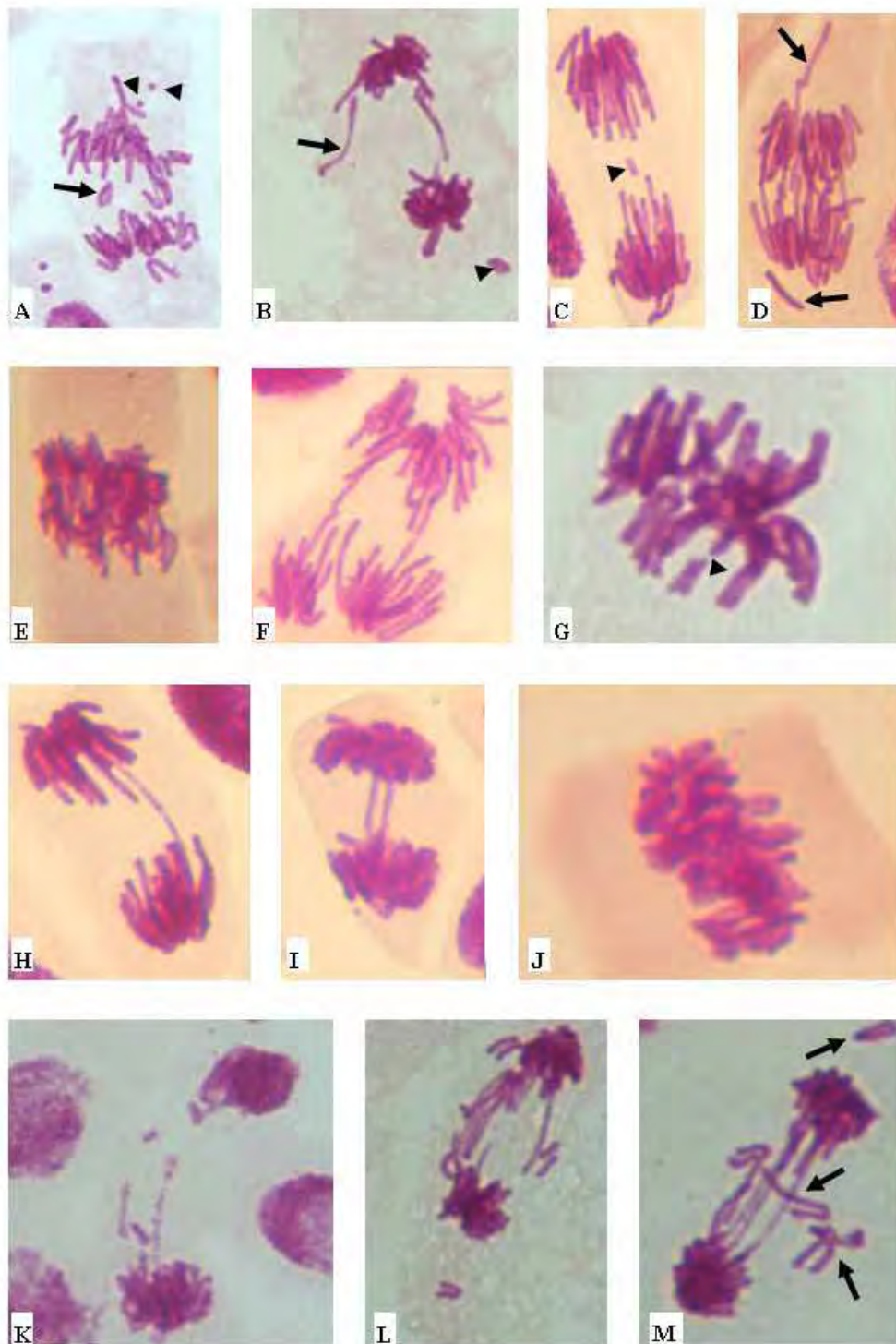


FIGURA 1

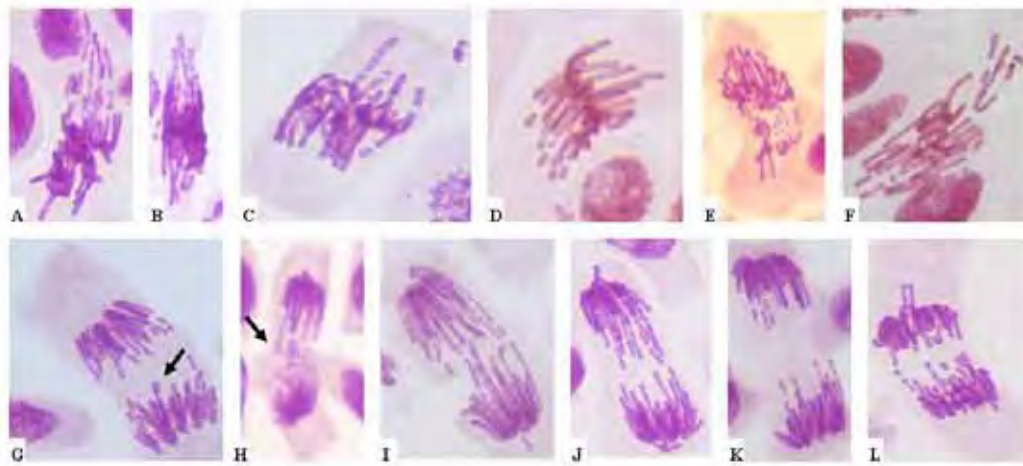


FIGURA 2

7.5. Uso de diplópodos como bioindicadores – uma revisão

Esse artigo será submetido ao periódico **“Environmental Pollution”**

Uso de diplópodos como bioindicadores – uma revisão

Tatiana da Silva Souza, Cyntia Aparecida Christofolletti, Vlamir Bozzatto, Carmem Silvia Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Rio Claro-SP

Resumo

Diplópodos desempenham um importante papel na dinâmica terrestre, pois auxiliam na decomposição da matéria orgânica e participam ativamente da aeração do solo. Por fazer parte da fauna edáfica, mudanças sutis no ambiente podem ser refletidas por diplópodos. Assim, nos últimos anos, esses animais têm sido utilizados como bioindicadores na ecotoxicologia terrestre. A grande maioria dos trabalhos disponíveis na literatura relata os efeitos de metais em diplópodos. Esses contaminantes ambientais podem afetar a estrutura de comunidades de diplópodos, resultando na diminuição das taxas de decomposição da matéria orgânica. A concentração corpórea de metais pode ser relacionada com o grau de contaminação no solo. A ingestão de solo e/ou serrapilheira contaminada pode afetar a integridade do intestino. A investigação de mecanismos de defesa contra a ação de metais e de processos de destoxificação tem se revelado interessante. Em comparação, os efeitos de contaminantes orgânicos e de misturas complexas têm sido pouco avaliados. Nesse contexto, o presente trabalho apresenta uma revisão do emprego de diplópodos como bioindicadores da qualidade de solos e explora as manifestações de estresse ambiental, utilizadas como biomarcadores, nesses animais.

Palavras-chave: milípedes, ecotoxicologia terrestre

1. Introdução

A maioria das atividades realizadas no solo, como a decomposição da matéria orgânica, o fluxo de nutrientes e de energia e a fertilidade é realizada ou mediada por microrganismos e invertebrados terrestres (SOCHOVÁ et al., 2006). Entretanto, essas atividades podem ser afetadas devido à crescente contaminação do solo, decorrente de atividades industriais, agrícolas e crescente urbanização.

A manutenção da qualidade do ecossistema terrestre está diretamente relacionada com o estudo das relações entre poluentes ambientais e organismos que desempenham papéis importantes no solo (SOCHOVÁ et al., 2006). A escolha de uma espécie bioindicadora depende de sua importância ecológica e ecotoxicológica, da facilidade da mesma ser mantida em laboratório, das suas taxas de reprodução e de sua sensibilidade (deve ser afetada por

diversos agentes químicos, mas menos afetada por fatores abióticos). Ainda, a possibilidade do uso de diversos biomarcadores, tanto no campo quanto em laboratório, deve ser considerada (RÖMBKE; GARCIA, 2000).

Invertebrados terrestres têm sido considerados excelentes indicadores da qualidade de solos, uma vez que permanecem em contato direto com todos os contaminantes presentes (TRIEBSKORN et al., 1991; HEIKENS et al., 2001). Ainda, bioensaios com a fauna terrestre são relativamente simples de serem realizados, os taxa estão largamente distribuídos e o tamanho e movimentação de muitas espécies resolve problemas associados com a heterogeneidade espacial da contaminação do solo (PATON et al., 2005). As principais espécies de invertebrados terrestres, utilizadas como bioindicadores, pertencem ao grupo dos nemátodos (SOCHOVÁ et al., 2006), minhocas (NATAL DA LUZ et al., 2004) e colêmbolas (EOM et al., 2007). Todavia, atualmente, outras espécies com potencial bioindicador têm sido requeridas devido ao aumento das fontes de contaminação (LØKKE; VAN GESTEL, 1998; EOM et al., 2007).

Diplópodos são artrópodos terrestres também conhecidos popularmente, no Brasil, como milípedes piolhos-de-cobra, caramujis, gongôlos, emboás, dentre outros. Compreendem cerca de 11000 espécies descritas. Seus representantes estão distribuídos por todo o mundo, mas habitam preferencialmente os trópicos. Possuem hábito noturno, vivem em ambientes úmidos, sendo encontrados sob troncos e folhas caídas no solo. Alimentando-se de matéria orgânica, detritos, frutas e relativa quantidade de matéria mineral (SCHUBART, 1942; HOFFMANN et al., 2002; RUPPERT; BARNES, 2005).

Esses animais desempenham um importante papel na dinâmica do ecossistema terrestre, participando ativamente da aeração do solo e favorecendo a decomposição da matéria orgânica por fungos e bactérias. Além disso, os produtos da excreção de diplópodos, amônia e ácido úrico, quando degradados, enriquecem o solo com nitrato. Desse modo, estimulam o metabolismo microbiano, essencial para a ciclagem de nutrientes. (SCHUBART, 1942, HOPKIN; READ, 1992).

Por fazer parte da fauna edáfica, diplópodos são expostos continuamente a contaminantes presentes no solo. Nos últimos 20 anos esses animais têm sido empregados em estudos ecotóxicológicos. O objetivo do presente trabalho foi apresentar uma revisão do uso de diplópodos como bioindicadores do ecossistema terrestre e os efeitos de diversas classes de agentes químicos, relevantes do ponto de vista ecotoxicológico, nesses animais.

2. Espécies de diplópodos utilizadas como bioindicadoras da contaminação do solo

Diversas espécies de diplópodos têm se mostrado sensíveis a contaminantes ambientais. Espécies da família Julidae, comuns no Hemisfério Norte, têm sido largamente utilizadas na avaliação de metais tóxicos, como *Allaiulus nitidus* (KÖHLER et al., 1992a), *Cylindroiulus britannicus* (RANTALA, 1990), *C. punctatus* (KÖHLER et al., 1992a), *C. silvarium* (KÖHLER; ALBERTI, 1992), *Julus scandinavius* (KÖHLER; ALBERTI, 1992; KÖHLER et al., 1992a; ZANGER; KÖHLER, 1996; ZANGER et al., 1996; KÖHLER et al., 2000), *Leptoiulus belgicus* (KÖHLER; ALBERTI, 1992), *Ommatoiulus rutilans* (KÖHLER; ALBERTI, 1991), *Rossiulus kesseleri* (ZHULIDOV; DUBOVA, 1988) e *Tachypodoiulus niger* (KÖHLER; ALBERTI, 1992; KÖHLER et al., 1992a,b).

Outras espécies empregadas na avaliação de metais compreendem *Craspedosoma alemannicum* (Craspedosomatidae) (KÖHLER; ALBERTI, 1992), *Glomeris marginata* (KÖHLER; ALBERTI, 1992; HOPKIN et al., 1985; KÖHLER et al., 1992b), *G. conspersa* (Glomeridae), *Mycogona germanica* (Chordeumatidae) (KÖHLER; ALBERTI, 1992), *Polydesmus angustus* (KÖHLER; ALBERTI, 1992), *P. denticulatus* (Polydesmidae) (KÖHLER et al., 1992a), *Chamberlinius hualienensis* (NAKAMURA et al., 2005) e *Oxidus gracilis* (Paradoxosomatidae) (NAKAMURA; TAIRA, 2005).

Contaminantes orgânicos foram avaliados em *Brachdesmus superus* (Polydesmidae) (TAJOSKY, 1998) e *J. scandinavius* (ZANGER; KÖHLER, 1996).

Nos trópicos, representantes da família Spirostreptidae, *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger*, foram utilizadas na avaliação de pesticidas (BOCCARDO; FERNANDES, 2000; BOCCARDO et al., 2001). A espécie *Rhinocricus padbergi* (Rhinocricidae) tem sido utilizada na avaliação de misturas complexas de contaminantes ambientais, como lodo de esgoto (GODOY; FONTANETTI, 2009, NOGAROL; FONTANETTI, 2010; FONTANETTI et al., no prelo) e solo de *landfarming* (SOUZA; FONTANETTI, 2010, submetido).

3. Efeitos de contaminantes ambientais em diplópodos e principais biomarcadores empregados

3.1. Estudos de campo

O estudo de comunidades de invertebrados edáficos fornece dados para a compreensão do funcionamento do ecossistema e revela mudanças sutis decorrentes dos efeitos dos contaminantes ambientais. Constitui, portanto, uma ferramenta importante no monitoramento ambiental (KNIGGE; KÖHLER, 2000).

Uma das maneiras de avaliar os efeitos da poluição é examinar espécies presentes ou ausentes em determinado local (READ; MARTIN, 1990).

Krivoluckij et al. (1972) reportaram uma diminuição do número de diplópodos em locais contaminados com Sr⁹⁰.

Hopkin et al. (1985) mostraram que a maioria das espécies de diplópodos presentes em locais não contaminados com metais estavam ausentes em locais contaminados.

Contudo, Grelle et al. (2000) concluíram que relacionar a presença de um gênero ou espécie com solos contaminados merece discussão. Nesse estudo, nenhuma relação foi encontrada entre a diversidade de diplópodos, espécies dominantes e o grau de contaminação dos locais avaliados. Inclusive, solos não contaminados apresentaram poucos indivíduos. Porém, houve uma forte evidência para a existência de um limiar de concentração de metais, uma vez que nos locais altamente poluídos nenhum diplópodo foi encontrado. Também, Read e Martin (1990) não encontraram qualquer relação entre o número de espécies de diplópodos ou o número de indivíduos coletados e a concentração de metais no solo. Grelle et al. (2000) concluíram que fatores como a disponibilidade de matéria orgânica, tipo de vegetação e estrutura do solo podem ser importantes para a abundância de espécies de diplópodos e a presença de espécies dominantes.

De fato, o solo é um ecossistema extremamente complexo e parâmetros ambientais podem mascarar os efeitos de poluentes sobre comunidades de invertebrados terrestres. Para minimizar as interferências ambientais, recomenda-se que estudos de campo sejam cuidadosamente planejados e as localidades escolhidas devem ser comparáveis quanto à quantidade de matéria orgânica, pH, textura, tipo de solo e umidade, dentre outras propriedades (SOCHOVÁ et al., 2006).

3.2. Estudos em laboratório

Comparados com estudos de campo, ensaios realizados em laboratório mostram uma relação mais clara entre exposição e efeitos de contaminantes ambientais, devido à possibilidade de controle das condições experimentais e menor variabilidade. Portanto,

representam o primeiro passo para a avaliação de risco ecológico. Contudo, recomenda-se a utilização de uma bateria de testes, com diferentes biomarcadores e espécies para que resultados de laboratório possam ser eficazes em prever efeitos em ecossistemas naturais (LØKKE; VAN GESTEL, 1998).

3.2.1. Toxicidade

De acordo com Fairbrother et al. (2002), a análise da taxa de mortalidade é um parâmetro chave para a avaliação de solos, pois representa uma resposta severa à exposição ao contaminante, sendo um parâmetro bastante utilizado em análises ecotoxicológicas.

A toxicidade aguda do detergente linear alquilbenzeno sulfonato (LAS) foi reportada para o diplópodo *B. superus* ($LC_{50} > 10000$ mg LAS/Kg) (TAJOSKY, 1998).

Pesticidas são potencialmente perigosos para espécies não-alvos. Os efeitos do fungicida dithane M-45 (mancozeb), em diversas taxa de artrópodos, foram estudados por Adamski et al. (2007). Alta mortalidade foi reportada para Diplopoda. O curto tempo de exposição ao fungicida (24h) indicou um baixo valor de LC ($LC_{50}=0.351$; $LC_{95}=6.13$). De acordo com os autores, esse fato provavelmente subestima os efeitos do fungicida no campo, uma vez que populações inteiras de diplópodos podem correr o risco de desaparecimento.

A aplicação tópica dos pesticidas carbamato methiocarb e do piretróide deltamethrin, nas espécies *G. olivaceus* e *P. setiger* promoveu baixa toxicidade, com altos valores de DL_{50} , 515, 216, 137 e 93 e 489 mg/g, 222, 108 e 71 mg/g respectivamente. Essa resposta foi atribuída ao exoesqueleto calcificado rígido dos diplópodos, que pode ter interferido na penetração dos produtos (BOCCARDO; FERNANDES, 2000; BOCCARDO et al., 2001).

Já Weber e Nentwig (2006) não verificaram alterações nas taxas de mortalidade, de *Allajulus latestriatus* alimentados com folhas de milho transgênico N4640Bt que expressa a proteína Bt Cry1Ab, utilizada como herbicida. Todavia, os autores verificaram que o diplópodo excretou quantidades consideráveis da proteína ativa, juntamente com as fezes, podendo disponibilizá-la para outros organismos que habitam o solo.

3.2.2. Consumo de alimentos, assimilação de nutrientes e biomassa

Embora o número de espécies de diplópodos possa sofrer redução em áreas altamente contaminadas com metais, algumas espécies podem desenvolver estratégias que minimizem os efeitos desses poluentes, permitindo sua sobrevivência. Dentre elas, tem sido relatada a

redução das taxas de consumo de alimentos e da eficácia da assimilação de nutrientes em função da quantidade de contaminantes presentes. Assim, exemplares de *G. marginata* reduziram significativamente o consumo de serrapilheira contaminada com Cd, Cu, Pb e Zn e, conseqüentemente, apresentaram também diminuição da biomassa (HOPKIN et al., 1985).

Exemplares de *A. nitidus*, *G. conspersa*, *J. scandinavius* e de *P. denticulatus* (KÖHLER et al., 1992a) alimentados com liter contaminado com Pb diminuíram a assimilação de nutrientes. O mesmo foi observado em *R. kesseleri*, alimentados com Cd e Hg (ZHULIDOV; DUBOVA, 1988). Köhler et al. (1992a) reportaram que indivíduos de *G. conspersa* foram capazes de compensar essa diminuição com o aumento do consumo de serrapilheira. As outras espécies de Julidae investigadas nesse estudo não apresentaram tal compensação, mas sobreviveram. Já *P. denticulatus* também não apresentou essa compensação, porém os indivíduos dessa espécie morreram ao final do experimento. Zhulidov e Dubova (1988) consideraram que a diminuição da assimilação de nutrientes constitui um mecanismo de defesa contra a ação de compostos tóxicos no substrato. Contudo, Köhler et al. (1992a) observaram que a eficácia dessa estratégia depende das características nutricionais de cada espécie. Espécies relativamente grandes, como Julidae, consomem grande quantidade de alimento e utilizam somente uma pequena quantidade dos nutrientes presentes. Já espécies de pequeno porte, como *P. denticulatus*, tendem a consumir pequenas quantidades de alimento, mas apresentam alta eficácia na assimilação de nutrientes. No estudo conduzido, indivíduos dessa espécie não conseguiram um suprimento energético adequado para a sobrevivência.

3.2.3. Bioacumulação

Devido seus hábitos alimentares, diplópodos apresentam grande capacidade de acumular metais presentes no ambiente. Assim, foi demonstrado que esses animais podem acumular Hg (SIEGEL et al., 1975), Cu e Zn (BEYER et al., 1985, 1990; CARTER 1983; PAOLETTI et al., 1988), Mg e Sr (PONOMARENKO et al., 1974).

Entretanto, a concentração corpórea de metais varia de espécie para espécie assim como as taxas de assimilação desses compostos. Em condições normais, metais essenciais, como Cu e Zn, são assimilados e acumulados em grandes quantidades para a realização de processos vitais. Já o Pb e o Cd, metais não essenciais, são pouco assimilados (HOPKIN et al., 1985; HOPKIN; READ, 1992; KÖHLER et al., 1992a).

Heikens et al. (2001) estudaram a bioacumulação de metais em vários grupos de artrópodos. De maneira geral, a concentração de metais no corpo dos animais aumentou com o aumento da concentração desses elementos no solo. Os grupos taxonômicos foram categorizados da maior para a menor acumulação interna: a) Cd= Lumbricidae > Arachnida > Diplura > Diplopoda > Collembola > Collembola; b) Cu= Diplopoda = Isopoda > Collembola > Arachnida > Lumbricidae > Collembola = Formicidae; c) Zn= Diplopoda = Isopoda > Arachnida Chilopoda > Formicidae > Lumbricidae > Collembola. A concentração de Pb foi extremamente alta em Isopoda e Collembola, intermediária em Diplopoda, baixa em Chilopoda e Collembola.

Nakamura e Taira (2005) e Nakamura et al. (2005) sugeriram que diplópodos podem fornecer informações da acumulação e mecanismos de regulação de metais perigosos presentes no meio ambiente. Os autores mostraram que a acumulação de metais não essenciais para diplópodos foi na ordem de: Cu > Pb > Cd. Em *C. hualienensis*, a concentração interna de As e Ag foram dependentes da concentração no solo. Já a concentração de Zn em *O. gracilis* e *C. hualienensis* mostrou-se diferente nos locais amostrados, mas a concentração corpórea desse elemento permaneceu constante.

Hubert (1977; 1978a,b; 1979a,b) foi o primeiro pesquisador a identificar os locais de armazenamento de metais em diplópodos. Geralmente, os grânulos contendo metais encontram-se associados com órgãos de funções digestória, de armazenamento e de excreção, como o intestino médio, células hepáticas, corpo gorduroso e túbulos de Malpighi. Köhler e Alberti (1992) identificaram numerosos grânulos contendo fosfato de cálcio, em células do intestino médio do diplópodo *M. germanica*. Estudos realizados nos diplópodos *G. marginata* (HOPKIN et al., 1985; KÖHLER et al., 1995) e em *L. belgicus* (KÖHLER et al., 1995) revelaram que as células epiteliais do intestino médio são os principais locais de armazenamento de Cd (60-68%) e de Pb (47-64%). Segundo os autores, Zn é predominantemente estocado na cutícula e somente uma pequena fração (3-6.5%) é armazenada no intestino médio. Células do corpo gorduroso também armazenam metais em grânulos insolúveis, porém a composição dos mesmos ainda não foi estudada (HOPKIN; READ, 1992; FONTANETTI et al., 2006).

Tanto metais essenciais quanto os não essenciais podem estar presentes no ambiente em quantidades elevadas, aumentando as taxas de assimilação e acumulação dos mesmos (HOPKIN; READ, 1992). Assim, a acumulação de metais em invertebrados terrestres

saprófagos, baseada na concentração total desses elementos no solo e no corpo dos animais avaliados, pode ser utilizada como um parâmetro chave na ecotoxicologia terrestre (HEIKENS et al., 2001).

Read e Martin (1990) encontraram altas concentrações de metais em exemplares de *G. marginata*, provenientes de locais poluídos enquanto baixas concentrações foram reportadas em indivíduos provenientes de locais não contaminados. Em experimentos conduzidos em laboratório, juvenis acumularam rapidamente Cd e Zn quando alimentados com serrapilheira contaminada e se desenvolveram significativamente mais devagar que os indivíduos alimentados com serrapilheira não contaminada. Juvenis de *T. niger* também acumularam metais rapidamente e apresentaram baixas taxas de crescimento e de sobrevivência em relação aos indivíduos do grupo controle.

Além de metais, a bioacumulação de material radioativo também foi avaliada em diplópodos. Rantala (1990) estudou a acumulação de Cs radioativo em *C. britannicus* após o acidente nuclear em Chernobyl ocorrido em 1986. Os diplópodos oriundos de locais contaminados apresentaram níveis de 7360 a 13420 Bq Kg⁻¹, sendo que os níveis mais elevados foram encontrados nos indivíduos jovens.

A análise da bioconcentração (concentração de xenobióticos no solo dividido pela concentração no animal) tem sido utilizada para o cálculo da concentração máxima permitida de contaminantes ambientais no meio terrestre. Contudo, por causa da capacidade de distinguir a presença de contaminantes ambientais no substrato e evitar sua ingestão, a concentração corpórea desses contaminantes em invertebrados terrestres, incluindo algumas espécies de diplópodos, pode não refletir diretamente a concentração dos mesmos no solo (HAIMI, 2000).

3.2.4. Biomarcadores bioquímicos

Em vertebrados, a indução do citocromo P450 tem sido aceita como um biomarcador subletal de estresse bem estabelecido, decorrente da exposição a xenobióticos. Em invertebrados, o estudo da organização e distribuição do citocromo P450 é limitado a poucas espécies (LIVINGSTONE, 1990). Zanger et al. (1997) reportaram a indução de compostos do sistema citocromo P450 no diplópodo *J. scandinavius* e no isópodo *Oniscus asellus*, alimentados com serrapilheira contendo β-naphthoflavone. Assim, os resultados indicaram que essa poderia ser uma ferramenta promissora na ecotoxicologia de solos. Entretanto, para o

monitoramento ecotoxicológico, um grande número de animais seria requerido para uma adequada análise estatística, visto que as análises enzimáticas foram realizadas com um *pool* de espécimens (10 diplópodos e 15 isópodos). Também, os autores salientaram que análises individuais seriam necessárias, assim como a identificação das proteínas induzidas, para revelar similaridades e/ou diferenças no modo de indução do sistema P450 de vertebrados.

A indução da proteína de estresse hsp70, cuja síntese é aumentada em organismos expostos a estressores ambientais proteotóxicos (efeitos adversos na integridade de proteínas intracelulares) tem sido considerada por muitos pesquisadores como um biomarcador universal de estresse. Alguns trabalhos com esse enfoque têm sido realizados com diplópodos, sobretudo com exemplares da espécie *J. scandinavius*, expostos a diferentes concentrações de metais (ZANGER; KÖHLER, 1996, ZANGER et al., 1996, KÖHLER et al., 1996).

Desse modo, Zanger et al. (1996) demonstraram o aumento da expressão de hsp70 em adultos de *J. scandinavius*, alimentados com serrapilheira contaminada com diferentes concentrações de Cd (10, 30, 50 e 60 mg/Kg CdCl₂). Em outro estudo, elevados níveis de hsp70 foram reportados em diplópodos com o aumento das concentrações de Zn (2518, 4705 e 22203 mg/Kg ZnCl₂) e de Cd (51, 133, 216 e 257 mg/Kg CdCl₂); entretanto, concentrações extremamente elevadas de Cd (422 mg/Kg CdCl₂) diminuíram os níveis da proteína. Os autores sugeriram que essa redução seria uma consequência de severos danos histopatológicos no intestino médio do diplópodo (ZANGER; KÖHLER, 1996). Por outro lado, Köhler et al. (1992b) não encontraram nenhuma relação entre a exposição de Pb (1000 mg/Kg) e a expressão de hsp70 em três outras espécies de diplópodos, *G. marginata*, *C. punctatus* e *T. niger*.

Köhler et al. (2000) estudaram 38 populações de diplópodos (*J. scandinavius*) e isópodos (*O. asellus* e *Porcellio scaber*), oriundos de locais cronicamente contaminados com metais, principalmente Cd, Pb e Zn. A maioria dessas populações exibiu baixos níveis de hsp70. A insensibilidade aos metais foi associada com os baixos níveis da proteína de estresse. Baseados em modelos matemáticos e análises estatísticas, os autores propuseram que a seleção de fenótipos insensíveis à poluição crônica poderia atuar. Assim o nível da proteína de estresse seria minimizado, indicando alta integridade intracelular de proteínas. Seleção para um alto nível de hsp70, que compensaria efeitos adversos da contaminação crônica, não foi observada. Isópodos (*O. asellus*) oriundos de um local controle não foram capazes de

manter um nível baixo de hsp70 após exposição, em laboratório, a um *cocktail* de metais ou solo proveniente dos locais cronicamente contaminados.

De acordo com os autores, a excessiva acumulação corpórea de metais e danos histopatológicos podem limitar a sobrevivência de diplópodos e isópodos em locais cronicamente contaminados com metais. Assim, a seleção de fenótipos insensíveis favoreceria mecanismos de respostas que levariam os animais a evitarem o estressor ou seu impacto com pouco custo em termos de reprodução e sobrevivência, resultando em um aumento da energia despendida para mecanismos de destoxificação.

Nesse trabalho, os principais fatores, além do histórico de contaminação, explicando tanto o alto nível de hsp70 em populações não tolerantes e o baixo nível de hsp70 em populações insensíveis ao estresse diferiram entre as espécies estudadas: Pb e Cd para *J. scandinavius* e *O. asellus*; e Zn para *P. scaber*.

Diplópodos expostos a contaminantes orgânicos, γ -hexaclorociclohexano (lindane) e 2,2',5,5'-tetraclorobifenil (PCB 52), e submetidos à privação alimentar, falharam em elevar os níveis de hsp70. De acordo com os autores, a baixa proteotoxicidade decorrente da exposição aos contaminantes orgânicos sugere à presença (e indução) de enzimas de biotransformação nos diplópodos. Esses animais seriam capazes de destoxificar baixas concentrações de substâncias orgânicas antes da degradação intracelular de proteínas e, subsequentemente, antes da resposta da hsp70. Também, a privação alimentar levaria ao consumo de reservas energéticas, mas não ao acúmulo intracelular de proteínas degradadas (ZANGER; KÖHLER, 1996).

Nesse mesmo estudo, Zanger e Köhler (1996) propuseram o uso de um novo biomarcador subletal de estresse ambiental em diplópodos. Os autores observaram diferenças entre a cor do homogeneizado do grupo controle e dos animais expostos. Então, concluíram que a mudança de cor do homogeneizado estava associada com o status energético dos diplópodos em condições de estresse, uma vez que decorreu da mobilização de proteínas e polissacarídeos presentes na cutícula de *J. scandinavius*, que contém pigmentos associados. Baseados em análises estatísticas e modelos matemáticos, os autores desenvolveram um teste de cor capaz de indicar e quantificar o grau de estresse causado por metais, contaminantes orgânicos e privação alimentar. Zanger e Köhler (1996) apontaram ainda que a exposição a metais pode estar, em muitos casos, fortemente associada à privação alimentar, portanto,

deve-se levar em consideração a variação individual com um número estatisticamente significativo de replicatas.

3.2.4. Histopatologia

Análises histológicas e ultra-estruturais são métodos de diagnose bastante utilizados em humanos e outros vertebrados, para a análise de determinadas patologias. Nas últimas décadas biomarcadores histopatológicos passaram a ser aplicados em espécies de invertebrados, para a identificação de danos celulares e tissulares decorrentes de contaminação ambiental (TRIEBSKORN; KÜNAST, 1990; TRIEBSKORN et al., 1991; TRIEBSKORN et al., 1999).

Nesses estudos, órgãos relacionados com a absorção e assimilação de nutrientes essenciais tais como lipídios, carboidratos e proteínas têm sido preferencialmente utilizados (HOPKIN, 1989; PIGINO et al. 2005). Em diplópodos, o intestino médio tem sido largamente empregado por possuir, além dessas funções, um importante papel nos processos de destoxificação e excreção de xenobióticos (HOPKIN et al., 1985; TRIEBSKORN et al., 1991; KÖHLER; ALBERTI, 1991; KÖHLER; TRIEBSKORN, 1998; GODOY; FONTANETTI, 2009, NOGAROL; FONTANETTI, 2010).

O intestino médio de diplópodos é constituído por epitélio pseudoestratificado, apoiado em uma espessa membrana basal, seguido de uma camada muscular, uma camada de corpo gorduroso revestido por uma membrana externa. Abaixo da camada muscular encontram-se células hepáticas distribuídas de modo aleatório e abaixo da camada de corpo gorduroso pode se observar uma musculatura não contínua (KÖHLER; ALBERTI, 1992; FANTAZZINI et al., 2002).

Em condições normais, análises da ultra-estrutura do intestino médio de diferentes espécies de diplópodos (HUBERT, 1979b; HOPKIN; READ, 1992; CAMARGO-MATHIAS et al., 2004) revelaram que este é formado por um epitélio pseudoestratificado, constituído pelos seguintes tipos celulares: a) células principais: envolvidas com a absorção de nutrientes e também com o transporte de substâncias a partir da hemolinfa. Apresentam bordo em escova bem desenvolvido. No domínio apical, estão localizadas numerosas mitocôndrias. O núcleo localiza-se na região central e a cromatina é levemente condensada. Apresentam retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido. São observadas também várias cisternas do complexo de Golgi e numerosos esferocristais. O domínio basal é caracterizada por várias

invaginações, alcançadas por prolongamentos das células hepáticas; b) células regenerativas: estão localizadas na região basal do epitélio. O ápice dessas células não alcança o lúmen intestinal. O núcleo encontra-se na região central e as cisternas do Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso estão igualmente distribuídos pela célula; c) células secretoras: estão inseridas entre as células principais, produzem substâncias de natureza glicoprotéica que auxiliam na absorção e/ou na lubrificação da superfície epitelial.

Na camada de corpo gorduroso estão as células hepáticas, que não se apresentam interconectadas. Possuem núcleo central e as cisternas do Golgi, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e lisossomos igualmente distribuídos pela célula. (KÖHLER; ALBERTI, 1992; CAMARGO-MATHIAS et al., 2004). Apresentam ramificações que penetram através da lâmina basal nas invaginações presentes nas células principais; observa-se junções que permitem a troca de substâncias entre os dois tipos celulares (HUBERT, 1988). As células hepáticas atuam no estoque de compostos energéticos e na destoxificação do organismo por meio do armazenamento e excreção de metais e de outras substâncias tóxicas (HUBERT 1978a,b; 1979a,b).

Triebkorn et al. (1991) reportaram alterações ultra-estruturais em *C. punctatus*, após ingestão de concentrações subletais de Pb, como condensação citoplasmática, redução do volume celular, dilatação dos espaços intercelulares e desorganização das cisternas do retículo endoplasmático e dos microtúbulos. As mitocôndrias, normalmente localizadas na zona apical, apresentaram-se distribuídas pela célula. Segundo os autores, o Pb atuou no citoesqueleto e/ou balanço osmótico das células, induzindo as alterações observadas.

A ultra-estrutura do intestino médio dos diplópodos *C. alemannicum*, *C. silvarum*, *G. marginata*, *J. scandinavus*, *M. germanica*, *O. rutilans*, *P. angustus*, *T. niger*, coletados em um local contaminado com Cd, Pb e Zn, revelou alterações, não observadas no grupo controle. A principal alteração observada foi a condensação citoplasmática das células principais. Como consequência dessa redução de volume, as células regenerativas e as células principais se desconectaram tanto na região basal quanto na apical, resultando na formação de extensos espaços intercelulares. Também, os esferocristais presentes nas células principais mostraram-se completamente eletrondensos. As mitocôndrias apresentaram-se distribuídas igualmente pela célula e o retículo endoplasmático rugoso mostrou-se menor. A lâmina basal mostrou-se fina e condensada. Nas células hepáticas, foi observado um aumento da

quantidade de lipídeos e de glicogênio e alongamento dos prolongamentos celulares (KÖHLER; ALBERTI, 1992).

No mesmo trabalho, Köhler e Alberti (1992) mostraram que diplópodos alimentados com serrapilheira contaminada com Pb, em laboratório, apresentaram as mesmas alterações descritas acima, porém mais pronunciadas.

Baseados em um estudo realizado com *Deroceras reticulatum* (molusco), *Porcelio scaber* (isopoda), *J. scandinavus* (diplópoda) e *Tetrodontophora bielanensis* (colêmbola), expostos a substrato contaminado com Cd, Pb e Zn, e nos efeitos conhecidos de metais e outras toxinas no sistema digestório de outros invertebrados, Köhler e Triesbskorn (1998) desenvolveram um protocolo que combina análises quantitativas e qualitativas para avaliar mudanças ultra-estruturais aplicadas à ecotoxicologia terrestre. Os autores selecionaram quatro organelas celulares (microvilosidades, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo) e classificaram as alterações observadas em três categorias: (1) controle – estado não alterado; (2) compensação – alterações ultra-estruturais que representam uma reação frente a situações de estresse ambiental e (3) não compensação – reflete a destruição das organelas.

A descrição das alterações observadas em cada organela, de acordo com a classificação proposta, é resumida abaixo:

a) Compensação: Microvilos: encurtamento, morfologia irregular e redução numérica. Mitocôndria: aumento ou diminuição da elétron-densidade da matriz mitocondrial, moderada dilatação, aumento da formação de cristas mitocondriais. Retículo endoplasmático: encurtamento, vesicularização, dilatação ou circularização das cisternas, degranulação, aumento ou diminuição do número de cristas. Núcleo: alterações da morfologia nuclear e/ou nucleolar, alterações da elétron-densidade do carioplasma, dilatação do espaço perinuclear, aumento do número de mitoses.

b) Não compensação: Microvilos: ausência e destruição. Mitocôndria: ruptura da membrana, destruição das cristas, formação de estruturas de mielina, severa dilatação em combinação com a redução das cristas. Retículo endoplasmático: ruptura da membrana e formação de figuras mielínicas. Núcleo: ruptura, formação de *blebbeds*, destruição do envoltório nuclear e cariólise.

Nesse trabalho, Köhler e Triesbskorn (1998) observaram que *J. scandinavus* apresentou maior sensibilidade ao Cd e, em menor extensão, ao Pb.

Alterações tissulares no intestino médio do diplópodo *R. padbergi* foram estudadas, após exposição a solos contaminados com diferentes proporções de resíduos de natureza complexa, como lodo de esgoto (GODOY; FONTANETTI, 2009, NOGAROL; FONTANETTI, 2010) e solo de um sistema de biorremediação desativado, proveniente de uma refinaria de petróleo, contaminado com metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (SOUZA; FONTANETTI, submetido). Conjuntamente, as respostas obtidas nos trabalhos citados acima poderiam ser interpretadas como mecanismos de defesa dos animais expostos, numa tentativa de neutralizar e/ou eliminar os resíduos tóxicos ingeridos. Resumidamente, os principais biomarcadores tissulares observados nesses trabalhos foram:

a) Morte celular: Foram reportados vacuolização do citoplasma epitelial e das células da camada de corpo gorduroso, condensação da cromatina nuclear e dilatação do espaço intercelular. De acordo com Nogarol e Fontanetti (2010), a morte celular poderia atuar como uma resposta fisiológica, permitindo a remoção de tecidos alterados, exercendo, portanto, um papel importante na manutenção da estrutura do órgão. Contudo, a morte celular representa a ação direta de contaminantes ambientais sobre o tecido e sua persistência ou progressão pode levar à perda parcial ou total da função do órgão alvo (SOUZA; FONTANETTI, submetido).

b) Aumento na taxa epitelial de renovação: No processo de renovação epitelial, as células danificadas ou rompidas são eliminadas no lúmen do intestino, onde são digeridas. O epitélio eliminado é então substituído por um novo, oriundo do crescimento e divisão de células regenerativas. Esse processo constitui um evento fisiológico normal, que ocorre, por exemplo, durante o processo de muda e durante a substituição de células velhas (HOPKIN; READ, 1992). O aumento de regiões do epitélio em processo de renovação indica que pelo menos uma parte dos compostos tóxicos presentes no organismo poderia estar sendo eliminado durante a substituição do epitélio intestinal;

c) Aumento do número de vesículas de secreção: Vesículas de secreção do tipo apócrino (FONTANETTI et al., 2001; FANTAZZINI et al., 2002), cujo conteúdo é liberado juntamente com parte de seu citoplasma, foram observadas em toda a extensão do epitélio de *R. padbergi*, por Nogarol e Fontanetti (2010). A natureza glicoprotéica dessas vesículas levou as autoras a inferirem que esta resposta constituiria uma proteção do tecido contra a entrada de substâncias potencialmente tóxicas. Porém, em alguns tratamentos, as vesículas de secreção mostraram-se vacuolizadas, indicando que os compostos tóxicos presentes no solo alcançaram o citoplasma das células principais do epitélio intestinal. Também, o aumento da

quantidade de vesículas de secreção liberadas em direção ao lúmen, poderia representar uma resposta do organismo aos efeitos de poluentes, uma vez que a excreção de compostos tóxicos armazenados no epitélio do intestino dos diplópodos seria acelerada.

d) Aumento do número de hemócitos por entre as células do corpo gorduroso: Hemócitos são células do sistema imune de artrópodos, capazes de detectar, encapsular ou fagocitar patógenos e substâncias estranhas ao organismo (XYLANDER, 2009). O número total de hemócitos circulantes pode ser afetado por mudanças das condições ambientais. Diferentes tipos de estressores podem ativar a proliferação e migração de hemócitos para os tecidos afetados. Grande quantidade de hemócitos isolados e agrupados tem sido observado por entre as células da camada de corpo gorduroso de *R. padbergi*, indicando a ocorrência de lesão tecidual com possível processo inflamatório (GODOY; FONTANETTI; 2009; NOGAROL; FONTANETTI, 2010, SOUZA; FONTANETTI, submetido), constituindo, portanto, um mecanismo de defesa do organismo, que atuaria na destruição de toxinas, podendo estar relacionado também com processos de renovação tecidual, por meio da reabsorção do epitélio injuriado;

e) Aumento de grânulos citoplasmáticos nas células do corpo gorduroso: Em diplópodos, assim como em outros invertebrados, o acúmulo intracelular de metais potencialmente tóxicos em formas insolúveis, fisiologicamente inativas, é um importante mecanismo para a manutenção da homeostase e, também, para a destoxificação desses elementos (HOPKIN; READ, 1992).

A origem dessas estruturas ainda não está esclarecida do ponto de vista biológico. Tem sido sugerido que os grânulos podem ser gerados diretamente no complexo de Golgi ou nas cisternas associadas. Uma segunda hipótese considera que os grânulos são produzidos no retículo endoplasmático rugoso. Grânulos que aparecem em vacúolos ou vesículas de origem indeterminada constituem uma terceira possibilidade. O quarto local de formação de grânulos seria a porção interna das mitocôndrias (KÖHLER, 2002).

Em algumas espécies, os grânulos podem permanecer por um grande período de tempo na célula, antes de ser excretado. Quando precipitados, podem ser transportados para o lúmen intestinal e posteriormente liberados (VANDENBULCKE et al., 1998). O processo de muda também constitui um importante meio de destoxificação, uma vez que o epitélio do intestino é rompido e o conteúdo das células principais é eliminado juntamente com as fezes (HUBERT, 1979b). O aumento da quantidade de grânulos intracelulares, em tecidos de invertebrados

aquáticos e terrestres, em função da concentração de metais presentes no substrato tem sido utilizado como um biomarcador sensível de contaminação ambiental por metais (KÖHLER et al., 1996; BARKA et al., 2007). O mesmo parece ser verdadeiro para o diplópodo *R. padbergi*.

A indução de processos de destoxificação, bem como a sobrevivência, frente às situações de estresse requer a mobilização de reservas energéticas (KÖHLER et al., 1996). O consumo dessas reservas pode ser avaliado por meio de análises histoquímicas. Essas análises podem ser utilizadas em complementação às análises morfológicas, para a detecção de substâncias específicas, como glicogênio, proteínas e lipídeos. Atualmente, a depleção dessas substâncias tem sido considerada na avaliação ecotoxicológica (ANSALDO et al., 2006). Alguns pesquisadores têm aplicado esses biomarcadores em diplópodos para a avaliação dos efeitos de contaminantes ambientais (GODOY; FONTANETTI, 2010, NOGAROL; FONTANETTI, 2010, FONTANETTI; SOUZA, dados não publicados).

Estudos recentes indicam que o corpo gorduroso perivisceral de diplópodos também pode ser utilizado em estudos ecotóxicológicos (SOUZA, FONTANETTI, submetido). Esse órgão apresenta intensa atividade metabólica e sua função está relacionada com o armazenamento de lipídios, glicogênio, proteínas e ácido úrico, assim como o armazenamento, neutralização e excreção de substâncias que não são úteis para o animal (HUBERT, 1979, HOPKIN; READ, 1992, FONTANETTI et al., 2006).

Análises histológicas e histoquímicas foram realizadas no corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* por Souza e Fontanetti (dados não publicados). Nesse órgão, a perda da integridade da membrana plasmática, a desorganização citoplasmática, o aumento do número de hemócitos e a depleção de polissacarídeos neutros, proteínas totais e de cálcio poderiam ser considerados biomarcadores de contaminação ambiental em diplópodos.

Köhler e Alberti (1992) demonstraram que a reação de diplópodos submetidos a estresse ambiental em condições naturais correspondeu grandemente com as respostas observadas em laboratório, indicando que impactos histopatológicos podem influenciar o papel ecológico desses animais no ecossistema.

4. Conclusão

O uso de ferramentas biológicas para a detecção de xenobióticos no ecossistema terrestre vem ganhando destaque. Apesar de sua importância ecológica, o uso de diplópodos como bioindicadores ainda é relativamente escasso em comparação com outros invertebrados terrestres saprófagos. Ensaios ecotoxicológicos com diplópodos podem revelar o grau de poluição do solo e fornecer subsídios para o desenvolvimento de programas voltados à preservação desse ecossistema. Esses animais podem ser negativamente afetados por contaminantes ambientais em diferentes níveis de sua organização biológica. A análise da taxa de mortalidade é um parâmetro largamente utilizado. Biomarcadores subletais podem ser considerados mais sensíveis, acurados e relevantes do ponto de vista ecológico e ecotoxicológico. Assim, alterações bioquímicas, histológicas, ultraestruturais, fisiológicas ou ainda qualquer manifestação de estresse ambiental têm sido utilizadas como biomarcadores subletais em diplópodos, constituindo ferramentas promissoras na ecotoxicologia terrestre. Nesses animais, a ação de metais tem sido largamente estudada e a sensibilidade a esses compostos têm sido relatada. Diplópodos tem se mostrado sensíveis também para a ação de contaminantes orgânicos, porém, comparativamente, os efeitos desses poluentes têm sido avaliados em menor extensão. Necessita-se, portanto, de mais estudos com enfoque na ação de contaminantes orgânicos bem como na ação de misturas complexas em diplópodos.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Referências

ADAMSKI, Z.; BLOSZYK, J.; BRUIN, J.; ZIEMNICK, K. Non-omnia moriantur—toxicity of mancozeb on dead wood microarthropod fauna. **Experimental Applied Acarology**, v. 42, p. 47–53, 2007.

ANSALDO, M., NAHABEDIAN D.E.; HOLMES-BROWN, E.; AGOTE, M.; ANSAY, C.V.; GUERRERO, N.R.V.; WIDER, E. A. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. **Toxicology**, v. 224, p. 119-127, 2006.

BARKA, S. 2007 Insoluble detoxification of trace metals in a marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to copper, zinc, nickel, cadmium, silver and mercury **Ecotoxicology**, v. 16, p. 491–502, 2007.

BEYER, W.N.; PATTEE, O.H.; SILEO, L.; HOFFMAN, D.J.; MULHERN, B.M. Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. **Environmental Pollution**, v. 38, p. 63-83, 1985.

BEYER, W.N.; MILLER, G.; SIMMERS, J.W. Trace elements in soil and soil biota in confined disposal facilities for dredged material. **Environmental Pollution**, v. 65, p. 19-32, 1990.

BOCCARDO, L.; FERNANDES, M.N. Toxicidade do Carbamato Methiocarb para os diplópodos *Gymnostreptus olivaceus* e *Plusioporus setiger*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 13, p. 29-33, 2000.

BOCCARDO, L.; FERNANDES, M.N. Toxicity of the deltamethrin pyrethroid on neotropical millipedes, *Gymnostreptus olivaceus* and *Plusioporus setiger*. **Journal Advanced Zoology**, v. 22, p. 1-4, 2001.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). **Brazilian Journal of Morphology. Science**, v. 21, n. 2, p. 65-71, 2004.

CARTER, A. Cadmium, cooper and zinc in soil animals and their food in a red system. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, p. 2751-2757, 1983.

EOM, I.M.; RAST, C.; VEBER, A.M.; VASSEUR, P. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 190-205, 2007.

FAIRBROTHER, A.; GLAZEBROOK, P.W.; VAN STRAALLEN, N.M.; TARAZONA, J.V. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press Pensacola FL, 2002.

FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Midgut of the millipede, *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida): Histology and histochemistry. **Arthropoda Selecta**, v. 11, n. 2, p. 135-142, 2002.

FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; TIRITAN, B.M.S. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Brazilian Journal of Morphology Science Iheringia.**, v. 23, p. 487-493, 2006.

FONTANETTI, C.S.; PEREZ, D.G.; NOGAROL, L.R.; SOUZA, B.S.; BOZZATO, V. Biomonitoring of substrates containing sewage sludge: assessment of the feasibility in using the *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda) as bioindicator. **Journal of Brazilian Ecotoxicology**, in press.

GODOY, J.A.P.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substrate containing sewage sludge. **Water, Air and Soil Pollution**, 2009, in press.

GRELLE, C.; FABRE, M.-C.; LEPRÊTE, A.; DESCAMPS, M. Myriapod and isopod communities in soils contaminated by heavy metals in northern France. **European Journal of Soil Science**, v. 51, p. 425-433, 2000.

HAIMI, J. Decomposer animals and bioremediation of soils. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 233-238, 2000.

HEIKENS, A.; PEIJNENBURG, W.J.G.M.; HENDRIKS, A.J. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 113, p.385-393, 2001.

HOPKIN, S.P.; WATSON, K.; MARTIN, M.H.; MOULD, M.L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius _B_lembola* and *Glomeris marginata* (Chil: Dipl.). **Bijdragen Tot De Dierkunde**, v. 55, p. 88-94, 1985.

HOPKIN, S.P. **Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates**. New York, Elsevier, 1989.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The Biology of Millipedes**. Oxford, Oxford University Press. 233p, 1992.

HOFFMAN, R.L.; GOLOVATCH, S.I., ADIS, J., MORAIS, J.W., 2002. Myriapoda : Diplopoda. In : **Amazonian Arachnida and Myriapoda**. Moscow : Pensoft, p. 505-534.

HUBERT, M. **Contribution à l'étude des organes excréteurs et de l'excrétion chez les Diplopedes**. Thèse de Doctorat d'État, Université de Rennes, France.1977.

HUBERT M. Données histophysiologiques complémentaires sur les bioaccumulations minérales et puriques chez *Cylindroiulus londinensis* (Leach, 1814) (Diplopode, Iuloidea). **Archives de Zoologie Experimental et Generale**, v. 119, p. 669–683, 1978a.

HUBERT, M. Les cellules hépatiques de *Cylindroiulus londinensis* (Leach, 1814) (Diplopode, Iuloidea). **Comptes Rendus de l'Académie Science Paris**, v. 286D, p. 627–630, 1978b.

HUBERT, M. L'intestin moyen de *Cylindroiulus londinensis* Leach (*psylopygus* Latzel) (Diplopoda, Iuloidea) : observations ultrastructurales en relation avec la fonction d'accumulation, **Ibid.** T.289D, p.749-752, 1979a.

HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: **Myriapod Biology** (M. Camatini ed.), p.127-134. Academic Press: London, 1979b.

HUBERT, M. Le complexe anatomique et fonctionnel cellules hépatiques- mésenteron de *Cylindroiulus londinensis* Leach (*psylopygus* Latzel): étude ultrastructurale et spectrographique. **Bulletin de la Société Zoologique de France**, v. 113, p.191-198, 1988.

KNIGGE, T. ; KÖHLER, H.-R. Lead impact on nutrition, energy reserves, respiration and stress protein (hsp70) level in *Porcellio scaber* (Isopoda) populations differently preconditioned in their habitats. **Environmental Pollution**, v. 108, 209-217, 2000.

KÖHLER, H.-R.; ALBERTI, G. The effect of heavy metal stress on the intestine of diplopods. In: E. Meyer, K. Thaler and W. Schedl (Editors), **Advances in Myriapodology**. Ber. Nat.-med. Ver. Innsbruck, Suppl. 10: 257-267, 1992.

KÖHLER, H.-R.; STORCH, V.; ALBERTI, G. The impact of lead on the assimilation efficiency of laboratory-held Diplopoda (Arthropoda) preconditioned in different environmental situations. **Oecologia**, v. 90, p. 113-119, 1992a.

KÖHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R.; STÖCKER, W.; KOETZEL, P.M.; ALBERTI, G. The 70 Kd heat shock protein (hsp70) in soil invertebrates: A possible tool for monitoring environmental toxicants. **Archives of Environmental and Contamination Toxicology**, v. 22 p. 334–338, 1992b.

KÖHLER, H.-R.; KÖRTJE, K.-H.; ALBERTI, G. Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). **BioMetals**, v. 8, 37-46, 1995.

KÖHLER, H.-R.; HÜTTENRAUCH, K.; BERKUS, M.; GRÄFF, S., ALBERTI, G. Applied soil ecology cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. **Applied Soil Ecology**, v. 3, p. 1-15, 1996.

KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. **Biomarkes**, v. 3, n. 2, p. 109-127, 1998.

KÖHLER, H.-R.; ZANGER, M.; ECKWERT, H.; EINFELDT, I. Selection favours low hsp70 levels in chronically metal-stressed soil arthropods. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 13, p. 569-582, 2000.

KÖHLER, H.-R. Localization of metals in cells of saprophagous soil arthropods (Isopoda, Diplopoda, Collembola). **Microscopy Research and Technique**, v. 56, p. 393-401, 2002.

KRIVOLUCKIJ, D.A.; TICHOMIROVA, A.L.; TURCANINOVA, V.A. Strukturaänderungen des Tierbesatzes (Land-und Bodenwirbellose) unter dem Einfluss der Kontamination des Bodens mit Sr⁹⁰. **Pedologia**, v. 12, p.374-380, 1972.

LIVINGSTONE, D.R. Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in invertebrates. **Biochemical Society Transactions**, v. 18, p. 15-19, 1990.

LØKKE, H.; VAN GESTEL, C.A.M. **Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests**. Chichester, UK: John Wilwy and Sons Ltd, 1998.

NAKAMURA, K.; TAIRA, J. Distribution of elements in the millipede, *Oxidus gracilis* C. L. Koch (Polydesmida: Paradoxosomatidae) and to relation of environmental habitats. **Biomaterials**, v. 18, p. 651–658, 2005.

NAKAMURA, K.; TAIRA, J.; HIGA, Y. Internal elements of the millipede, *Chamberlinius hualienensis* Wang (Polydesmida: Paradoxosomatidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 40, p. 283–288, 2005.

NATAL DA LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. Avoidance tests with collembolan and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2188-2193, 2004.

NOGAROL, L. R.; FONTANETTI, C. S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissue responses of the midgut. **Micron**, v.41, p.239-246, 2010.

PAOLETTI, M.G.; IOVANE, E.; CORTESE, M. Pedofauna bioindicators and heavy metals in five agroecosystems in north-east Italy. **Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol**, v. 25, p. 33-58, 1988.

PATON, G.I.; KILLHAM, K.; WEITX, H.J.; SEMPLE, K.T. Biological tools for the assessment of contaminated land: applied soil ecotoxicology. **Soil Use and Management**, v. 21, p. 487-499, 2006.

PIGINO, G. ; MIGLIORINI, M.; PACCAGNINI, E.; BERNINI, F. ; LEONZIO, C. Fine structure of the midgut and Malpighian papillae in *Campodea (Monocampa) quilisi* Silvestri, 1932 (Hexapoda, Diplura) with special reference to the metal composition and physiological significance of midgut intracellular electron-dense granules. **Tissue and Cell**, v. 37, p. 223-232, 2005.

PONOMARENKO, A.N.; TRUFANOV, G.V.; GOLUBEV, S.N. Microelements in soil invertebrates. **Soviet Journal of Ecology**, v.5, p.279-281, 1974.

PYZA, E.P.; MAK, P.; KRAMARZ, P.; LASKOWSKI, R. Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, p. 244-251, 1997.

RANTALA, M. Intensity of radiation in some diplopods and chilopods reared in radioactive compost. In: **Proceedings of the 7th International Congress of Myriapodology**, (ed. MINELLI, A.), E.J. Brill, Leiden, p. 271-287, 1990.

READ; H.J.; MARTIN, M.H. A study of myriapod communities in woodlands contaminated with heavy metals. In: **Proceedings of the 7th International Congress of Myriapodology**. (Ed. MINELLI, A.). Brill, Leiden, 289-298, 1990.

RÖMBKE, J.; GARCIA, M. Assessment of ecotoxicological effects of pesticides on the soil fauna and soil processes under tropical conditions. German-Brazilian Workshop on Neotropical Ecosystems – Achievements and Prospects of Cooperative Research. Hamburg, September 3-8, 2000. Session 4: Living Resources Management: Approaches, Techniques, Variability.

RUPPERT E.E.; BARNES R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Roca, 6^a ed., 2005. 1029p.

SCHUBART, O. Os miriápodos e suas relações com a agricultura. **Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia**, v.2, n.16, p.205-234, 1942.

SIEGEL, S.M.; SIEGEL, B.Z.; PUERNER, N.; SPEITEL, T.; THORARINSSON, F. Water and soil biotic relations in mercury distribution. **Water, Air and Soil Pollution**, v.4, p. 9-18, 1975.

SOCHOVÁ, I.; HOFMAN, J.; HOLOUBEK, I. Using nematodes in soil ecotoxicology. **Environmental International**, v. 32, p. 374-383, 2006.

TAJOVSKY, K., 1998. Test on the millipede *Brachydesmus superus* Latzel 1884. In: LOKKE, H.; VAN GESTEL, C.A.M. (Eds.), **Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests**. Wiley, Chichester, pp. 97–205.

TRIEBSKORN, R.; KÜNAST, C. Ultrastructural change in the digestive system of *Deroceras reticulatum* (Mollusca: Gastropoda) induced by lethal and sublethal concentrations of the carbamate molluscicide cloethocarb. **Malacologia**, v. 32, n.1, p. 89-106, 1990.

TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.R.; ZANH, T.; VOGT, G.; LUDWIG, M.; RUMPF, S.; KRATZMANN, M.; ALBERTI, G.; STORCH, V. Invertebrate cells as targets for Hazardous substances. **Zeitschrift für Angewandte Zoologie.**, v. 78, p. 277-287, 1991.

TRIEBSKORN, R.; HENDERSON, I.F.; MARTIN, A.P. Detection of iron in tissues from slugs (*Deroceras reticulatum* Müller) after ingestion of iron chelates by means of energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM). **Pesticide Science**, v. 55, p. 55-61, 1999.

VANDENBULCKE, F.; GRELE, C.; FABRE, M.-C.; DESCAMPS, M. Implication of the midgut of the centipede *Lithobius forficatus* in the heavy metal detoxification process. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 41, p. 258-268, 1998.

XYLANDER, W. Hemocytes in Myriapoda (Arthropoda): a review. **Invertebrate Survival Journal**, v. 6, p. 114-124, 2009.

WEBER, M.; NENTWIG, W. Impact of Bt corn on the diplopod *Allajulus latestriatus*. **Pedobiologia**, v. 50, p. 357-368, 2006.

ZANGER, M.; HARREUS, D.; ALBERTI, G.; KÖHLER, H.-R. Different methods for quantifying hsp70 in diplopods. **Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft**, v. 187, p. 335, 1994.

ZANGER, M.; KÖHLER, H.-R. Colour change: A novel biomarker indicating sublethal stress in the millipede *Julus scandinavicus* (Diplopoda). **Biomarkers**, v. 1, p. 99-106, 1996.

ZANGER, M.; ALBERTI, G.; KUHN, M.; KÖHLER, H.-R. The stress-70 protein family in diplopods: induction and characterization. **J. Comp. Physiol. B**, v. 165, p. 622-627, 1996.

ZANGER, M.; GRÄFF, S.; BRAUNBECK, T.; ALBERTI, G.; KÖHLER, H.-R. Detection and Induction of Cytochrome P450IA (CYP 1A)-Like Proteins in *Julus scandinavicus*

(Diplopoda) and *Oniscus asellus* (Isopoda): A First Analysis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 511-517, 1997.

ZHULIDOV, A.V.; DUBOVA, N.A. Mercury and cadmium accumulation by *Rossiulus kesseleri* (Diplopoda) at various levels of metals in food. **Ekologiya** (Sverdlovsk), v. 19, p. 86-88, 1988.

Tabela 1. Contaminantes ambientais avaliados e biomarcadores empregados em diplópodos

Contaminantes ambientais	Biomarcadores	Referências
Metais		
Cd, Cu, _B e Zn.	Consumo de alimentos e assimilação de nutrientes	Hopkin et al. (1985)
Cd e Hg	Consumo de alimentos e assimilação de nutrientes	Zhulidov e Dubova (1988)
Cu, Cd, _B e Zn	Estrutura de comunidades	Read e Martin (1990)
Pb	Histopatologia	Tribskorn et al. (1991)
Cd, _B e Zn	Histopatologia	Köhler e Alberti (1992)
Pb	Consumo de alimentos e assimilação de nutrientes	Köhler et al. (1992a)
Pb	Indução de proteína de estresse (hsp70)	Köhler et al. (1992b)
Cd e Zn	Mudança de cor do homogeneizado	Zanger e Köhler (1996)
Cd	Indução de proteína de estresse (hsp70)	Zanger et al. (1996)
Cd, Pb e Zn	Histopatologia	Köhler e Tribskorn (1998)
Cd, Pb e Zn	Indução de proteína de estresse (hsp70)	Köhler et al. (2000)
Cd, Pb e Zn	Estrutura de comunidades	Grelle et al. (2000)
Cd, Cu, Pb e Zn	Bioacumulação	Heinks et al. (2001)
Metais	Bioacumulação	Nakamura et al. (2005)
Metais	Bioacumulação	Nakamura e Taira (2005)
Material radiotativo		
Sr ⁹⁰	Estrutura de comunidades	Krivoluckij et al. (1972)
Cs	Bioacumulação	Rantala (1990)

Contaminantes orgânicos		
β -naphthoflavone	Indução de citocromo P450	Zanger et al., (1997)
Linear alquilbenzeno sulfonato	Mortalidade	Tajosky, 1998
Carmato methiocarb	Mortalidade	Boccardo e Fernandes (2000); Boccardo et al. (2001)
Deltametrin	Mortalidade	Boccardo e Fernandes (2000); Boccardo et al. (2001)
Lindane	Indução de proteína de estresse (hsp70)	Zanger and Köhler (2006)
PCB 52	Indução de proteína de estresse (hsp70)	Zanger and Köhler (2006)
Mancozeb	Mortalidade	Adamski et al. (2007)
Misturas complexas		
Lodo de esgoto	Histopatologia	Godoy e Fontanetti (2009); Nogarol e Fontanetti (2009)
<i>Landfarming</i>	Histopatologia	Souza e Fontanetti (2010)

7.6. Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil

Esse artigo foi submetido ao periódico “**Ecotoxicology and Environmental Safety**”.

Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil

Tatiana da Silva Souza¹, Carmem Silvia Fontanetti¹

¹Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, Brazil

Correspondence to: Carmem Silvia Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24A, nº 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil

Phone: (55) 19 3526-4156, FAX: (55) 19 3526-4136

e-mail: fontanet@rc.unesp.br

Artigo submetido ao periódico **Ecotoxicology and Environmental Safety**

Abstract

Morphological studies have been performed in invertebrates to elucidate cellular and/or tissue damage caused by environmental contamination. In present work, the exposure to industrial soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons and metals led to histological alterations in the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). The following alterations were observed: increase of cytoplasmic granules in the fat body; increase in the number of regions of the epithelium in the process of renewal; increase in the number of hemocytes present among the cells of the fat body and degenerative changes in the midgut epithelium. Based on results, we concluded that *R. padbergi* proved to be an excellent bioindicator for the evaluation of soil quality. The observed changes could be used as biomarkers for assessing sublethal effects of contaminated soils.

Keywords: Histopathology, ecotoxicology, landfarming, heavy metals, PAHs

1. Introduction

Diplopods are known for their role in decomposition of vegetal organic matter and in soil aeration and enrichment, stimulating microbial activity essential for nutrient cycling (Hopkin and Read, 1992). Due to their habit in the soil layers and their feeding behaviour, diplopods have been used to assess the quality of soils (Köhler et al., 1992, 1995).

Morphological studies have been used in invertebrate species for the identification of cellular and/or tissue responses due to environmental contamination (Triebkorn and Künast, 1990, Triebkorn et al., 1999).

The midgut of diplopods acts as a barrier preventing toxic or non-essential compounds from reaching the rest of the body (Hopkin et al., 1985). Thus, this organ plays an important role in the process of detoxification and excretion of xenobiotics (Hopkin et al., 1985, Triebkorn et al., 1991, Köhler and Triebkorn, 1998). For example, metals are accumulated in insoluble granules in order to neutralize the toxic effects of these compounds (Köhler, 2002). Moreover, the activation process of biotransformation of organic pollutants is more complex because each class of contaminant has a specific metabolic pathway that may lead to the formation of insoluble and soluble metabolites, which can be stored in the body of the animal or may be disposed (Triebkorn and Köhler, 1996). However, when they ingest highly contaminated soil or food, undesirable compounds may actively enter into their cells (Vandenbulcke et al., 1998), promoting changes.

The *Rhinocricus padbergi* species has a high population density, is easily maintained in the laboratory and a number of aspects of their biology and morphology are described in the literature (Camargo-Mathias et al., 1998, 2004, Fantazzini et al., 1998, 2002, Camargo-Mathias and Fontanetti, 2000, Arab et al., 2003, Fontanetti and Camargo-Mathias, 2004, Fontanetti et al., 2004, 2006).

Landfarmings from oil refineries are industrial soils that are periodically contaminated with oil residue. This waste has high concentrations of important environmental pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and metals

(Marin et al., 2005). Few ecotoxicological studies have been conducted of terrestrial invertebrates for the assessment of soil contaminated with PAHs and metals. The landfarming soil is well suited for this purpose.

The aim of this study was to investigate histological and histochemical changes in the midgut of *R. padbergi* that could act as biomarkers in the assessment of soil contaminated with hydrocarbons and metals.

2. Material and Methods

2.1. Soils

The landfarming area evaluated in this study came into operation in 1988 for the treatment and disposal of oil waste generated during oil refining. In June 2007, it was deactivated. The landfarming area consisted of a set of eight cells, each one having an area of 5,000m² with a capacity to treat about 100m³ of oil sludge per month (total area = 40,000m² and total capacity of 800m³ of oil sludge per month). Nine months after the deactivation, about 10kg of landfarming soil was collected.

Soil from the Universidade Estadual Paulista, Rio Claro campus, from the same place where the diplopods were collected, was used as the control soil (SC).

After collection, soils were kept at 4°C until the beginning of the experiments.

2.2. Soil analyses

The concentration of metals (Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) presents in both landfarming and control soil was determined according to USEPA method 6010B. The analysis of total petroleum hydrocarbons (TPHS) and PAHs was performed according to USEPA methods - SW 846 - 015A and USEPA 8100, respectively. All analyses were performed by the Laboratório São Lucas - Environmental Analysis, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

The values obtained in this study were compared with the Guiding Values for Soil and Groundwater for the State of São Paulo (CETESB, 2005). According to this standard, the Reference Value of Quality (RVQ) is the concentration of a substance in the soil that defines a soil as clean. Concentrations above the Value of Prevention (VP) can promote

harmful changes to soil quality. Concentrations above the Value of Intervention (VI) represent potential risks to human health, considering a generic exposure scenario.

2.3. Bioassays with *R. padbergi*

Adult specimens of *R. padbergi* were collected on the campus of Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo. After collection, specimens were kept in the laboratory for two weeks in a tank filled with a mixture of soil, tubers and tree trunks in the process of decomposition, from the same areas of capture. The room temperature was controlled ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) and the photoperiod was 12 hours light/12 hours dark.

After the acclimation period, four tanks (20cm wide x 25cm long x 45cm high) were filled with different concentrations of landfarming soil (100%: 5kg of landfarming soil; 70%: 1.5kg of control soil + 3.5kg of landfarming soil; 50%: 2.5kg of control soil + 2.5kg of landfarming soil; 30%: 3.5kg of control soil + 1.5kg of landfarming soil). A fifth tank was filled with 5kg of control soil. Twenty diplopods were placed in each tank.

The animals were monitored for 90 days. Every day dead diplopods were removed from the tank. In this way, the analysis of the toxicity of landfarming soil was performed, excluding the animals that were dissected for histological analysis and histochemistry. Results related to mortality were expressed as the number of dead animals found in each bioassay, in relation to exposure time.

2.4. Histology and histochemistry

After 7 and 21 days of exposure, three diplopods from each bioassay were anaesthetized with ether or chloroform and dissected with a stereomicroscope in a Petri dish containing a saline solution for insects. The midgut was removed and subsequently fixed in 4% paraformaldehyde and Carnoy. Then the material was dehydrated in ethanol solutions at 70, 80, 90 and 95% and embedded in resin (JB-4 - Polaron Instruments/BIO RAD) for 24 hours in a refrigerator. Subsequently, the material was transferred to plastic molds containing resin for inclusion. Once polymerized, sections of $6\mu\text{m}$ thick were obtained with the aid of a LEICA Microtome RM2245.

For the histological analysis, the sections were stained with haematoxylin and eosin. Histochemical tests were applied for detection of total proteins – the bromophenol

blue technique (Pearse, 1985), neutral polysaccharides – the PAS technique (Junqueira and Junqueira, 1983) and calcium - the von Kossa technique (Junqueira and Junqueira, 1983).

3. Results

3.1. Soil analyses

The concentration of the TPHs from the landfarming soil was 448.7 times higher than in the control soil, indicating that the soil was contaminated with waste oil. The landfarming soil presented 2749mg/kg of PAHs. Of these, 16% was composed of PAHs with 2 aromatic rings (naphthalene), 26.22% with PAHs of 3 aromatic rings (acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene and anthracene), 19.35% of PAHs with 4 aromatic rings (fluoranthene, pyrene, benzo [a] anthracene and chrysene), 33.46% of PAHs with 5 aromatic rings (benzo [b] fluoranthene, benzo [k] fluoranthene, benzo [a] pyrene and dibenzo [a, h] perylene) and 4.87% of PAHs with 6 aromatic rings (benzo [g, h, i] perylene and indeno [1, 2, 3-c, d] pyrene). In the landfarming soil, the values for PAHs were higher than those established in accordance with the Guiding Values for Soils and Groundwater for the State of São Paulo (CETESB, 2005) (Table 1).

The control soil had concentrations below the detection limit for the 16 PAHs analyzed, which are consistent with those established by CETESB (2005) (Table 1).

The concentration of metals was also significantly higher in the landfarming soil. The Ni concentration was 24.29 times higher in landfarming than in the control soil. High levels of Pb were also detected in landfarming soil (9.03 times higher than in the control). Concentrations of Ba, Zn, Cu, Cr and Fe were also higher in the landfarming soil. The concentration of Mn was higher in the control soil (1.6 times) compared to the landfarming. In both soils evaluated, the levels of Cd did not exceed the limit of detection (<0.07mg/kg) for the analytical method used (Table 1).

In the soil from the landfarming the values obtained for the Ba, Cr, Cu, Ni and Pb were higher than the Values of Quality and Prevention, according to CETESB (2005). The concentration of Zn was higher than the Value of Prevention (Table 1).

Of the control soil, only the value obtained for Cr (82mg/kg) was above the Value of Quality (40mg/kg) and the Value of Prevention (75mg/kg), according to CETESB (2005) (Table 1).

3.2. Bioassays with *R. padbergi*

3.2.1. Behavior and mortality of *R. padbergi* exposed to different concentrations of landfarming

During the day, the control group remained buried in the soil, while being very active on the surface area overnight.

The animals exposed to concentrations of landfarming also turned over the soil, being observed as buried during the day and in intense activity during the night. However, several individuals of *R. padbergi* remained on the soil surface, even during the day, a fact uncommon for nocturnal animals. This behavior was intensified after the 15th day of exposure. Since the beginning of the experiment, diplopods climbing the walls of the tank, apparently in an attempt to escape, were observed.

From the 7th to 21st day of exposure, the 100% landfarming soil promoted the highest number of deaths, nine in total. In that same period, only two of the diplopods exposed to 70% landfarming soil died. No deaths were reported in other concentrations (Table 2).

From the 21st to 60th day of exposure, four of the diplopods exposed to 100% landfarming soil died. Seven animals died in both 70% and 50% landfarming soil and four diplopods died in 30% landfarming (Table 2).

All diplopods exposed to landfarming soil died before the 90 days of exposure (Table 2).

3.2.2. Histology and histochemistry

3.2.2.1. Control group

The control group presented a midgut (Figure 1) comprised of an intact epithelium, characterized as pseudostratified, as described by Fantazzini et al. (2002). The principal cells showed nuclei of round to oval morphology, located in the middle-apical region (Figure 1A). The apical membrane of these cells had a brush border (arrow

in Figure 1A). In the basal region, regenerative cells were found (Figure 1B). A basal membrane, clearly demonstrated by the PAS technique (Fig. 1C), supports the epithelium, where below this there is a layer of muscle cells (Figures 1B, D, E). Next, the fat body is located; whose cells had an irregular morphology, spherical nucleus and cytoplasm with cytoplasmic granules of varied content (Figures 1A, B). Among the fat body cells some hemocytes (Figures 1A, B) were observed. Secretory vesicles being released into the lumen were rarely observed (Figure 1E).

The control group showed the same histochemical pattern described for *R. padbergi* by Fantazzini et al. (2002). Neutral polysaccharides were detected in the brush border, in the principal cells, in the basal membrane and in the fat body (Figure 1C). The principal cells, the microvilli, the cells of the fat body and muscle fibers, reacted strongly to the technique used for the detection of proteins (Figures 1D, E). The principal cells showed a positive reaction to the detection of calcium, as well as cytoplasmic granules in the cells of the fat body (Figure 1F).

Agranulocyte and granulocyte hemocytes were observed (Figure 1B); some of the hemocytes reacted positively when subjected to bromophenol blue (used for the detection of protein) (Figure 4B) while others responded more positively to the technique for the detection of neutral polysaccharides (detail in Figure 4B).

The vesicles of the secretion showed a weakly positive reaction for the detection of total protein (Figure 1E), neutral polysaccharides and calcium.

3.2.2.2. Animals exposed for 7 and 21 days to different concentrations of landfarming soil

All concentrations of landfarming soil promoted histological changes in the midgut of *R. padbergi*. The same changes were observed in both exposure times, 7 and 21 days. These changes were more severe at the higher concentrations of landfarming, (100%, 70% and 50%) and milder at 30% landfarming (Table 3).

Cell death was observed in both the epithelium and in the fat body. The epithelium showed intense cytoplasmic vacuolization in both the middle-apical region (Figures 2A, B, C) and in the basal region (Figure 2D). The principal cells showed fragmented nucleus (arrows in Figure 2C). In some regions of the epithelium, the

intercellular space appeared dilated (arrowheads in Figure 2E). The fat body showed cellular vacuolization (Figure 2F), karyolysis (arrowheads in Figure 3A) and nuclei with an altered morphology (arrow in Figure 3A).

There was a large increase in regions of the epithelium in the renewal process established by the release of cells into the intestinal lumen (Figures 3B, C, D, E). These cells had nuclei with a pale coloration, characteristic of karyolysis (arrowheads in Figures 3D, E).

A large increase of cytoplasmic granules in cells of the fat body were observed (Figures 2A, B, 4A, D), especially after the 7 day exposure. The animals exposed for 21 days had a reduced amount of these granules.

In some regions of the intestine, a reduction of the volume of the fat body cells was observed (Figure 3F).

There was a notable increase in the number of isolated hemocytes (Fig. 2A). Atypically grouped hemocytes, apparently in an enclosed compartment, were consistently observed among the cells of the fat body (Figures 4A, C).

In the histochemical analysis, the exposed animals showed the same pattern described for the control group.

4. Discussion

In this study, few deaths were recorded until the 21st day of the experiment. Thus, the species *R. padbergi* proved adequate for the study of the sublethal effects of landfarming soil.

Tissue changes related to defence and detoxification may be reversible, being present only as a result of an altered metabolic status of the organism (Nero et al., 2006). In invertebrates, the intracellular accumulation of potentially toxic metals in insoluble forms and in physiologically inactive ones is an efficient mechanism for detoxification of these elements (Köhler et al. 1996, Köhler, 2002, Pigino et al. 2006; Barka, 2007). In diplopods, the midgut, including liver cells and the associated fat body, works actively in this process (Köhler, 2002). In this study, seven days of exposure were sufficient to activate the detoxification of *R. padbergi*, caused by the remarkable increase of cytoplasmic granules in the cells of the fat body of these animals.

The biotransformation of toxic compounds requires the consumption of energy reserves. In response to exposure to metals, Ansaldo et al. (2006) reported a depletion of glycogen in various organs of the gastropod *Biomphalaria glabrata*. Köhler et al. (1996) reported a reduction in the amount of lipids in the hepatopancreas of the isopod *Porcellio scaber*. The fat body associated with the midgut of *R. padbergi* is an important storage site for neutral polysaccharides and protein compounds (Fantazzini et al., 2002). In the present study, no decrease in the amount of any such elements was observed, however the reduction of the volume of fat body cells of the animals exposed to landfarming soil could be due to the large energy demand for detoxification of the toxic compounds found in the soil.

Degeneration and regeneration of the intestinal epithelium are normal physiological events that occur, for example, during the molting process and during the replacement of old cells. Damaged or broken cells are eliminated in the lumen of the intestine, where they are digested. The epithelium is eliminated and then replaced by a new one, derived from the growth and division of regenerative cells (Hopkins and Read, 1992, Rost-Roszkowska, 2008). In this study, the increase in regions of the epithelium in the renewal process represents an attempt by the body to compensate for the damage suffered after the ingestion of contaminated soil. According to Hupert et al. (1979), toxic metals, and other accumulated debris can be excreted during the replacement of the intestinal epithelium. Possibly, some of the toxic compounds present in landfarming soil could be eliminated in this way.

The persistence or progression of degenerative changes may lead to partial or total loss of organ function (Nero et al., 2006). These changes have been related to the direct action of petroleum hydrocarbons and metals on tissues of both invertebrates and vertebrates and are recognized as sensitive biomarkers in the exposure to contaminants (Nero et al., 2006, Frías-Espéricueta et al., 2008).

The degenerative changes observed in the epithelium of *R. padbergi* are typical of necrotic cells. Their morphological characteristics are essentially the result of enzymatic digestion of the cell and the denaturation of proteins. Cytoplasmic vacuolization is due to the digestion of organelles. Nonspecific DNA fragmentation leads to fragmentation of the nucleus and karyolysis, which is characterized by the degradation of chromatin by

DNAses as the pH of the cell decreases. Additionally, the necrotic cells undergo changes in osmotic balance, causing an increase in cell volume, culminating in the break and release of its contents into the extracellular environment, promoting inflammation in adjacent tissues (Kumar et al., 1994, Junqueira and Carneiro, 2004).

Another change observed in the epithelium of *R. padbergi* was the dilation of the intercellular space. According to Kumar et al. (1994), this would be a change in the plasma membrane, characteristic of necrotic cells, related to the destabilization of the junction complex.

The increase in the number of isolated and grouped hemocytes, among the cells of the fat body is also evidence of a necrotic process, indicating that the landfarming soil caused tissue damage with possible inflammation. This process is a defence mechanism of the body which acts in the removal of toxins and may also be related to processes of tissue renewal through re-absorption of the damaged epithelium (David et al., 2008). Several authors have reported an increase in the number of hemocytes in organisms exposed to metals (Frías-Espericueta et al., 2008, David et al., 2008) and PAHs (David et al., 2008).

After the 21st day of exposure to landfarming soil, it was found that there was a reduction in the number of cytoplasmic granules in the cells of the fat body. This fact indicated that the diplopods, at a particular time, started to avoid the ingestion of contaminated soil. This hypothesis is supported by the atypical behavior of individuals of *R. padbergi*, which remained on the soil surface of landfarming soil, even during the day. According to Hopkin and Read (1992) and Hopkin (1985), some species of diplopods prefer to starve than to ingest food or highly contaminated soil. These facts, combined with the direct action of contaminants in the soil, as evidenced by chemical analysis, explain the death of all individuals of *R. padbergi* before the full 90 days of exposure to the landfarming soil.

5. Conclusions

The diplopod *R. padbergi* proved to be an excellent bioindicator for evaluation of soil quality. The changes observed in the midgut of this species can be used as sublethal

biomarkers in the assessment of soil contaminated with complex mixtures such as the landfarming soil used.

Acknowledgments

The authors thanks to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support, to Renato de Almeida Gonçalves for providing the landfarming soil, to Dejanira de Franceschi de Angelis from the Department of Biochemistry and Microbiology, UNESP, Rio Claro, to Valdenilson José Alves de Oliveira for collecting the landfarming soil and to Gerson Mello de Souza and Sandra Veloso for technical support.

6. References

Ansaldo, M., Nahabedian D.E., Holmes-Brown, E., Agote, M., Ansay, C.V., Guerrero, N.R.V., Wider, E. A., 2006. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. *Toxicology* 224, 119-127.

Arab, A., Zacarin, G.G., Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., Dos Santos, M.G., Cabrera, A.C., 2003. Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Entomotropica* 18, 79-82.

Barka, S., 2007. Insoluble detoxification of trace metals in a marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to copper, zinc, nickel, cadmium, silver and mercury. *Ecotoxicology* 16, 491–502.

Camargo-Mathias, M.I., Fontanetti, C.S., Micó-Balaguer, E., 1998. Histochemical studies of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff ovaries (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). *Cytobios* 94, 169-184.

Camargo-Mathias, M.I., Fontanetti, C.S., 2000. Ultrastructural features of the fat body and oenocytes of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida). *Biocell* 24, 1-12.

Camargo-Mathias, M.I., Fantazzini, E.R., Fontanetti, C.S., 2004. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). *Braz. J. Morphol. Sci.* 21, 65-71.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo. Decisão de Diretoria nº 195-2005-E, 2005.

David, J.A.O., Salaroli, R.B., Fontanetti, C.S., 2008. The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. *Micron* 39, 1293-1299.

Fantazzini, E.R., Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., 1998. Anatomy of the digestive tube, histology and histochemistry of the foregut and salivary glands of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Rinocricidae). *Arthropoda Selecta* 7, 256-264.

Fantazzini, E.R., Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., 2002. Midgut of the millipede, *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida): Histology and histochemistry. *Arthropoda Selecta* 11, 135-142.

Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., 2004. External morphology of the antennae of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida). *Braz. J. Morphol. Sci.* 21, 73-79.

Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., Tiritan, B.M.S., 2004. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). *Iheringia* 94, 351-355.

Fontanetti, C.S., Camargo-Mathias, M.I., Tiritan, B.M.S., 2006. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). *Braz. J. Morphol. Sci.* 23, 487-493.

Frías-Espericueta, M.G., Abad-Rosales, S., Nevárez-Velázquez, A.C., Osuna-López, I., Páes-Osuna, F., Lozano-Olvera, r., Voltolina, D., 2008. Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquat. Toxicol.* 89, 152-157.

Hopkin, S.P., Watson, K., Martin, M.H., Mould, M.L., 1985. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chil: Dipl.). *Bijdr. Duerk.* 55, 88-94.

Hopkin, S. P., Read, H.J., 1992. *The Biology of Millipedes*. Oxford, Oxford University Press. 233p.

Hubert, M., 1979. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: Camatini, M. (Ed.), *Myriapod Biology*. Academic Press: London, pp.127-134.

Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2004. *Biologia Celular e Molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 339p.

Junqueira, L.C., Junqueira, L.M.M.S., 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. São Paulo: Livraria Editora Santos, 123p.

Köhler, H.-R., Storch, V., Alberti, G., 1992. The impact of lead on the assimilation efficiency of laboratory-held Diplopoda (Arthropoda) preconditioned in different environmental situations. *Oecologia*, 90, 113-119.

Köhler, H.-R., Wein, C., Reiss, S., Storch, V., Alberti, G., 1995. Impact of heavy metals on mass and energy flux within the decomposition process in deciduous forests. *Ecotoxicology* 4, 114-137.

Köhler, H.-R., Hüttenrauch, K., Berkus, M., Gräff, S., Alberti, G., 1996. Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. *Appl. Soil Ecol.* 3, 1996.

Köhler, H.-R., Tribskorn, R., 1998. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. *Biomarkess* 3, 109-127.

Köhler, H.-R., 2002. Localization of metals in cells of saprophagous soil arthropods (Isopoda, Diplopoda, Collembola). *Microsc. Res. Techniq.* 56, 393-401.

Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., 1994. *Patologia básica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6008p.

Marin, J.A., Hernandez, T., Garcia, C., 2005. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: influence on soil microbial activity. *Environ. Res.* 98, 185-195.

Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van der Kraak, G., Leec, L.E.J., Van Meer, T., Mackinnon, M.D., Dixon, D.G., 2006. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotox. Environ. Safe.* 63, 365–377.

Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemical: Theoretical and Applied*. Churchill, 530p.

Pigino, G., Migliorini, M., Paccagnini, E., Bernini, F., 2006. Localisation of heavy metals in the midgut epithelial cells of *Xenillus tegeocranus* (Hermann, 1804) (Acari: Oribatida). *Ecotox. Environ. Safe.* 64, 257-263.

Rost-Roszkowska, M.M., 2008. Degeneration of the Midgut Epithelium in *Allacma fusca* L. (Insecta, Collembola, Symphypleona): Apoptosis and Necrosis. *Zool. Sci.* 25, 753-759.

Triebkorn, R., Künast, C., 1990. Ultrastructural change in the digestive system of *Deroceras reticulatum* (Mollusca: Gastropoda) induced by lethal and sublethal concentrations of the carbamate molluscicide cloethocarb. *Malacologia* 32, 89-106.

Triebkorn, R., Köhler, H.R.; Zanh, T., Vogt, G., Ludwig, M., Rumpf, S., Kratzmann, M., Alberti, G., Storch, V., 1991. Invertebrate cells as targets for Hazardous substances. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie* 78, 277-287.

Triebkorn, R., Köhler, H.-R., 1996. The impact of heavy metal on the gray garden slug, *Deroceras reticulatum* (Müller): metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. *Environ. Pollut.* 3, 327-343, 1996.

Triebkorn, R., Henderson, I.F., Martin, A.P., 1999. Detection of iron in tissues from slugs (*Deroceras reticulatum* Müller) after ingestion of iron chelates by means of energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM). *Pestic. Sci.* 55, 55-61.

Vandenbulcke, F., Grelle, C., Fabre, M.-C., Descamps, M., 1998. Implication of the midgut of the centipede *Lithobius forticatus* in the heavy metal detoxification process. *Ecotox. Environ. Safe.* 41, 258-268.

Table 1. Soil analyses

Parameter	Control	<i>Landfarming</i>	Resolution CETESB (2005)			
			RVQ	VP	VRI	VII
TPH (mg/kg)	31.90	14313.58	NA	ND	ND	ND
PAH (mg/kg)						
Naphthalene	<0.023	442	NA	0.12	60	90
Acenaphthylene	<0.027	143	NA	ND	ND	ND
Acenaphthene	<0.013	98	NA	ND	ND	ND
Fluorene	<0.027	82	NA	ND	ND	ND
Phenanthrene	<0.034	300	NA	3.3	40	95
Anthracene	<0.037	98	NA	0.039	ND	ND
Fluoranthene	<0.010	115	NA	ND	ND	ND
Pyrene	<0.026	210	NA	ND	ND	ND
Benzo[a]anthracene	<0.022	118	NA	0.025	20	65
Chrysene	<0.010	89	NA	8.1	ND	ND
Benzo[b]fluoranthene	<0.017	351	NA	ND	ND	ND
Benzo[k]fluoranthene	<0.028	230	NA	0.38	ND	ND
Benzo[a]pyrene	<0.014	105	NA	0.052	1.5	3.5
Dibenzo[a, h]perylene	<0.013	234	NA	ND	ND	ND
Benzo[g, h, i]perylene	<0.030	89	NA	ND	ND	ND
Indeno[1, 2, 3 -c, d]pyrene	<0.018	45	NA	0.031	25	130
Metals (mg/kg)						
Ba	50	237	75	150	500	750
Cd	<0.07	<0.07	<0.50	1.3	8	20
Cr	82	157	40	75	ND	400
Cu	31	62.5	35	60	400	600
Fe	24985	39545	ND	ND	ND	400
Mn	365	228	ND	ND	ND	ND
Ni	2.4	58.3	13	30	100	130
Pb	8.3	75	17	72	300	900
Zn	58	230	60	300	1000	2000

TPHs: total petroleum hydrocarbons

PAHs: Polycyclic aromatic hydrocarbons

Resolution CETESB (2005): RVQ: Reference Value of Quality; VP: Value of Prevention; VRI: Value of Residential Intervention; VII: Value of Industrial Intervention.

Values expressed in mg/kg soil

NA: not applicable for organic substances

ND: not determined

Table 2. Number of dead diplopod, after exposure to different concentrations of landfarming soil.

Bioassays	N	Mortality			
		first 7 days	From the 7 th to the 21 st day	From the 21 st to the 60 th day	From the 60 th to the 90 th day
Control soil	14	0	0	1	2
100% <i>Landfarming</i>	14	3	6	4	1
70% <i>Landfarming</i>	14	0	2	7	5
50% <i>Landfarming</i>	14	0	0	7	7
30% <i>Landfarming</i>	14	0	0	4	10

N: Total number of diplopods per tank, excluding the animals that were dissected for histological analysis and histochemistry (6)

Table 3. Histological changes in the midgut of *R. padbergi* following landfarming soil exposure

Effects	Bioassay				
	Control soil	100% Landfarming	70% Landfarming	50% Landfarming	30% Landfarming
Ephitelium cytoplasmic vacuolization					
7 days	-	+++	+++	+++	+
21 days	-	+++	+++	+++	++
Fat body cytoplasmic vacuolization					
7 days	-	+++	+++	++	+
21 days	-	+++	+++	++	+
Fragmentation chromatin					
7 days	-	+++	+++	+++	+
21 days	-	+++	+++	+++	+
Intercelullar space dilatation					
7 days	-	+++	+++	+++	-
21 days	-	+++	+++	++	-
Increase of ephitelium renewal					
7 days	-	+++	+++	++	+
21 days	-	+++	+++	++	+
Reduction in cell volume of fat body					
7 days	-	+++	+++	+++	-
21 days	-	+++	++	++	-
Increase of intracellular granules in fat body					
7 days	-	+++	+++	+++	++
21 days	-	++	++	++	+

-absent of histological changes, + histological changes occurred rarely, ++ histological changes occurred often, +++histological changes occurred regularly in wide areas of the midgut

LEGENDS

Figure 1. Histological sections of the midgut of *R. padbergi* exposed to the techniques of HE (A, B), PAS (C), bromophenol blue (D, E) and von Kossa (F). Exposure to control soil.

ah=agranulocyte hemocyte; bm=basal membrane; e=epithelium; fb=fat body; gh=granulocyte hemocyte; h=hemocytes; l=lumen; m=muscle; ml=muscular layer; n=nucleus; om=outer membrane; rc=regenerative cell; sv=secretory vesicles; arrow in A=brush border; arrows in B and F=cytoplasmic granules.

A, C, D=400x, B, F=600x, E=1000x.

Figure 2. Histological sections of the midgut of *R. padbergi*, stained with HE. Exposure to landfarming soil.

A, B. Observe intensely vacuolated epithelium, fat body filled with granules and high number of hemocytes. C. Detail of the epithelium, observe fragmented nucleus (arrows). D. Basal epithelium vacuolated. E. Dilatation of intercellular space (arrowheads). F. Fat body cell with vacuolization (arrow).

ah=agranulocyte hemocyte; e=epithelium; fb=fat body; l=lumen; ml=muscular layer; n=nucleus; v=vacuoles.

A=200x, B=400x, C=1200x, D=1000x, E, F = 600x.

Figure 3. Histological sections of the midgut of *R. padbergi*, stained with HE. Exposure to landfarming soil.

A. Karyolysis in the fat body cells (arrowheads) and nucleus with altered morphology (arrow). B. Part of the epithelium being released into the lumen (arrow). C. Cells lost in the intestinal lumen. D. Dead cells being expelled from the intestinal epithelium, nucleus of these cells in the process of karyolysis (arrowheads) and cell being eliminated into the lumen (arrow). E. Epithelial cells in the intestinal lumen with nuclei in the process of karyolysis (arrowheads). F. Fat body with reduced cell volume.

e=epithelium; fb=fat body; ml=muscular layer; l=lumen; m=muscle; pm=peritrophic membrane.

A=600x, B, C, F = 400x, D, E=1200x.

Figure 4. Histological sections of the midgut of *R. padbergi*, stained with HE (A) and exposed to the techniques of bromophenol blue (B, C), PAS (detail in B) and von Kossa (D). Exposure to landfarming soil.

A. Grouped hemocytes apparently limited by a compartment. Fat body with increased cytoplasmic granules (arrows). B. Hemocytes, positively stained by bromophenol blue. Detail, hemocytes stained by PAS. C. Hemocyte groups, apparently limited by a compartment, moderately stained by bromophenol blue. D. Fat body cells filled with cytoplasmic granules.

e=epithelium; h=hemocyte; fb=fat body; l=lumen; ml=muscular layer; om=outer membrane.

A, detail in B = 400x, B = 1200x, C, D = 600x.

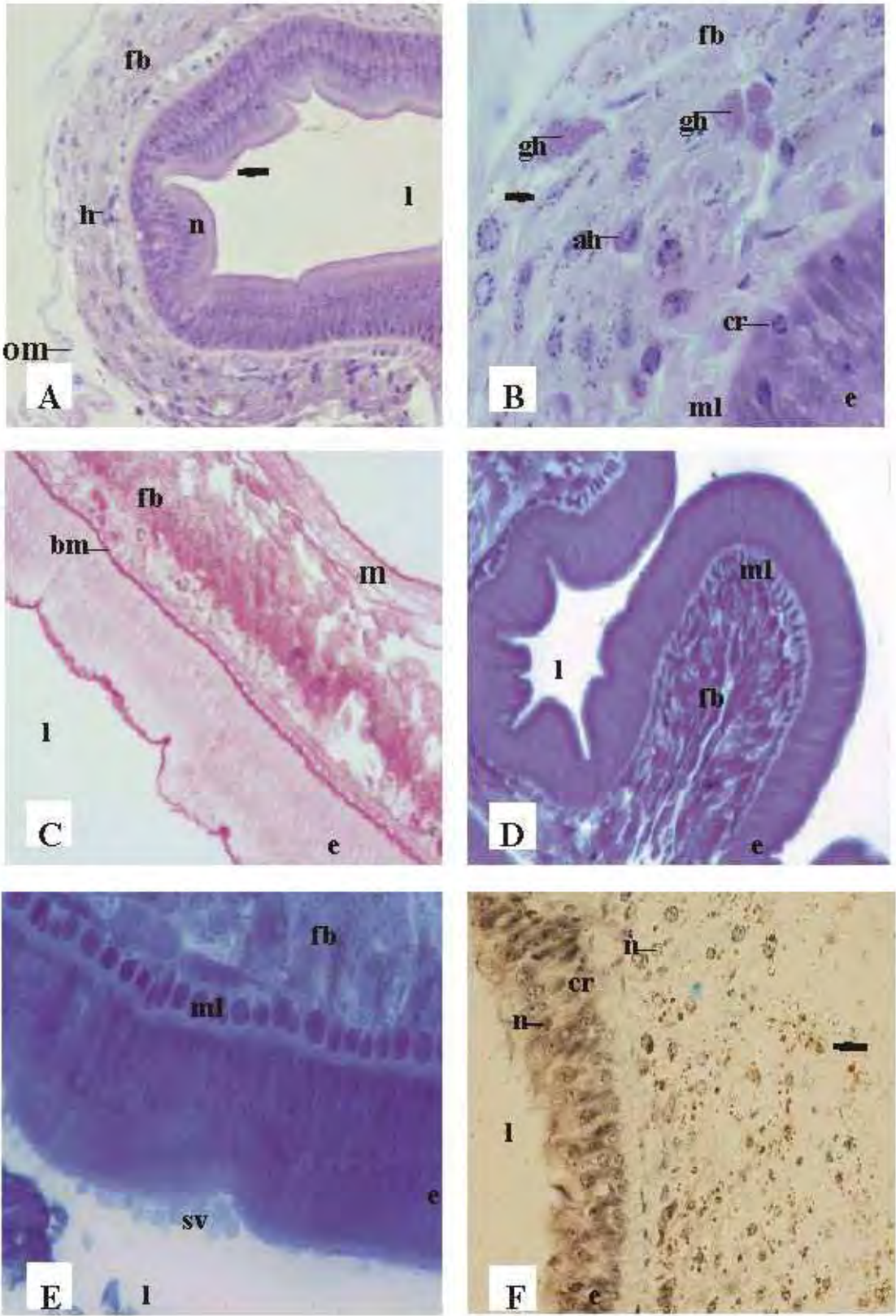


FIGURE 1

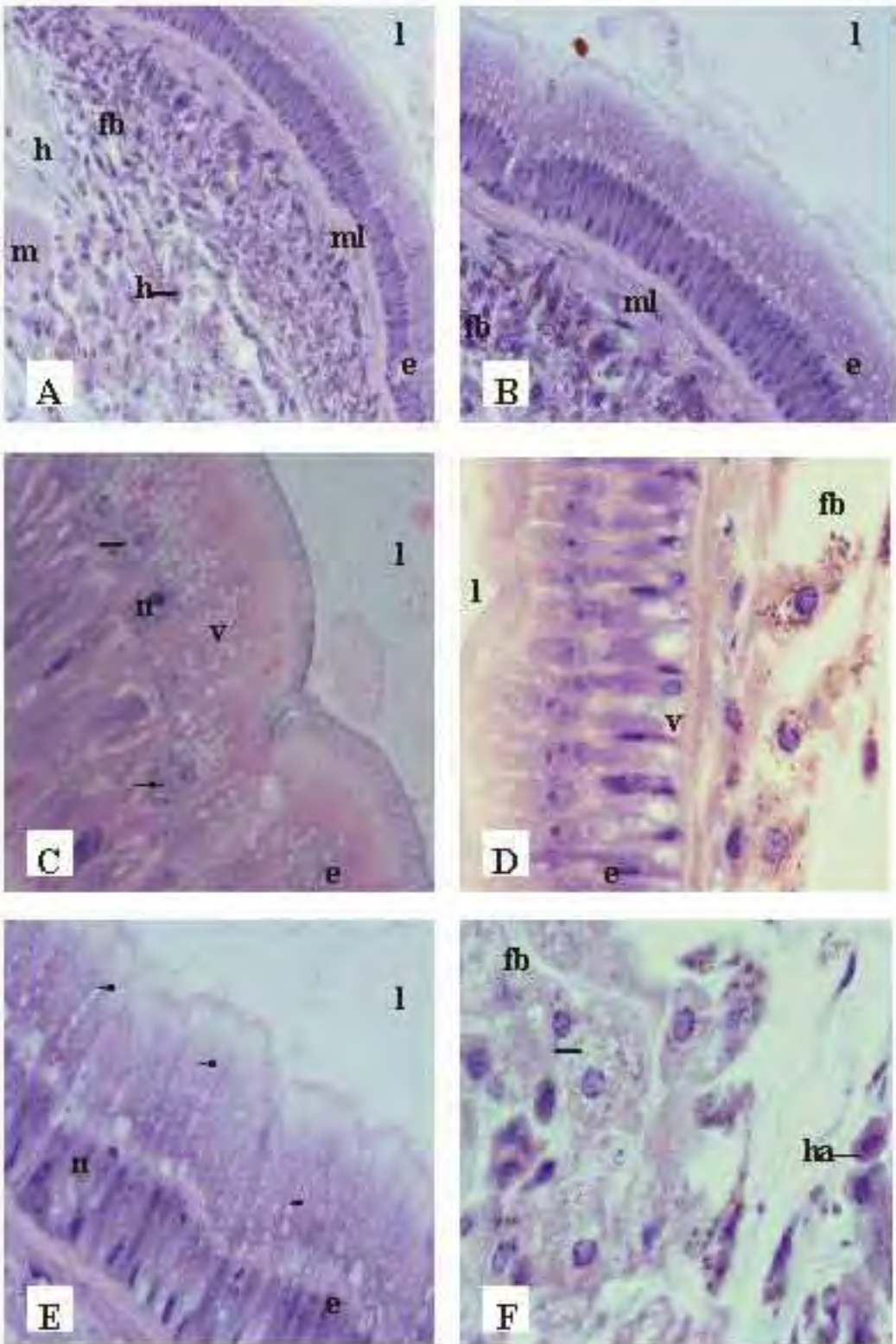


FIGURE 2

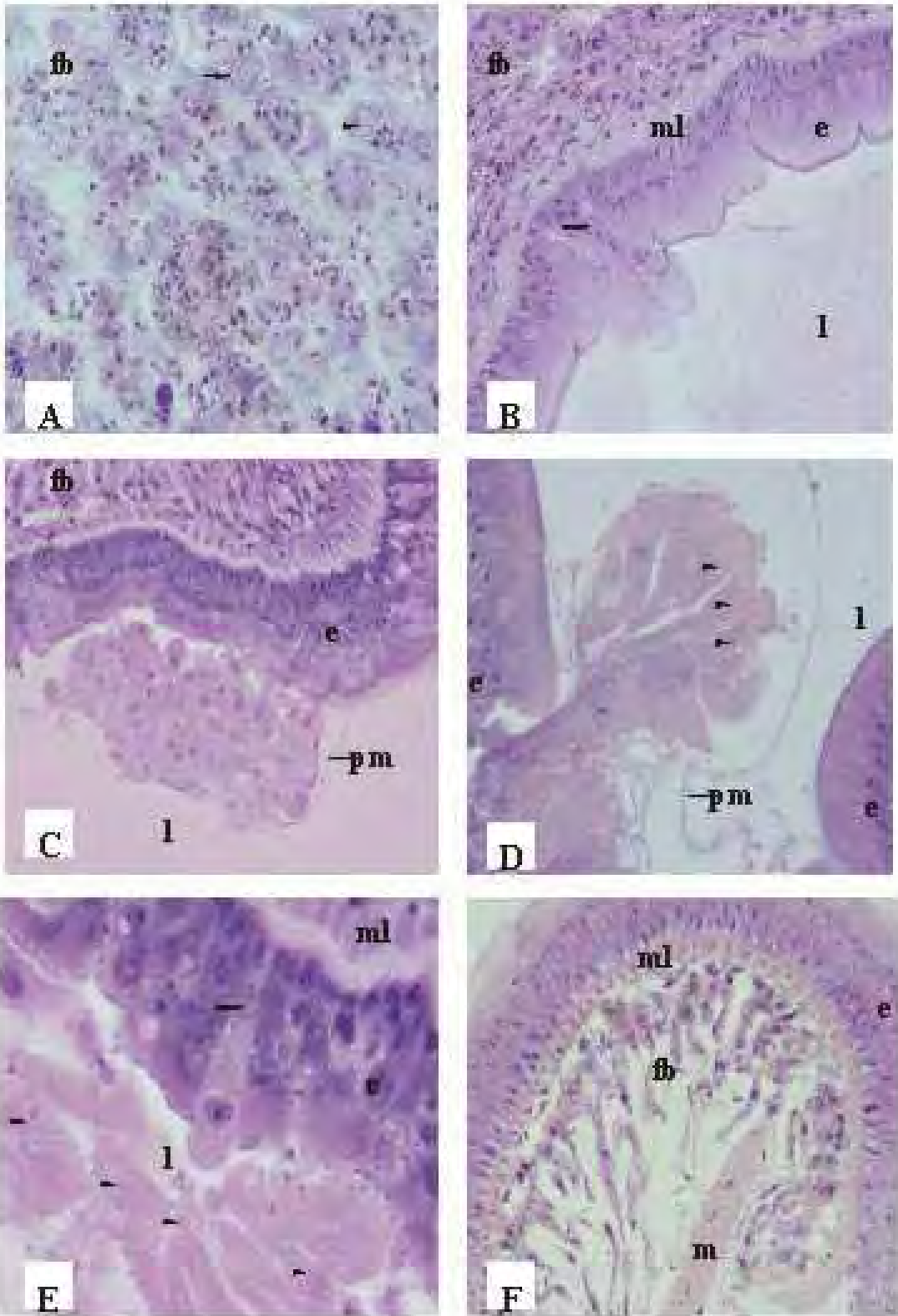


FIGURE 3

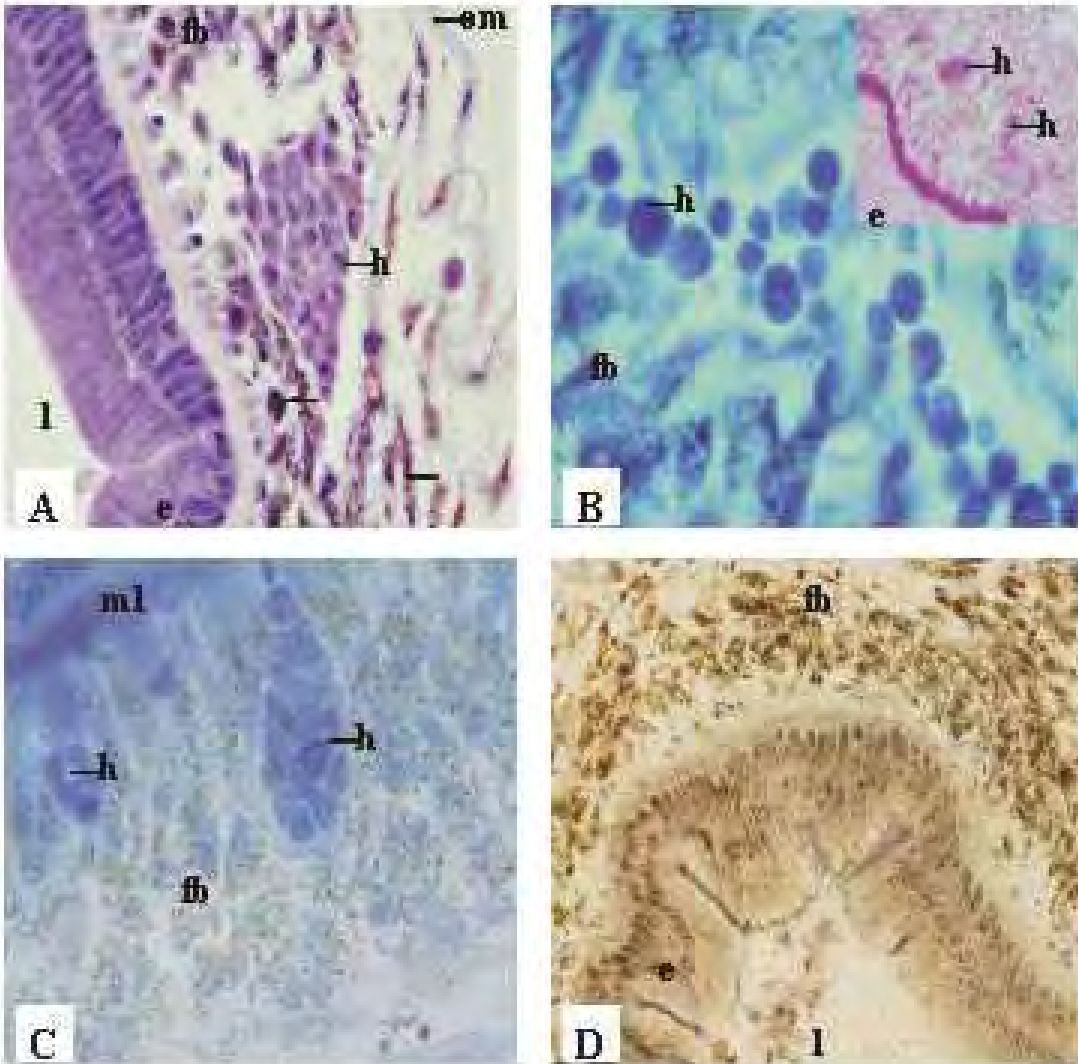


FIGURE 4

7.7. Análise histológica e histoquímica do corpo gorduroso perivisceral de *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda), expostos a um solo industrial contaminado

Esse artigo será submetido ao periódico “**Journal and Environmental Monitoring**”

Análise histológica e histoquímica do corpo gorduroso perivisceral de *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda), expostos a um solo industrial contaminado

Tatiana da Silva Souza¹; Dejanira de Franceschi de Angelis², Carmem Silvia Fontanetti³.

^{1,3}Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP

²Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP

Resumo

Por fazer parte da fauna edáfica, diplópodos têm sido utilizados como bioindicadores da qualidade de solos. Um dos mais interessantes *endpoints* subletais aplicados em diplópodos é a análise morfológica de tecidos alvo. O presente trabalho teve como objetivo investigar se o corpo gorduroso perivisceral da espécie *Rhinocricus padbergi* pode ser utilizado como órgão alvo em estudos ecotoxicológicos e identificar possíveis biomarcadores histológicos e histoquímicos nesse tecido. Após exposição de exemplares de *R. padbergi* a diferentes concentrações de um solo industrial contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Σ 2749.0 mg/Kg) e metais (Σ 40355.8 mg/Kg), verificamos que o corpo gorduroso perivisceral desse animal mostrou-se sensível à ação dos contaminantes ambientais presentes no solo. A perda da integridade da membrana plasmática, a desorganização citoplasmática e a depleção de proteínas totais, de polissacarídeos neutros, de cálcio e de lipídios podem ser considerados biomarcadores de estresse em *R. padbergi*.

Palavras-chave: *Landfarming*, HPAs, metais pesados, histopatologia, ecotoxicologia do solo

1. Introdução

Solos industriais podem apresentar concentrações elevadas de diversos contaminantes ambientais. *Landfarmings* de refinarias de petróleo são solos periodicamente contaminados com resíduo oleoso, que contém altas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e metais (MARIN et al., 2005).

Diplópodos são artrópodos terrestres de hábito noturno, que vivem em ambientes úmidos, sendo encontrados sob troncos e folhas caídas no solo; alimentam-se de matéria orgânica, detritos, frutas e relativa quantidade de matéria mineral. Desempenham importante papel na dinâmica do ecossistema terrestre, participando da aeração do solo e favorecendo a decomposição da matéria orgânica por fungos e bactérias. Além disso, os produtos da excreção de diplópodos, amônia e ácido úrico, quando degradados, enriquecem o solo com nitrato (SCHUBART, 1942, HOPKIN; READ, 1992).

Por fazer parte da fauna edáfica, diplópodos são expostos continuamente a contaminantes presentes no solo. Algumas espécies têm sido utilizadas com sucesso na avaliação ecotoxicológica desses compostos (TRIEBSKORN et al., 1991). Atualmente, a sensibilidade da espécie *Rhinocricus padbergi* a contaminantes ambientais tem sido investigada e resultados positivos têm sido encontrados (GODOY; FONTANETTI, 2009, NOGAROL; FONTANETTI, 2010).

Um dos mais interessantes *endpoints* subletais aplicados em espécies de diplópodos é a análise histológica e ultra-estrutural de tecidos alvo, principalmente o intestino médio (TRIEBSKORN et al., 1991; KÖHLER; TRIEBKORN, 1998, GODOY; FONTANETTI, 2009, NOGAROL; FONTANETTI, 2010).

As características do corpo gorduroso de diplópodos também o qualificam para ser utilizado em estudos ecotoxicológicos. Esse órgão é composto por um tecido difuso, que preenche a cavidade corpórea; apresenta intensa atividade metabólica, estando relacionado com o armazenamento de lipídios, glicogênio, proteínas e ácido úrico, bem como o armazenamento, neutralização e excreção de substâncias que não são úteis para o animal (HUBERT, 1979, HOPKIN; READ, 1992; FONTANETTI et al., 2006). Porém, poucos estudos foram conduzidos até o momento com esse enfoque (SOUZA, 2009).

Em diplópodos diferenciamos duas porções de corpo gorduroso: o parietal e o perivisceral, distintos principalmente por sua localização. O corpo gorduroso parietal

encontra-se firmemente aderido ao tegumento do animal, enquanto que o corpo gorduroso perivisceral envolve vários órgãos, como o trato digestório e as gônadas (FONTANETTI et al., 2004).

Assim como em insetos, os principais tipos celulares que constituem o corpo gorduroso dos diplópodos são os adipócitos e os enócitos (CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 1999; 2000). Os adipócitos apresentam-se dispostos em cordões. São células grandes, apresentam limites bem definidos e núcleos esféricos localizados em diferentes posições. O citoplasma possui grande quantidade de grânulos esféricos, organizados em camadas concêntricas. De acordo com Fontanetti et al. (2006), nessas estruturas ocorre o armazenamento de substâncias que serão posteriormente excretadas.

Os enócitos aparecem distribuídos entre os adipócitos. São células menores, com morfologia que varia de arredondada a elíptica. Possuem citoplasma repleto de grânulos de diferentes composições. Apresentam grande capacidade de absorver substâncias da hemolinfa por meio de invaginações presentes na membrana plasmática. Além disso, parecem estar envolvidos na síntese e armazenamento de proteínas (CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 1999; 2000; FONTANETTI et al., 2004).

Os objetivos do presente trabalho foram: (a) confirmar a sensibilidade de *R. padbergi* para a avaliação de solo contaminado com uma mistura complexa de metais e HPAs; (b) investigar se o corpo gorduroso perivisceral dessa espécie pode ser utilizado como órgão alvo em estudos ecotoxicológicos; (c) identificar nesse tecido, alterações histológicas e histoquímicas que possam ser utilizadas como biomarcadores de exposição a solos contaminados.

2. Material e Métodos

2.1. Solos

O solo avaliado nesse estudo é proveniente do *landfarming* de uma refinaria de petróleo que entrou em operação em 1988 para tratamento e disposição de resíduos oleosos gerados durante o processo de refino. Em junho de 2007, foi desativado. O *landfarming* era composto por um conjunto de oito células; cada uma possuía uma área de 5.000 m² com capacidade para tratar cerca de 100 m³ de borra oleosa por mês (área total = 40.000 m² e

capacidade total de 800 m³ de borra oleosa por mês). Nove meses depois da desativação, cerca de 10 Kg de solo de *landfarming* foi coletado.

Solo coletado na Universidade Estadual Paulista, UNESP, campus de Rio Claro, proveniente do mesmo local de captura dos diplópodos, foi utilizado como solo controle (SC).

Após a coleta, os solos foram mantidos a 4°C, até o início dos experimentos.

2.2. Análise química dos solos

A concentração de metais (Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn) presentes no *landfarming* e no solo controle, foi determinada de acordo com o método USEPA 6010B. A análise de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs) e de HPAs foi realizada segundo os métodos USEPA – SW 846 - 015B e USEPA 8100, respectivamente. Todas as análises foram realizadas pelo Laboratório São Lucas – Análises Ambientais, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

2.3. Biensaio com *R. padbergi*

Exemplares adultos de *R. padbergi* foram coletados manualmente no campus da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil. Após a coleta, os espécimens foram aclimatados em laboratório por duas semanas, em aquário contendo substrato de terra, tubérculos e troncos de árvore em processo de decomposição, provenientes das mesmas áreas de captura. A temperatura da sala foi controlada, 21±2 °C, assim como o fotoperíodo, 12 horas claro/12 horas escuro.

Após o período de aclimação, 4 aquários (20 cm de largura x 25 cm de comprimento x 45 cm de altura) foram preenchidos com diferentes concentrações de solo de *landfarming* (100%: 5 Kg de *landfarming*; 70%: 1.5 Kg de solo controle + 3.5 Kg de *landfarming*; 50%: 2.5 Kg de solo controle + 2.5 Kg de *landfarming* e 30%: 3.5 Kg de solo controle + 1.5 Kg de *landfarming*). Um quinto aquário foi preenchido com 5 Kg de solo controle.

Vinte diplópodos foram colocados em cada aquário. No decorrer do experimento, 6 animais por bioensaio foram dissecados para a realização das técnicas histológicas e histoquímicas. Os diplópodos restantes (14) foram monitorados por 90 dias.

2.5. Histologia e histoquímica

Após sete e 21 dias de exposição, três diplópodos por bioensaio foram anestesiados com éter etílico ou clorofórmio e dissecados com auxílio de estereomicroscópio em placas de Petri contendo solução fisiológica. O corpo gorduroso perivisceral foi removido e posteriormente fixado em paraformaldeído a 4%, Carnoy (álcool absoluto, clorofórmio e ácido acético) e formol cálcio. A seguir, o material foi desidratado em soluções de etanol a 70, 80, 90 e 95% e embebido em resina (JB-4 – Polaron Instruments/BIO RAD), durante 24 horas em geladeira. Posteriormente, o material foi transferido para moldes plásticos contendo resina de inclusão. Depois de polimerizados, secções de 6 µm de espessura foram obtidas com o auxílio de Micrótomo Leica RM2245.

Para análise histológica, as secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina. A análise histoquímica foi realizada para a detecção de proteínas totais - técnica do azul de bromofenol (PEARSE, 1985), polissacarídeos neutros - técnica do PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), cálcio – técnica de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e lipídeos - técnica do sudan black B (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

3. Resultados

3.1. Análise química dos solos

No *landfarming*, a concentração de TPHs foi 448.7 vezes maior do que no solo controle, indicando contaminação desse solo com resíduos de petróleo. O *landfarming* apresentou 2749 mg/Kg de HPAs. Desse total, 16% mostrou-se composto por HPAs de 2 anéis aromáticos (naftaleno), 26.22% por HPAs de 3 anéis aromáticos (acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno), 19.35% por HPAs de 4 anéis aromáticos (fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno e criseno), 33.46% por HPAs de 5 anéis aromáticos (benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno e dibenzo[a, h]perileno) e 4.87% por HPAs de 6 anéis aromáticos (benzo[g, h, i]perileno e indeno[1, 2, 3 -c, d]pireno). No *landfarming*, os valores obtidos para HPAs estão acima do estabelecido, de acordo com os Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas do Estado de São Paulo (CETESB, 2005) (Tabela 1).

O solo controle apresentou concentrações abaixo do limite de detecção para os 16 HPAs analisados, cujos valores estão de acordo com os valores estabelecidos pela CETESB (2005) (Tabela 1).

A concentração de metais pesados também foi consideravelmente maior no solo de *landfarming*. A concentração do Ni foi 24.29 vezes maior no *landfarming* do que no solo controle. Altos níveis de Pb também foram detectados no *landfarming* (9.03 vezes maior do que no controle). As concentrações do Ba, Zn, Cu, Cr e Fe também foram maiores no *landfarming*. Já a concentração do Mn foi mais elevada no solo controle (1.6 vezes) em relação ao *landfarming*. Em ambos os solos avaliados, os níveis de Cd não ultrapassaram o limite de detecção (<0.07 mg/Kg) para o método analítico utilizado (Tabela 1).

No solo de *landfarming* os valores obtidos para o Ba, Cr, Cu, Ni e Pb mostraram-se acima dos Valores de Qualidade e de Prevenção, de acordo com a CETESB (2005). A concentração do Zn mostrou-se acima do Valor de Prevenção (Tabela 1).

No solo controle, apenas o valor obtido para o Cr (82 mg/Kg) mostrou-se acima dos Valores de Referência de Qualidade (40 mg/Kg) e do Valor de Prevenção (75 mg/Kg), de acordo com a CETESB (2005) (Tabela 1).

3.2. Bioensaios com *R. padbergi*

No decorrer de todo o experimento, apenas três diplópodos, pertencentes ao grupo controle, morreram.

Até o 21º dia, nove mortes foram registradas entre os diplópodos que permaneceram no *landfarming* 100%. Nesse mesmo período, apenas dois dos diplópodos expostos ao *landfarming* 70% morreram. Nenhuma morte foi registrada nas demais concentrações.

Do 21º ao 60º dia de exposição, quatro dos diplópodos expostos ao *landfarming* 100% vieram à óbito. Sete animais morreram no *landfarming* 70% e 50% e quatro diplópodos morreram no *landfarming* 30%. Os diplópodos restantes morreram do 60º ao 90º dia de experimento (Tabela 2).

3.2.1. Histologia e histoquímica

3.2.1.2. Animais do grupo controle

A histologia do corpo gorduroso perivisceral dos animais pertencentes ao grupo controle mostrou-se como a descrita previamente para *R. padbergi* (FONTANETTI et al., 2004). Desse modo, os adipócitos apresentaram-se como células volumosas dispostas em cordão, com morfologia irregular. O citoplasma dessas células mostrou-se heterogêneo, preenchido por grânulos, alguns dispostos em camadas concêntricas (setas nas Figuras 1A,

B). Muitas células apresentaram espaços vazios em seu citoplasma (cabeça de seta na Figura 1A), comumente observados neste tecido (FONTANETTI et al., 2004). Esses espaços correspondem, provavelmente, a grânulos que foram retirados durante a microtomia. O núcleo dos adipócitos mostrou-se esférico, localizado em diferentes posições. Grande número de traqueíolas foi observado por entre os adipócitos (Figuras 1A, B); alguns hemócitos também foram observados (Figura 1A). Por entre os adipócitos foram observadas células menores, os enócitos, cujo citoplasma apresentou-se repleto de grânulos (Figura 1A).

As análises histoquímicas revelaram que os adipócitos apresentaram grande quantidade de proteínas totais (Figura 1B) e moderada quantidade de polissacarídeos neutros (Figura 1C). Também foi observada grande quantidade de cálcio distribuído como grânulos no citoplasma (setas nas Figuras 1D, E). Lipídios foram encontrados irregularmente distribuídos no citoplasma (setas nas Figuras 1F, G).

A porção central dos grânulos citoplasmáticos apresentou pequena quantidade de proteínas totais (seta na Figura 1B), reagiu de moderada à fortemente positiva para a detecção de polissacarídeos neutros (setas na Figura 1C), e reagiu negativamente à detecção de cálcio (cabeças de seta no detalhe da Figura 1E) e à detecção de lipídeo (cabeças de seta na Figura 1F).

Os enócitos apresentaram grande quantidade de proteínas totais (detalhe na Figura 1B), quantidade de moderada à positiva para a detecção de polissacarídeos neutros (Figura 1C) e reagiram negativamente à detecção de cálcio (Figura 1D) e moderadamente à detecção de lipídeo (Figura 1G).

Os dados histoquímicos estão listados na Tabela 3.

3.2.1.3. Animais expostos por sete e 21 dias em diferentes concentrações de solo de *landfarming*

Todas as concentrações de solo de *landfarming* promoveram alterações histológicas e histoquímicas no corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi*. De maneira geral, a severidade dessas alterações foi diretamente proporcional à concentração de *landfarming* em que os animais foram expostos e ao tempo de exposição (Tabela 4).

A membrana plasmática dos adipócitos apresentou morfologia irregular, com perda do limite celular. O conteúdo citoplasmático dessas células mostrou-se ausente (Figuras

2A-D). Foi observado aumento do número de enócitos e dos grânulos presentes no citoplasma dessas células (Figuras 2A-D).

A análise histoquímica revelou que os adipócitos apresentaram depleção de polissacarídeos neutros (Figuras 3A), de proteínas totais (Figura 3B), de cálcio (Figura 3C) e de lipídios (Figura 3D) (Tabela 4).

Os enócitos não apresentaram alterações histoquímicas quando comparados ao grupo controle.

4. Discussão

Apesar de o solo controle ter apresentado maior quantidade de Mn, em comparação com o solo de *landfarming*, e a concentração de Cr estar acima dos limites estabelecidos pela CETESB, nenhum dano histológico foi observado nos diplópodos expostos, assim como poucos indivíduos morreram no decorrer do experimento.

O *landfarming* mostrou-se constituído por uma mistura complexa de contaminantes, formada por HPAs e metais, que podem ser acumulados em altas concentrações em tecidos de invertebrados terrestres, uma vez que as taxas de assimilação podem exceder as taxas de metabolização e eliminação. Esses compostos podem alterar as taxas de reprodução e atividades enzimáticas (BROWN et al., 2004), assim como a morfologia e fisiologia desses invertebrados (TRIEBSKORN et al., 1991).

O uso de invertebrados terrestres como bioindicadores é interessante, pois esses organismos interagem com todas as frações de contaminantes, desde os fortemente adsorvidos nas partículas sólidas até os disponíveis na fase aquosa (TRIEBSKORN et al., 1991; HEIKENS et al., 2001). Dentre a fauna terrestre, os efeitos deletérios de HPAs e metais têm sido, em sua maioria, estudados em espécies de minhocas (BROWN et al., 2004, EOM et al., 2007), colêmbolas (EOM et al., 2007; PAWERT et al., 1996) e isópodos (KÖHLER et al., 1996). Devido o aumento das fontes de contaminação do ecossistema terrestre, estudos com outros bioindicadores tornam-se importantes. Nesse contexto, diplópodos têm-se mostrado bioindicadores promissores da qualidade do solo (TRIEBSKORN et al., 1991; KÖHLER; TRIEBKORN, 1998; GODOY; FONTANETTI, 2009; NOGAROL; FONTANETTI, 2010). No presente trabalho, os efeitos biológicos observados em *R. padbergi* podem ser resultado de interações sinérgicas ou antagonistas de HPAs e metais.

Estudos prévios revelaram a presença de alterações morfológicas no intestino médio de *R. padbergi*, após exposição ao mesmo solo avaliado no presente estudo (SOUZA; FONTANETTI, submetido). Em diplópodos, geralmente, o epitélio intestinal funciona como uma barreira à passagem de contaminantes, do lúmen para outros tecidos do corpo (HOPKIN et al., 1985). Contudo, no presente trabalho, essa barreira não apresentou total eficiência, visto que as análises histológicas e histoquímicas revelaram que o corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* também foi afetado pelos contaminantes presentes no solo.

A perda da integridade da membrana plasmática, associada com a desorganização citoplasmática, são sinais de que a célula está perdendo suas funções vitais. Estímulos patológicos, como hipertermia, privação de nutrientes, estresse oxidativo, sobrecarga intracelular de Ca^{2+} , hipóxia ou altas concentrações de substâncias tóxicas, geram uma falha catastrófica no metabolismo desencadeando o processo necrótico. Durante a necrose os eventos não seguem necessariamente uma ordem, ocorrendo a perda da integridade da membrana plasmática, disfunção de organelas intracelulares e perda da homeostase iônica (Na^+ , K^+ , Cl^+ , Ca^{2+}) intracelular. Isso gera o aumento no volume total da célula e de suas organelas, seguindo-se a dissolução das membranas e ruptura celular, com liberação de seus subprodutos, estimulando um processo de inflamação (MELLO; CASTILHO, 2007).

A biotransformação de compostos tóxicos também requer o consumo de reservas energéticas, muitas vezes destinada a outros processos vitais do organismo (KÖHLER et al., 1996; ANSALDO et al., 2006). Como resposta à exposição a metais, Ansaldo et al. (2006) relataram a depleção de glicogênio em diversos órgãos do gastrópode *Biomphalaria glabrata*, Köhler et al. (1996) reportaram a diminuição da quantidade de lipídios no hepatopâncreas do isópodo *Porcellio scaber* e Triebkorn e Köhler (1996) relataram a depleção de lipídios e glicogênio no hepatopâncreas do molusco *Deroceras reticulatum*. Os resultados histoquímicos reportados no presente trabalho indicaram que o corpo gorduroso perivisceral pode ter servido como fonte de reservas energéticas para a destoxificação de compostos tóxicos presentes no solo, processo previamente observado no intestino médio de *R. padbergi* (SOUZA; FONTANETTI, submetido).

Não foi possível quantificar os enócitos devido à característica difusa do tecido. Contudo, a análise do corpo gorduroso perivisceral indicou um aumento na presença de enócitos e de seus grânulos citoplasmáticos, nos animais expostos ao *landfarming*. Aspectos morfológicos indicam que os enócitos possuem grande capacidade de absorver substâncias da

hemolinfa. Análises ultraestruturais indicaram que essas células estão principalmente envolvidas no metabolismo de proteínas (CAMARGO-MATHIAS; FONTANETTI, 1999, 2000; FONTANETTI et al., 2004). Apesar de não haver relatos do envolvimento dessas células em processos de destoxificação de compostos tóxicos, os resultados do presente trabalho poderiam indicar tal relação.

Apesar do consumo de reservas energéticas, visando o restabelecimento da integridade do organismo, a ação direta dos contaminantes presentes no *landfarming*, promoveu a morte de todos os exemplares de *R. padbergi* antes dos 90 dias de exposição.

5. Conclusões

Assim como outras espécies de Diplopoda, *R. padbergi* revelou-se um bioindicador adequado para estudos ecotoxicológicos. O corpo gorduroso perivisceral desse animal pode ser utilizado como órgão alvo. A perda da integridade da membrana plasmática, a desorganização citoplasmática e a depleção de reservas energéticas podem ser considerados biomarcadores de estresse nesse animal.

Alerta-se ainda que o solo industrial avaliado no presente estudo apresenta perigo do ponto de vista ecotoxicológico.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, a Renato de Almeida Gonçalves, da Refinaria de Petróleo do Planalto (REPLAN), por ter cedido o solo de *landfarming*, ao Valdenilson José Alves de Oliveira, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro, pela coleta do *landfarming*, a Cristiane Mileo, Gerson Mello de Souza e Sandra Veloso pelo suporte técnico.

Referências

ANSALDO, M., NAHABEDIAN D.E.; HOLMES-BROWN, E.; AGOTE, M.; ANSAY, C.V.; GUERRERO, N.R.V.; WIDER, E. A. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. **Toxicology**, v. 224, p. 119-127, 2006.

BROWN, P.J.; LONG, S.M.; SPURGEON D.J.; SVENDSEN, C.; HANKARD, P.K.. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. **Chemosphere**, v. 57 p. 1675–1681, 2004.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FONTANETTI, C.S. Morphology and histochemistry of fat body of males and females of *Plusioporus setiger*, Brolemann 1901 (Diplopoda, Spirostreptidae). **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.5, p.109-116, 1999.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural features of the fat body and oenocytes of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida). **Biocell**, Mendoza, v.24, n.1, p.1-12, 2000.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo**. Decisão de Diretoria nº 195-2005-E, 2005.

EOM, I.C.; RAST, C.; VEBER, A.M.; VASSEUR, P. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 190-205, 2007.

FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; TIRITAN, B.M.S. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). **Iheringia.**, v. 94, p. 351-355, 2004.

FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; TIRITAN, B.M.S. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Braz. J. Morphol. Sci Iheringia.**, v. 23, p. 487-493, 2006.

GODOY, J.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substrate containing sewage sludge. **Water, Air and Soil Pollution**, 2009, DOI 10.1007/s11270-009-0261-z.

HEIKENS, A.; PEIJNENBURG, W.J.G.M.; HENDRIKS, A.J. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 113, p.385-393, 2001.

HOPKIN, S.P.; WATSON, K.; MARTIN, M.H.; MOULD, M.L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chil: Dipl.). **Bijdr. Duerk.**, v. 55, p. 88-94, 1985.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The Biology of Millipedes**. Oxford, Oxford University Press. 233p, 1992.

HUBERT, M. Localization and identification of mineral elements and nitrogenous waste in Diplopoda. In: **Myriapod Biology** (M. Camatini ed.), p.127-134. Academic Press: London, 1979.

JUNQUEIRA, L.C.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983.123p.

KÖHLER, H-R.; HÜTTENRAUCH, K.; BERKUS, M.; GRÄFF, S.; ALBERTI, G. Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. **Applied Soil Ecology**, v. 3, p.1-15, 1996.

KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. **Biomarkess**, v. 3, n. 2, p. 109-127, 1998.

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

MELLO, M.L.S.; CASTILHO, R. Morte celular. In: **A célula**. (CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; Eds.), Barueri, SP: Editora Manole, 2007. 380p.

NOGAROL, L.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: tissular responses of the midgut. **Micron**, v. 41, p. 239-246, 2010.

PAWERT, M.; TRIEBSKORN, R.; GRÄFF, S.; BERKUS, M.; SCHULZ, J.; KÖHLER, H.-R. Cellular alterations in collembolan midgut cells as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. **The Science of the Total Environment**, v.181, p. 187-200, 1996.

PEARSE, A.G.E. **Histochemical: Theoretical and Applied**. Churchill, 1985. 530p.

SCHUBART, O. Os myriapodes e suas relações com a agricultura. **Pap. Avul. Zool.**, v. 2, p. 205-234, 1942.

SOUZA, R.B. **Análise do corpo gorduroso do diplópodo *Rhinocricus padbergi* para verificação de seu potencial bioindicador de solos impactados**. 2009. 35f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP.

TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.R.; ZANH, T.; VOGT, G.; LUDWIG, M.; RUMPF, S.; KRATZMANN, M.; ALBERTI, G.; STORCH, V. Invertebrate cells as targets for hazardous substances. **Zeitschrift für Angewandte Zoologie**, v. 78, p. 277-287, 1991.

TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.R. The impact of heavy metals on the grey garden slug, *Deroceras reticulatum* (Muller): metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. **Environmental Pollution**, v. 93, p. 321-343, 1996.

Tabela 1. Características químicas do solo controle e do *landfarming*

Parâmetro	Controle	<i>Landfarming</i>	Resolução CETESB (2005)			
			VRQ	VP	VIR	VII
TPH (mg/Kg)	31.90	14313.58	NA	ND	ND	ND
HPA (mg/Kg)						
Naftaleno	<0.023	442	NA	0.12	60	90
Acenaftileno	<0.027	143	NA	ND	ND	ND
Acenafteno	<0.013	98	NA	ND	ND	ND
Fluoreno	<0.027	82	NA	ND	ND	ND
Fenantreno	<0.034	300	NA	3.3	40	95
Antraceno	<0.037	98	NA	0.039	ND	ND
Fluoranteno	<0.010	115	NA	ND	ND	ND
Pireno	<0.026	210	NA	ND	ND	ND
Benzo[a]antraceno	<0.022	118	NA	0.025	20	65
Criseno	<0.010	89	NA	8.1	ND	ND
Benzo[b]fluoranteno	<0.017	351	NA	ND	ND	ND
Benzo[k]fluoranteno	<0.028	230	NA	0.38	ND	ND
Benzo[a]pireno	<0.014	105	NA	0.052	1.5	3.5
Dibenzo[a, h]perileno	<0.013	234	NA	ND	ND	ND
Benzo[g, h, i]perileno	<0.030	89	NA	ND	ND	ND
Indeno[1, 2, 3 -c, d]pireno	<0.018	45	NA	0.031	25	130
Metais (mg/Kg)						
Ba	50	237	75	150	500	750
Cd	<0.07	<0.07	<0.50	1.3	8	20
Cr	82	157	40	75	ND	400
Cu	31	62.5	35	60	400	600
Fe	24985	39545	ND	ND	ND	400
Mn	365	228	ND	ND	ND	ND
Ni	2.4	58.3	13	30	100	130
Pb	8.3	75	17	72	300	900
Zn	58	230	60	300	1000	2000

TPHs: Hidrocarbonetos totais de petróleo

HPAs: Hidrocarbonetos policíclicos aromático

Resolução CETESB (2005): VRQ: Valor de Referência de Qualidade; VP: Valor de Prevenção; VIR: Valor de Intervenção Residencial; VII: Valor de Intervenção Industrial.

Valores expressos em mg/Kg de solo

NA: não aplicável para substâncias orgânicas

ND: não determinado

Tabela 2. Número de diplópodos mortos após exposição a diferentes concentrações de solo de *landfarming*

Bioensaios	N	Mortalidade			
		Até 7 dias	Do 7 ao 21 dia	Do 21 ao 60 dia	Do 60 ao 90 dia
Solo controle	14	0	0	1	2
<i>Landfarming</i> 100%	14	3	6	4	1
<i>Landfarming</i> 70%	14	0	2	7	5
<i>Landfarming</i> 50%	14	0	0	7	7
<i>Landfarming</i> 30%	14	0	0	4	10

N: Número total de diplópodos por bioensaio, excluindo os animais que foram dissecados nas análises histológicas e histoquímicas (6)

Tabela 3. Análise histoquímica do corpo gorduroso perivisceral de exemplares de *R. padbergi* expostos ao solo controle

Análise histoquímica	Corpo gorduroso perivisceral		
	Adipócitos	Enócitos	Grânulos citoplasmáticos
Proteínas totais			
7 dias	+++	+++	+
21 dias	+++	+++	+
Polissacarídeos neutros			
7 dias	++	++	++/+++
21 dias	++/+++	++/+++	++/+++
Cálcio			
7 dias	+++	-	-
21 dias	+++	-	-
Lipídios			
7 dias	+++	++	-
21 dias	+++	++	-

+++reação fortemente positiva; ++reação moderadamente positiva; +reação fracamente positiva; -reação negativa

Tabela 4. Alterações histológicas no corpo gorduroso perivisceral de exemplares de *R. padbergi*, após exposição a solo de *landfarming*

Efeitos	Bioensaios				
	Solo controle	<i>Landfarming</i> 100%	<i>Landfarming</i> 70%	<i>Landfarming</i> 50%	<i>Landfarming</i> 30%
Membrana plasmática com morfologia irregular					
7 dias	-	+++	++	++	+
21 dias	-	+++	+++	+++	++
Ausência do conteúdo citoplasmático					
7 dias	-	+++	++	++	+
21 dias	-	+++	+++	+++	++
Aumento de grânulos citoplasmáticos nos enócitos					
7 dias	-	++	++	+++	++
21 dias	-	+++	++	+++	++

+++alteração presente regularmente em grandes áreas do corpo gorduroso; ++alteração observada frequentemente; +alteração raramente observada; -ausência de alteração

Tabela 5. Efeitos do solo de *landfarming* na histoquímica dos adipócitos do corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi*

Efeitos	Bioensaios			
	<i>Landfarming</i>	<i>Landfarming</i>	<i>Landfarming</i>	<i>Landfarming</i>
	100%	70%	50%	30%
Proteínas totais				
7 dias	-	-	+	+
21 dias	-	-	+	+
Polissacarídeos neutros				
7 dias	-	++	+	+
21 dias	-	-	+	+
Cálcio				
7 dias	-	-	+	++
21 dias	-	-	++	+
Lipídios				
7 dias	+	+	++	++
21 dias	-	-	+	+

+++reação fortemente positiva; ++reação moderadamente positiva; +reação fracamente positiva; - reação negativa

LEGENDAS

Figura 1. Secções histológicas do corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi*, submetidas às técnicas de coloração por hematoxilina/eosina (HE) (A), azul de bromofenol (B), PAS (C), von Kossa (E, F) e sudan black B (F, G).

Espécimens expostos ao solo controle por 7 e 21 dias.

Setas em A=grânulos citoplasmáticos dispostos em camadas concêntricas; cabeça de seta em A=espaços vazios correspondentes a grânulos citoplasmáticos retirados durante microtomia; seta em B=porção central do grânulo citoplasmático fracamente corado pelo azul de bromofenol; setas em C=grânulos citoplasmáticos com reação positiva para polissacarídeos neutros; setas em D e E=cálcio; cabeças de seta em detalhe da figura E=grânulo citoplasmático com reação negativa para cálcio; setas em F e G=lipídio, cabeças de seta em F e G=grânulos citoplasmáticos com reação negativa para a detecção de lipídios.

a=adipócito; e=enócito; h=hemócito; n=núcleo; tr=traqueíola.

Figura 2. Secções histológicas do corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi*, coradas por HE.

Espécimen exposto a *landfarming* 30% por 7 dias (A). Espécimen exposto a *landfarming* 50% por 7 dias (B). Espécimen exposto a *landfarming* 50% por 21 dias (C). Espécimen exposto a *landfarming* 100% por 21 dias (D).

A-D. Membrana plasmática dos adipócitos com morfologia irregular e conteúdo citoplasmático ausente. B-D. Aumento do número de enócitos e de seus grânulos citoplasmáticos.

a=adipócito; e=enócito; h=hemócito; n=núcleo; tr=traqueíola.

Figura 3. Secções histológicas do corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi*, submetidas às técnicas de PAS (A), azul de bromofenol (B), von Kossa (C) e sudan black B (D).

Espécimen exposto a *landfarming* 50% por 7 dias (A). Espécimen exposto a *landfarming* 100% por 7 dias (B). Espécimen exposto a *landfarming* 30% por 21 dias (C). Espécimen exposto a *landfarming* 70% por 21 dias (D).

A. Depleção de polissacarídeos neutros. B. Diminuição da quantidade de proteínas totais. C. Depleção de cálcio. D. Depleção de lipídios.

a=adipócito; e=enócito; tr=traqueíola.

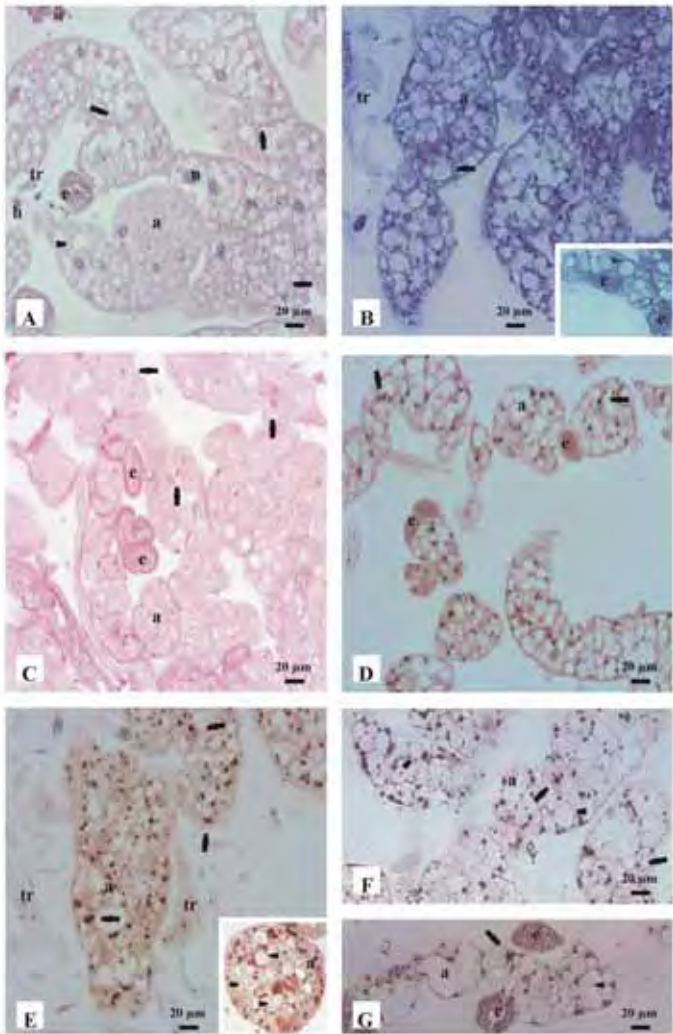


FIGURA 1

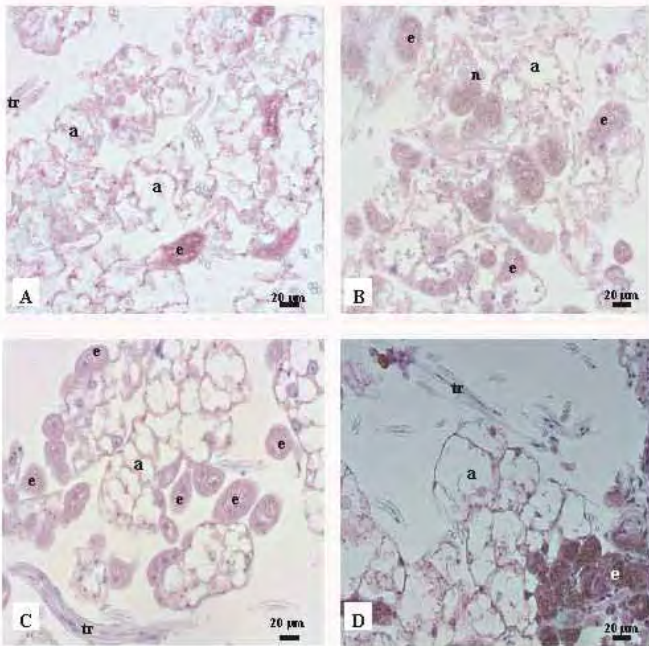


FIGURA 2

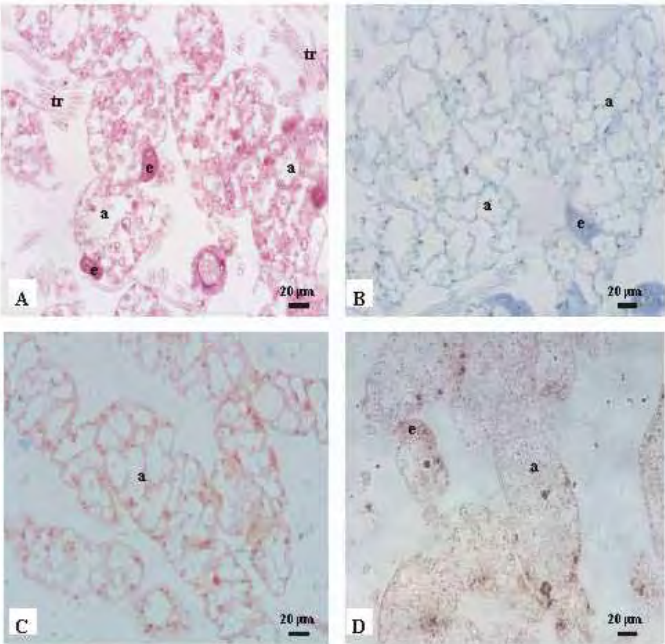


FIGURA 3

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação de resíduos atende a concepção moderna de manejo ambiental que apresenta como base a reciclagem e reutilização dos mesmos.

O ensaio respirométrico de Bartha & Pramer e a análise de TPHs mostraram que a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solo de *landfarming* pode ser estimulada quando resíduos agroindustriais contendo nutrientes, bem como compostos que promovam a aeração e a descompactação do solo, são adicionados.

A casca de arroz, empregada nesse estudo como agente descompactante, aumenta o fluxo de oxigênio no solo e contém microrganismos decompositores de celulose, que apresentam também, capacidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo. Os resultados do presente trabalho mostraram que esse material pode constituir uma alternativa economicamente viável para a biorremediação de resíduos derivados da indústria do petróleo, descartados no solo.

Quando a casca de arroz foi utilizada juntamente com a vinhaça, que atuou como corretora de umidade e aditivo orgânico, uma notável redução da concentração de TPHs do solo de *landfarming* foi observada.

Ao contrário, a vinhaça, quando utilizada *in natura*, não foi capaz de estimular o metabolismo microbiano, visto que a taxa de depleção de TPHs não foi significativa nas amostras de *landfarming* tratadas com esse efluente agroindustrial.

O potencial genotóxico e mutagênico do solo *landfarming* foi avaliado por meio do teste de anormalidades mitóticas e cromossômicas em *A. cepa*.

No decorrer desse estudo, aderências, pontes e quebras cromossômicas foram os principais tipos de anormalidades observadas em *A. cepa*. A indução dessas anormalidades apresenta certa correlação, uma vez que a presença de aderência pode induzir a formação de pontes e de quebras cromossômicas. Desse modo, o *landfarming* foi caracterizado como clastogênico para *A. cepa*.

A atividade mutagênica do *landfarming* foi evidenciada pela indução significativa de micronúcleos e brotos nucleares.

Nas amostras avaliadas nesse estudo, anormalidades relacionadas com o mau funcionamento do fuso mitótico foram raramente observadas.

Os efeitos dos resíduos associados também foram monitorados por meio de testes citogenéticos em *A. cepa*.

A casca de arroz promoveu um decréscimo da atividade genotóxica e mutagênica do solo de *landfarming*. Desse modo, os dados obtidos com *A. cepa* reforçaram a viabilidade do uso da casca de arroz na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

Apesar da casca de arroz associada com a vinhaça ter também diminuído a genotoxicidade e a mutagenicidade do *landfarming*, uma das amostras avaliadas foi citotóxica para *A. cepa*.

Os dados obtidos com *A. cepa* mostraram que a vinhaça potencializou a clastogenicidade do *landfarming* de refinaria de petróleo. Nossos resultados são relevantes por mostrar a importância do uso de ensaios biológicos para o monitoramento dos efeitos da adição da vinhaça *in natura* em solos contendo resíduos orgânicos a serem biorremediados. Também, nossos dados alertam para o uso desse efluente em solos agrícolas juntamente com misturas ambientais complexas, como o lodo de esgoto.

As análises realizadas em laboratório mostraram que *A. cepa* constitui um excelente organismo para avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de misturas ambientais complexas. Também, conclui-se que o teste de anormalidades mitóticas e cromossômicas com essa espécie vegetal pode ser rotineiramente requerido, por agências regulatórias, para avaliar a destoxificação de contaminantes orgânicos dispostos no solo.

Apesar de sua importância ecológica, o uso de diplópodos como bioindicadores da qualidade de solos ainda é relativamente escasso, em comparação com outros invertebrados terrestres saprófagos.

Desse modo, outro objetivo desse trabalho foi investigar a viabilidade do uso do diplópodo *Rhinocricus padbergi* como organismo-teste na avaliação de um solo de *landfarming* de refinaria de petróleo desativado.

Essa espécie foi escolhida por ser abundante, facilmente mantida em laboratório e por possuir anatomias externa e interna bem descritas na literatura, incluindo o trato

digestório e o corpo gorduroso. Assim, análises histológicas e histoquímicas foram realizadas no intestino médio, por ser a porção do trato digestório onde a digestão ocorre, e no corpo gorduroso perivisceral, que apresenta intensa atividade metabólica. Esses dois órgãos possuem também um importante papel nos processos de destoxificação e excreção de xenobióticos.

Conjuntamente, as respostas obtidas no intestino médio representam mecanismos de defesa dos animais expostos, numa tentativa de neutralizar e/ou eliminar os resíduos tóxicos ingeridos.

Primeiramente, foi observado o aumento de grânulos citoplasmáticos presentes nas células da camada de corpo gorduroso constituinte da parede do intestino médio. Nesses grânulos, toxinas são acumuladas em formas insolúveis, metabolicamente inativas, para a posterior excreção. Porém, como essa estratégia funciona até um limite máximo de concentração de toxinas presentes no organismo dos animais, danos histológicos foram induzidos.

Foram observadas regiões do epitélio intestinal em processo de renovação tecidual, uma resposta fisiológica do organismo que permite a remoção de tecidos alterados, visando a manutenção das funções do órgão. O aumento da renovação epitelial indicou que as células danificadas estavam sendo eliminadas no lúmen do intestino.

A grande quantidade de hemócitos observada por entre as células da camada de corpo gorduroso foi relacionada com o desencadeamento de processos inflamatórios, visando a destruição de toxinas e a reabsorção do epitélio injuriado.

No presente trabalho, o epitélio intestinal não conseguiu conter a passagem de contaminantes, do lúmen para outros tecidos do corpo, visto que as análises histológicas e histoquímicas revelaram que o corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* também foi afetado pelos contaminantes presentes no *landfarming*.

Os adipócitos apresentaram sintomas de morte celular. Devido o aumento da presença de enócitos e de seus grânulos citoplasmáticos inferimos que essas células podem estar envolvidas com processos de destoxificação de compostos tóxicos.

A diminuição das quantidades de proteínas, lipídios, polissacarídeos neutros e de cálcio no corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* pode ter servido como fonte de reservas energéticas para a ativação de processos de destoxificação e de mecanismos de defesa contra os contaminantes presentes no solo de *landfarming*.

No campo, a ativação desses processos, visando a sobrevivência dos animais, pode prejudicar outras atividades vitais, afetando negativamente a decomposição da matéria orgânica e, conseqüentemente, o ecossistema como um todo.

Após os testes realizados em laboratório, concluiu-se que o diplópodo *R. padbergi* pode ser utilizado como bioindicador da qualidade de solos. Ensaios ecotoxicológicos realizados com essa espécie podem revelar o grau de poluição do solo e fornecer subsídios para o desenvolvimento de programas voltados à preservação desse ecossistema.

As alterações observadas no intestino médio e no corpo gorduroso perivisceral de *R. padbergi* podem ser utilizadas como biomarcadores subletais na avaliação de solos contaminados com misturas complexas, como o solo de *landfarming* utilizado.

Os resultados do presente trabalho alertam que *landfarmings* de refinaria de petróleo, mesmo desativados, apresentam perigo do ponto de vista ecotoxicológico e estratégias que visam acelerar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo no solo são bem vistas do ponto de vista ambiental, desde que ensaios biológicos, juntamente com análises químicas, sejam realizados para monitorar o progresso da biorremediação.

9. CONCLUSÕES

A partir do trabalho apresentado, concluímos que:

- A casca de arroz acelerou a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo e reduziu a genotoxicidade e a mutagenicidade do solo *landfarming*;
- A vinhaça não alterou de modo significativo a concentração de TPHs do solo de *landfarming* e aumentou sua clastogenicidade;
- A casca de arroz associada com a vinhaça reduziu a concentração de TPHs do solo de *landfarming*, bem como sua genotoxicidade e mutagenicidade;
- A espécie *A. cepa* pode ser utilizada para avaliar a qualidade de solos e para monitorar o progresso da biorremediação de contaminantes orgânicos no meio terrestre;
- A espécie *R. padbergi* mostrou-se sensível para avaliar a qualidade de solos e pode ser utilizada para monitorar o progresso da biorremediação de contaminantes orgânicos no meio terrestre;
- Tanto o intestino médio quanto o corpo gorduroso perivisceral foram sensíveis à ação do *landfarming* da refinaria de petróleo. Ambos os tecidos apresentaram respostas tissulares relacionadas com a ativação de mecanismos de defesa e destoxificação do organismo;
- As alterações observadas no intestino médio de *R. padbergi*, aumento do número de hemócitos presentes por entre as células do corpo gorduroso, aumento de regiões do epitélio em processo de renovação e aumento de grânulos citoplasmáticos nas células do corpo gorduroso, podem ser utilizadas como biomarcadores subletais na avaliação de solos contaminados com misturas complexas, como o solo de *landfarming* utilizado
- No corpo gorduroso perivisceral, a perda da integridade da membrana plasmática, a desorganização citoplasmática e a depleção de proteínas totais, de

polissacarídeos neutros, de cálcio e de lipídios podem ser considerados biomarcadores de estresse em *R. padbergi*;

- *Landfarmings* de refinaria de petróleo, mesmo desativados, apresentam perigo do ponto de vista ecotoxicológico e estratégias que visam acelerar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo presentes na borra oleosa são bem vistas do ponto vista ambiental.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. New York: Academic Press, 1994. p. 146-263.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATAJARAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALMEIDA, M. H. L.; CARVALHO, F. J. P. C. Metodologia empregada na caracterização e determinação da dosagem de aplicação de resíduos para disposição no solo. In: **Mesa redonda sobre química analítica ambiental**, 1., 1994, Petrobras, 8 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR - 6457: Amostras de solo – Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização**. Rio de Janeiro, 1986. 9p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR - 14283: Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico**. Rio de Janeiro, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR - 10.007: Amostragem de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004. 25p.

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v.32, p.155-164, 1998.

BANO, K.; BAGYARAJ, D.J.; KRISHNAMOORTHY, R.V. Feeding activity of the millipede *Jonespeltis splendidus* (Verhoeff) and soil humification. **Proceedings of the Indian Academy of Science**, v.185, n.1, p.1-11, 1976.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, p. 68-70, 1965

BERGER, T.M. **Biorremediação de solos contaminados com TPH – enfoque na aplicação do processo TERRAFERM**. 2005. 86f. Tese de Doutorado (Ecologia) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.

BOOPATHY, R. Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal petroleum hydrocarbons in soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 52, n. 3, p. 161-166, 2003.

CAI, Q.-Y.; MO, C.-H.; WU, Q.-T.; ZENG, Q.-Y.; KATSOYIANNIS, A.; FÉRARD, J.-F. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, p. 535-542, 2007.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural features of the fat body and oenocytes of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida). **Biocell**, v.24, n.1, p.1-12, 2000.

CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S. Ultrastructural features of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 21, n. 2, p. 65-71, 2004.

CHO, B.; CHINO, H.; TSUJI, H.; KUNITO, T.; NAGAOKA, K.; OTSUKA, S.; YAMASHITA, K.; MATSUMOTO, S.; OYAIZU, H. Laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil amendment materials. **Chemosphere**, v. 37, n. 7, p. 1599-1611, 1997.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma Técnica P4.231: Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação em solo agrícola**. São Paulo, 2006, 17p.

Conselho Estadual do Meio Ambiente – CONSEMA – Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Deliberação CONSEMA 44/2006. 229ª Reunião Ordinária do Plenário do CONSEMA. 21 de novembro de 2006.

Coordenadoria de Licenciamento Ambiental e de Proteção de Recursos Naturais – Parecer Técnico CPRN/DAIA/440/07. Anexo 6 – Despacho 060/06/ESRI/ESRD da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB – Solicitação de avaliação dos aspectos de poluição por resíduos sólidos de empreendimento apresentado pela PETROBRÁS – Petróleo Brasileiro S/A: Estudo de Impacto Ambiental (EIA) da Modernização da Refinaria de Paulínia, REPLAN – 4 de dezembro de 2006.

CORAZZA, R. I. Reflexões sobre o papel das Políticas Públicas Ambientais e de Ciência e Tecnologia na modelagem de opções produtivas “mais limpas” numa perspectiva evolucionista: um estudo sobre o problema da disposição da vinhaça. In: III ENCONTRO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA ECOLÓGICA, 1999,

Recife, p. 1-18. Disponível em <http://www.race.nuca.ie.ufrj.br/eco/trabalhos/mesa3/6.doc>. Acesso em 19 de abril de 2008.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F.; FÉRARD, J.F. Assessment of genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* – micronucleus and the *Tradescantia* – micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p. 67-171, 1999.

CRIVELARO, S.H.R. **Associação de borra oleosa de refinaria de petróleo e vinhaça visando a biodegradação**. 2005. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP.

CROTT, J.W.; MASHIYAMA, S.T.; AMES, B.N.; FENECH, M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism does not alter folic acid deficiency-induced uracil incorporation into primary human lymphocyte DNA in vitro. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 1019-1025, 2001.

DA SILVA, J.; FONSECA, M.B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. In: DA SILVA, J.; ERDTMAN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (Org.). **Genética Toxicológica**, Porto Alegre: Alcance, p. 71-84, 2003.

DEL'ARCO, J.P.; FRANÇA, F.P. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 44, n. 2, p. 87-92, 1999.

DELLA, V.P., KUHN, I., HOTZA, D. Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica. **Química Nova**, v. 24, n.6, p.778-782, 2001.

FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Anatomy of the digestive tube and histochemistry of the foregut and salivary glands of *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Dipl., Spirobolida; Rhinocricidae). **Arthropoda Selecta**, v.7, n. 4, p. 257-264, 1998.

FANTAZZINI, E.R.; FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Midgut of the millipede, *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida): Histology and histochemistry. **Arthropoda Selecta**, v. 11, n. 2, p. 135-142, 2002.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FENECH, M.; CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, p. 131-136, 2002.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in the environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; TIRITAN, B.M.S. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda: Spirobolida). **Iheringia.**, v. 94, p. 351-355, 2004.

FONTANETTI, C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; TIRITAN, B.M.S. Mineralized bodies in the fat body of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 23, p. 487-493, 2006.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 203p.

FRIEAUFF, W.; POTTER-LOCHER, F.; CORDIER, A.; SUTTER, W. Automatica analysis of the *in vitro* micronucleus test on V79 cells. **Mutation Research**, v. 413, p. 57-68, 1998.

GISSELSSON, D.; BJORK, J.; HOGLUND, J.M.; MERTENS, F.; DAL CIN, P.; AKERMAN, M.; MANDAHL, N. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. **American Journal Pathology**, v. 158, p. 199-206, 2001.

GLISSMANN, K., CONRAD, R. Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, 117-126, 2000.

GLÓRIA, N.A.; ORLANDO FILHO, J. **Aplicação de vinhaça como fertilizante**. São Paulo: Coopersucar, 1983. 38p.

GODOY, J.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substrate containing sewage sludge. **Water, Air and Soil Pollution**, 2009, DOI 10.1007/s11270-009-0261-z.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

GUARACHO, V.V. **Remediação eletrocinética de chumbo e níquel em solos de *landfarming* de refinaria**. 2005. 137 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual do Paraná, Curitiba, 2005.

HAMDI, H.; BENZARTI, S.; IANASC, L.M.; AOYAMAA, I.; JEDIDID, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 1926–1935, 2007.

HARMSSEN, J. 1991. **Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated sites**. In: Hinchee, R.E., Olfenbittel, R.F. (Eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*, Butterworth-Heinemann, London.

HAUG, R., 1993. **The Practical Handbook of Compost Engineering**. Lewis Publishers, Florida. p. 717.

HEJAZI, R.F.; HUSAIN, T.; KHAN, F.I. Landfarming operation of oily sludge in arid region—human health risk assessment. **Journal Hazardous Materials**, v. 99, p. 287-302, 2003.

HOPKIN, S.P. **Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates**. New York, Elsevier, 1989.

HOPKIN, S.P.; WATSON, K.; MARTIN, M.H.; MOULD, M.L. The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chil: Dipl.). **Bijdragen Tot De Dierkunde**, v. 55, p. 88-94, 1985.

HOPKIN, S. P.; READ, H. J. **The Biology of Millipedes**. Oxford, Oxford University Press. 233p, 1992.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Research**, v. 277, p.91-138, 1992.

HUANG, X.D.; EL-ALAWI, Y.; GURSKA, J.; GLICK, B.R.; GREENBERG, B.M. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. **Microchemical Journal**, v.81, p.139-147, 2005.

IRANZO, M.; CAÑIZARES, J.V.; ROCA-PEREZ, L.; SAINZ-PARDO, I.; MORMENEO, S.; BOLUDA, R. Characteristics of rice straw and sewage sludge as composting materials in Valencia (Spain). **Bioresource Technology**, v.95, p. 107-112, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983.123p.

KIME, R.K.; GOLOVATCH, S.I. Trends in the ecological strategies and evolution of millipedes (Diplopoda). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 63, p. 333-349, 2000.

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

KIRSCH-VOLDERS, M.; CUNDARI, E.; VERDOODT, B. Towards a unifying model for the metaphase/anaphase transition. **Mutagenesis**, v. 13, p. 321-335, 1998.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M. DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KLEMZ, C. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus* sp (cascudo)**. 2002. Dissertação (Mestrado), Departamento de Farmacologia – Universidade Federal do Paraná, 2002.

KÖHLER, H.R.; ALBERTI, G. The effect of heavy metal stress on the intestine of diplopods. In: ADVANCES IN MYRIAPODOLOGY, E. Meyer, K. Thaler and W. Schedl, eds. Ber. nat.-med. Ver. Innsbruck, Suppl., v. 10, p. 257-267, 1992.

KÖHLER, H.R.; KÖRTJE, K.H.; ALBERTI, G. Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). **BioMetals**, v.8, p.37-46, 1995.

KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Assessment of the cytotoxic impact of heavy metals on soil invertebrates using a protocol integrating qualitative and quantitative components. **Biomarkes**, v. 3, n. 2, p. 109-127, 1998.

KÖHLER, H.-R. Localization of metals in cells of saprophagous soil arthropods (Isopoda, Diplopoda, Collembola). **Microscopy Research and Technique**, v. 56, p. 393-401, 2002.

KONG, M.S.; MA, T.H. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p. 221-228, 1999.

LEME, D.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214-219, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486. 1938.

LINDBERG, H.K.; WANG, X.; JÄRVENTAU, H.; FALCK, G.C.-M.; NORPPA, H.; FENECH, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 617, p. 33-45, 2007.

LYRA, M.R.C.C.; ROLIM, M.M.; SILVA, J.A.A. Toposequência de solos fertirrigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, n.3, p.525-532, 2003.

MA, T.-H; XU, Z.; XU, C.; McCONNELL, H. The improved *Allium /Vicia* root tip assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MACEDO, R.C.; BERBERT, V.H.C.; RIZZO, A.C.L.; TRINDADE, P.V.O.; LEMOS, J.L.S. **Biorremediação de solos impactados com óleo cru utilizando fungos filamentosos**. In: X Jornada de Iniciação Científica – CETEM, Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: www.cetem.gov.br. Acesso em 12 dez. 2005.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221-226, 2004.

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

MATSUMOTO, ST.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148–158, 2006.

MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 881-887, 2003.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000, 295p.

MIGID, H.M.A.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 57-64, 2007.

MORAIS, E.B. **Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas**. 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2005.

MORELLI, I.S.; DEL PANNO, M.T.; DE ANTONI, G.L.; PAINCEIRA, M.T. Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.55, p.271–278, 2005.

NAKAMAE, I.J. **Agriannual 2004 – Anuário da agricultura brasileira**. 2004. São Paulo: Editora FNP, 1 Ed., 496p., 2004.

NELSON, E.C.; WALTER, M.V.; BOSSERT, I.D.; MARTIN, D.G. Enhancing biodegradation of petroleum hydrocarbons with guanidinium fatty acids. **Environmental Science & Technology**, n. 30, p. 2406-2411, 1996.

NETO, P.F.S.; SANTOS, R.; RIZZO, A. Estudo da aplicação de material estruturante na biorremediação de solos contaminados por petróleo em biorreator. In: XIII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005, **Anais do XIII CETEM**, Rio de Janeiro.

Disponível em: www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XIII_jic_2005. Acesso em: 12 dez. 2005.

NOGAROL, L.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: tissular responses of the midgut. **Micron**, v. 41, p. 239-246, 2010.

OH, Y.S.; CHOI, W.Y.; LEE, Y.H.; CHOI, S.C.; KIM, S.J. Biological treatment of oil contaminated sand: comparison of oil degradation based on thin-layer chromatography/flameionization detector and respirometric analysis. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 595-598, 2000.

PEARSE, A.G.E. **Histochemical: Theoretical and Applied**. Churchill, 1985. 530p.

PIGINO G. ; MIGLIORINI, M.; PACCAGNINI, E.; BERNINI, F.; LEONZIO, C. Fine structure of the midgut and Malpighian papillae in *Campodea (Monocampa) quilisi* Silvestri, 1932 (Hexapoda, Diplura) with special reference to the metal composition and physiological significance of midgut intracellular electron-dense granules. **Tissue and Cell**, v.37, p. 223-232, 2005.

PILOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Chemical carcinogenesis. In: KLAASEN, C. D. (Ed.). Casarett and Doull's **Toxicology: the basic science of poisons**. 5 ed. New York: McGraw Hill, 1996. 201-267p.

PINTO-MARIANO, A.; CRIVELARO, S.H.R.; ANGELIS, D.F.; BONOTO, D.M. Use of vinasse, an ethanol distillery waste, as an amendment to bioremediation of diesel oil contaminated soils. In: XXII INTERAMERICAN CONFEDERATION OF CHEMICAL ENGINEERING, 2006. **Anais do XXII Interamerican Confederation of Chemical Engineering**, 2006, Buenos Aires.

Disponível em http://dpi.ep.ufrj.br/ciaq_22/CD/formCrCongresso/papers/11b/11b_335.pdf.

Acesso em: 19 de abril de 2008.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R.L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil bioremediation. **Chemosphere**, 59, p. 289–296, 2005a.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R.L. Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil Grazyna. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.62, p.415–420, 2005b.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20–33, 2001.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 975-981, 2001.

QUINTEIRO, A.C. **Estudo de caso: atendimento do processo de gestão ambiental, através de um sistema integrado de gerenciamento de resíduos sólidos industriais, SIR**. 2004. 271f. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Gestão Ambiental) - Instituto de Biociências, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro-RJ.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátides hermanas**. 1987. Tese (Doutorado), Universidade de Complutense, Madrid, 1987.

RAIMUNDO, R.S.; MACEDO, R.C.; RIZZO, A.C.L. Tratamento de solo contaminado por petróleo empregando material estruturante. In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA (ABQ), **Anais do XLIV Congresso Brasileiro de Química**, Fortaleza, Ceará, 2004.

RAIMUNDO R.S.; RIZZO, A.C.L. Emprego de biorreator não convencional no tratamento de solo contaminado por petróleo. In: XIII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CETEM, Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: www.cetem.gov.br. Acesso em 12 dez. 2005.

RAMALHO, J.F.G.P.; SOBRINHO, N.M.B.A. Metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso de resíduos agroindustriais. **Revista Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1. p. 120-129, 2001.

RANK J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium cepa* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-53, 1993.

RANK, J.; JENSEN, A.-G.; SKOV, B.; PEDERSEN, L.H.; JENSEN, K. Genotoxicity testing of the herbicide Rondoup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. **Mutation Research**, v. 300, p. 29-36, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v. 390, p. 121-127, 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, p. 113-119, 1998.

RANK, J. The method of *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Ekologija**, p. 38-42, 2003.

RHYKERD, R.L.; CREWS, B.; MCINNES, K.J.; WEAVER, R.W. Impact of bulking agents, forced aeration and tillage on remediation of oil-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 279-285, 1999.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra, 2003, p. 21-26.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra, 2003, p. 21-26.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1998.

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutation. In: CUMMINGS, B. (Ed.). **Genetics**. San Francisco: Pearson Education Inc., 2002. p. 595-621.

SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A.M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **Intern. Biodet. Biodegrad.**, Edinburg, v. 54, n. 1, p. 19-25, 2004.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v.136, p.187-195, 2005.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, p. 38-45, 2001.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, p. 1307-1320, 1998.

SILVA, E.J.; TASHIMA, M.M.; AKASAKI, J.L. Estudo de reações expansivas em argamassas de cimento Portland com cinza de casca de arroz (CCA). **Holos Environment**, v. 7, n.1, p. 72-86, 2007.

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; GONÇALVES, R.A.; FONTANETTI, C.S. The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1363-1368, 2009.

STRAUBE, W.L.; NESTLER, C.C.; HANSEN, L.D.; RINGLEBERG, D.; PRITCHARD, P.H.; JONES-MEEHAN, J. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulations and bioaugmentation. **Acta Biochnologica**, v. 23, p. 179-196, 2003.

TRIEBSKORN, R.; KÜNAST, C. Ultrastructural change in the digestive system of *Deroceras reticulatum* (Mollusca: Gastropoda) induced by lethal and sublethal concentrations of the carbamate molluscicide cloethocarb. **Malacologia**, v. 32, n.1, p. 89-106, 1990.

TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.R.; ZANH, T.; VOGT, G.; LUDWIG, M.; RUMPF, S.; KRATZMANN, M.; ALBERTI, G.; STORCH, V. Invertebrate cells as targets for Hazardous substances. **Zeitschrift für Angewandte Zoologie.**, v. 78, p. 277-287, 1991.

TRIEBSKORN, R.; HENDERSON, I.F.; MARTIN, A.P. Detection of iron in tissues from slugs (*Deroceras reticulatum* Müller) after ingestion of iron chelates by means of energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM). **Pesticide Science**, v. 55, p. 55-61, 1999.

TÜRKÖĞLU S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa*. **Mutation Research**, v.626, p. 4-14, 2006

USEPA- United States Environmental Protection Agency (1994). Landfarming In: How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A guide for Corrective Action Plan reviews (EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007).

USEPA - United States Environmental Protection Agency (1998). Landfarming. Office of the Underground Storage Tank, US Environmental Protection Agency. Publication # EPA 510-B-95-007. <http://www.epa.gov/swerust/cat/landfarm.htm>

USEPA - United States Environmental Protection Agency (2008). Using TPH in risk – based corrective action. Shell Development Company.

URURAHY, A.F.P.; MARINS, M.D.M.; VITAL, R.L.; GABARDO, I.T.; PEREIRA JR., N. Efeito da aeração na biodegradação de resíduo de petróleo. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, 1998.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. **Environmental International**, v. 26, p. 409-411, 2001.

WALKER, J.A.; BOREHAM, D.R.; UNRAU, P.; DUCAN, A.M.V. Chromosome content and ultrastructure of radiation-induced micronuclei. **Mutation Research**, v. 11, p.419-424, 1996.