

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
Centro de Estudos do Mar

**EFEITOS DE UM DERRAME EXPERIMENTAL DE ÓLEO BUNKER NA  
SOBREVIVÊNCIA E TAXAS DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE  
*LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN. F.**

Emanoela Nardes

PONTAL DO PARANÁ  
2011

EMANOELA NARDES

**EFEITOS DE UM DERRAME EXPERIMENTAL DE ÓLEO BUNKER NA  
SOBREVIVÊNCIA E TAXAS DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE  
*LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN. F.**

Dissertação apresentada ao Centro de Estudos do Mar como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos pela Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Garcia de Camargo

PONTAL DO PARANÁ  
2011

N223e Nardes, Emanoela (1979-)  
Efeitos de um derrame experimental de óleo Bunker na sobrevivência e taxas de crescimento de plântulas de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn f. / Emanoela Nardes. – Pontal do Paraná, 2011.  
29 f.; 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Garcia de Camargo.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Mangue branco. 2. Hidrocarbonetos. 3. Impacto.  
4. *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn f. I. Título. II. Maurício Garcia de Camargo. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 583.42



Curso de Pós-Graduação em Sistemas  
Costeiros e Oceânicos da UFPR

Centro de Estudos do Mar - Setor Ciências da Terra - UFPR  
Avn. Beltrão, s/n.º - Bln. Ponta do Sul - Pontal do Paraná - Paraná - Brasil  
Tel. (41) 3511-8644 - Fax (41) 3511-8644 - www.cem.ufpr.br/pgsico - pgsico@ufpr.br

## TERMO DE APROVAÇÃO

**Emanoela Nardes**

**Efeitos de um derrame experimental de óleo bunker na sobrevivência e  
taxas de crescimento de plântulas de *Laguncularia racemosa* (L.)  
Gaertn. F.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos, da Universidade Federal do  
Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Dr. Márcio Garcia de Camargo  
Orientador e Presidente

Dr. César de Castro Martins  
Membro Examinador

Dr. Mário Luiz Gomes Soares  
Membro Examinador

Pontal do Paraná, 03/03/2011.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
Centro de Estudos do Mar

**EFEITOS DE UM DERRAME EXPERIMENTAL DE ÓLEO BUNKER NA  
SOBREVIVÊNCIA E TAXAS DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE  
*LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN. F.**

**Emanoela Nardes**

Dissertação apresentada ao Centro de Estudos do Mar como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos pela Universidade Federal do Paraná.

**Aprovada em: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_**

---

Prof. Dr. Maurício Garcia de Camargo  
Professor Doutor em Zoologia  
Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná (CEM/UFPR).

---

Prof. Dr. César de Castro Martins  
Professor Doutor em Oceanografia Química e Geológica  
Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná (CEM/UFPR).

---

Prof. Dr. Mário Luiz Gomes Soares  
Professor Doutor Oceanografia Biológica  
Faculdade de Oceanografia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (NEMA/UERJ).

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Maurício Garcia de Camargo pela orientação deste trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo da Cunha Lana pela assistência intelectual no início deste estudo e no processo inicial de criação da escala de qualidade.

Ao Centro de Estudos do Mar (UFPR), pelo espaço cedido para a instalação e manutenção do viveiro.

Ao Laboratório de Modelagem Ecológica (LAMEC) e ao REUNI pelo apoio financeiro.

À TRANSPETRO, pelo óleo bunker utilizado no experimento.

## RESUMO

Os efeitos do óleo bunker sobre a viabilidade e taxas de crescimento de plântulas *Laguncularia racemosa* foram testados por meio de derrame experimental agudo. Após a aplicação de seis tratamentos (0, 10, 20, 30, 40 e 50 mL) em 10 repetições, as 60 plântulas foram monitoradas por 20 semanas e os resultados analisados através de ANOVA por medidas repetidas e regressão linear. Uma escala de qualidade foi criada para combinar as principais variáveis e resumir e confirmar os efeitos do óleo nas plantas. Nas primeiras sete semanas foram observadas clorose (folhas amareladas), perda de folhas e consequente taxa de mortalidade significativamente superior para as plantas de todos os tratamentos em comparação com o grupo controle. Efeitos crônicos como prejuízos ao crescimento e produção de folhas foram proporcionais às concentrações de óleo dos tratamentos. As plântulas dos tratamentos controle e 10 mL foram significativamente superiores aos demais tratamentos em altura, número de folhas e nível de vitalidade. Os resultados indicam que as plântulas de *Laguncularia racemosa* sofrem efeitos letais e subletais com a exposição ao óleo bunker e que a presença de cotilédones saudáveis e de folhas novas podem ser fundamentais para a sua sobrevivência.

**Palavras-chave:** mangue-branco, impacto, hidrocarbonetos.

## ABSTRACT

The effects of bunker oil on survival and growth rate of *Laguncularia racemosa* seedlings were tested using a controlled experimental spill. An unique spill was applied to ten replicates of six treatments (0, 10, 20, 30, 40 e 50 mL) which were monitored for 20 weeks. The results were analyzed by repeated measure ANOVA and linear regression. In the first seven weeks, we observed chlorosis, loss of leafs and consequently death rate significantly superior to plants of all treatments compared to the control group. Persistent effects like reduction of stem growth and leaf production was proportional to the initial oil concentration. The plants from control and 10 mL treatments were significantly higher to all remaining treatments in height, leaf number and vitality level. Results indicate that *Laguncularia racemosa* seedlings suffer both lethal and sublethal effects from bunker oil exposure and that the presence of healthy cotyledons and new leaves may play a fundamental role to their survival.

**Keywords:** white mangrove, impact, hydrocarbons.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
<b>3 RESULTADOS</b> .....	14
3.1 MORTALIDADE.....	15
3.2 ALTURA.....	15
3.3 DIÂMETRO.....	17
3.4 PRODUÇÃO DE FOLHAS.....	17
3.5 COMPRIMENTO E LARGURA DAS FOLHAS.....	19
3.6 ASPECTO DAS FOLHAS.....	20
3.7 NÍVEL DE VITALIDADE.....	21
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	23
4.1 EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS.....	23
4.2 EFEITOS DO ÓLEO BUNKER.....	23
4.3 A IMPORTÂNCIA DAS FOLHAS.....	24
4.4 EFEITOS DOS TRATAMENTOS.....	24
4.5 NÍVEL DE VITALIDADE.....	26
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	26

**Effects of an experimental oil spill (bunker) on survival and growth rate of *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. F. seedlings.**

Efeitos de um derrame experimental de óleo bunker na sobrevivência e taxas de crescimento de plântulas de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn F.

**Revista Pretendida:** Pan-American Journal of Aquatic Sciences (*Pan Am J Aquat Sci*), ISSN (1809 – 9009). Qualis CAPES = Estrato B4

Emanoela Nardes, Maurício Garcia de Camargo\* & Paulo da Cunha Lana

Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, P.O.Box: 50.002, Zip Code: 83255-000,

Pontal do Paraná (PR) Brazil.

\*e-mail address: camargo.ufpr@gmail.com

**Keywords:** white mangrove, impact, hydrocarbons.

**Palavras-chave:** mangue-branco, impacto, hidrocarbonetos.

## 1. Introdução

Os efeitos do petróleo e seus derivados nos manguezais vêm sendo investigados há mais de 40 anos através de experimentos de campo e laboratório, além de observações diretas de derrames acidentais. A maioria destes estudos demonstra que o óleo prejudica ou mata as árvores de mangue. O que é menos óbvio é como estes danos ocorrem e os mecanismos de toxicidade envolvidos (NRC 2003).

Há o consenso entre os pesquisadores de que o óleo causa sufocamento físico e impactos fisiológicos e toxicológicos, mas o maior desafio para a ciência é descobrir qual a contribuição relativa destes mecanismos sobre os efeitos observados e a variação na resposta de acordo com diferentes tipos de derivados de petróleo, além dos efeitos das variáveis ambientais no tamanho do impacto causado por um derrame (NOAA 2002).

Em contato com o óleo, árvores adultas e juvenis podem sofrer intensa perda de folhas (conseqüência da clorose e murchamento destas) e conseqüente morte nas primeiras semanas, efeitos estes considerados letais ou agudos (Grant *et al.* 1993, Proffit *et al.* 1995). Após o primeiro mês são comuns os efeitos subletais ou crônicos como anomalias nos pneumatóforos, lenticelas e tronco, declínio na produção de folhas, prejuízos à reprodução, redução do tamanho das folhas, mutações e, no caso dos juvenis, prejuízos ao estabelecimento e irregularidades no crescimento (Proffit & Devlin 1998).

Os efeitos agudos e crônicos variam de acordo com o tipo de planta e de óleo envolvidos. *Laguncularia racemosa* conhecida popularmente como mangue-branco, é uma árvore de pequeno porte, pioneira, típica dos manguezais da costa leste da América (Bigarella, 2001) e bastante sensível em comparação com as demais plantas do mangue (Touchette *et al.* 1992), juvenis são mais sensíveis do que plantas já estabelecidas (Imbert 2000) e, devido à maior capacidade de penetração nos tecidos vivos, óleos leves são mais tóxicos que os óleos densos (Duke *et al.* 2000).

Cada tipo de óleo sofre diferentes efeitos dos processos de intemperização (Volkman *et al.* 1992), que modificam de forma única sua composição e definem o tipo de impacto que seus compostos causarão ao ambiente (Burns & Simmons 1994).

De acordo com a densidade e propriedades específicas, os diferentes tipos de óleo bruto e derivados foram classificados pela National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) (2003) em quatro categorias: super leves (combustíveis de avião e gasolina); leves (óleo diesel, óleo combustível No. 2 e brutos leves); médios (maioria dos óleos brutos) e densos (bunker C, óleo combustível No. 6 e brutos densos).

De acordo com a NOAA (2003), o óleo bunker, combustível de navios, é bastante denso, composto por hidrocarbonetos alifáticos (alcanos de cadeia longa e ciclo-alcanos) e policíclicos aromáticos (PAHs), com faixa de ebulição entre 250 e 350°C e ponto de fulgor mínimo de 60°C. Possui baixo teor de metais e enxofre e é uma combinação de óleos combustíveis leves e densos.

O óleo bunker é um combustível de navios que possui baixa solubilidade devido à sua grande densidade, propriedade que o torna menos tóxico. Seus efeitos agudos (letais e em curto prazo) são, portanto, causados principalmente pelo contato direto do óleo com as folhas, pneumatóforos e lenticelas das árvores, prejudicando seus mecanismos de sobrevivência no mangue (NRC 2003).

De acordo com a NOAA (2003), o óleo bunker, combustível de navios, é bastante denso, composto por hidrocarbonetos alifáticos (alcanos de cadeia longa e ciclo-alcanos) e policíclicos aromáticos (PAHs), com faixa de ebulição entre 250 e 350°C e ponto de fulgor mínimo de 60°C. Possui baixo teor de metais e enxofre e é uma combinação de óleos combustíveis leves e densos. Quando as folhas e pneumatóforos são recobertos por óleo denso, as plantas de mangue têm seus processos biológicos de troca com o ambiente reduzidos, especialmente a fotossíntese e a respiração (Pezeshki *et al.* 2000).

A grande densidade do óleo bunker lhe confere as propriedades de alta emulsificação, baixa evaporação e intemperização lenta, que fazem com que permaneça por longos períodos no sedimento e que seus componentes fiquem disponíveis para bioacumulação e biomagnificação (efeitos crônicos) (NOAA 2003, Nudi *et al.* 2007).

A presença de anéis de benzeno na composição do óleo bunker, principalmente hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Wang 1999), representa perigo adicional para o meio ambiente, pois estes apresentam maior estabilidade química e persistência, podem ter efeitos tóxicos e deletérios nos organismos, danificar tecidos e, em elevadas concentrações no sedimento, produzir mutações de deficiência de clorofila em plantas de mangue (NRC 2003).

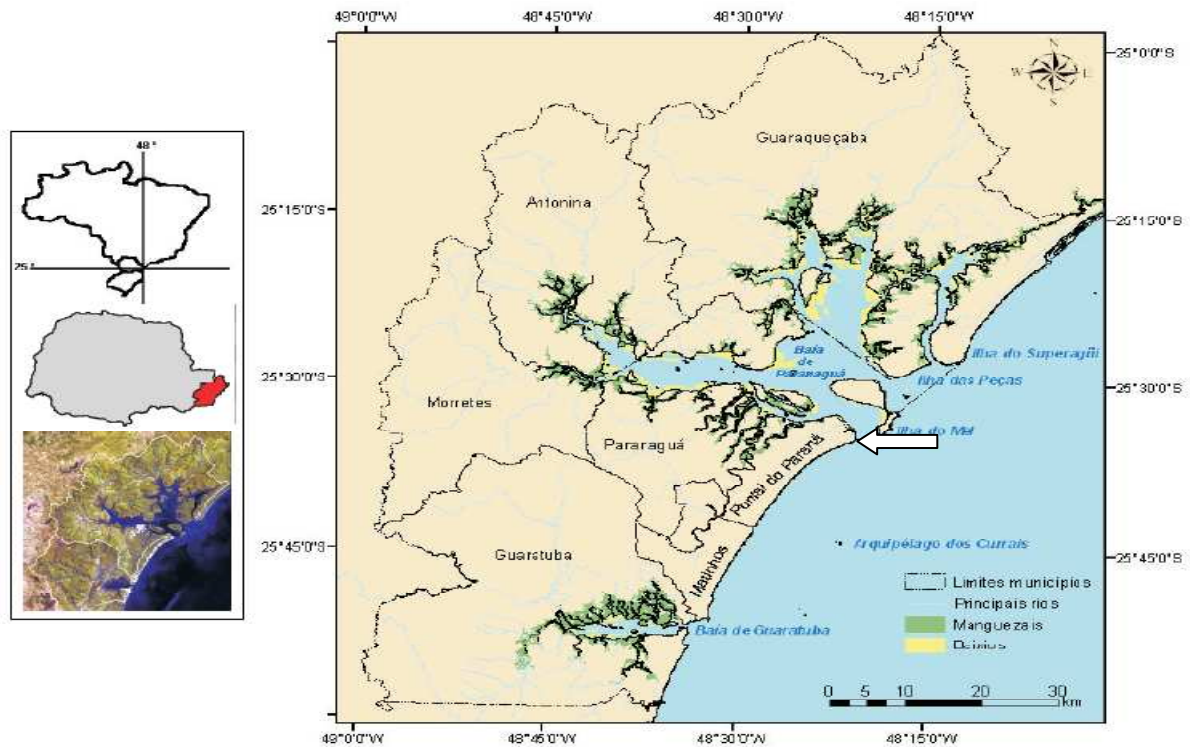
O objetivo deste trabalho é avaliar as taxas de mortalidade, crescimento, produção de folhas e vitalidade de plântulas de *Laguncularia racemosa* cultivadas em viveiro e submetidas a derrames experimentais agudos de óleo bunker.

Estudos desta natureza ajudam a preencher as lacunas existentes no conhecimento das respostas biológicas das plantas de mangue a derrames de óleo e podem auxiliar na proposição de técnicas mais eficazes de recuperação e remediação (Lewis 2005, Brito *et al.* 2009).

## **2. Material e métodos**

Os efeitos do óleo bunker MF-380 em plântulas de *Laguncularia racemosa* foram testados por meio de derrame experimental único (agudo) e monitorados por 20 semanas.

Foram coletadas diretamente do manguezal do rio Perequê em Pontal do Sul (PR) 120 plântulas de *Laguncularia racemosa* (Fig.1), todas com cerca de 20 dias de vida, cotilédones abertos e bem desenvolvidos. Cada uma foi plantada em um saco de muda com 800 g de sedimento natural homogeneizado. As mudas foram então estocadas em um viveiro coberto com proteção solar e acomodadas em bancadas protegidas contra insetos (Fig. 2).



**Fig. 1** Localização da área de estudo.

As plântulas receberam rega com água da gamboa adjacente ao manguezal de origem até completarem 70 dias, quando apresentaram pelo menos quatro folhas com cotilédones. Destas, as 60 melhores mudas foram selecionadas para a realização do experimento.



**Fig. 2** Viveiro, fases do desenvolvimento e proteção contra formigas (Fonte: o autor, 2009)

Cada uma das 60 plântulas foi designada aleatoriamente a cada um dos seis tratamentos deste estudo, perfazendo 10 réplicas. Os tratamentos consistiram no derrame de diferentes concentrações de óleo sobre as plântulas (0, 10, 20, 30, 40 e 50 mL).

O óleo bunker foi derramado em cada plântula apenas uma vez (derrame agudo), atingindo as folhas, caule e sedimento a uma distância de 5 cm das folhas superiores (Fig. 3)



**Fig. 3** Derrame experimental (Fonte: o autor, 2009)

Altura, diâmetro da haste, produção, comprimento e largura das folhas e nível de vitalidade foram as variáveis dependentes, medidas com auxílio de paquímetros, régua e trena e monitoradas por 20 semanas.

Cada variável dependente foi analisada usando uma ANOVA por medidas repetidas em um modelo linear misto com dois fatores, tratamentos (fixo, com seis níveis) e tempos (aleatório, com 20 níveis). Comparações *a posteriori* foram efetuadas entre os tratamentos através do teste de SNK (Underwood, 1997).

Uma escala de qualidade das plantas denominada “Nível de Vitalidade (NV)” foi construída através da combinação das principais variáveis consideradas neste estudo (altura, número total de folhas, número de folhas amareladas e murchas e estado geral da plântula). O índice consiste numa escala dos seis níveis de vitalidade possíveis através dos quais a planta pode passar após o contato com óleo. O nível de vitalidade representa uma tentativa quali-quantitativa de avaliar o estado geral das plantas durante o experimento e a sua construção é detalhada na tabela I.

O nível máximo de vitalidade é dado pelo número 6, quando a planta se apresenta perfeitamente saudável, seguido pelos níveis 5, 4 e 3, quando os efeitos do óleo se manifestam crescentemente por meio de clorose (folhas amareladas), perda das folhas, perda de vitalidade e prejuízos ao crescimento do indivíduo. No nível 2, a planta apresenta apenas uma folha ou está com a maioria delas comprometidas, evoluindo daí para a morte, representada pelo nível 1.

Tabela I

NÍVEL DE VITALIDADE	
<b>6</b>	 <p><u>Até 4 meses de vida (segundo mês de experimento):</u> presença de no mínimo quatro folhas, planta ereta, sem indícios de herbivoria (necrose) ou fungos, folhas livres, verdes, lisas e brilhantes, permitida a ausência de cotilédones após 100 dias de vida.</p> <p><u>Após 4 meses:</u> todas as informações acima + presença de mais de quatro folhas saudáveis.</p>
<b>5</b>	 <p><u>Até 4 meses:</u> presença de no mínimo quatro folhas e uma folha amarelada ou murcha ou com pontos de necrose ou atrofia leve do caule ou das folhas em desenvolvimento.</p> <p><u>Após 4 meses:</u> presença de apenas quatro folhas saudáveis.</p>
<b>4</b>	 <p><u>Até 4 meses:</u> presença de apenas três folhas ou duas folhas amareladas ou murchas ou um par de folhas grudadas ou clara atrofia do caule ou das folhas em desenvolvimento ou presença de grandes pontos de necrose em mais de uma folha.</p> <p><u>Após 4 meses:</u> presença de apenas três folhas saudáveis ou atrofia do caule.</p>
<b>3</b>	 <p><u>Até 4 meses:</u> presença de apenas duas folhas ou três folhas amareladas ou murchas ou dois pares de folhas grudadas ou indícios de comprometimento do caule por necrose ou atrofia acentuada do caule ou das folhas em desenvolvimento.</p> <p><u>Após 4 meses:</u> presença de apenas duas folhas saudáveis ou atrofia acentuada do caule.</p>
<b>2</b>	 <p>Presença de apenas uma folha ou todas as folhas murchas ou comprometimento do caule por necrose.</p>
<b>1</b>	 <p>Perda de todas as folhas, morte</p>

Nível de vitalidade (NV): O nível 6 representa vitalidade e o 1 a morte da plântula. Cada nível é dividido em duas partes para diferenciar os quatro meses iniciais das plântulas dos demais meses, onde os efeitos aparecem de maneiras distintas (FONTE: O autor 2009).

As tendências dos seis tratamentos experimentais ao longo das 20 semanas do estudo foram avaliadas estatisticamente para as variáveis dependentes que apresentaram relação linear (altura e diâmetro da plântula, número e comprimento das folhas), através do ajuste a um modelo linear regressivo e posterior inferência sobre os coeficientes angulares de regressão resultantes através do método descrito em Zar (1996). O teste consiste na comparação da inclinação de duas retas (b) partindo da hipótese nula de que as retas possuem a mesma inclinação.

Todas estas análises foram realizadas no ambiente R (R Development Core Team, 2011). Para as ANOVA e os testes SNK foi usado o pacote GAD (Sandrini-Neto & Camargo, 2010) e para as comparações entre inclinações de retas de regressão foi usada uma função baseada nas fórmulas fornecidas por Sokal & Rohlf (1995).

### 3. Resultados

Os resultados de ANOVA por medidas repetidas e do teste *a posteriori* SNK para as variáveis selecionadas são sumarizados na tabela 2.

**Tabela II**

<b>Altura</b>			<b>Largura das folhas</b>		
Tempos (T)	F = 45,7	p < 0,001	Tempos (T)	F = 4,24	p < 0,001
Tratamentos (Tr)	F = 3,78	p = 0,003	Tratamentos (Tr)	F = 13,28	p < 0,001
SNK: (0 = 10 = 20) > (30 = 40) > 50			SNK: 0 > (30 = 50 = 20 = 10) > 40		
<b>Diâmetro</b>			<b>Número de folhas</b>		
Tempos (T)	F = 33,30	p < 0,001	Tempos (T)	F = 22,8	p < 0,001
Tratamentos (Tr)	F = 2,96	p = 0,014	Tratamentos (Tr)	F = 7,59	p < 0,001
SNK: 0 > (30 = 50 = 20 = 10) > 40			SNK: 0 > (10 = 20 = 30 = 50 = 40)		
<b>Comprimento</b>			<b>Nível de Vitalidade (NV)</b>		
Tempos (T)	F = 17,71	p < 0,001	Tempos (T)	F = 2,19	p < 0,001
Tratamentos (Tr)	F = 3,42	p = 0,006	Tratamentos (Tr)	F = 40,08	p < 0,001
SNK: (30 = 0 = 20 = 50 = 10) > 40			SNK: 0 > 10 > (30 = 20 = 40) > 50		

ANOVA por medidas repetidas e teste *a posteriori* SNK entre os tratamentos experimentais para variáveis dependentes selecionadas. Tempos (T) é um fator aleatório com 20 níveis e Tratamentos (Tr) é um fator fixo com seis níveis. O teste SNK mostra os resultados dos seis tratamentos (0 mL a 50 mL) em ordem decrescente de média.

Como esperado, as plântulas do tratamento controle apresentaram valores significativamente superiores de sobrevivência e crescimento ao longo do experimento em relação aos demais

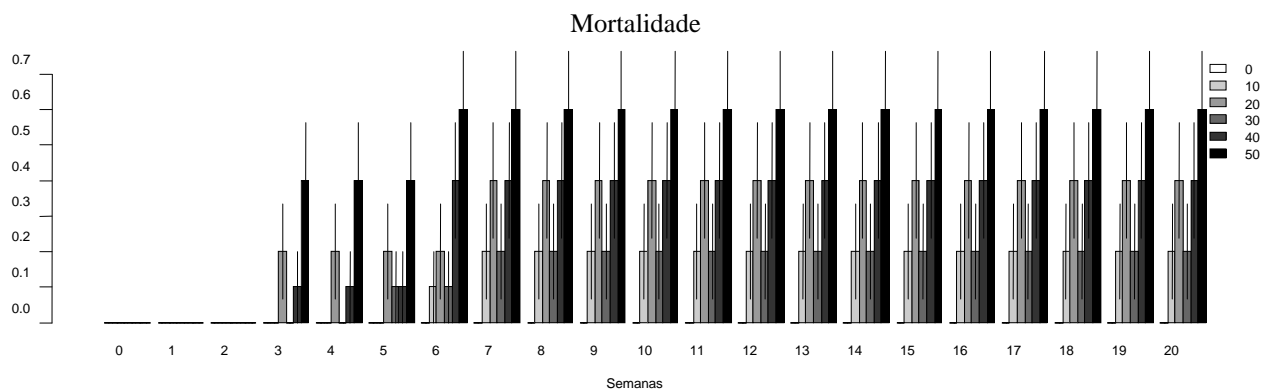
tratamentos para todas as variáveis (tabela 2) (Figs. 4 a 18). De um modo geral, as plântulas dos tratamentos de 10 mL e 20 mL apresentaram valores mais próximos do controle (0 mL) do que aquelas de tratamentos com maiores volumes (30 a 50 mL).

### 3.1 Mortalidade

Nas primeiras sete semanas foi observada taxa de mortalidade de 60% nas plântulas tratadas com 50 mL de óleo, enquanto as plântulas dos tratamentos 40, 30, 20 e 10 mL tiveram taxa de mortalidade de 40, 20, 40 e 20%, respectivamente e o controle não apresentou mortes (Fig. 4).

Embora as taxas de mortalidade das plântulas dos tratamentos de maior concentração (50 mL) em alguns casos se igualem com as dos tratamentos de menor concentração (40 e 20 mL, por exemplo), a observação das demais variáveis demonstra que as plântulas sobreviventes que receberam concentrações superiores de óleo tiveram mais prejuízos do que as demais, o que será visto posteriormente.

As taxas de mortalidade observadas nas primeiras sete semanas se mantiveram iguais até o final do experimento, com sobrevivência significativamente superior para as plântulas do controle do que para as dos outros tratamentos (Fig. 4).



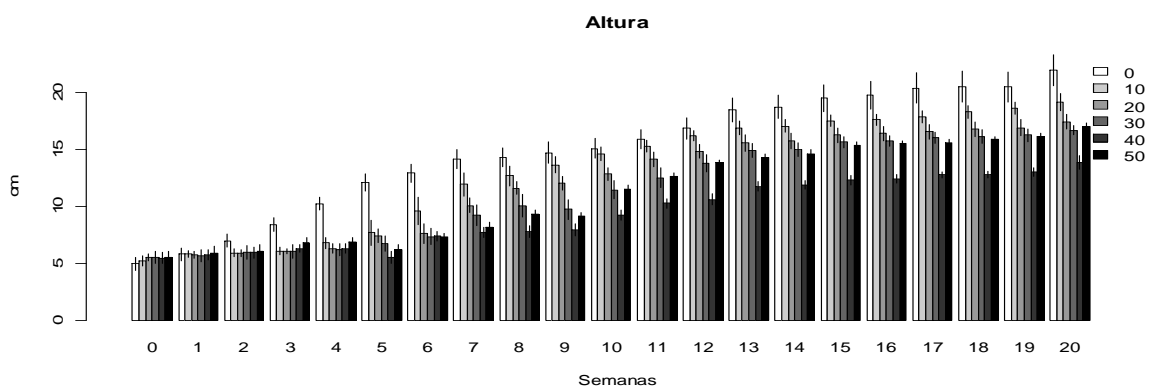
**Fig. 4** Taxas de mortalidade (em %) de plântulas de *L. racemosa* em função dos seis tratamentos experimentais (de 0 até 50 mL de óleo bunker derramado) e do tempo em semanas. A legenda mostra a concentração de óleo dos tratamentos em uma escala crescente de cinza, desde o controle (0 mL) em branco até a maior concentração (50 mL) em preto.

### 3.2 Altura

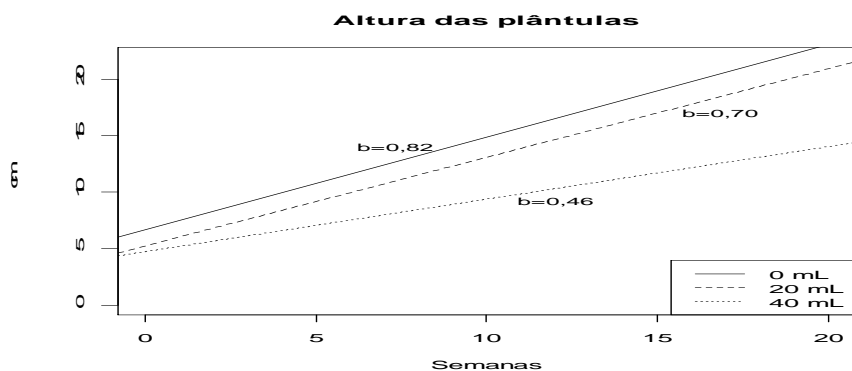
As plântulas do tratamento controle apresentaram altura significativamente superior às dos demais tratamentos a partir da segunda semana e as do tratamento 10 mL tiveram altura significativamente superior às dos tratamentos de maior concentração a partir da semana seis, com exceção da semana 8 (Fig. 5 e 6). Da oitava semana até a 11<sup>a</sup>, as plântulas do tratamento 20 mL tiveram altura significativamente superior às dos tratamentos de maior concentração.



**Fig. 5** Diferenças de altura entre as plântulas do controle e demais tratamentos até a semana sete (Fonte: o autor, 2010)



**Fig. 6** Altura (em cm) de plântulas de *L. racemosa* em função dos seis tratamentos experimentais (de 0 até 50 mL de óleo bunker derramado) e do tempo em semanas. A legenda mostra a concentração de óleo dos tratamentos em uma escala crescente de cinza, desde o controle (0 mL) em branco até a maior concentração (50 mL) em preto.

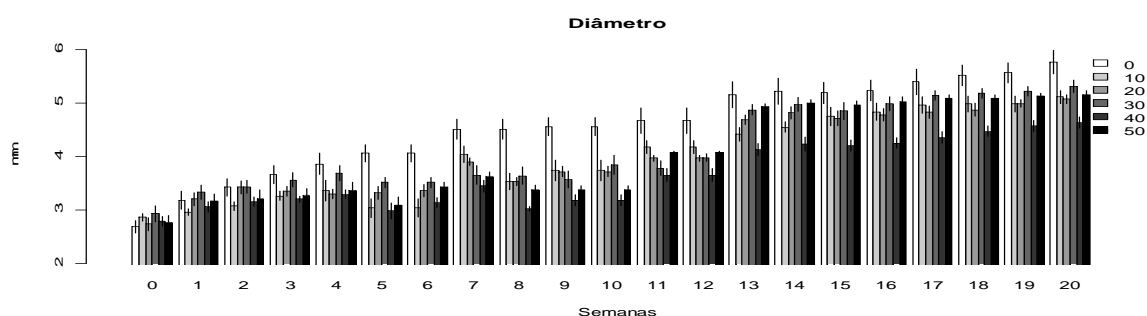


**Fig. 7** Ajustes lineares das alturas das plântulas (em cm) de *L. racemosa* em três dos tratamentos experimentais. O gráfico mostra ambos os eixos escalonados em zero para melhor demonstrar a diferença de inclinação da reta ( $b$ ) entre os tratamentos de 0 mL (controle), 20 mL e 40 mL. Apesar da grande discrepância entre os valores, houve diferença apenas marginalmente significativa ( $p = 0,1$ ) entre as inclinações do tratamento 0 mL ( $b=0,82$ ) e 40 mL ( $b=0,46$ ).

Os ajustes lineares das alturas em três tratamentos (0 mL, 20 mL e 40 mL) da figura 7 demonstra que o controle apresentou uma inclinação de reta mais pronunciada do que no tratamento de 40 mL (marginalmente significante).

### 3.3 Diâmetro

As plântulas do tratamento controle apresentaram valores de diâmetro significativamente superiores às dos demais tratamentos da semana 3 à 12 e da semana 17 até o final do experimento (semana 20) (Fig. 8).



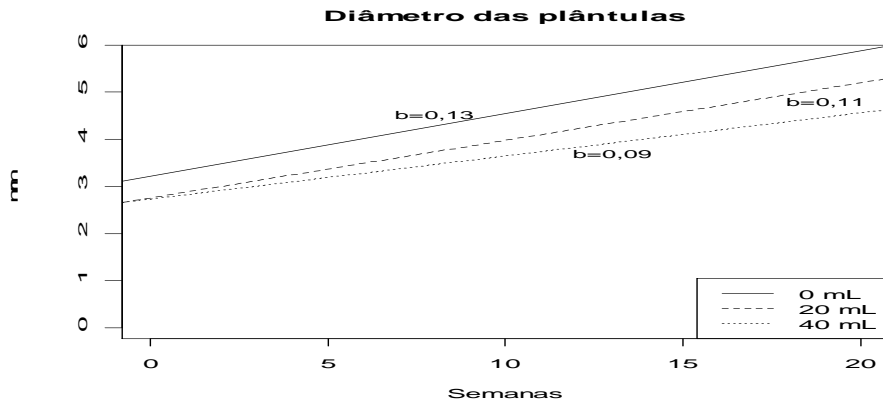
**Fig. 8** Diâmetro (em mm) de plântulas de *L. racemosa* em função dos seis tratamentos experimentais (de 0 até 50 mL de óleo bunker derramado) e do tempo em semanas. A legenda mostra a concentração de óleo dos tratamentos em uma escala crescente de cinza, desde o controle (0 mL) em branco até a maior concentração (50 mL) em preto.

As plântulas dos tratamentos 10 e 20 mL tiveram diâmetro significativamente superior às dos tratamentos de maior concentração na semana sete e nas semanas nove e 10. Da semana 11 até a 17 as plântulas do tratamento 50 mL tiveram pico de crescimento em diâmetro, porém esse crescimento não foi mantido e apresentou queda nas semanas seguintes.

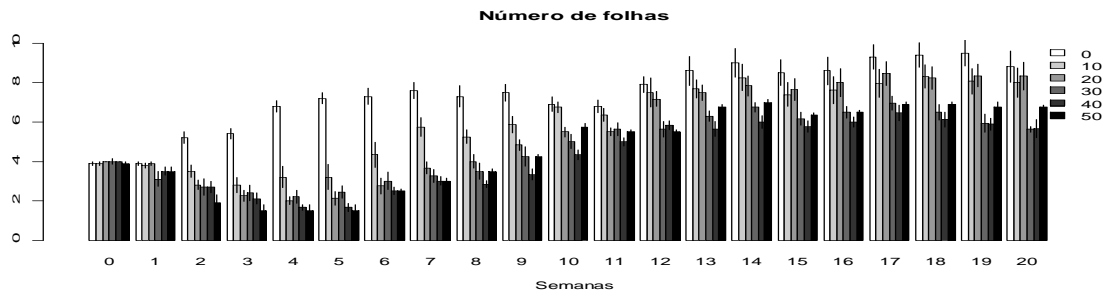
A figura 9 apresenta os ajustes lineares dos três tratamentos escolhidos. Apesar de existir uma queda do valor do coeficiente angular (b) desde o controle (0 mL) até a concentração mais alta (40 mL), estas diferenças não são significativas.

### 3.4 Produção de folhas

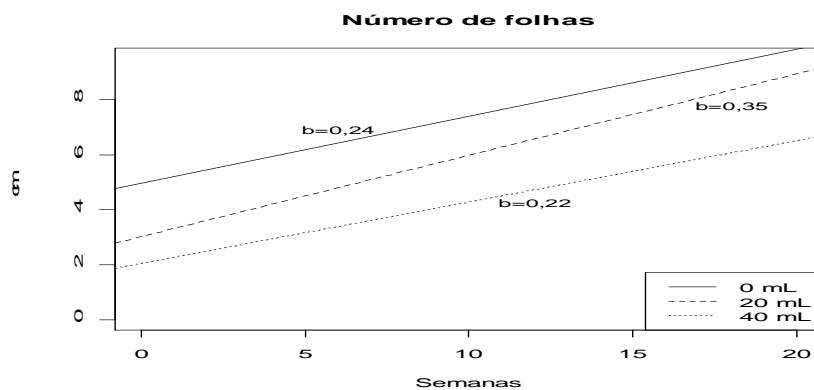
O número de folhas foi significativamente superior nas plântulas dos tratamentos controle e 10 mL em comparação com as dos tratamentos 40 e 50 mL a partir da segunda semana (Fig.10). Nas plântulas do tratamento 20 mL o número de folhas foi superior às dos tratamentos de maior concentração da semana sete até a nove e da semana 12 até 20. Após as primeiras oito semanas, o controle apresentou perda de folhas semelhante ao padrão natural (comparável àqueles das demais plântulas em crescimento no viveiro). A partir da semana 9 a perda de folhas de todos os vegetais sobreviventes ocorreu em número reduzido e relativamente constante.



**Fig. 9** Ajustes lineares dos diâmetros das plântulas (em mm) de *L. racemosa* em três dos tratamentos experimentais. O gráfico mostra ambos os eixos escalonados em zero para melhor demonstrar a diferença de inclinação da reta ( $b$ ) entre os tratamentos de 0 mL (controle), 20 mL e 40 mL. Não houve diferenças significativas entre as inclinações da reta ( $p > 0,1$ ).



**Fig. 10** Número de folhas em plântulas de *L. racemosa* em função dos seis tratamentos experimentais (de 0 até 50 mL de óleo bunker derramado) e do tempo em semanas. A legenda mostra a concentração de óleo dos tratamentos em uma escala crescente de cinza, desde o controle (0 mL) em branco até a maior concentração (50 mL) em preto.

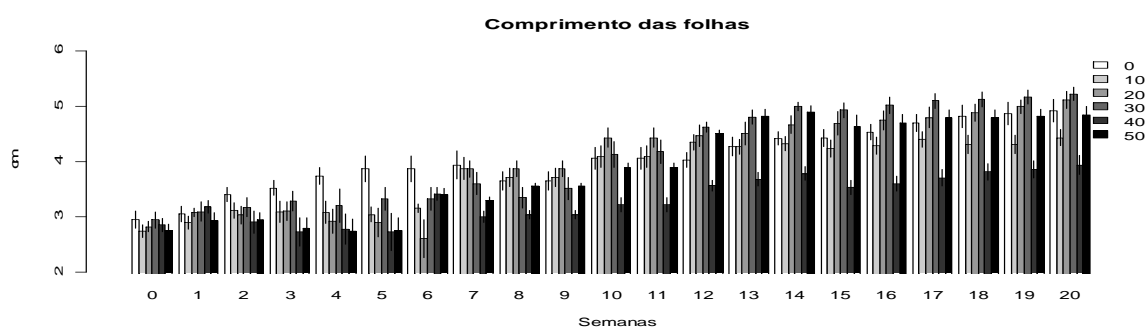


**Fig. 11** Ajustes lineares do número de folhas (em cm) de plântulas de *L. racemosa* em três dos tratamentos experimentais. O gráfico mostra ambos os eixos escalonados em zero para melhor demonstrar a diferença de inclinação da reta ( $b$ ) entre os tratamentos de 0 mL (controle), 20 mL e 40 mL. Não houve diferenças significativas entre as inclinações da reta ( $p > 0,1$ ).

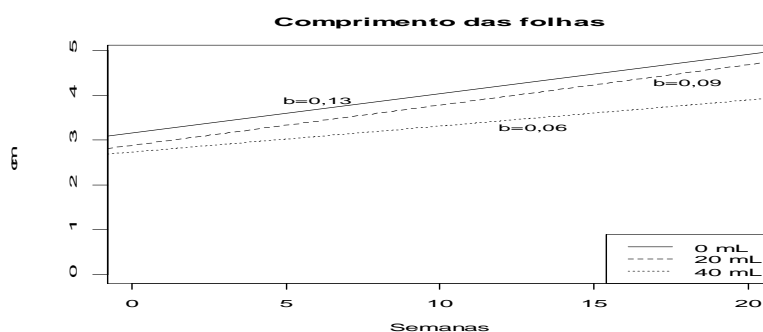
Os ajustes lineares dos tratamentos escolhidos mostraram (Fig. 11), mais uma vez, maiores inclinações no controle e no tratamento de menor concentração (20 mL) em relação aos demais, porém as diferenças não foram significativas estatisticamente.

### 3.5 Comprimento e largura das folhas

O comprimento das folhas foi significativamente superior nas plântulas do tratamento controle em comparação com o dos tratamentos 40 e 50 mL da semana 2 até a 7 (Fig. 12). Os ajustes lineares dos tratamentos selecionados mostraram baixas declividades (Fig. 13).



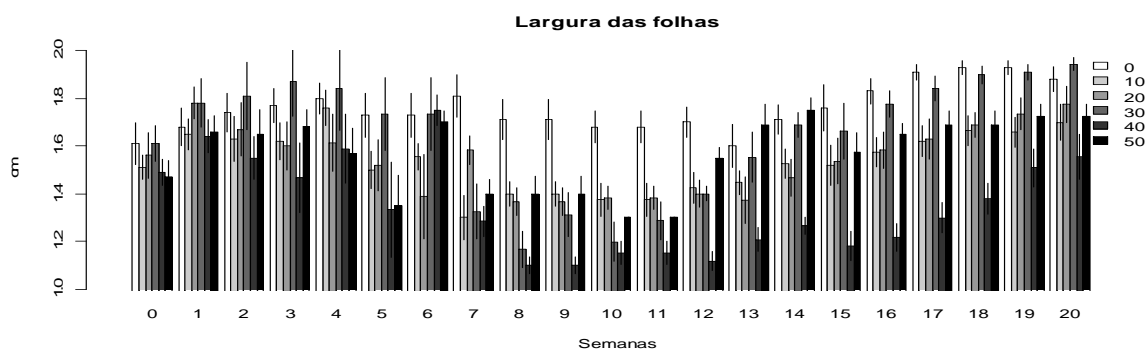
**Fig. 12** Comprimento das folhas (em cm) de plântulas de *L. racemosa* em função dos seis tratamentos experimentais (de 0 até 50 mL de óleo bunker derramado) e do tempo em semanas. A legenda mostra a concentração de óleo dos tratamentos em uma escala crescente de cinza, desde o controle (0 mL) em branco até a maior concentração (50 mL) em preto.



**Fig. 13** Ajustes lineares do comprimento das folhas (em cm) de plântulas de *L. racemosa* em três dos tratamentos experimentais. O gráfico mostra ambos os eixos escalonados em zero para melhor demonstrar a diferença de inclinação da reta ( $b$ ) entre os tratamentos de 0 mL (controle), 20 mL e 40 mL. Não houve diferenças significativas entre as inclinações da reta ( $p > 0,1$ ).

As plântulas do controle apresentaram largura das folhas significativamente superior às dos tratamentos 40 e 50 mL nas semanas 4 e 5, da semana 7 a 12 e da semana 15 em diante (Fig. 14).

As plântulas do tratamento 50 mL superaram as do controle em largura nas semanas 13 e 14, mas não mantiveram este crescimento e as dos tratamentos de maior concentração foram superiores ao controle em comprimento a partir da semana 10. As plântulas dos tratamentos de maior concentração apresentaram folhas mais finas e compridas que as dos tratamentos de menor concentração.

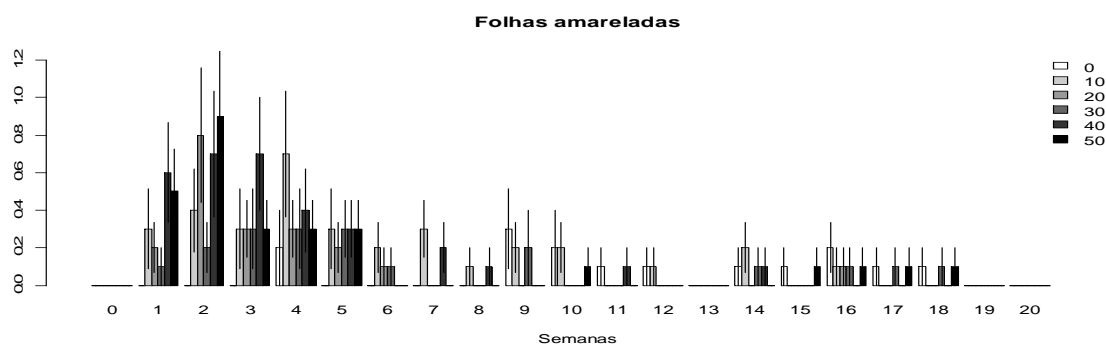


**Fig. 14** Largura das folhas (em cm) de plântulas de *L. racemosa* em função dos seis tratamentos experimentais (de 0 até 50 mL de óleo bunker derramado) e do tempo em semanas. A legenda mostra a concentração de óleo dos tratamentos em uma escala crescente de cinza, desde o controle (0 mL) em branco até a maior concentração (50 mL) em preto.

### 3.6 Aspectos das folhas

Nas primeiras três semanas, ocorreu um número maior de folhas amareladas.

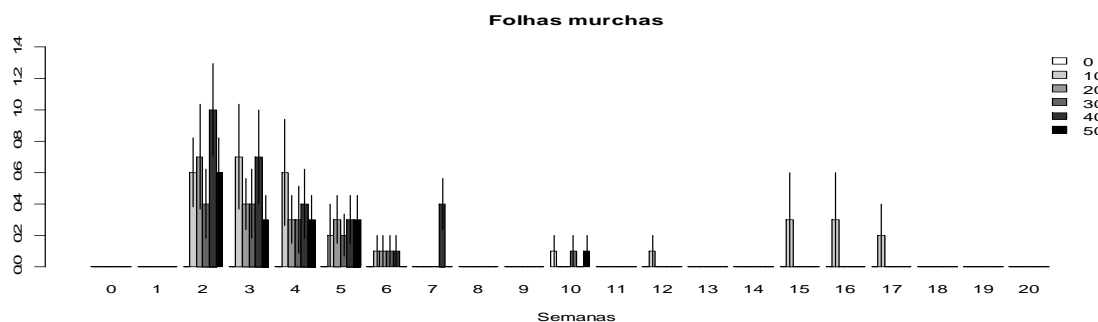
No final da primeira semana, 13 plântulas apresentavam pelo menos uma folha amarelada (Fig. 15), principalmente nos tratamentos 40 e 50 mL, número que dobrou na segunda semana.



**Fig. 15** Número de folhas amareladas em plântulas de *L. racemosa* em função dos seis tratamentos experimentais (de 0 até 50 mL de óleo bunker derramado) e do tempo em semanas. A legenda mostra a concentração de óleo dos tratamentos em uma escala crescente de cinza, desde o controle (0 mL) em branco até a maior concentração (50 mL) em preto.

O número de folhas amareladas e murchas (Figs. 15 e 16) foi significativamente maior nas plântulas de todos os tratamentos nas primeiras oito semanas (exceto na semana 4 para folhas amareladas) do que no controle.

Todas as folhas grudadas pelo óleo, ou com coloração mais escura que o normal ou amarelada, murcharam e caíram das plantas ou, devido ao ressecamento dos pecíolos, caíram antes de murchar (Fig.17).



**Fig. 16** Número de folhas murchas em plântulas de *L. racemosa* em função dos seis tratamentos experimentais (de 0 até 50 mL de óleo bunker derramado) e do tempo em semanas. A legenda mostra a concentração de óleo dos tratamentos em uma escala crescente de cinza, desde o controle (0 mL) em branco até a maior concentração (50 mL) em preto.

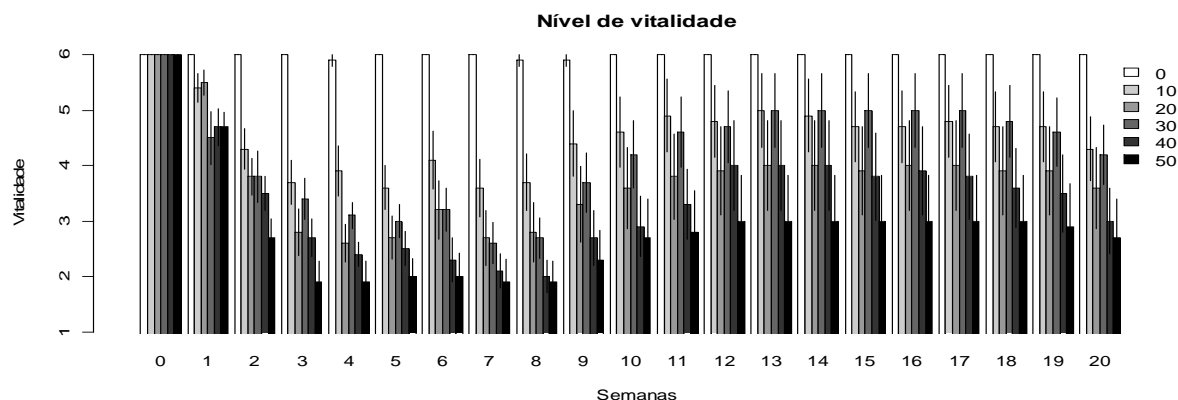


**Fig. 17** Evolução dos efeitos do óleo em plântula: primeira, segunda, quarta e quinta semana respectivamente (Fonte: o autor, 2009).

### 3.7. Nível de vitalidade

O nível de vitalidade das plântulas do controle se manteve significativamente superior ao de todos os outros tratamentos durante todo o experimento, com maior altura e aspecto do caule e folhas muito mais saudáveis que os demais tratamentos (Fig. 18). As plântulas do tratamento 10 mL apresentaram nível de vitalidade significativamente superior às do tratamento 50 mL durante todo o

experimento e também significativamente superior às plântulas do tratamento 40 mL da primeira semana até a 11 e na semana 20.



**Fig. 18** Nível de Vitalidade (NV) de plântulas de *L. racemosa* em função dos seis tratamentos experimentais (de 0 até 50 mL de óleo bunker derramado) e do tempo em semanas. A legenda mostra a concentração de óleo dos tratamentos em uma escala crescente de cinza, desde o controle (0 mL) em branco até a maior concentração (50 mL) em preto.

**Tabela III**

<b>Altura da plântula</b>			<b>Diâmetro da plântula</b>		
mL de óleo bunker	b	r <sup>2</sup>	mL de óleo bunker	b	r <sup>2</sup>
0	0,82	0,96	0	0,13	0,94
10	0,78	0,94	10	0,12	0,94
20	0,70	0,94	20	0,11	0,92
30	0,67	0,95	30	0,12	0,88
40	0,46	0,96	40	0,09	0,87
50	0,65	0,95	50	0,13	0,88
<b>Comprimento das folhas</b>			<b>Número de folhas</b>		
mL de óleo bunker	b	r <sup>2</sup>	mL de óleo bunker	b	r <sup>2</sup>
0	0,09	0,92	0	0,24	0,83
10	0,09	0,87	10	0,29	0,87
20	0,13	0,88	20	0,35	0,84
30	0,13	0,93	30	0,23	0,75
40	0,06	0,79	40	0,22	0,70 <sup>ns</sup>
50	0,13	0,90	50	0,19	0,76

Coefficiente angular de regressão (b) e coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>) para cada um dos seis tratamentos experimentais (0 mL a 50 mL de óleo) para aquelas variáveis que apresentaram relações lineares. ns: não-significativa.

A observação dos tratamentos de maior concentração (40 e 50 mL) nos gráficos relacionados com as folhas e no gráfico de nível de vitalidade confirma a eficiência do nível de vitalidade em ilustrar as condições de vida das plântulas.

Da semana três até a oito, quando houve maior prejuízo às folhas, o nível de vitalidade das plântulas dos tratamentos de maior concentração registrou valores baixos, ainda mais distantes dos valores do tratamento controle. Nos meses seguintes, com a recuperação destas plântulas, o nível de vitalidade voltou a subir.

## **4. Discussão**

### *4.1 Efeitos letais e subletais*

Neste estudo, a divisão dos efeitos do derrame de óleo em plântulas do mangue em duas fases, como descritas por Lewis (1983), ficou bastante visível nos gráficos. Efeitos como o aparecimento de folhas amareladas, perda de folhas e conseqüente morte das plântulas, registrados também pela NOAA (2002), Grant *et al.* (1993) e Proffit *et al.* (1995), respectivamente, ocorreram principalmente nas primeiras semanas e por isso são considerados efeitos agudos.

Os prejuízos ao crescimento e produção de folhas, descritos também por Proffit & Devlin (1998), ocorreram mais intensamente após o primeiro mês e por isso são definidos como efeitos crônicos.

Segundo Lewis (1983) os efeitos agudos ou letais se manifestam nos primeiros 30 dias após o derrame, fase em que ocorre a maior parte das mortes. Os efeitos crônicos ou subletais ocorrem na segunda fase, nos meses e anos após o derrame, quando os prejuízos ao crescimento, reprodução são observados.

### *4.2 Efeitos do óleo bunker*

O óleo bunker, como a maioria dos óleos densos, recobriu o sedimento, caule, folhas, pneumatóforos e em algumas plântulas faz com que estas grudassem umas nas outras, dificultando de várias maneiras as trocas gasosas e a fotossíntese (Pezeshki *et. al.*, 2000).

Apesar da reduzida capacidade de penetrar (e intoxicar) se comparada com óleos leves (NOAA, 2003), a presença do óleo bunker causou grande mortalidade nas plântulas dos tratamentos de maior concentração, resultado comparável ao estudo de Duke *et. al.*,(2000).

Os efeitos agudos foram causados provavelmente não apenas pela toxicidade imediata e pela presença dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que danificam tecidos das plântulas, mas também pelo estresse e impossibilidade de realizar a fotossíntese e trocas gasosas satisfatórias com o ambiente (NRC, 2003).

Quando a morte não é imediata (na primeira semana), os efeitos do óleo se traduzem na redução na qualidade das folhas, em alguns casos até mesmo do caule e que podem posteriormente causar a morte ou efeitos crônicos (NOAA, 2002).

#### 4.3 A importância das folhas

Assim como em Pezeshki *et. al*, (2000), as pequenas folhas em desenvolvimento (folhas novas) demonstraram vital importância para as plântulas, pois substituíram aquelas perdidas nas primeiras semanas após o contato com óleo .

Além das folhas novas, algumas plântulas atingidas por óleo contaram com a permanência dos cotilédones por mais tempo que o normal, os quais podem servir como reserva de alimento adicional diante da impossibilidade de realizar satisfatoriamente a fotossíntese enquanto as folhas estão impregnadas por óleo (Fig. 19).



**Fig. 19** Recuperação das plântulas após a sétima semana: folhas novas, abscisão da parte comprometida do caule e importância dos cotilédones (Fonte: o autor, 2010).

#### 4.4 Efeitos dos tratamentos

As plântulas dos tratamentos de maior concentração (especialmente 50 mL) apresentaram folhas amareladas em maior número nas primeiras quatro semanas, as quais murcharam e caíram nas semanas 3 até a 5 (incluindo cotilédones e folhas novas) de forma tão intensa que impediram a recuperação da maioria dessas plântulas e, junto com a atrofia do caule causaram as mortes observadas da semana três até a seis, resultados comparáveis ao estudo de Geo-Marine Inc. (2000).

O aumento da quantidade de folhas do controle é seguido por uma ligeira queda e em seguida novo aumento, este é um padrão natural, onde as folhas caem e novas são produzidas, até que a partir de uma determinada fase do desenvolvimento o aumento predomina, pois a produção de muitas folhas em diferentes ramos suplanta a perda de folhas isoladas. Nos tratamentos ocorre uma queda inicial que demonstra os efeitos agudos, seguida de emissão de folhas e leve tendência à nova queda.

As plântulas que conseguiram sobreviver às primeiras sete semanas após o contato com óleo (em sua maioria pertencente aos tratamentos de menor concentração) permaneceram vivas até o final do experimento, com crescimento e qualidade muito inferiores ao controle (exceto 10 mL).

A observação dos gráficos de altura diâmetro, número de folhas e vitalidade mostra que o crescimento ocorreu de forma tardia nas plântulas que receberam os tratamentos de maior concentração, o que demonstra os efeitos crônicos do óleo especialmente nas primeiras semanas e também a grande capacidade de adaptação destas plantas, já que estas se recuperaram com o tempo.

A recuperação das plantas pode ocorrer também devido ao processo de “lavagem” das folhas e sedimento pela rega (semelhante ao que ocorre na natureza pela água das marés) que carregou os componentes leves e mais tóxicos do óleo para fora dos sacos de muda, enquanto as folhas atingidas por óleo foram substituídas por novas e a atrofia do caule, quando presente, corrigida por abscisão.

A sobrevivência de todas as plântulas do controle até o final do experimento é comparável aos resultados descritos por Grant *et al.* (1993).

No tratamento 10 mL, as plântulas sobreviventes mantiveram todas as variáveis com valores altos durante a maior parte do estudo (em comparação com as dos tratamentos de maior concentração), ou seja, embora as mortes tenham ocorrido de forma muito parecida entre os tratamentos (exceto 50 mL), os efeitos crônicos como prejuízos ao crescimento se manifestaram mais intensamente em função do aumento da concentração de óleo.

Enquanto nas plântulas do tratamento controle, onde não houve mortes, as variáveis medidas apenas cresceram com o tempo, enquanto nos tratamentos onde as mortes ocorreram mais intensamente estas apresentaram queda pronunciada logo após as mortes.

As plantas sobreviventes do tratamento 50 mL apresentaram pico de crescimento em comprimento e largura das folhas e diâmetro nas semanas 13 a 15 demonstrando a grande capacidade de recuperação e adaptação destes vegetais, porém este crescimento não foi mantido, ou seja, não acompanhou na mesma proporção as plântulas do controle nas semanas seguintes.

Assim como em Wardrop *et al.* (1996) a tendência para todas as variáveis foi de decréscimo em função do aumento da concentração de óleo. Essa tendência foi quebrada para o tratamento 50 mL, pois apenas três plantas deste tratamento sobreviveram e estas tinham boa qualidade de folhas (embora os demais aspectos não fossem comparáveis às plântulas do controle).

Alterações na média dos valores de comprimento e largura das folhas refletem o grau de deformação foliar. A presença de folhas com maior comprimento e menor largura que o normal nas plântulas dos tratamentos de maior concentração pode ser mais um dos efeitos causados pelo contato entre o óleo e estas, já que *Laguncularia racemosa*, sendo sal excretora pode favorecer a entrada de hidrocarbonetos para as folhas, ocasionando as deformações foliares encontradas (Rodrigues *et al.*, 1989)

Embora as plântulas do tratamento 10 mL tenham se mantido significativamente superiores às dos tratamentos 40 e 50 mL em crescimento e vitalidade durante a maior parte do experimento, a

comparação das variáveis, principalmente do nível de vitalidade entre as plântulas do controle e do tratamento 10 mL demonstra que mesmo em concentrações pequenas os efeitos crônicos do óleo bunker são significativos.

#### 4.5 Nível de vitalidade

A criação da escala de qualidade tornou possível não apenas resumir e concentrar os resultados de todas as variáveis em apenas uma de maneira muito eficiente, mas também confirmar as tendências do impacto por meio da observação dos aspectos gerais do vegetal no viveiro.

O gráfico do nível de vitalidade evidencia a intensa mortalidade das primeiras semanas, a recuperação das plântulas sobreviventes meses depois, a proporcionalidade entre os efeitos crônicos e a concentração de óleo e principalmente a superioridade do controle em vitalidade.

Ao confrontar os gráficos de todas as variáveis com gráfico do nível de vitalidade é possível perceber que as plântulas do controle foram absolutas em qualidade durante todo o experimento, e que as dos tratamentos de maior concentração tiveram adaptação limitada à nova situação (da presença do óleo), o que demonstra uma capacidade também limitada de recuperação de *Laguncularia racemosa*.

Demonstrando os efeitos letais e subletais do óleo bunker, além da importância das folhas em desenvolvimento e cotilédones na sobrevivência de plântulas de *Laguncularia racemosa*, este trabalho pode ajudar a preencher as lacunas existentes no conhecimento das respostas biológicas das plantas de mangue a derrames de óleo e pode auxiliar na proposição de técnicas mais eficazes de recuperação e remediação (Lewis 2005, Brito *et al.* 2009).

## 5. Conclusões

Em relação aos efeitos agudos, este estudo mostrou que o óleo bunker, mesmo em pequenas concentrações (10 e 20 mL), causa clorose, perda de folhas e conseqüente morte de plântulas de *Laguncularia racemosa* nas primeiras semanas após o contato.

A taxa de mortalidade foi significativamente superior nas plântulas de todos os tratamentos (principalmente 50 mL) em comparação com as do controle (que não apresentou mortes).

Efeitos crônicos como prejuízos ao crescimento e produção de folhas, mais do que os agudos, mostraram proporcionalidade, aumentando sua intensidade em função da maior concentração de óleo.

As plântulas dos tratamentos controle e 10 mL foram significativamente superiores às demais em altura, número de folhas e nível de vitalidade.

A escala de qualidade (nível de vitalidade) foi um instrumento visual importante, que traduziu com eficiência a evolução das variáveis dependentes em função dos fatores neste estudo, embora novos testes sejam necessários para aperfeiçoá-la, dada a complexidade das respostas das plantas nas diferentes fases do seu desenvolvimento.

A presença de cotilédones saudáveis e de folhas novas, que substituem as perdidas, podem ser variáveis importantes, que definem o limite entre a sobrevivência e a morte das plântulas, além da quantidade de óleo no sedimento e nas folhas testados neste estudo.

Para pesquisas futuras sugerem-se estudos detalhados da presença e estados das folhas novas e cotilédones e da área foliar (na verificação da deformação foliar) durante a observação dos efeitos de derrames e testes envolvendo a escala de qualidade. Sugerem-se também derrames crônicos de óleo bunker em plântulas de *Laguncularia racemosa* e derrames agudos e crônicos em outras plantas de mangue, para possibilitar a comparação das diferenças dos efeitos deste tipo de óleo em diferentes plantas e em diferentes tipos de derrames, comparações para as quais os dados deste estudo poderão ser úteis.

## **Referências**

- Bigarella, J. J. 2001. Contribuição ao estudo da planície litorânea do estado do Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 65-110
- Brito, E. M. S., Duran, S., Guyoneaud, R., Urriza, M. G., Oteyza, T. G., Crapez, M. A. C., Aleluia, I. & Wasserman, J. C. A. 2009. A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio de Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, 58: 418-423.
- Burns, K. A. & Simmons, L. Y. 1994. The Galeta Oil Spill. IV. Relationship Between Sediment and Organism Hydrocarbon Loads. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 38: 397-412.
- Duke, N. C., Burns, K. A., Swannell, R. P. J., Dalhaus, O. & Rupp, R. J. 2000. Dispersant use and a bioremediation strategy as alternate means of reducing impacts of large oil spills on mangroves: The Gladstone field trials. **Marine Pollution Bulletin**, 41: 403-412.
- Geo-Marine, Inc. 2000. **Natural resource damage assessment for a JP-5 fuel spill at Naval Station Roosevelt Roads, Puerto Rico**. Draft final report. Norfolk: Commander, Atlantic Division, Naval Facilities Engineering Command. 58 pp.
- Grant, D. L., Clarke, P. J. & Allaway, W. G. 1993. The response of grey mangrove (*Avicennia marina*) seedlings to spills of crude oil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 171: 273- 295.

Lewis, R. R. 1983. Impact of oil spills on mangrove forests. **Tasks for Vegetation Science**, 8: 171-183.

Lewis, R. R. 2005. Ecological engineering for successful management and restoration of mangrove forests. **Ecological Engineering**, 24: 403-418.

National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) 2002. **Oil Spills in Mangroves: Planning & Response Considerations**. Seattle, Washington: U.S. Department of commerce.

National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) 2003. **An introduction to coastal habitats and biological resources for oil spill responses**. Seattle, Washington: U.S. Department of commerce.

National Research Council (NRC) 2003. **Oil in the sea III. Inputs, fate and effects**. The National Academies Press, Washington D C.

Nudi, A. H., Wagener, A. L. R., Francioni, E., Scofield, A.L., Sette, C.B. & Veiga, A. 2007. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. **Environment International**, 33: 315-327.

Pezeshki, S. R., Hester, M. W., Lin, Q. & Nyman J. A. 2000. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. **Environmental Pollution**, 108: 129-139.

Proffitt, C. E. & Devlin, D. J. 1998. Are there cumulative effects in red mangroves from oil spills during seedling and sapling stages? **Ecological applications**, 8 (1): 121-127.

Proffitt, C. E., Devlin, D. J. & Lindsey, M. 1995. Effects of oil on mangrove seedlings grown under different environmental conditions. **Marine Pollution Bulletin**, 30 (12): 788-793.

R Development Core Team 2010. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>

Rodrigues, F. O., Moura, D. O. & Lamparelli, C. C. 1989. Efeitos do óleo nas folhas de mangue. **Revista ambiente**, 3 (1): 36-45.

Sandrini-Neto, L. e Camargo, M.G. GAD (General ANOVA Design): an R package for ANOVA designs from the general principles. Available on <http://cran.r-project.org/web/packages>

Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. 1995. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. W. H. Freeman and Co., New York, 887 p.

Touchette, B. W., Stout, D. K. & Baca, B. J. 1992. Effects of An Oil Spill in a Mangrove Mitigation Site. **Coastal Science**, 213-227.

Underwood, A. J. 1997. Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance. **Cambridge University Press**, Cambridge.

Volkman, J. K., Holdsworth, G. D., Neill, G. P. & Bavor, H. J. 1992. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. **Science of the Total Environment**, 112: 203-219.

Wang, Z., Fingas, M. & Page, D.S. 1999. Oil spill identification. **Journal of Chromatography A**, 834: 369-411.

Wardrop, J.A., Wagstaff, B., Pfennig, P., Leeder, J. & Connoly, R. M. 1996. **The distribution, persistence and effects of petroleum hydrocarbons in mangroves impacted by the “Era” oil spill (September, 1992)**. Final Phase One report. South Australian Department of Environment and Natural Resources.

Zar, J. H. 1996. **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall, 662 p.

