

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THALITA COLOMBO BIAZÃO

UTILIZAÇÃO DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. (POACEAE) NA
FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO

CURITIBA
2012

THALITA COLOMBO BIAZÃO

UTILIZAÇÃO DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. (POACEAE) NA
FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Meio Ambiente Urbano e Industrial do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná em parceria com o SENAI – PR e a Universität Stuttgart, Alemanha, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Meio Ambiente Urbano e Industrial.

Orientadora: Prof. Dra. Regina Weinschutz.
Co-orientadora: Prof. Dra. Leila Teresinha Maranhão.

CURITIBA
2012

Biazão, Thalita Colombo

Utilização de *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. (Poaceae) na fitorremediação de solo contaminado com petróleo / Thalita Colombo Biazão. – Curitiba, 2012.

61 f. : il.; tab.

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente Urbano e Industrial, SENAI – PR, Universität Stuttgart.

Orientadora: Regina Weinschutz

Co-orientadora: Leila Teresinha Maranhão

1. Solos – Poluição por petróleo. 2. Solos – Remediação.
I. Weinschutz, Regina. II. Maranhão, Leila Teresinha. III. Título.

CDD 628.55

TERMO DE APROVAÇÃO

THALITA COLOMBO BIAZÃO

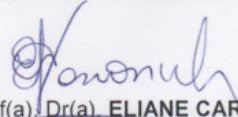
UTILIZAÇÃO DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. (POACEAE) NA
FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Mestrado Profissional em Meio Ambiente Urbano e Industrial, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná em parceria com SENAI-PR e a *Universität Stuttgart*, Alemanha, pela seguinte banca examinadora:

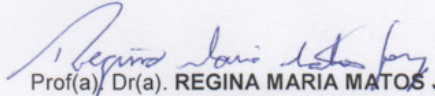
Orientador(a):


Prof(a). Dr(a). **REGINA WEINSCHUTZ**

Departamento de Engenharia Química/UFPR

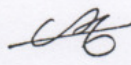

Prof(a). Dr(a). **ELIANE CARVALHO DE VASCONCELOS**

Pós-Graduação em Gestão Ambiental/ UP


Prof(a). Dr(a). **REGINA MARIA MATOS JORGE**

Departamento de Engenharia Química/UFPR





Prof. Dr. **ALVARO LUIZ MATHIAS** 09409-9
Coordenador do TC/MAUI-UFPR

Curitiba, 28 de março de 2012.

Ao meu esposo, por toda dedicação,
paciência, incentivo e amor.

Aos meus pais, por todo apoio, exemplo de
vida, ensinamentos e amor.

As minhas irmãs e cunhados, por todo
incentivo e amor.

A professora Leila pela sabedoria
transmitida, acessibilidade e inteligência.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus bondoso pela vida.

Ao meu esposo maravilhoso e amado.

Aos meus pais, excelentes pais e amados.

As minhas irmãs e cunhados amados.

A Prof. Regina pela orientação, incentivo e confiança.

A Prof. Leila agradeço imensamente, sem ela a realização deste trabalho não seria possível, pela orientação, conhecimento e dedicação por tudo que faz.

A Marielle Feilstrecker pelo apoio, dedicação ao curso e amizade.

A Universidade Positivo pelas instalações.

Aos funcionários, professores e alunos (as) da biologia da Universidade Positivo que contribuíram de alguma forma para realização do trabalho.

A todos que me apoiaram e auxiliaram de algum modo.

Muito obrigada a todos!

Contudo, seja qual for o grau a que chegamos, o que importa é prosseguir decididamente.

Paulo Apóstolo

RESUMO

Devido à utilização mundial do petróleo e seus derivados, surge à possibilidade de acidentes por derramamento em solo, fazendo-se necessário o estudo de técnicas que possam ser aplicadas para remediação de contaminantes. A fitorremediação é uma das técnicas aplicada, que utiliza uma espécie vegetal e microbiota associada para a redução de contaminantes. O presente estudo avalia o potencial fitorremediador de *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. em substrato contaminado com petróleo. *E. polystachya* foi cultivada em casa de vegetação em substratos contaminados com diferentes concentrações de petróleo: tratamento T25 com 25 g.kg⁻¹ de petróleo; tratamento T50 com 50 g.kg⁻¹ de petróleo; tratamento T75 com 75 g.kg⁻¹ de petróleo; tratamento T100 com 100 g.kg⁻¹ de petróleo; e tratamento controle Tcontrole. Durante o período experimental, de 60 dias, avaliou-se a tolerância da planta por meio de medidas de crescimento e desenvolvimento, a influência do petróleo na organização estrutural das plantas, os micro-organismos presentes na região rizosférica e a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo. *E. polystachya* demonstrou-se tolerante ao solo contaminado com o petróleo independentemente da concentração, e demonstrou o desenvolvimento de estratégias morfofisiológicas, como o aumento no teor de clorofila, na espessura do mesofilo e maior área de aerênquima para sua sobrevivência e, conseqüente, desenvolvimento quando cultivada em substrato contaminado com petróleo. Houve o crescimento de micro-organismos em material coletado na rizosfera das plantas que cresceram em substrato contaminado com 100 g.kg⁻¹ de petróleo e degradação de hidrocarbonetos de petróleo em tratamentos contaminados com petróleo na presença e na ausência de plantas (atenuação natural). Diante desses resultados é possível inferir que *E. polystachya* pode ser cultivada em sítios contaminados com petróleo, e possui potencial para contribuir com uma recuperação mais rápida do solo.

Palavras-chave: Poluição por petróleo. Remediação. Rizodegradação. Rizosfera. Espécie nativa.

ABSTRACT

Due to the world use of petroleum and its derivatives, arises the possibility of accidents caused by oil spilling, becoming necessary the research of techniques to be applied to solve the problems caused by the polluting agents. The phytoremediation is one of the applied techniques, which uses a plant and microbiota combined, to reduce the polluting agents. This research evaluates the phytoremediating potential of *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. in a substratum contaminated with petroleum. *E. Polystachya* was cultivated in a greenhouse, in contaminated substrates with different levels of petroleum: treatment T25 with 25 g.kg⁻¹ of petroleum; treatment T50 with 50 g.kg⁻¹ of petroleum; treatment T75 with 75 g.kg⁻¹ of petroleum; treatment T100 with 100 g.kg⁻¹ of petroleum; and control treatment Tcontrol. During the test period, 60 days, it was evaluated the tolerance of the plant through growing measures and development, the influence of petroleum on the plants organizational structures, the microorganisms in the rhizospheric region and the degradation of the oil hydrocarbons. *E. Polystachya* showed itself tolerant to the contaminated soil with petroleum regardless of the concentration and it showed the development of morphologic strategies, as the increase of the chlorophyll thickness of the mesophyll and a larger aerenchyma area to its survival and, consequently, development when cultivated in substrate contaminated with petroleum. There was an increase of microorganisms in material collected in rhizosphere of the plants which had grown in substrate contaminated with 100 g.kg⁻¹ of petroleum and degradation of petroleum hydrocarbons in treatment contaminated with petroleum in the presence and absence of plants (natural attenuation). Upon those results it is possible infer that *E. Polystachya* is able to be cultivated in sites contaminated with petroleum and it has potential to contribute to a faster recovery of the soil.

Key-Words: Petroleum pollution. Remediation. Rhyzodegradation. Rhizosphere. Native species.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - ESQUEMA QUE DEMONSTRA OS DIFERENTES TRATAMENTOS, BEM COMO O NÚMERO DE UNIDADES EXPERIMENTAIS.....28
- FIGURA 2 - DESPLANTE DO TRATAMENTO T75. A) PARTE AÉREA; B) SISTEMA DE RAÍZES.....29
- FIGURA 3 - PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DENSIDADE ESTOMÁTICA. A) PROCEDIMENTO DE MONTAGEM; B) LÂMINAS MONTADAS.....32
- FIGURA 4 - CONFECÇÃO DAS LÂMINAS PERMANENTES. A) SECCIONAMENTO EM MICRÓTOMO; B) LÂMINAS MONTADAS.....33
- FIGURA 5 - ESQUEMA QUE DEMONSTRA A DILUIÇÃO SERIADA REALIZADA PARA AS ANÁLISES DE COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DA RIZOSFERA.....34
- FIGURA 6 - PLACAS COM OS MEIOS DE CULTURA ÁGAR NUTRITIVO E PDA. A) CRESCIMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS ; B) CONTAGEM DE UFC.....34
- FIGURA 7 - ASPECTO DO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. NO TRATAMENTO T75. A) PARTE AÉREA; B) SISTEMA DE RAÍZES.....36
- FIGURA 8 - PERFIL CROMATOGRÁFICO COM IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO.....46

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - MÉDIAS \pm DESVIOS-PADRÃO DOS PARÂMETROS QUANTITATIVOS ANALISADOS DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. EM SUBSTRATO CONTAMINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PETRÓLEO.....39
- TABELA 2 - MÉDIAS \pm DESVIOS-PADRÃO DAS MENSURAÇÕES DAS ESTRUTURAS DA FOLHA (μm) DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. EM SUBSTRATO CONTAMINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PETRÓLEO.....41
- TABELA 3 - MÉDIAS \pm DESVIOS-PADRÃO DAS MENSURAÇÕES DAS ESTRUTURAS DA RAIZ (μm^2) DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. EM SUBSTRATO CONTAMINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PETRÓLEO.....42
- TABELA 4 - MÉDIAS \pm DESVIOS-PADRÃO DAS MENSURAÇÕES E PORCENTAGENS DE AERÊNQUIMA (μm^2) DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. EM SUBSTRATO CONTAMINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PETRÓLEO.....43
- TABELA 5 - MÉDIAS \pm DESVIOS-PADRÃO DAS COLÔNIAS PRESENTES NOS MEIOS DE CULTURA DOS TRATAMENTOS CONTROLE E T100 CONTAMINADOS COM PETRÓLEO.....44
- TABELA 6 - MÉDIAS \pm DESVIOS-PADRÃO DOS COMPOSTOS DE PETRÓLEO IDENTIFICADOS NOS T CONTROLE, T100 E T100 SP E DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS.....46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 PETRÓLEO	16
2.1.1 Definição e seus derivados	16
2.1.2 Riscos de contaminação e impactos no ambiente	17
2.1.3 Técnicas utilizadas na recuperação da qualidade ambiental do solo	18
2.2 FITORREMEDIAÇÃO	20
2.2.1 Mecanismos de fitorremediação	20
2.2.2 Rizodegradação	21
2.2.2.1 Solo	22
2.2.2.2 Micro-organismos do solo	22
2.2.2.3 Interações ecológicas	24
2.3 A ESPÉCIE <i>Echinochloa polystachya</i> (Kunth) Hitchc.	24
2.3.1 Descrição morfológica	25
2.3.2 Características agronômicas da espécie	25
2.3.2.1 Produção de forragem e manejo	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 ESTABELECIMENTO DOS EXPERIMENTOS	27
3.2 DESPLANTE DAS MUDAS E COLETA DOS SUBSTRATOS	29
3.3 DOSAGEM DE CLOROFILA	29
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA E BIOMASSA DA PARTE AÉREA E RAIZ	31
3.5 ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL	31
3.5.1 Coleta do material	31
3.5.2 Densidade estomática	31
3.5.3 Organização estrutural das epidermes e mesofilo da folha e raiz	32
3.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DA RIZOSFERA	33
3.7 EFICIÊNCIA DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO ..	35
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 TOLERÂNCIA DA <i>Echinochloa polystachya</i> (Kunth) Hitchc. AO SUBSTRATO CONTAMINADO COM PETRÓLEO	36
4.1.1 Crescimento e desenvolvimento de <i>Echinochloa polystachya</i> (Kunth) Hitchc. em substrato contaminado com petróleo	37
4.2 INFLUÊNCIA DO PETRÓLEO NA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS PLANTAS	41
4.3 ANÁLISE DOS MICRO-ORGANISMOS NA RIZOSFERA	44
4.3.1 Crescimento de bactérias	44
4.3.2 Crescimento de fungos	45
4.4 DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO	45
5 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

Diante da necessidade mundial de petróleo e seus derivados surge o risco de derramamentos acidentais nos diferentes compartimentos ambientais, sendo necessária a busca de técnicas que possam ser aplicadas na remediação, seja por meio da degradação ou redução dos contaminantes presentes no ambiente.

Várias metodologias vêm sendo aplicadas para melhoria da qualidade de ambientes impactados por diferentes tipos de contaminantes. Segundo Andrade. *et al.* (2010), as técnicas de remediação mais empregadas atualmente no tratamento de solos contaminados por petróleo e seus derivados são: química (oxidação química *in-situ*), biológica (atenuação natural e biorremediação) e física (extração de vapores no solo).

De acordo com Andrade (2007), o processo de remediação é comumente denominado em razão do principal mecanismo responsável pela melhoria da qualidade ambiental. Quando a presença de seres vivos constitui o fator determinante da remediação, o processo é denominado biorremediação. Ainda, dentro da biorremediação, nos casos em que as plantas representam os principais mecanismos de remediação ou quando são essenciais para desencadear o processo, denomina-se fitorremediação. A real origem e aplicação da fitorremediação e os conceitos de suas várias derivações ainda apresentam-se controversos. Parece provável, entretanto, que a prática tenha se desenvolvido em períodos diferenciados nas várias partes do mundo, e muitas das origens descritas sugerem que sua aplicação tenha começado na observação de melhorias ambientais naturalmente decorrentes da presença de plantas em locais contaminados, o que demonstrou o potencial de sua utilização para esse fim. A partir desse ponto, prosseguiram as investigações e a seleção de plantas mais aptas para essa função.

Várias espécies de Poaceae, Fabaceae, Mimosaceae, e Caesalpiniaceae têm sido estudadas devido ao seu potencial de degradação do petróleo. Estudos relatam que a degradação do petróleo e seus derivados em solos cultivados com *Festuca arundinacea* Vill., *Sorghum bicolor* L. Moench, *Vigna sinensis* (L.) Endl. ex Hassk., *Medicago sativa* L., *Juncus roemerianus* Scheele, *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. e *Panicum maximum* Jacq., foram maiores quando comparados aos

solos sem vegetação (FERRERA-CERRATO *et al.*, 2006; SANGABRIEL *et al.*, 2006).

Grande importância é dada às espécies da família Poaceae, uma vez que favorecem a redução de hidrocarbonetos de petróleo (APRILL; SIMS, 1990; GUNTHER *et al.*, 1996; REILLEY *et al.*, 1996; QIU *et al.*, 1997), devido à ação de suas raízes, que influenciam a degradação dos contaminantes ao promoverem uma alteração das condições físicas e químicas do solo (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

Echinochloa polystachya (Kunth) Hitchc., espécie da família Poaceae, é uma planta herbácea nativa de terras inundáveis (CAMARÃO *et al.*, 2004) que se desenvolve em águas ricas em nutrientes (PIEADADE *et al.*, 1991; PIEADADE, 1993; CAVALHEIRO *et al.*, 2011). Pesquisas demonstram que essa espécie quando presente em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo é capaz de sobreviver, embora apresente redução em sua biomassa (RIVERA-CRUZ *et al.*, 2001, 2004). Solís-Domínguez *et al.* (2007) revelam que *E. polystachya* mostrou-se capaz de acumular cádmio em suas raízes e folhas, sem sofrer alterações no crescimento, o que sugere tratar-se de uma espécie promissora para recuperação de ambientes contaminados com petróleo.

No que se refere ao potencial de uso da fitorremediação para a recuperação de solos contaminados com petróleo, poucos são os estudos relacionados, de tal forma que mais pesquisas são necessárias, para avaliar esta técnica, especialmente aquelas que prevêm a avaliação de espécies nativas. Dessa forma, o presente estudo aborda a possibilidade de utilização de uma espécie nativa com potencial remediador de solo contaminado com petróleo, seja na degradação ou redução desse contaminante.

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial fitorremediador de *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. em solo contaminado com petróleo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a tolerância da planta por meio de seu desenvolvimento e crescimento em substrato contaminado com petróleo;
- Avaliar a influência do petróleo na organização estrutural das plantas.
- Analisar os micro-organismos presentes na região rizosférica;
- Avaliar a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo nos substratos contaminados com petróleo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PETRÓLEO

O petróleo é utilizado em diversos produtos do cotidiano, como plásticos, tintas, borrachas, fertilizantes e outros. De acordo com PETROBRAS (2010), esse óleo de origem fóssil, que levou milhões de anos para ser formado nas rochas sedimentares, se tornou a principal fonte de energia do mundo moderno. No Brasil, a maior parte das reservas está nos campos marítimos, em lâminas d'água com profundidades maiores do que as dos demais países produtores, exigindo conhecimento e tecnologia para encontra-lo e capta-lo.

O petróleo, originado da transformação de grandes deposições fósseis, é uma mistura de composição variável, formada por uma fração polar, os asfaltenos e resinas (HUESEMANN, 1994; DORN *et al.*, 1998) e, predominantemente por hidrocarbonetos (saturados e aromáticos), além de baixas concentrações de Ni, Fe e Vn (FREEDMAN, 1995).

O elemento mais importante e fundamental para a ocorrência de petróleo em quantidades significativas em uma bacia sedimentar, em algum tempo geológico passado ou presente, é a existência de grandes volumes de matéria orgânica de qualidade adequada acumulada quando da deposição de certas rochas sedimentares que são denominadas de geradoras. São estas rochas que, submetidas a adequadas temperaturas e pressões, geraram o petróleo em subsuperfície (MILANI *et al.*, 2000).

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

2.1.1 Definição e seus derivados

Segundo ANP (2010), o petróleo pode ser definido como todo e qualquer hidrocarboneto líquido em seu estado natural, a exemplo do óleo cru e condensado. Diferencia-se em:

Petróleo Brent: mistura de tipos de petróleo produzidos no Mar do Norte, oriundos dos sistemas petrolíferos Brent e Ninian;

Petróleo Estabilizado: petróleo com pressão de vapor inferior a 70 kPa, na temperatura de medição;

Petróleo Extra-pesado: todo petróleo com densidade superior a 1,00 (ou grau API inferior a 10° / Grau API: utilizado para medir a densidade relativa de líquidos, quanto mais densidade apresentar o óleo, menor será o grau API);

Petróleo Leve: todo petróleo com densidade igual ou inferior a 0,87 (ou grau API igual ou superior a 31°);

Petróleo Mediano: todo petróleo com densidade superior a 0,87 e igual ou inferior a 0,92 (ou grau API igual ou superior a 22° e inferior a 31°);

Petróleo Pesado: todo petróleo com densidade superior a 0,92 e igual ou inferior a 1,00 (ou grau API igual ou superior a 10° e inferior a 22°).

No Brasil, o petróleo pesado é encontrado em campos marítimos e terrestres. Seu processamento requer uma capacidade maior das unidades de refino para que seja convertido em combustíveis nobres. Além disso, sua alta densidade e viscosidade exigem maior esforço para o escoamento dos poços até as refinarias. Já o petróleo mais leve produz maior volume de gasolina, óleo diesel, GLP e naftas (PETROBRAS, 2010). Nas refinarias, o óleo bruto passa por uma série de processos até a obtenção dos produtos derivados, como gasolina, diesel, lubrificantes, nafta, querosene de aviação.

2.1.2 Riscos de contaminação e impactos no ambiente

Segundo Milani Junior *et al.* (2007), a Indústria do Petróleo pode ser descrita por um grande processo, composto de seis atividades: exploração, desenvolvimento, produção, refino, transporte e distribuição. Em uma abordagem mais ampla, podem ser acrescentados o processamento, o condicionamento, o transporte e a distribuição do gás natural e seus derivados, a geração de energia termelétrica a partir do gás natural ou de derivados do óleo, a petroquímica, a gasquímica, os serviços de sondagem e o apoio logístico. Este grande processo pode ser segmentado de diversas formas. Uma forma bastante comum é dividi-lo em *upstream* (exploração, desenvolvimento e produção) e *downstream* (refino, transporte e distribuição).

Os processos de produção e refino de petróleo podem levar à contaminação do solo e água. As principais causas de contaminação são vazamentos em tanques de estocagem e tubulações, despejo de resíduos de petróleo no solo e derramamentos acidentais (WHITE *et al.*, 2006).

Petróleo e produtos petroquímicos são importantes poluentes ambientais, contendo uma complexa mistura de várias substâncias (benzeno, tolueno, óxido de etileno etc.) que podem causar lesões no material genético e potencialmente desencadear processos carcinogênicos em seres humanos (KHALIL *et al.*, 1994).

Muitos pesquisadores vêm desenvolvendo trabalhos com objetivo de encontrar alternativas apropriadas para remover contaminantes orgânicos do solo e água, principalmente aromáticos, sendo que técnicas emergentes como a biorremediação e fitorremediação têm sido alternativas atraentes para a recuperação de locais contaminados por petróleo e derivados (ANDREONI *et al.*, 2004).

2.1.3 Técnicas utilizadas na recuperação da qualidade ambiental do solo

Cada técnica de tratamento é dependente de vários fatores, como: 1) condições físicas, químicas e biológicas do local contaminado; 2) concentração do contaminante e; 3) tempo requerido para a degradação ou a remoção do composto alvo, conforme a técnica empregada (ANDRADE *et al.*, 2010). Algumas técnicas utilizadas:

Oxidação química in-situ: consiste na injeção de produtos químicos reativos diretamente no local contaminado, com o objetivo de degradar rapidamente os contaminantes por meio de reações químicas que promovem a oxidação ou a redução das substâncias de interesse presentes em uma determinada área (ANDRADE *et al.*, 2010). Segundo Brown (2003), esse processo é mais frequentemente empregado em locais contendo concentrações elevadas do contaminante, geralmente, presentes na fonte e na "pluma" de contaminação;

Extração de vapores no solo (SVE): também conhecida como SVE (*Soil Vapor Extraction*), é uma técnica de remediação comumente empregada no tratamento de solos contaminados, porém, deve-se ressaltar que essa técnica é aplicada somente à "zona não-saturada" (zona que se situa imediatamente abaixo da superfície topográfica e acima do nível freático, onde os espaços entre as partículas estão parcialmente preenchidos por gases, essencialmente ar atmosférico

e vapor de água, e por água (ANDRADE *et al.*, 2010). A SVE baseia-se na aplicação de vácuo em pontos estratégicos do solo, a fim de induzir o fluxo controlado de ar e, então, remover os contaminantes presentes no solo, sobretudo, nas regiões da sub superfície. Nessa técnica, os gases extraídos devem, obrigatoriamente, passar por etapas de tratamento de vapores, antes de serem lançados para a atmosfera (ANDRADE *et al.*, 2010);

Atenuação Natural: compreende um trabalho de remediação que inclui uma variedade de processos físicos, químicos e biológicos que, dentro de condições favoráveis, permite a redução de massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentrações de contaminantes no solo ou água subterrânea sem intervenção humana (MOREIRA *et al.*, 2006). Este processo ocorre naturalmente em qualquer área contaminada, com variável grau de eficiência, dependendo dos tipos e concentrações de contaminantes presentes e dos processos físicos, químicos e biológicos característicos do solo e da água subterrânea (EPA, 2004).

O termo "atenuação natural" também tem sido empregado para descrever a remediação passiva de solo que envolve a ocorrência de diversos processos, de origens naturais, como a biodegradação, a volatilização, a dispersão, a diluição e a adsorção, promovidos na subsuperfície. Dentre estes, somente a biodegradação, facilitada por micro-organismos, destrói fisicamente os contaminantes de interesse (ANDRADE *et al.*, 2010). Este processo é importante para a degradação de derivados de petróleo, que podem ser degradados por organismos encontrados em quase todos os ambientes (MOREIRA *et al.*, 2006). Em muitos locais, o processo de biodegradação fica limitado às zonas periféricas da pluma contaminante, pois a presença de contaminante em elevadas concentrações dificulta a proliferação de micro-organismos no ambiente (WILSON; JONES, 1993; RABUS; HEIDER, 1998).

Fitorremediação: utiliza espécies vegetais capazes de remover ou degradar xenobióticos no solo (PIRES *et al.*, 2005) e, conseqüentemente, permitir o cultivo subsequente de espécies sensíveis na área (D'ANTONINO *et al.*, 2009), e/ou descontaminar o ambiente.

2.2 FITORREMEDIAÇÃO

A utilização da fitorremediação é baseada na seletividade, que algumas espécies apresentam a determinados tipos de compostos (PIRES *et al.*, 2006).

O estudo do comportamento de plantas em solos contaminados com petróleo permite selecionar e identificar espécies fito indicadoras de tal contaminação (MARANHO, 2006). Para obter indicadores de fito toxicidade do petróleo em solos, é necessário identificar a sensibilidade de plantas nativas (RIVERA-CRUZ; TRUJILLO-NARCÍA, 2004).

A fitorremediação pode ser utilizada em solos contaminados com metais pesados, hidrocarbonetos de petróleo, agrotóxicos, explosivos, solventes clorados e subprodutos tóxicos da indústria (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

A fitorremediação promove a reabilitação da estrutura e da ecologia do solo (MERKL *et al.*, 2006), aumenta a porosidade e a infiltração da água no solo e reduz a erosão (MARQUES *et al.*, 2011).

2.2.1 Mecanismos de fitorremediação

Segundo Procópio *et al.* (2009), a fitorremediação pode ser dividida em oito processos denominados de fitoextração, fitoacumulação, fitodegradação, fitovolatilização, fitoestimulação, rizodegradação, rizovolatilização e rizoestabilização, os quais ocorrem em função das características morfofisiológicas de cada espécie vegetal, e esses processos não são exclusivos e podem ocorrer simultaneamente ou sequencialmente. Os mecanismos da fitorremediação são definidos da seguinte forma:

Fitoextração: absorção do contaminante presente no ambiente pela espécie vegetal;

Fitoacumulação: armazenamento do contaminante nas raízes ou em outros órgãos, sem modificação nas moléculas do xenobiótico (aprisionamento). Ocorre após a fitoextração;

Fitodegradação: bioconversão do contaminante em formas menos tóxicas ou não tóxicas nas raízes ou em outros órgãos dos vegetais; em alguns casos a transformação ocorre de forma intensa, resultando na mineralização do xenobiótico. Ocorre após a fitoextração, ou mesmo após a fitoacumulação;

Fitovolatilização: volatilização de um contaminante fitotransformado a uma forma volátil, a qual é liberada na atmosfera. Ocorre após a fitoextração, ou mesmo após a fitoacumulação;

Fitoestimulação: estimulação à concentração/ativação de comunidade microbiana apta a biodegradar o contaminante, resultado da produção e liberação de exsudatos radiculares pela espécie vegetal;

Rizodegradação: biodegradação do contaminante pela comunidade microbiana associada à rizosfera da espécie vegetal Normalmente ocorre após a fitoestimulação;

Rizovolatilização: volatilização de um contaminante rizotransformado a uma forma volátil, a qual é liberada na atmosfera;

Rizoestabilização: imobilização, lignificação ou humificação do contaminante na rizosfera da espécie vegetal, ficando o contaminante inativo no solo, mesmo que preservando sua integridade molecular.

As plantas mantêm a estrutura do solo, garantem trocas gasosas e proporcionam o desenvolvimento dos micro-organismos, inclusive os biorremediadores (MARQUES *et al.*, 2011), que atuam através da rizodegradação promovendo a degradação de contaminantes, entre eles o petróleo.

Em solos contaminados com petróleo, a fitorremediação pode ocorrer pela estimulação da capacidade de degradação dos micro-organismos da rizosfera (ANDERSON *et al.*, 1993), mecanismo esse denominado rizodegradação.

2.2.2 Rizodegradação

A rizodegradação promove elevadas taxas de remediação, obtidas com utilização de plantas que, comprovadamente, aumentam a degradação microbiana de compostos orgânicos danosos ao solo (ANDERSON *et al.*, 1993).

Segundo Santos (2007), a rizosfera em associação com o fornecimento constante de substratos orgânicos e fatores de crescimento favorece a intensa atividade metabólica e multiplicação das populações microbianas associadas, interferindo na capacidade destes em (co)metabolizar diferentes compostos presentes no meio. A interação entre raiz e solo promove a proliferação da comunidade microbiana na região da rizosfera, pela exsudação de nutrientes aminoácidos e polissacarídeos da planta (ARTHUR *et al.*, 2000). O número de

micro-organismos no solo rizosférico é normalmente 5-10 vezes maior que naqueles não rizosféricos, podendo chegar a mais de 100 vezes (ANDERSON *et al.*, 1993).

2.2.2.1 Solo

O solo é a fonte mais importante de nutrientes para os vegetais. Os solos devem fornecer não somente um suporte físico para as plantas, mas, também, os nutrientes inorgânicos adequados. Além disso, o solo fornece a água e um ambiente gasoso conveniente para o desenvolvimento do sistema radicular (RAVEN *et al.*, 2007).

Segundo Vargas e Hungria (1997), do ponto de vista ecológico e global, a particularidade principal do solo é a sua capacidade de possibilitar o crescimento das plantas, sustentando a produção primária contínua. Para sintetizar seus componentes celulares, as plantas precisam dos elementos biogênicos, tais como: carbono, hidrogênio, oxigênio, enxofre, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e, em quantidades menores, os chamados micronutrientes, como: boro, ferro, manganês, molibdênio, cobalto, cloro, cobre, zinco.

Como fonte de carbono, as plantas aproveitam, graças à fotossíntese, o CO₂ presente na atmosfera do solo e no ar. A atmosfera serve, também, como fonte de O₂. Em solos com vegetação natural, os recursos biológicos resultam de processos de adaptação às condições ambientais, refletindo os mecanismos de evolução do ecossistema como um todo (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Segundo EMBRAPA (2003), o solo pode ser considerado resultado da adaptação das rochas às condições de equilíbrio do meio em que se encontram expostas, geralmente diferentes daquele que condicionou sua gênese. Os problemas ambientais têm sido e são abordados como consequência, entre outras, das disfunções que a atividade humana provoca, e de suas repercussões.

2.2.2.2 Micro-organismos do solo

O que distingue o solo de outras formações geológicas é a sua atividade biológica. Essa atividade e os componentes microbiológicos podem ser mensuráveis e seus valores caracterizam o potencial biológico do solo. O componente principal

da atividade biológica é a presença de micro-organismos, e também as funções das raízes das plantas (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Os micro-organismos do solo atuam nos processos de decomposição da matéria orgânica, participando diretamente no ciclo biogeoquímico dos nutrientes e, conseqüentemente, mediando a sua disponibilidade no solo (BALOTA *et al.*, 1998). Assim, a biomassa microbiana total do solo funciona como importante reservatório de vários nutrientes das plantas (GRISI; GRAY, 1986), pois pertence ao componente lábil da matéria orgânica do solo, e possui atividade influenciada pelas condições bióticas e abióticas, o que permite que o seu acompanhamento reflita possíveis modificações no solo (BALOTA *et al.*, 1998).

De acordo com Vargas e Hungria (1997), quando se observa um volume de solo, a primeira impressão é que quase não existe vida naquele conjunto de partículas, porém, o solo, em uma análise mais detalhada, revela que nesse volume existem matérias de origem mineral e outros com origem orgânica; que esses materiais guardam entre si relações importantes, as quais conferem aos solos inúmeras características dinâmicas; nesse volume prolifera uma população muito grande e diversificada de organismos vivos, de vários tamanhos, desde bactérias com cerca de $1 \mu\text{m}^3$ até insetos e vermes anelados com diâmetro aproximado superior a 1 mm.

Bactérias, fungos e protozoários povoam o solo com milhões, bilhões de indivíduos por decímetro cúbico e exercem um papel fundamental na decomposição de restos orgânicos e na formação de compostos organo-minerais (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

A microbiota do solo é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do solo, exercendo influência na transformação da matéria orgânica e na estocagem do carbono e nutrientes minerais (JENKINSON; LADD, 1981).

A comunidade de organismos do solo é marcada pela sua complexidade, tanto em termos quantitativos quanto em tipos de organismo, podendo ser encontrada com grande diversidade genética e funcional (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

2.2.2.3 Interações ecológicas

As plantas quando tolerantes podem controlar e “revegetar” áreas contaminadas. São elas que favorecem o crescimento de outras plantas menos tolerantes (UNICAMP, 2010). Através de interações ecológicas indivíduos de diferentes espécies de uma comunidade biológica interagem entre si, tanto com indivíduos de mesma espécie, quanto com indivíduos de espécies diferentes, através de trocas de benefícios entre si (AMABIS; MARTHO, 1997). Proporcionando assim, a possibilidade de outros micro-organismos se reproduzirem e sobreviverem em determinadas áreas.

2.3 A ESPÉCIE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc.

Essa espécie é comumente conhecida como capim-canarana-de-pico, canarana fluvial ou canarana verdadeira. É uma das principais espécies componentes das ilhas flutuantes de capins do Rio Amazonas (CAMARÃO *et al.*, 2006). Ocorre desde o México até a Argentina (PIEADADE *et al.*, 2010).

Segundo Barbosa *et al.* (2008), *Echinochloa polystachya* em sua área de ocorrência, substitui comunidades pioneiras de plantas anuais, devido a seu rápido crescimento, a reprodução da espécie é predominantemente vegetativa, e seu ciclo de vida é fortemente regulado pelo ciclo anual do nível da água, podendo ser dividido nas fases terrestre e aquática.

Echinochloa polystachya pertence à família Poaceae (Gramineae), é um capim semi-aquático (LOPES *et al.*, 2009). Conforme Welker e Longhi-Wagner (2007), os representantes da família Poaceae predominam em formações campestres, sendo menos comuns no interior das formações florestais.

Esta família tem grande importância ecológica e econômica, pela dominância em vários ecossistemas vegetais, pela utilização na alimentação dos animais e pelo uso dos cereais na dieta alimentar do homem (WELKER; LONGHI-WAGNER, 2007).

Estudos realizados com *E. polystachya* demonstraram que a planta é capaz de sobreviver em solos contaminados com petróleo (LOPES *et al.*, 2009). Sendo

uma espécie promissora para restauração de ambientes contaminados com petróleo (SOLÍS-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2007).

2.3.1 Descrição morfológica

É uma erva perene, com colmo de 1,0-3,0 m de altura, base comprida e reptante, glabro; nós densamente híspidos com pelos amarelo-adpressos, bainhas glabras ou pilosas (pálido-híspidas); lígula composta de uma linha de pelos amarelos, rígidos, até 4,0 mm de comprimento; lâmina podendo alcançar até 2,5 cm de largura, escabra na margem e na superfície inferior (CAMARÃO *et al.*, 2006). Inflorescência panícula de 10-20 cm, algo densa; racemos ascendentes, os inferiores na maioria escabros e mais ou menos papiloso-híspidos; espiguetas dispostas em série, bem junta, quase sésseis, com 5 mm de comprimento; floreta estéril estaminada, com arista de 2-10 mm (ou mais) de comprimento; cariopse mole, com 4 mm de comprimento, terminada por uma ponta com 0,5 mm de comprimento (BLACK, 1950; RENVOIZE, 1998).

2.3.2 Características agronômicas da espécie

Análises efetuadas utilizando-se isótopos naturais revelaram que a *E. polystachya* possui ciclo fotossintético C4 (CAMARÃO *et al.*, 2006). Essa planta apresenta-se em duas formas: uma aquática e outra terrestre (entre as várzeas alta e baixa), porém, morfologicamente, não são muito diferentes (PIE DADE *et al.*, 1992). A porcentagem de biomassa, no entanto, de *E. polystachya* da forma aquática (16,5 %) é menor que a da forma terrestre (22,6 %) (TEJOS, 1978). A sua propagação é totalmente vegetativa, formando novas rebrotas nas camadas superiores dos sedimentos (PIE DADE *et al.*, 2005).

2.3.2.1 Produção de forragem e manejo

E. polystachya pode produzir em condições naturais cerca de 108 t/ha/ano de biomassa (PIE DADE *et al.*, 1992). Segundo Camarão *et al.* (2006), no manejo, *E. polystachya* é uma das gramíneas mais consumidas em pastagens nativas de várzeas do Baixo Amazonas, chegando a até 32,5 % da dieta em pastejo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTABELECIMENTO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos inteiramente ao acaso em casa de vegetação na Universidade Positivo (UP), em Curitiba, PR, Brasil.

O petróleo utilizado nos experimentos foi fornecido pela refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), unidade da PETROBRAS (Petróleo Brasileiro S.A.). O substrato foi constituído por húmus de minhoca (Boutin[®]).

Previamente à montagem das unidades experimentais, o substrato foi peneirado e cerca de 1 kg foi separado e enviado para o Laboratório do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para proceder à análise de rotina e a fração argila, com o objetivo de verificar a composição nutricional do substrato (ANEXO).

Após, procedeu-se a contaminação dos substratos. O petróleo foi pesado e misturado manualmente no substrato em uma bandeja. Foram estabelecidos nove tratamentos, cada um com dez unidades experimentais: tratamento T25 com 25 g.kg⁻¹ de petróleo; tratamento T50 com 50 g.kg⁻¹ de petróleo; tratamento T75 com 75 g.kg⁻¹ de petróleo; e tratamento T100 com 100 g.kg⁻¹ de petróleo. Esses tratamentos foram divididos ainda, em tratamento com planta (T"X") e tratamento sem planta (T"X" SP), esse último foi estabelecido com a finalidade de avaliar a atenuação natural. Também, foi estabelecido o tratamento controle (Tcontrole) sem contaminação e com planta. Os substratos contaminados foram colocados em vasos de policloreto de vinila (PVC) com capacidade de 2 Litros. Para melhor compreensão da composição dos tratamentos um esquema é apresentado na FIGURA 1.

O experimento foi inteiramente ao acaso e conduzido por 60 dias, sendo acompanhado diariamente. A irrigação foi feita manualmente e com água destilada, aproximadamente, 100 mL por unidade experimental.

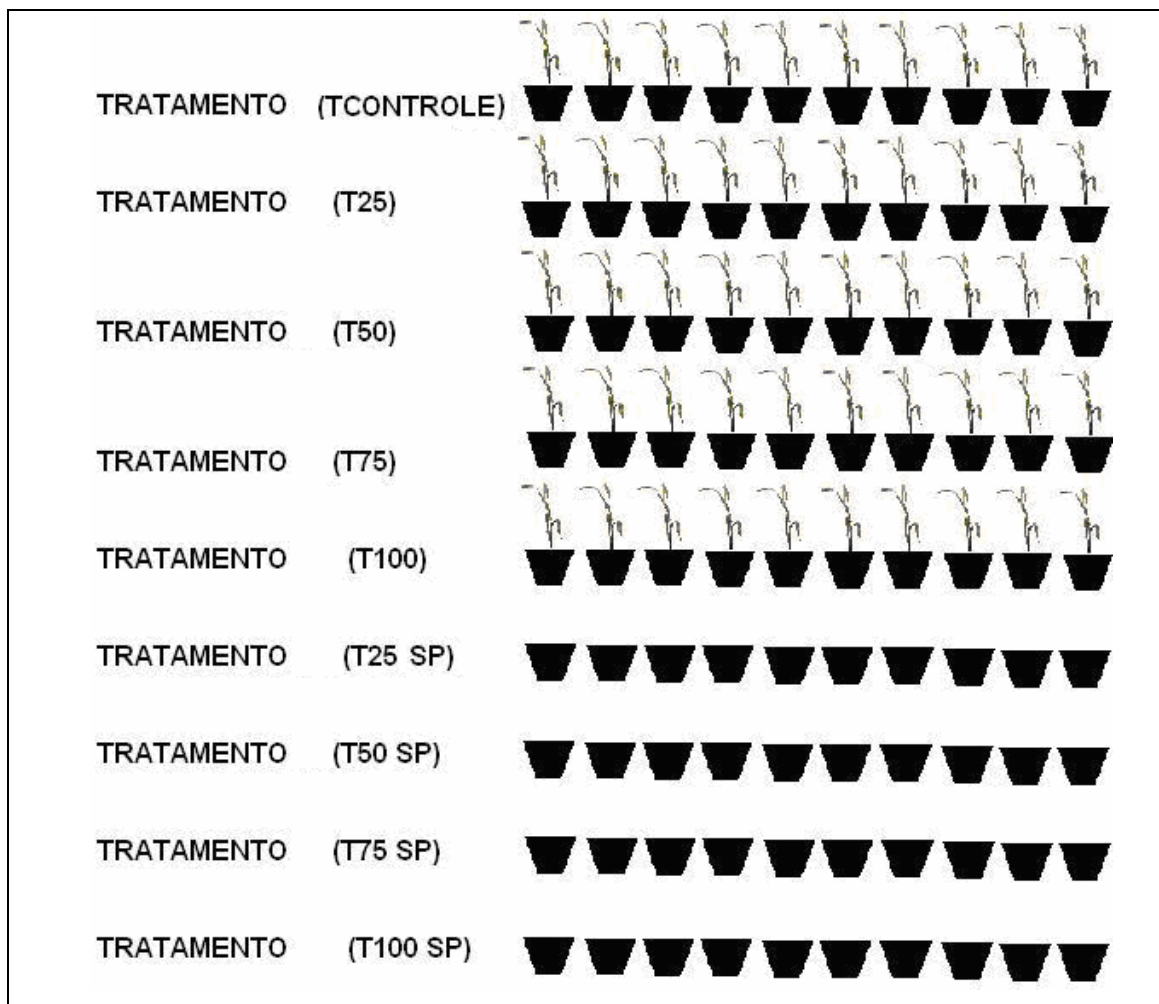


FIGURA 1 - ESQUEMA QUE DEMONSTRA OS DIFERENTES TRATAMENTOS, BEM COMO O NÚMERO DE UNIDADES EXPERIMENTAIS.
 FONTE: O Autor (2012)

As plantas de *Echinochloa polystachya* foram coletadas em uma região de várzea no bairro Caximba, Curitiba, PR, Brasil, próxima às coordenadas geográficas 25°62'S e 49°33'W. Após coleta fez-se a seleção das estacas de, aproximadamente, 30 cm para compor os tratamentos com plantas.

Em cada vaso, antes de receber as estacas, foi realizado o umedecimento completo do substrato com cerca de 300 mL de água destilada. As estacas foram colocadas nos vasos com as respectivas contaminações com petróleo. Na segunda semana após o plantio, devido ao crescimento e inclinação das estacas foi colocado suporte de bambu de, aproximadamente, 30 cm para sustentação das mesmas.

Durante o período experimental observou-se o índice de pega das estacas, o crescimento e desenvolvimento das plantas.

3.2 DESPLANTE DAS MUDAS E COLETA DOS SUBSTRATOS

O desplante foi realizado após 60 dias de plantio. No desplante foram selecionados seis vasos em cada tratamento com planta. Para a seleção consideraram-se plantas com características similares, principalmente no que se refere à altura das mesmas.

Após desplante foram coletadas amostras de substrato da região rizosférica para proceder às análises de degradação do petróleo e composição microbológica da rizosfera. Já para os tratamentos com as mesmas contaminações por petróleo, porém sem planta (atenuação natural), foram coletadas amostras de substrato, em profundidades aproximadas às ocupadas pelos sistemas de raízes das plantas. Coletou-se uma amostra por vaso, totalizando seis amostras por tratamento. As amostras foram coletadas com espátula de alumínio, acondicionadas em frascos coletores universais esterilizados e mantidas sob refrigeração.

As plantas foram separadas em parte aérea e raiz (FIGURA 2A e 2B) e mensuradas com régua milimetrada.

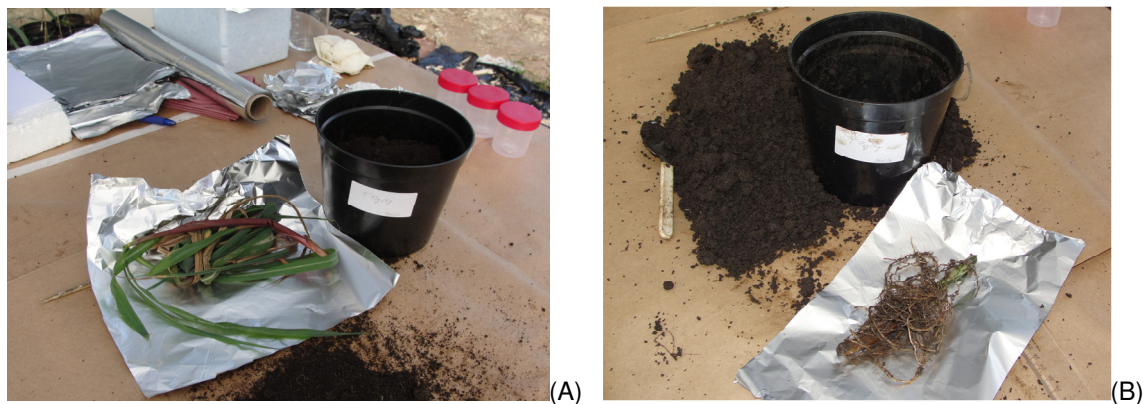


FIGURA 2 – DESPLANTE DO TRATAMENTO T75. A) PARTE AÉREA; B) SISTEMA DE RAÍZES.
FONTE: O Autor (2012)

3.3 DOSAGEM DE CLOROFILA

Para a determinação do teor de clorofila empregou-se a metodologia proposta por Barnes *et al.* (1992). As amostras de folhas posicionadas no 4º nó caulinar de, aproximadamente, 7 cm x 1 cm foram coletadas e imediatamente

aconditionadas envoltas em papel alumínio (para evitar a fotodegradação da clorofila) e num recipiente de isopor com gelo para análises posteriores.

Na extração das clorofilas o material coletado foi fragmentado previamente. Após, foram pesadas 0,028 g de folha e colocadas em tubos de ensaio com 5 mL de dimetilsulfóxido para extração dos pigmentos. A extração foi feita em banho-maria a 65°C durante 6h, ou seja, até extração completa do pigmento. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (UV-Visible Spectrophotometer UV-1601 Shimadzu) nos comprimentos de onda de 648 nm e 665 nm. Os valores de absorbância obtidos foram aplicados nas seguintes equações (1), (2) e (3):

$$C_a = 14,85 * A(665) - 5,144 * A(648) \quad (1)$$

$$C_b = 25,48A_{648} - 7,36A_{665} \quad (2)$$

$$C(a + b) = 7,49A_{665} + 20,34A_{648} \quad (3)$$

Em que: C_a = clorofila a; C_b = clorofila b; $C(a + b)$ = clorofila total; $A(665)$ = absorbância no comprimento de onda 665 nm e $A(648)$ = absorbância no comprimento de onda 648 nm.

A concentração de cada pigmento foi obtida pela equação (4):

$$C_{Ca} = \left(\frac{C_a * V}{m} \right) mL.mg^{-1} \quad (4)$$

Em que: V = volume de solvente utilizado (5 mL); m = massa de folha por tubo de ensaio (28 mg).

Obtendo-se a concentração de cada pigmento por unidade de peso foliar. Considerando o Sistema Internacional de Medidas que preconiza a expressão da quantidade de substância em moles, a conversão foi realizada tomando-se por base os pesos moleculares. Dessa forma, os valores obtidos para as clorofilas a e b foram respectivamente, multiplicados por 1,121 e 1,104, sendo a unidade expressa em $mmol.mg^{-1}$.

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA E BIOMASSA DA PARTE AÉREA E RAIZ

Para a determinação do teor de água e biomassa da parte aérea e raiz empregou-se como base a metodologia proposta por Silva *et al.* (2006), modificada. Após o período de exposição, fez-se o desplante em cada vaso. Cada planta foi separada em parte aérea e raiz, posteriormente foi determinada a parte fresca. Em seguida, tanto as raízes quanto a parte aérea foram secas em estufa a aproximadamente a 80 °C por 48 h até estabilização da massa. Posteriormente, foi feito o cálculo para determinação da porcentagem de água, bem como da biomassa da parte aérea e raízes.

3.5 ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL

3.5.1 Coleta do material

As amostras de folhas (aproximadamente 1 cm x 0,5 cm) utilizadas para a determinação da densidade estomática e estudo da estrutura interna foram coletadas posicionadas no 4º nó caulinar e na região mediana da folha. Das raízes foram coletadas amostras de aproximadamente 5 mm, posicionadas a 3 cm do ápice. Após coleta essas amostras foram imediatamente fixadas em FAA 70 (formol, ácido acético e etanol 70 % na proporção de 0,5: 0,5: 9,0, respectivamente) por 72 h (JOHANSEN, 1940). Após o material foi armazenado em etanol 70 % (BERLYN; MIKSCHE, 1976) até o processamento final.

3.5.2 Densidade estomática

Para contagem dos estômatos foi realizado o preparo das amostras de folhas por meio da separação das faces adaxial e abaxial com auxílio de uma lâmina de barbear e solução Franklin (1946). As epidermes foram colocadas em placa de Petri e com o auxílio de um pincel foi retirado todo o mesófilo, posteriormente, lavando-as em água destilada, neutralizando o pH em água acidulada, lavando-as

novamente em água destilada, e por último fazendo a coloração em azul de toluidina 0,05 % (SAKAI, 1973), (FIGURA 3A).

As lâminas foram montadas com glicerina e a lutagem foi feita com esmalte incolor (FIGURA 3B). Foram analisadas 12 folhas de cada grupo, onde foi contado o número de estômatos existentes em 1 mm² por meio de microscópio fotônico (Olympus – CX41RF) acoplado à câmara clara em objetiva de 40X.

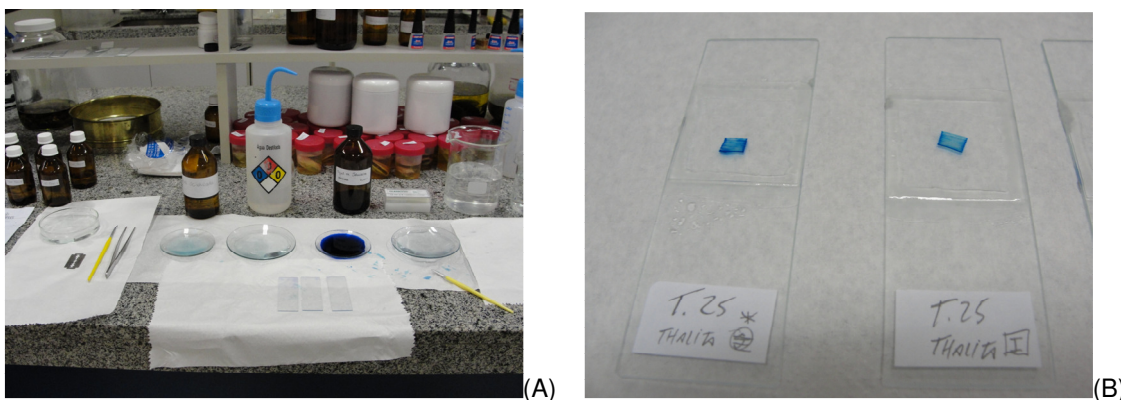


FIGURA 3 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DENSIDADE ESTOMÁTICA. A) PROCEDIMENTO DE MONTAGEM; B) LÂMINAS MONTADAS.
FONTE: O Autor (2012)

3.5.3 Organização estrutural das epidermes e mesofilo da folha e raiz

Para a confecção das lâminas permanentes, as amostras foram incluídas em metacrilatoaglicol (JB-4) conforme descrito por Feder e O'Brien (1968) e especificações do fabricante (Polysciences Inc.). O seccionamento foi realizado em micrótomo de rotação (Leica RM2125), com espessura de 7 µm (FIGURA 4A), sendo as secções coradas com azul de toluidina. As lâminas foram montadas com resina sintética (Entelan®), (FIGURA 4B). As ilustrações foram obtidas por meio de fotomicroscópio (Olympus BX – 41) com captura de imagem pelo software Image Pro-Plus.

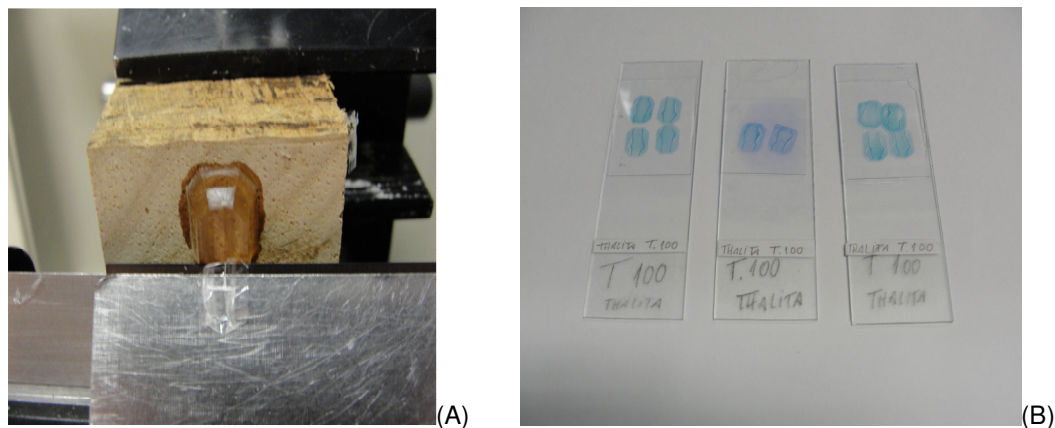


FIGURA 4 – CONFECÇÃO DAS LÂMINAS PERMANENTES. A) SECCIONAMENTO EM MICRÓTOMO; B) LÂMINAS MONTADAS.
 FONTE: O Autor (2012)

As mensurações foram realizadas em seis secções por folha e em seis secções das raízes. Foram mensurados nas folhas: epiderme na face adaxial, epiderme na face abaxial e mesofilo, totalizando 1624 medições; e nas raízes: área total e área do cilindro central, totalizando 360 medições.

3.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DA RIZOSFERA

A partir da observação do comportamento de *Echinochloa polystachya* nos diferentes tratamentos, foram selecionados para as análises da composição microbiológica da rizosfera o tratamento controle (Tcontrole), e o tratamento (T100) com e sem planta (atenuação natural), devido ser o tratamento com maior concentração de petróleo. Do substrato coletado na região rizosférica após desplante, foram pesadas 5 g de cada amostra e colocadas em erlenmeyer com 45 mL de solução salina 0,9 %. Esse material foi agitado em shaker com rotação de 145 rpm e temperatura de 30°C por 48 h.

Para a diluição seriada foi transferido 0,5 mL do sobrenadante para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina. Depois de adicionar 0,5 mL do erlenmeyer para o primeiro tubo identificado como 10^{-2} o tubo foi colocado em vórtex para agitar e, posteriormente, transferido 0,5 mL para a próxima diluição 10^{-3} e repetido o procedimento sucessivamente até a diluição 10^{-7} (FIGURA 5).

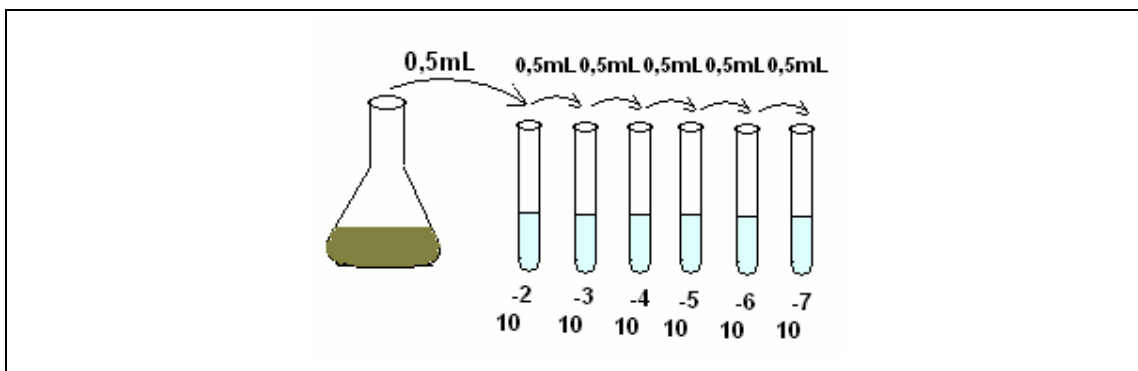


FIGURA 5 – ESQUEMA QUE DEMONSTRA A DILUIÇÃO SERIADA REALIZADA PARA AS ANÁLISES DE COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DA RIZOSFERA.
 FONTE: O Autor (2012)

Realizadas as diluições, para avaliar o crescimento de bactérias, acrescentou-se 0,1 mL de cada diluição 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} em placas de Petri contendo Meio Agar Nutritivo (AN). Para avaliar o crescimento de fungos acrescentou-se 0,1 mL de cada diluição 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} e 10^{-7} em placas de Petri contendo Meio Agar Batata Dextrose - Papa-Dextrosa Ágar (PDA). Esse procedimento foi realizado em duplicata.

Posteriormente, as placas foram colocadas em estufa para o crescimento dos micro-organismos, bactérias a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fungos a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 48 h. Após 48 h as placas foram retiradas da estufa e realizou-se a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por quadrante de cada placa (FIGURA 6A e 6B).

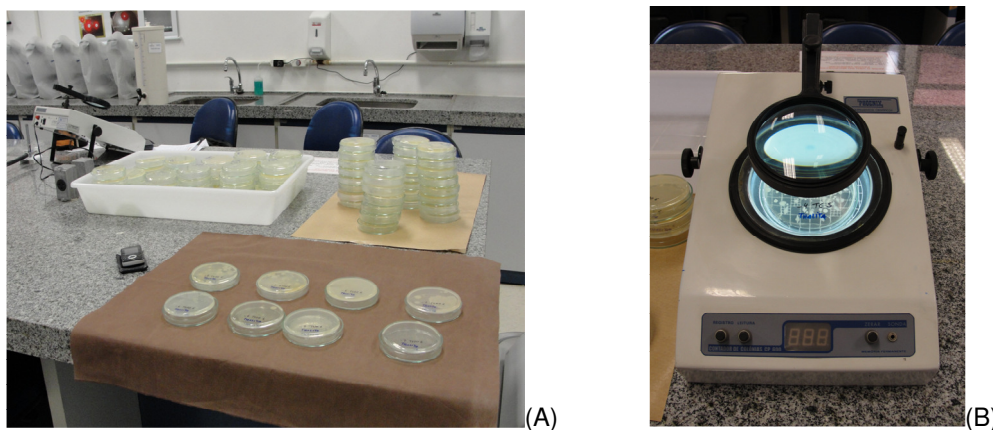


FIGURA 6 – PLACAS COM OS MEIOS DE CULTURA ÁGAR NUTRITIVO E PDA. A) CRESCIMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS ; B) CONTAGEM DE UFC.
 FONTE: O Autor (2012)

3.7 EFICIÊNCIA DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

Assim como descrito anteriormente, a partir da observação do comportamento de *Echinochloa polystachya* nos diferentes tratamentos, foram selecionados para as análises da eficiência da degradação de hidrocarbonetos de petróleo, o tratamento controle (Tcontrole), e o tratamento (T100) com e sem planta (atenuação natural).

A avaliação da degradação de hidrocarbonetos foi efetuada por meio da extração e quantificação de hidrocarbonetos de petróleo (HTP) da rizosfera. A extração dos hidrocarbonetos presentes na rizosfera foi efetuada conforme Schwab et al. (1999). Em um tubo de polipropileno foram adicionadas 2 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) para a absorção da água contida na amostra, 2 g da amostra do substrato (rizosfera) e 5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2). Em seguida os tubos foram colocados em "shaker" por 30 minutos a 100 rpm. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm durante 15 min. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e armazenado em vidros de âmbar com tampa e colocados sob refrigeração.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010. A coluna capilar utilizada foi DB-5 com diâmetro interno de 0,25 mm, comprimento de 30 m e espessura da fase estacionária de 0,25 μm . O hidrogênio atuou como carregador ($1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). A temperatura inicial foi mantida a 70°C por 4 min, depois incrementada até 190°C ($20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$) para 250°C (10 min^{-1}) e finalmente atingiu 280°C ($30^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$), mantida por 10 min. A temperatura do injetor foi de 250°C e do detector foi de 280°C .

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para todos os parâmetros analisados foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn a 5 % de probabilidade. Essas análises foram conduzidas com o auxílio do software BioEstat, versão 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TOLERÂNCIA DA *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. AO SUBSTRATO CONTAMINADO COM PETRÓLEO

Houve intenso rebrotamento e índice de sobrevivência de 100% para todos os propágulos em todos os tratamentos, além do crescimento e desenvolvimento, tanto das partes aéreas como dos sistemas de raízes das plantas (FIGURA 7A e 7B).

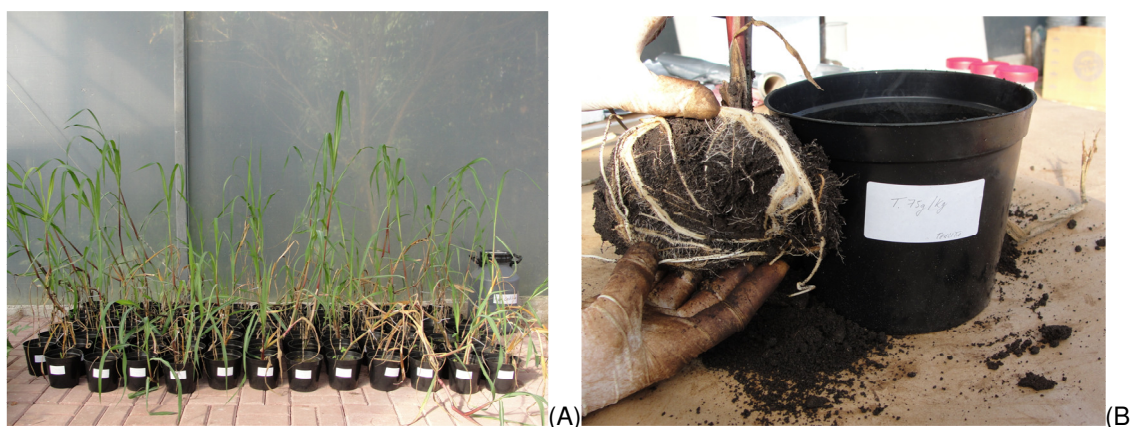


FIGURA 7 – ASPECTO DO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. NO TRATAMENTO T75. A) PARTE AÉREA; B) SISTEMA DE RAÍZES.
FONTE: O Autor (2012)

Echinochloa polystachya demonstrou, no presente estudo, tolerância ao substrato contaminado com petróleo independentemente da concentração. Lopes e Piedade (2009), entretanto, constataram para *E. polystachya*, em experimentos realizados em casa de vegetação, que doses mais altas de petróleo ($0,46 \text{ L.m}^{-2}$) no solo foram limitantes para o seu estabelecimento, uma vez que houve reduzido número de rebrotamento nessa concentração. Diante desse fato, concluem que *E. polystachya* se desenvolve em solos contaminados com baixas quantidades de petróleo ($0,12 \text{ L.m}^{-2}$).

Kulakow *et al.* (2000) citam que as espécies vegetais que apresentam maiores taxas de germinação e crescimento (produção de biomassa) em solos contaminados podem ser consideradas potencialmente úteis para uso na fitorremediação de áreas contaminadas. Já Rosa Smocking (2006) afirma, no entanto, que o parâmetro sobrevivência não avalia a capacidade de fitorremediação,

apenas a tolerância ao contaminante. Kyle (1998) e Rosa Smocking (2006) salientam que o vigor, de uma planta na presença de contaminantes, não está necessariamente relacionado à sua capacidade de degradação, embora esse fator seja condição necessária para o estabelecimento da planta no ambiente a ser recuperado.

4.1.1 Crescimento e desenvolvimento de *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. em substrato contaminado com petróleo

Os resultados obtidos em relação ao comprimento da parte aérea e do sistema de raízes, biomassa da parte aérea e raiz, porcentagem de água da planta, clorofila a e clorofila b e densidade estomática estão demonstrados na TABELA 1.

No que se refere ao comprimento da parte aérea, nos tratamentos T25, T50 e T75 foram constatadas menores médias quando comparadas ao Tcontrole e T100. As análises estatísticas, no entanto, revelaram que, quando comparados os comprimentos da parte aérea e comprimentos da raiz entre tratamentos não houve diferenças significativas [(H=8,528; gL=4; p=0,074) e (H=3,218; gL=4; p=0,522) respectivamente].

Esses resultados diferem daqueles apresentados por Lopes e Piedade (2009), em que o aumento da concentração de hidrocarbonetos de petróleo influenciou negativamente o desenvolvimento de *E. polystachya*, pois mesmo que os indivíduos tenham apresentado rebrota em solo contaminado sofreram diversos danos no que se refere ao crescimento.

Os tratamentos T25, T50 e T75 demonstraram menores médias quando comparadas ao Tcontrole e T100 em relação à biomassa da parte aérea e raiz. Essas médias, porém, não diferiram significativamente pelo teste Dunn [(H=6,976; gL=4; (H=6,155; gL=4; p=0,188) respectivamente]. Resultado esse, que difere do apresentado por Rivera-Cruz *et al.* (2004), uma vez que esses autores constataram uma redução de cerca de 50% na biomassa das plantas em solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. Lopes e Piedade (2009) demonstraram uma redução de biomassa de *E. polystachya* diretamente proporcional ao aumento na concentração de petróleo no solo contaminado.

Ramos *et al.*, (2009) cita que a espécie *Sebastiania commersoniana* nas maiores concentrações de petróleo em relação às plantas livres de contaminação, a

parte aérea apresentou menor concentração de água em sua composição. E as raízes tiveram o crescimento prejudicado nas maiores concentrações de petróleo.

Segundo Farias *et al.* (2007), o crescimento da parte aérea de *E. crista-galli* diferenciou-se em tratamentos com diferentes concentrações de petróleo, apresentando menor crescimento nos indivíduos em ambiente contaminado.

Estas diferenças podem ocorrer devido ao impedimento da distribuição homogênea da água provocada pelo petróleo (MERKL *et al.*, 2004). Podendo provocar alterações, fazendo com que a planta desenvolva um mecanismo de adaptação, aumentando o diâmetro da raiz e reduzindo seu crescimento (KECHAVARZI *et al.*, 2007).

TABELA 1 MÉDIAS ± DESVIOS-PADRÃO DOS PARÂMETROS QUANTITATIVOS ANALISADOS DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. EM SUBSTRATO CONTAMINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PETRÓLEO

Parâmetro (unidade)	T controle	T25	T50	T75	T100
Comprimento parte aérea (cm)	86,50 ± 8,19 ^a 100%	83,50 ± 19,24 ^a ↓3,46%	76,67 ± 15,92 ^a ↓11,36%	66,00 ± 10,58 ^a ↓23,69%	92,33 ± 15,07 ^a ↑6,73%
Comprimento raiz (cm)	35,00 ± 7,32 ^a 100%	35,17 ± 12,45 ^a ↑0,48%	35,33 ± 10,65 ^a ↑0,94%	41,67 ± 9,97 ^a ↑19,05%	34,00 ± 8,44 ^a ↓2,85%
Biomassa parte aérea (g)	5,53 ± 1,61 ^a 100%	4,75 ± 1,63 ^a ↓14,10%	4,25 ± 1,61 ^a ↓23,14%	3,52 ± 1,01 ^a ↓36,34%	5,49 ± 1,88 ^a ↓0,72%
Biomassa raiz (g)	1,23 ± 0,48 ^a 100%	0,94 ± 0,25 ^a ↓23,57%	0,91 ± 0,19 ^a ↓26,01%	0,98 ± 0,55 ^a ↓20,32%	1,27 ± 0,31 ^a ↑3,25%
Água parte aérea %	87,73 ± 2,92 ^a 100%	86,45 ± 1,93 ^a ↓1,45%	85,97 ± 2,76 ^a ↓2,00%	87,83 ± 2,20 ^a ↑0,11%	86,97 ± 2,15 ^a ↓0,86%
Água raiz %	83,97 ± 3,52 ^a 100%	86,21 ± 2,17 ^a ↑2,66%	86,50 ± 2,46 ^a ↑3,01%	88,89 ± 2,43 ^a ↑5,85%	86,54 ± 3,28 ^a ↑3,06%
Clorofila total (mmol.mg ⁻¹)	14157,71 ± 1768,573 ^a 100%	15207,96 ± 2022,006 ^a ↑7,41%	15107,9 ± 586,462 ^a ↑6,71%	15561,59 ± 677,8453 ^a ↑9,91%	16784,97 ± 1338,455 ^a ↑18,55%
Clorofila a (mmol.mg ⁻¹)	2046,61 ± 209,00 ^a 100%	2091,79 ± 230,79 ^a ↑2,20%	2067,25 ± 68,37 ^a ↑1,00%	2078,93 ± 65,47 ^a ↑1,57%	2223,16 ± 121,71 ^a ↑8,62%
Clorofila b (mmol.mg ⁻¹)	775,52 ± 146,20 ^a 100%	938,07 ± 174,50 ^{ab} ↑20,96%	942,52 ± 49,95 ^{ab} ↑21,53%	1020,45 ± 82,41 ^{ab} ↑31,58%	1119,59 ± 150,70 ^b ↑44,36%
Densidade estomática (uni./mm ²)	96,00 ± 18,05 ^a 100%	81,33 ± 15,94 ^a ↓15,28%	89,33 ± 14,41 ^a ↓6,94%	98,67 ± 11,48 ^a ↓2,78%	102,67 ± 12,69 ^a ↑6,94%

LETRAS DIFERENTES JUNTO AOS VALORES REPRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE DE DUNN A 5% DE SIGNIFICÂNCIA (P < 0,05). SIMBOLOS ↑ E ↓ INDICAM RESPECTIVAMENTE: AUMENTO E REDUÇÃO DO PARÂMETRO ANALISADO (EXPRESSOS EM PORCENTAGEM).
 FONTE: O Autor (2012)

Nos teores de água da parte aérea dos tratamentos T25, T50 e T100 foi observado redução quando comparados ao T75 e Tcontrole. Já em relação ao teor de água na raiz, os tratamentos T25, T50, T75 e T100 revelaram as maiores médias quando comparados ao Tcontrole. As médias dos teores de água, tanto da parte aérea quanto da raiz, entretanto, não demonstram diferenças significativas entre os tratamentos [(H=2,138; gL=4; p=0,71) e (H=8,017; gL=4; p=0,091)], respectivamente.

A clorofila total não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (H=7,471; gL=4; p=0,113).

As plantas cultivadas nos substratos contaminados com petróleo apresentaram maiores médias de clorofila a e clorofila b quando comparadas ao Tcontrole, mas quando comparadas as médias de clorofila a entre os tratamentos, constatou-se que não houve diferenças significativas (H=5,40; gL=4; p=0,248). Em relação às medias de clorofila b, o tratamento T100 diferiu significativamente do Tcontrole, sendo cerca de 44% superior (H=10,976; gL=4, p=0,015). Os dados obtidos, no presente estudo, em relação à clorofila, diferem de alguns autores que descrevem uma redução de pigmentos fotossintetizantes em espécies que crescem em solo contaminado com hidrocarbonetos (ACHUBA, 2006; MALLALAH *et al.*, 1998; GREEN *et al.*, 1996) e de outros que revelaram o aumento nos teores de clorofila como Mayer (2003; 2004) para *Campomanesia xanthocarpa* e Oliveira *et al.* (2008) para *Schinus terebinthifolius*.

No que se refere à densidade estomática, não foi constatado diferenças significativas entre os tratamentos (H=40,016; gL=5; p>0,05). Resultado diferente foi relatado por Maranhão *et al.* (2006), uma vez que os autores citam o aumento na densidade estomática em plantas de *Podocarpus lambertii* submetidas ao solo contaminado com petróleo. De acordo com Kozlowski e Pallardy (1997), a tolerância das plantas à poluição está correlacionada com a frequência dos estômatos. Balaganskaya e Kudrjajtseva (1998) revelam que o aumento no número de estômatos indica plantas sujeitas à poluição, o que pode ser considerado um bioindicador.

4.2 INFLUÊNCIA DO PETRÓLEO NA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS PLANTAS

A influência do petróleo foi avaliada sobre a organização estrutural das folhas e raízes das plantas cultivadas nos diferentes tratamentos.

As médias referentes às mensurações de espessura da epiderme¹ na face adaxial², do mesofilo³ e da epiderme na face abaxial⁴ são apresentadas na TABELA 2. A partir destes dados, foram testadas as hipóteses de que as médias são iguais independentemente do tratamento.

TABELA 2 - MÉDIAS \pm DESVIOS-PADRÃO DAS MENSURAÇÕES DAS ESTRUTURAS DA FOLHA (μm) DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. EM SUBSTRATO CONTAMINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PETRÓLEO

Tratamentos	Epiderme na face adaxial	Mesofilo	Epiderme na face abaxial
Tcontrole	32,37 \pm 7,61 ^a 100%	153,08 \pm 32,47 ^{ab} 100%	29,15 \pm 6,65 ^a 100%
T25	24,94 \pm 6,23 ^b \downarrow 22,95%	146,01 \pm 31,25 ^a \downarrow 4,61%	22,87 \pm 5,73 ^b \downarrow 21,54%
T50	25,22 \pm 4,79 ^b \downarrow 22,08%	161,60 \pm 37,32 ^b \uparrow 5,56%	23,98 \pm 4,58 ^b \downarrow 17,73%
T75	25,12 \pm 4,79 ^b \downarrow 22,39%	162,22 \pm 88,27 ^b \uparrow 5,97%	22,83 \pm 4,47 ^b \downarrow 21,68%
T100	26,23 \pm 5,67 ^b \downarrow 18,96%	154,82 \pm 44,64 ^{ab} \uparrow 1,13%	24,82 \pm 5,38 ^b \downarrow 14,85%

LETRAS DIFERENTES JUNTO AOS VALORES REPRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE DE DUNN A 5% DE SIGNIFICÂNCIA ($P < 0,05$). SÍMBOLOS \uparrow E \downarrow INDICAM RESPECTIVAMENTE: AUMENTO E REDUÇÃO DO PARÂMETRO ANALISADO (EXPRESSOS EM PORCENTAGEM).

FONTE: O Autor (2012)

As epidermes nas faces, tanto adaxial como abaxial, apresentaram médias significativamente diferentes quando comparados os tratamentos contaminados com petróleo ao Tcontrole ($H=82,179$; $gL=4$; $p<0,001$) e ($H=70,989$; $gL=4$; $p<0,001$), respectivamente.

¹ Epiderme: camada celular que reveste externamente as folhas, os caules e as raízes jovens. É de origem primária (RAVEN, 2007)

² Epiderme adaxial: células da face superior (KERBAUY, 2004)

³ Mesofilo: corresponde ao tecido fundamental (parênquima) de uma folha, localizado entre a epiderme das faces adaxial e abaxial (RAVEN, 2007)

⁴ Epiderme abaxial: células da face inferior (KERBAUY, 2004)

Foi constatado ainda, que a epiderme na face adaxial apresentou-se maior quando comparada à epiderme na face abaxial. Esse fato foi citado também por Nogueira (2008), que verificou as células epidérmicas na face adaxial maiores quando comparadas às células da face abaxial nas folhas de *Allophylus edulis*.

Foi constatado ainda, que a epiderme na face adaxial apresentou-se maior quando comparada à epiderme na face abaxial. Esse fato foi citado também por Nogueira (2008), que verificou as células epidérmicas na face adaxial maiores quando comparadas às células da face abaxial nas folhas de *Allophylus edulis*.

Alguns autores como Farias (2005) e Inckot (2007) não observaram alterações entre células epidérmicas das folhas de *Rhynchospora corymbosa* e *Mimosa pilulifera* em solo contaminado com petróleo.

O mesofilo apresentou uma redução de espessura no T25 quando comparado ao Tcontrole, e os tratamentos T50, T75 e T100 apresentaram aumento na espessura do mesofilo em relação ao Tcontrole. Houve diferenças estatísticas entre os tratamentos ($H=7,989$; $g_L=4$; $p<0,05$). T controle diferenciou-se de T50 e T75, porém não se diferenciou de T25 e T100. E T25 diferenciou-se T50 e T75 e não diferenciou-se dos demais.

Segundo Klich (2000) e Kürschner *et al.* (1998), o aumento da espessura dos tecidos do mesofilo reflete um mecanismo estrutural que potencializa a fotossíntese por unidade de área foliar e habilita a uma maior eficiência no uso da água.

Em relação à raiz, as médias referentes às mensurações de área total e área do cilindro central são apresentadas na TABELA 3.

TABELA 3 - MÉDIAS \pm DESVIOS-PADRÃO DAS MENSURAÇÕES DAS ESTRUTURAS DA RAIZ (μm^2) DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. EM SUBSTRATO CONTAMINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PETRÓLEO

Tratamentos	Área total	Área do cilindro central
Tcontrole	1.523,85 \pm 430,74 ^a 100%	491,48 \pm 152,04 ^a 100%
T25	1.792,98 \pm 550,92 ^a \uparrow 17,66%	510,68 \pm 148,42 ^{ac} \uparrow 3,90%
T50	2.234,89 \pm 360,92 ^b \uparrow 46,66%	686,46 \pm 211,28 ^b \uparrow 39,67%
T75	2.224,77 \pm 778,29 ^b \uparrow 45,99%	627,27 \pm 186,97 ^b \uparrow 27,62%
T100	2.410,82 \pm 641,70 ^b \uparrow 58,20%	602,84 \pm 146,97 ^{bc} \uparrow 22,65%

LETRAS DIFERENTES JUNTO AOS VALORES REPRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE DE DUNN A 5% DE SIGNIFICÂNCIA ($P < 0,05$). SÍMBOLOS \uparrow INDICA AUMENTO DO PARÂMETRO ANALISADO (EXPRESSOS EM PORCENTAGEM).

FONTE: O Autor (2012)

Os tratamentos contaminados com petróleo apresentaram aumento na área da raiz, tanto da área total como da área do cilindro central, quando comparados ao Tcontrole. Foram diferentes significativamente as médias de área do cilindro central entre Tcontrole e demais tratamentos contaminados com petróleo T50, T75 e T100 [T50 (H=29,791; gL=4; p<0,001); (H=29,791; gL=4; p=0,023) e (H=29,791; gL=4; p=0,046)]. Em relação ao T25 não houve diferença significativa. O T25 demonstrou diferença estatística significativa em relação a T50 e T75 [H=29,791; gL=4; p<0,001) e (H=29,791; gL=4; p=0,042)].

Área total da raiz demonstrou diferenças estatísticas significativas entre Tcontrole quando comparado aos tratamentos T50, T75 e T100 [(H=64,460; gL=4; p<0,001); (H=64,460; gL=4; p<0,001) e T100 (H=64,460; gL=4; p<0,001)]. O T25 apresentou diferenças significativas em relação a T50, T75 e T100 [(H=64,460; gL=4; p<0,001); (H=64,460; gL=4; p=0,007) e (H=64,460; gL=4; p<0,001)].

Diferenças na área do cilindro central entre tratamentos contaminados com petróleo também foram descritas por Moreira *et al.* (2011).

Em relação à área de aerênquima⁵, constatou-se um aumento proporcional ao aumento na concentração de petróleo, sendo, essa área, no T100 cerca de 75% maior quando comparado ao Tcontrole (TABELA 4).

TABELA 4 MÉDIAS \pm DESVIOS-PADRÃO DAS MENSURAÇÕES E PORCENTAGENS DE AERÊNQUIMA (μm^2) DE *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. EM SUBSTRATO CONTAMINADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PETRÓLEO

Tratamentos	Aerênquima	Porcentagem
Tcontrole	1.032,36 \pm 197,07	100%
T 25	1.282,29 \pm 284,61	↑24,20%
T50	1.548,44 \pm 105,81	↑49,99%
T75	1.597,50 \pm 418,13	↑54,74%
T100	1.807,99 \pm 349,83	↑75,13%

SÍMBOLO ↑ INDICA AUMENTO DO PARÂMETRO ANALISADO COMPARADO AO T. CONT
 FONTE: O Autor (2012)

O aumento de aerênquima também foi citado por Bregunze (2008) na espécie *Sagittaria montevidensis* em águas contaminadas. Sendo este aumento de

⁵ Aerênquima: parênquima repleto de espaços aéreos (CUTLER, 2011)

aerênquima relacionado ao armazenamento de gases devido à alta concentração de matéria orgânica.

O aumento de aerênquima também foi citado por Bregunze (2008) na espécie *Sagittaria montevidensis* em águas contaminadas. Sendo este aumento de aerênquima relacionado ao armazenamento de gases devido à alta concentração de matéria orgânica.

4.3 ANÁLISE DOS MICRO-ORGANISMOS NA RIZOSFERA

Em relação à rizosfera, testou-se apenas os tratamentos controle (Tcontrole) e os tratamento com as maiores concentrações de petróleo (T100) - sem planta (atenuação natural) e com planta. Observou-se crescimento de bactérias e fungos em todos os tratamentos (TABELA 5).

TABELA 5 - MÉDIAS \pm DESVIOS-PADRÃO DAS COLÔNIAS PRESENTES NOS MEIOS DE CULTURA DOS TRATAMENTOS CONTROLE E T100 CONTAMINADOS COM PETRÓLEO

Tratamento (meio de cultura)	Bactérias	Fungos
Tcontrole (Ágar Nutritivo)	693,75 \pm 642,52 ^a 100%	285,75 \pm 148,03 ^a 100%
T100 (Ágar Nutritivo)	845,00 \pm 706,62 ^a \uparrow 21,80%	286,75 \pm 234,62 ^a \uparrow 0,34%
T100 SP (Ágar Nutritivo)	1023,75 \pm 434,27 ^b \uparrow 47,56%	382,75 \pm 180,26 ^b \uparrow 33,94%
Tcontrole (Papa-Dextrosa Ágar)	7023,33 \pm 3494,53 ^a 100%	442,67 \pm 199,08 ^a 100%
T100 (Papa-Dextrosa Ágar)	2821,33 \pm 1937,36 ^a \downarrow 59,82%	905,67 \pm 392,04 ^b \uparrow 104,59%
T100 SP (Papa-Dextrosa Ágar)	7462,67 \pm 7098,67 ^a \uparrow 6,25%	697,67 \pm 316,98 ^a \uparrow 57,60%

LETRAS DIFERENTES JUNTO AOS VALORES REPRESENTAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS PELO TESTE DE DUNN A 5% DE SIGNIFICÂNCIA ($P < 0,05$). SÍMBOLOS \uparrow E \downarrow INDICAM RESPECTIVAMENTE: AUMENTO E REDUÇÃO DO PARÂMETRO ANALISADO (EXPRESSOS EM PORCENTAGEM).

FONTE: O Autor (2012)

4.3.1 Crescimento de bactérias

Foi observado no meio ágar nutritivo (AN) um aumento na porcentagem de colônias de bactérias nos tratamentos T100 – contaminado com petróleo e com planta e T100 SP – contaminado com petróleo e sem planta quando comparados ao

Tcontrole. Não houve diferenças estatísticas significativas entre Tcontrole e T100 com plantas, no entanto, houve diferenças significativas entre T100 sem planta e Tcontrole e T100 com planta ($H=54,138$; $gL=5$; $p<0,01$).

Nos tratamentos com meio PDA foi constatado aumento das colônias de bactérias no T100 sem planta e redução de colônias no T100 com planta quando comparados ao Tcontrole, entretanto, não ocorreram diferenças estatísticas significativas nesses tratamentos.

4.3.2 Crescimento de fungos

Nos tratamentos com ágar nutritivo ocorreu aumento nos fungos em T100 e T100 SP em relação ao Tcontrole. Diferiram significativamente T 100 e T100 SP ($H=40,021$; $gL=5$; $p<0,05$). Tcontrole não diferiu dos demais.

Houve um aumento nas colônias de fungos com meio PDA de T100 e T100 SP comparadas ao Tcontrole. O T100 apresentou diferenças estatísticas significativas em relação ao Tcontrole e T100 SP. Os demais não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Foi observado diversidades e variações de crescimento de bactérias e fungos nos tratamentos analisados. FERRERA-CERRATO et al., 2006 em seus estudos com plantas em solos contaminados com petróleo relatam a variação de crescimento observada entre os grupos de bactérias e fungos, e relaciona ao fato de haver uma diversidade fenotípica de bactérias não-degradadoras as quais são capazes de crescer em um meio com poluentes, sem, no entanto, degradá-lo.

Moreira *et al.* (2011) descreve que o principal mecanismo de fitorremediação de compostos orgânicos é a estimulação de microorganismos que vivem no ambiente adjacente às raízes, que fornece a degradação de contaminantes e diminui o risco de toxicidade para a planta.

4.4 DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

A identificação dos compostos de petróleo através dos respectivos picos detectados (FIGURA 8) foi realizada com base nos trabalhos de Farias *et al.* (2007)

e Ramos *et al.* (2009).

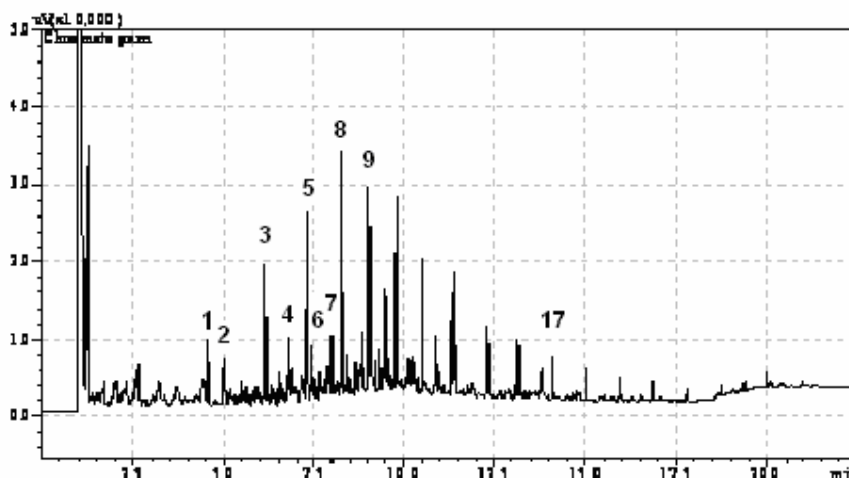


FIGURA 8 – PERFIL CROMATOGRÁFICO COM IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO.
FONTE: O Autor (2012)

A degradação dos compostos de petróleo analisados, a porcentagem de redução dos compostos comparados ao tratamento controle e comparações entre os tratamentos estão descritos na TABELA 6.

TABELA 6 MÉDIAS DAS ÁREAS \pm DESVIOS-PADRÃO OBTIDAS PARA OS HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO IDENTIFICADOS NOS T CONTROLE, T100 E T100 SP E DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS

Pico	Compostos de petróleo	T controle	T 100 (com planta)	T 100 SP (sem planta)	p c/ e s/ planta
1	Nonano	23226,00 \pm 6344,07 100%	5802,49 \pm 2830,17 \downarrow 75,01%	4369,32 \pm 947,89 \downarrow 81,18%	0,06
2	Decano	16967,80 \pm 5217,22 100%	7565,69 \pm 2672,60 \downarrow 55,41%	5446,28 \pm 1025,44 \downarrow 67,90%	0,00*
3	Dodecano	31661,13 \pm 8390,78 100%	12652,83 \pm 4266,04 \downarrow 60,03%	10185,94 \pm 2770,76 \downarrow 67,82%	0,05*
4	Tridecano	16871,13 \pm 4339,07 100%	8467,19 \pm 2334,25 \downarrow 49,81%	6665,95 \pm 1786,13 \downarrow 60,48%	0,02*
5	Tetradecano	36813,00 \pm 10061,50 100%	19150,47 \pm 5186,56 \downarrow 47,97%	17025,35 \pm 4405,39 \downarrow 53,75%	0,21
6	Pentadecano	13973,43 \pm 3503,69 100%	8838,02 \pm 2038,96 \downarrow 36,75%	8030,10 \pm 1631,34 \downarrow 42,53%	0,21
7	Hexadecano	20193,57 \pm 4702,80 100%	12105,59 \pm 2436,16 \downarrow 40,05%	11147,17 \pm 2305,90 \downarrow 44,79%	0,25
8	Heptadecano	51187,43 \pm 12661,58 100%	30299,33 \pm 6468,16 \downarrow 40,80%	28838,40 \pm 4861,46 \downarrow 43,66%	0,46
9	Nonadecano	57998,20 \pm 12028,35 100%	39794,58 \pm 7563,85 \downarrow 31,38%	38948,43 \pm 6658,92 \downarrow 32,84%	0,73
17	Heptacosano	13504,13 \pm 3721,01 100%	9061,79 \pm 3759,94 \downarrow 32,89%	7871,04 \pm 3437,13 \downarrow 41,71%	0,35

* ASTERISCOS JUNTO AOS VALORES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS AO NÍVEL DE 5% DE PROBABILIDADE ($P \leq 0,05$). SÍMBOLO \downarrow INDICA REDUÇÃO DO PARÂMETRO ANALISADO (EXPRESSOS EM PORCENTAGEM).

FONTE: O Autor (2012)

Todos os compostos foram reduzidos nos tratamentos testados quando comparados ao Tcontrole.

Os compostos decano, dodecano e tridecano diferiram estatisticamente ($p=0,00$; $p=0,05$; $p=0,02$ respectivamente) nos tratamentos T100 e T100SP.

Os demais compostos de petróleo não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si.

Em ambos os tratamentos, tanto no T100 (com planta), quanto no T100 SP (sem planta) houve redução dos compostos em relação ao tratamento Tcontrole.

Farias *et al.* (2007) cita redução de compostos petrolíferos onde as cadeias carbônicas de menor comprimento apresentaram maior degradação do poluente em *Erythrina crista-galli*, descrevendo aumento da degradação do petróleo no grupo SC-75 com planta em relação ao tratamento sem planta, SP-75. E nos demais tratamentos testados não houve diferenças na degradação do petróleo nos grupos com plantas em relação aos sem plantas.

Ramos *et al.* (2009) no estudo com *Sebastiania commersoniana* também descreve redução dos hidrocarbonetos de petróleo e relaciona a degradação dos hidrocarbonetos de cadeias menores com a maior facilidade de utilização pelos micro-organismos presentes na rizosfera do que em cadeias pesadas.

Resultados obtidos por Ferrera-Cerrato *et al.* (2006) em estudo com espécies de gramíneas relaciona a degradação com a presença de micro-organismos degradadores do petróleo, que podem ser estimulados pela presença de água proveniente da irrigação a qual acaba cedendo oxigênio aos micro-organismos e também pela própria presença do poluente.

5 CONCLUSÃO

Echinochloa polystachya demonstrou tolerância em solo contaminado com o petróleo, e o contaminante não influenciou negativamente o crescimento e desenvolvimento da planta.

Os substratos contaminados com petróleo interferiram no teor de clorofila, na espessura do mesofilo e área de aerênquima, o que pode demonstrar que *E. polystachya* desenvolveu estratégias morfofisiológicas que viabilizaram o seu desenvolvimento, a eficiência na utilização da água e o armazenamento de oxigênio para sobreviver às condições de estresse impostas pelo poluente.

Nos substratos contaminados com petróleo houve o desenvolvimento tanto bactérias quanto fungos, entretanto, faz-se necessário a realização de estudos que permitam o isolamento desses micro-organismos e avaliação do seu potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

Nas condições testadas no presente estudo, houve degradação dos hidrocarbonetos de petróleo em substratos contaminados com petróleo na presença ou ausência de plantas de *E. polystachya*. O que permite inferir que essa espécie não aumentou a degradação, mas que tem potencial para a recuperação de sítios contaminados com petróleo, visto que apresentou tolerância ao contaminante e sua presença nesses locais pode favorecer o crescimento e desenvolvimento de outras espécies por meio de interações ecológicas, propiciando a recuperação mais rápida do solo.

REFERÊNCIAS

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

ACHUBA, F. The effects of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. **The Environmentalist, Ontario**, v. 26, n.1, p.17-20, 2006.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Fundamentos da biologia moderna**. 2ed. São Paulo: Moderna, 1997.

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

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

ANDRADE, J. C.; TAVARES, S. R. **Fitorremediação – o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental**. São Paulo SP: Oficina de Textos, 2007.

ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M. A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL'AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. **Chemosphere**, v. 57, p. 401-412, 2004.

ANP - **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Glossário disponível em: <http://www.anp.gov.br/?id=582>. Acesso em 28 de novembro de 2010.

APRILL, W.; SIMS, R. C. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. **Chemosphere**. v. 20, p. 253-265. 1990.

ARTHUR, E. L.; *et al.* Degradation of an atrazine and metolachlor herbicide mixture in pesticide-contaminated soils from two agrochemical dealerships in Iowa. **Water, Air, Soil Poll.**, v. 119, p. 75–90, 2000.

BAKER, J.M. 1970. The effects of oils on plants. **Environmental Pollution 1**: 27-44.

BALAGANSKAYA, E.D. & KUDRJAVTSEVA, O.V. 1998. Change of the morphological structure of leaves of *Vaccinium vitisidaea* caused by heavy metal pollution. **Chemosphere 36**: 721-726.

BALOTA, E. I.; *et al.* Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, 22: 641-649, 1998.

BARBOSA, K. M. do N.; *et al.* Estudo temporal da vegetação herbácea da várzea da Amazônia central. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 38, n. 1, jan./mar. 2008.

BARNES, J. D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A. W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 32, p. 85-100, 1992.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: Iowa University. 326 p., 1976.

BLACK, G. A. **Os capins aquáticos da Amazônia**. Belém, PA: IAN (IAN.Boletim técnico, 9), p. 53-94, 1950.

BONA, C.; *et al.* Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) **Acta Botanica Brasilica 25(2)**: 277-285. 2011.

BREGUNCE, D. T. **Avaliação de sistema de leito cultivado com a macrófita *Sagittaria montevidensis* Cham. e Schltdl. para tratamentos de águas urbanas**

poluídas com águas residuárias, estudo de caso - Ribeirão dos Muller. Curitiba: Universidade Positivo, 203 p., 2008

BROWN, R.A. **In Situ Chemical Oxidation: Performance, Practice, and Pitfalls.** AFCEE Technology Transfer Workshop, San Antonio, Texas, 2003. Disponível em: <http://www.clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/InSituOxidation/download/techfocus/chemox/4brown.pdf>. Acesso em 06 mar. 2012.

BURMAN, A. G. Nature and composition of the grass flora of Brazil. **Willdenowia** **15**: 211-233, 1985.

CAMARÃO, A. P.; SOUZA FILHO, A. P. S.; MARQUES, J. R. F. **Gramíneas Forrageiras Nativas e Introduzidas de Terras Inundáveis da Amazônia.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 75 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 264).

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SCHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Adv. Agron.**, v. 56, p. 55-114, 1996.

CUNNINGHAM, S. D.; OW, D. W. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, v. 110, p. 715-719, 1996.

CUTLER, D. F.; BOTHA, T.; STEVENSON, D. W. **Anatomia Vegetal: uma abordagem aplicada.** 304p. Porto alegre: Artmed, 2011.

D'ANTONINO, L.; *et al.* Efeitos de culturas na persistência de herbicidas auxínicos no solo. **Planta daninha**, Viçosa, v. 27, n. 2, jun. 2009 .

DORN, P. H.; VIPON, T.; SALANITRO, J. & WISNIEWSKY, H. Assessment of the acute toxicity of crude oils using earthworms, microtox and plants. **Chemosphere** **37**: 845-860, 1998.

EMBRAPA - Embrapa Algodão Sistemas de Produção, 3 ISSN 1678-8710 Versão Eletrônica Jan/2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoIrrigado/solos.htm>. Acesso 10 de janeiro de 2012.

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2004. **Use of monitored natural attenuation at Superfund, RCRA corrective action, and Underground Storage Tank sites.** Office of Solid Waste and Emergency Response, Directive 9200. p. 4-17, Chapter IX Monitored Natural Attenuation, final version. 2004. Disponível em: <<http://www.epa.gov>>. Acesso em 04 fev. 2012.

FARIAS, L. H. M. **Efeitos do solo contaminado por petróleo nas folhas e raízes de *Rhynchospora corymbosa* (L.) Britt. (Cyperaceae).** Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná Curitiba, 2005.

FARIAS, V.; MARANHO, L. T.; VASCONCELOS, E. C.; LACERDA, L. G.; AZEVEDO, J. A. M.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Phytoremediation potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae, on petroleum contaminated soil. In: International Conference on New Horizons in Biotechnology & 4th BRSI Convention, 2007, Trivandrum. **Anais do International Conference on New Horizons in Biotechnology & 4th BRSI Convention.** Trivandrum: Sree Printers, 2007.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

FERRERA-CERRATO, R.; LÓPES-ORTIZ, C.; ALARCÓN, A.; DELGADILLO-MÁRTINEZ, J.; TREJO-AGUILAR, D.; MENDOZA-LÓPEZ, R.; CRUZ-SÁNCHEZ, S. Tolerancia y Fitorremediación de suelo contaminado con combustóleo por tres especies de gramíneas. In: VARALDO-POGGI, et al. 2006. **Environmental Biotechnology and Engineering.** Proceedings of the Second International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering (2IMEBE). México City. México.

FRANKLIN, G.L. A rapid method of softening wood for microtome sectioning. **Tropical Woods** 88: 35, 1946.

FREEDMAN, B. The ecological effects of pollution disturbance and stresses. **Environmental ecology.** 2nd ed. São Diego, Academic Press, 1995.

GILL, L. S.; NYAWUAME, H. G. K.; EHIKHAMETALOR, A. O. Effect of crude oil on the growth and anatomical features of *Chromolaena odorata* (L) K. e R. **Newsletter**, v. 6, n.1, p.1-6, 1992.

GREEN, T. B.; *et al.* Phytotoxicity observed in *Tradescantia* correlates with diesel fuel contamination in soil. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 36, p. 313-321, 1996.

GRISI, B.M. & GRAY, T.R.G. Comparação dos métodos de fumigação, taxa de respiração em resposta à adição de glicose e conteúdo de ATP para estimar a biomassa microbiana do solo. **R. Bras. Ci. Solo**, 10:109-115, 1986.

GUNTHER T.; DORNBERGER, U.; FRITSCHKE, W. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. **Chemosphere**. v. 33, p. 203-215. 1996.

HITCHCOCK, A. S. **Manual of the grasses of the West Indies**. Washington, DC: US Dep. Of Agriculture - Miscellaneous Publications. p. 243-493, 1936

HUESEMANN, H.M. Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils. **Journal Soil Contaminate 3**: 299-318, 1994.

INCKOT, R. C. **Germinação, desenvolvimento e morfoanatomia de *Mimosa pilulifera* Bentham (Leguminosae) em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado**. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007

INCKOT, R.C.; BONA, C.; SOUZA, A.L. & SANTOS, G.O. Anatomia das plântulas de *Mimosa pilulifera* (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. **Rodriguésia 59**: 513-524. 2008.

JENKINSON, D.S. & LADD, J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A. & LADD, J.N., eds., *Soil Biol. Biochem.*, 5:415-471, 1981.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book. 1940.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KHALIL, A. M.; QASSEM, W.; KAMAL, O. M. No significant increase in sister-chromatid exchanges in cultured blood lymphocytes from workers in a large oil refinery. **Mutat Res**, v. 312, p. 187-91, 1994.

KLICH, M.G. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. **Environmental and Experimental Botany 44**: 171-183. 2000.

KOZLOWSKI, T.T. & PALLARDY, S.G. **Physiology of woody plants**. San Diego, Academic Press. 1997.

KULAKOW, P.A.; SCHUAB, A.P.; BANKS, M.K. Screening plant species for growth on weathred sediments contaminated with petroleum hydrocarbons. **Int. J. Phytoremed.**, n.2, v.4, p. 297-317, 2000.

KÜRSCHNER, W.M.; STULEN, I.; WADNER, F. & KUIPER, P.J. Comparison of Paleobotanical Observations with Experimental Data on the Leaf Anatomy of Durmast Oak, *Quercus petraea* (Fagaceae) in Response to Environmental Change. **Annals of Botany 81**: 657-664. 1998

KYLE, W.A. **Heritability of the alfafa cultivar Riley for the enhanced bioremediation of crude oil contaminated soil**. Manhattan, Dissertação de mestrado, Dept. of Agron., Kansas State University, 1998.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stress: water, radiation, salt and other stresses**. New York, Academic Press. 1980.

LOPES, A.; PIEDADE, M. T. F. Estabelecimento de *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock (Poaceae) em solo de várzea contaminado com petróleo de Urucu. **Acta Amazônia.**, Manaus, v. 39, n. 3, Sept. 2009.

MALALLAH, G.; ALFZA, M.; KURIAN, M.; GULSHAN S.; DHAMI M. S. I. Impact of oil pollution on some desert. **Environmental Pollution**, Barking, v. 24, p. 919-924, 1998.

MARANHO, L. T.; *et al.* Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botânica Brasil.**, São Paulo, v. 20, n.3, set. 2006.

MARQUES, Marcia; AGUIAR, Christiane Rosas Chafim; SILVA, Jonatas José Luiz Soares da. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa , v. 35, n. 1, Feb. 2011 .

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT , R. & INFANTE, C. Phytoremediation in tropics- the effect of crude oil on the growth on tropical plants. **Biorremediation Journal 8**: 177-184. 2004.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT , R. & INFANTE. C. Phytoremediation in the tropics - influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. **Environmental Pollution 138**: 86-91. 2005.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R. & ARIAS, M. Effect of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Staf on microbial population an activity in petroleum-contaminated soil. *Microbiol. Res.*, 161:80-91, 2006.

MILANI, E. J.; *et al.* Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. **Rev. Bras. Geof.**, São Paulo, v. 18, n. 3, 2000.

MILANI JUNIOR, A.; BOMTEMPO, J. V.; PINTO JUNIOR, H. Q. A indústria do petróleo como uma organização complexa: modelagem de negócios e processo decisório. **Prod.**, São Paulo, v. 17, n. 1, abr. 2007.

MOREIRA, César Augusto; DOURADO, João Carlos; BRAGA, Antonio Celso de Oliveira. Aplicação da técnica de caminhamento elétrico em área contaminada por derivados de petróleo. **Rev. Bras. Geof.**, São Paulo, v. 24, n. 3, set. 2006.

MAYER, J. L. S.; BONA C.; SANTOS. G. O. Impacto do solo contaminado com petróleo no teor de clorofila e massa seca de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). In: **Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**. 2003, p. 288.

MAYER, J. L. **Impacto do solo contaminado com petróleo no crescimento e desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa*** O. Berg. (Myrtaceae). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

MOREIRA, B.; MARANHÃO L. T. **Fitorremediação: potencial de *Sesbania punicea* para a rizodegradação de petróleo em solo contaminado**. EPIC – Universidade Positivo, Curitiba PR: 2011

NOGUEIRA, L. Avaliação da germinação, desenvolvimento e estrutura morfoanatômica das plântulas de *Allophylus edulis* (Saint-Hilaire) Radlkofer (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado Curitiba, PR: 2008

OLIVEIRA, L. S.; *et al.* Crescimento de *Schinus terebinthifolius* raddi (anacardiaceae) em solo contaminado com petróleo **Acta Ambiental Catarinense** v. 5. n. 1/2, jan./dez./2008.

PEDROZO, M. F. M.; *et al.* **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo** Salvador : Centro de Recursos Ambientais - Cadernos de referência ambiental; v. 12., 246 p. 2002.

PETROBRAS – **Petróleo Brasileiro S.A.** Disponível em: <http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/fontes-de-energia/petroleo/>. Acesso em: 06 ago. 2010.

PIEPADE, M. T. F.; JUNK, W. J.; MELLO, J. A .N. A foodplain grassland of the central amazon. In: LONG, S. P.; JONES, M. B.; ROBERTS, M. J. **Primary**

productivity of grass ecosystem of the tropics and subtropics. London. p.127-158, 1992.

PIECADE, M. T. F.; SCHOENGART, J.; JUNK, W. J. O manejo sustentável das áreas alagáveis da Amazônia Central e as comunidades de herbáceas aquática. **Uakari**, v. 1, n. 1, p. 29-38, 2005.

PIECADE, M. T. F.; JUNK, W.; D'ÂNGELO, S. A.; WITTMANN, F.; SCHÖNGART, J.; BARBOSA, K. M. N.; LOPES, A. Aquatic herbaceous plants of the Amazon floodplains: state of the art and research needed. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 22, n. 2, p. 165-178, 2010.

PIRES, F.R.; *et al.* Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, ago. 2003 .

PIRES, F. R.; *et al.* Inferências sobre a atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 29, n. 4, p. 627-634, 2005.

PREUSSLER, K. H. **Avaliação da eficiência do tratamento de uma área alagável natural adotada no aterro sanitário de guaratuba, PR, Brasil para o pós-tratamento do chorume** Curitiba: Universidade Positivo, 137 p 2008.

PROCOPIO, S. O.; *et al.* **Fitorremediação de Solos com Resíduos de Herbicidas.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros - Documentos 156. 32 p., 2009.

QIU, X.; LELAND, T. W.; SHAH, S. I.; SORENSEN, D. L.; KENDALL, E. W. **Phytoremediation of soil and water contaminants.** Washington: American Chemical Society, p. 186-199, 1997.

RABUS R & HEIDER J. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. **Archives of Microbiology**, 170: 377-384, 1998.

RAMOS, D. T.; MARANHO, L. T.; GODOI, A. F. L.; CARVALHO FILHO, M. A. da S.; LACERDA, L. G.; VASCONCELOS, E. C. Petroleum Hydrocarbons Rhizodegradation by *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. SM. & amp; Downs. Water, Air, & Soil Pollution. Focus, p. 1-5, 2009.

RAVEN, P.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REILLEY, K. A.; BANKS, M. K.; SCHWAB, A. P. Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. **Journal Environmental Quality**. v. 25, p. 212-219. 1996.

RENVOIZE, S. A.; **Gramíneas de Bolívia**. Richmond, Surrey, England: The Royal Botanic Garden, Kew, 664 p., 1998.

RIVERA-CRUZ, M.C. & TRUJILLO-NARCÍA, A. Estudio de toxicidad vegetal em suelos com petróleos nuevo e intemperizado. **Interciencia** 29(7): 369-376, 2004.

ROSA SMOCKING, G. **Avaliação do potencial de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por petróleo**. Rio de Janeiro, RJ: 2006.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of parafin embedded plant material using toluidine blue. **Stain Technology** 48: 247-249, 1973.

SANGABRIEL, W.; FERRERA-CERRATO, R.; TREJO-AGUILAR, D.; MENDONZA-LÓPEZ, M. R.; CRUZ-SÁNCHEZ, J. S.; LÓPEZ-ORTIZ, C.; DELGADILLO-MARTÍNEZ, J.; ALARCÓN, A. Tolerancia y Capacidad de Fitorremediación de Combustóleo em el Suelo por Seis Especies Vegetales. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**. v. 22, n. 2, p. 63-73. 2006.

SANTOS, E. A.; *et al.* Fitoestimulação por *Stizolobium aterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfuron-sodium. **Planta daninha**, Viçosa, v. 25, n. 2, 2007.

SANTOS, L. C.; *et al.* Concentração de nitrogênio em folhas de dois cultivares de braquiária através de leitura com o clorofilômetro. Vol. VIII, n.9, Set/2007. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090720.pdf> Acesso em 10 mar 2012.

SANTOS, R. M.; *et al.* **Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas.** 4o PDPETRO, Campinas, SP 6.2.0321-1-121- 24 de Outubro de 2007.

SILVA, M. P.; MARANHO, L. T. Biomonitoramento da poluição por petróleo pela estrutura da folha de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. & Downs, Euphorbiaceae. In: **I Simpósio sobre Derramamento de Petróleo e Derivados em Ecossistemas de Água Doce**, Curitiba PR: 2006.

SOLIS-DOMINGUEZ, F.A.; GONZALEZ-CHAVEZ, M.C.; CARRILLO-GONZALEZ, R.; RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R. 2007. Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. **Journal of Hazardous Materials**, 141(3): 630-636.

SCHWAB, A. P.; SU, J.; WETZEL, S.; PEKAREK, S.; BANKS, K. M. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. **Environmental Science and Technology**. v. 33, p. 1940-1945, 1999.

TEJOS, R. M. Produccion del pasto paja de agua *Hymenachne amplexicaulis* (Rudge) Nees) durante el periodo inundado de una sabana. **Agronomia Tropical**, v. 28, n. 6, p. 599- 612, 1978.

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas. Biólogos utilizam plantas nativas para recuperação de solo degradado. **Jornal da Unicamp**, Campinas: 10 a 16 de maio de 2010 – ANO XXIV – Nº 461.

VARGAS, M.A.T; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos Cerrados.** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997.

WELKER, C. A. D. & LONGHI-WAGNER, H. M. A família Poaceae no Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 4, p. 53-92, out./dez. 2007

WHITE Jr., P. M.; WOLF, D. C.; THOMA, G. J.; REYNOLDS, C. M. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil contaminated soil. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 169, p. 207–220, 2006.

WILSON SC & JONES KC. Bioremediation of soils contaminated with Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. **Environmental Pollution**, 81: 229-249, 1993.

ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
 DEPARTAMENTO DE SOLOS E
 ENGENHARIA AGRÍCOLA

Solicitante: THALITA COLOMBO BIAZÃO
 Endereço:
 Cidade: CURITIBA Estado: PR Cep:
 Tel 8491-5080/3044-0089

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
UFPR
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAUDO DE ANÁLISE DE SOLO-ROTINA+FRAÇÃO ARGILA

Data: 21/11/2011

Nº LAB	Identificação da Amostra	pH		Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	SB	T	P	S	C	V	m	Ca/Mg	Argila
		CaCl ₂	SMP														
61090	01	5,80	6,40	0,00	3,70	12,70	6,30	1,50	20,60	24,30	408,00	-	45,7	85	0	2,0	400,0

Prof. Antonio C. V. Miotto
 Coord. Lab. de Fertilidade do Solo

Prof. Robson André Armindo - SIAD-202013
 Coord. Lab. de Física do Solo

Resultados restritos às amostras recebidas. Neste laudo não constam recomendações.

Rua dos Funcionários, 1540 - Curitiba, PR - CEP 80035-050 - Fone (041) 350 5673 - E-mail deptsol@ufpr.br

1 de 1