

**RENATA CHARVET INCKOT**

**GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E MORFOANATOMIA DE *Mimosa*  
*pilulifera* Bentham (LEGUMINOSAE) EM SOLO CONTAMINADO POR  
PETRÓLEO E SOLO BIORREMEDIADO**

**CURITIBA  
2007**

**RENATA CHARVET INCKOT**

**GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E MORFOANATOMIA DE *Mimosa  
pilulifera* Bentham (LEGUMINOSAE) EM SOLO CONTAMINADO POR  
PETRÓLEO E SOLO BIORREMEDIADO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica, Curso de Pós-Graduação em Botânica, Área de Respostas Morfo-fisiológicas das Plantas Vasculares Superiores, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Antonio de Souza

Co-orientadores:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cleusa Bona

Prof. Dr. Gedir de Oliveira Santos

**CURITIBA  
2007**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Souza, que apesar da distância, contribuiu muito para a elaboração deste trabalho, com suas sugestões, incentivos e amizade.

Agradeço especialmente à Profa. Dra. Cleusa Bona pela excelente orientação, pelas sugestões e correções, que sem dúvida, contribuiu muito para meu conhecimento pessoal. Além é claro de sua paciência, dedicação e carinho.

Ao Prof. Dr. Gedir de Oliveira Santos pela orientação, pelas excelentes correções e sugestões e amizade.

Ao Biólogo Nilson Belém Filho, pela ajuda na confecção das lâminas, além das intermináveis conversas.

Aos meus pais (Fabienne e João Alberto), e ao meu namorado e amigo Everton pelo incentivo, pelo imenso apoio e por sempre estarem ao meu lado.

Aos grandes amigos Katiane Paula Bagatin, Lucas Nogueira, Giovanna dos Santos, Fabrício Schmitz Mayer e Rafael F. da Silva Possette pela amizade, companheirismo e ajuda nas horas difíceis.

Aos amigos do mestrado: Alessandra, Anna Luiza, Ceusnei, Ciane, Dilma, Fabio Bosio, Eduardo, Fernanda, Gracielle, Júlio, Luciana, Marcelo, Mariângela e Manuela.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Tabelas</b> .....	v
<b>Lista de Figuras</b> .....	vi
<b>1. Resumo</b> .....	ix
<b>2. Abstract</b> .....	x
<b>3. Introdução Geral</b> .....	01
<b>4. Material e Métodos</b> .....	05
4.1 Apresentação da dissertação.....	05
4.2 Experimento.....	06
<i>Capítulo I: Germinação e desenvolvimento de <i>Mimosa pilulifera</i> Bentham (Leguminosae), em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado</i> .....	08
Resumo.....	09
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
2. Material e Métodos.....	13
3. Resultados e Discussão.....	16
4. Conclusão.....	27
5. Agradecimentos.....	27
6. Referências Bibliográficas.....	28
<i>Capítulo II: Estrutura das plântulas de <i>Mimosa pilulifera</i> Bentham (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado</i> .....	34
Resumo.....	35
Abstract.....	35
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	41
Conclusão.....	54
Agradecimentos.....	54
Referências bibliográficas.....	54
<b>5. Referências Bibliográficas</b> .....	59
<b>Anexo I</b> .....	64
<b>Anexo II</b> .....	72
<b>Anexo III</b> .....	77

## LISTA DE TABELAS

*Capítulo I: Germinação e desenvolvimento de *Mimosa pilulifera* Bentham (Leguminosae) em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado*

Tabela 1: Atributos físico-químicos e teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) do solo contaminado por petróleo (SC), solo biorremediado (SB) e solo não contaminado (SNC)..... 14

Tabela 2: Desenvolvimento das plântulas de *Mimosa pilulifera* Bentham, em solo contaminado por petróleo (SC), solo biorremediado (SB) e solo não contaminado (SNC), após 90 dias da sementeira..... 18

*Capítulo II: Estrutura das plântulas de *Mimosa pilulifera* Bentham (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado*

Tabela 1: Atributos físico-químicos e teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) do solo contaminado por petróleo (SC), solo biorremediado (SB) e solo não contaminado (SNC)..... 39

## LISTA DE FIGURAS

Figuras 1 e 2: <i>Mimosa pilulifera</i> Bentham. 1: Vista geral; 2: Detalhe de ramos floridos.....	05
Figura 3: Imagem via satélite do petróleo invadindo o rio Barigui. 4: Detalhe do solo contaminado por petróleo. 5: Área que foi isolada para a não intervenção. 6: Área biorremediada. 7: Coleta do solo. 8: Coleta do solo não contaminado. 9: Bandejas com solo. 10: Experimento montado em estufa.....	07
<i>Capítulo I: Germinação e desenvolvimento de <i>Mimosa pilulifera</i> Bentham (Leguminosae) em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado</i>	
Fig. 1 e 2. Germinação de <i>Mimosa pilulifera</i> Bentham em solo não contaminado - controle (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). 1. Porcentagem de germinação. 2. Índice de velocidade de germinação. Cada coluna representa a média de cinco repetições $\pm$ desvio padrão. <sup>ns</sup> - não significativo.....	16
Fig. 3-5. Plântulas de <i>Mimosa pilulifera</i> Bentham, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado (SC). 3, 4 e 5. 30, 60 e 90 dias após a semeadura, respectivamente. (Co: cotilédone; Eo1: primeiro eofilo; Eo2: segundo eofilo, Eo3: terceiro eofilo; Eo4: quarto eofilo; Ep: epicótilo, Hp: hipocótilo). Barra: 5cm.....	19
Fig. 6 e 7. Eofilo de <i>Mimosa pilulifera</i> Bentham em solo não contaminado - controle (SNC), solo biorremediado (SB), solo contaminado por petróleo (SC), após 30 dias da semeadura. 6. Biomassa. 7. Área foliar. Cada coluna representa a média de cinco repetições $\pm$ desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes baseadas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	21
Fig. 8. Comprimento da parte aérea de <i>Mimosa pilulifera</i> Bentham, após 30, 60 e 90 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). Cada coluna representa a média de cinco repetições $\pm$ desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes baseadas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	23
Fig. 9. Biomassa da parte aérea de <i>Mimosa pilulifera</i> Bentham, após 30, 60 e 90 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). Cada coluna representa a média de cinco repetições $\pm$ desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes baseadas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	24
Fig. 10. Comprimento da raiz de <i>Mimosa pilulifera</i> Bentham, após 30, 60 e 90 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). Cada coluna representa a média de cinco repetições $\pm$ desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes baseadas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	25

Fig. 11. Biomassa da raiz de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30, 60 e 90 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). Cada coluna representa a média de cinco repetições  $\pm$  desvio padrão. <sup>ns</sup> - não significativo..... 26

*Capítulo II: Estrutura das plântulas de Mimosa pilulifera Bentham (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado*

Figuras 1 - 9 - Raiz de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da semeadura. 1 - 3 – raiz com pêlos radiciais. 4 - 6 – ápices da raiz em secções longitudinais. 7 – 9 – detalhes das raízes em secções transversais. 1, 4 e 7 - solo não contaminado. 2, 5 e 8 - solo biorremediado. 3, 6 e 9 - solo contaminado com petróleo. (Cf: coifa; En: endoderme; Ep: epiderme; Ex: exoderme; Mf: meristema fundamental; Pc: procâmbio; Pm: promeristema)..... 44

Figura 10 e 11 - Raiz de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). 10 - espessura do córtex. 11 - diâmetro do cilindro vascular. Cada coluna representa a média de cinco repetições e as barras indicam o desvio padrão. <sup>ns</sup> - não significativo..... 45

Figuras 12-19 – *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da semeadura. 12- 14 - Hipocótilo em secção transversal. 12 - solo não contaminado. 13 - solo biorremediado. 14 - solo contaminado por petróleo. 15-19 – cotilédone. 15 e 16 – epiderme das faces adaxial e abaxial, em vista frontal, de solo não contaminado. 17-19 – limbo em secção transversal de solo não contaminado, de solo biorremediado e de solo contaminado por petróleo, respectivamente. (Ca: câmbio; Co: colênquima; Ep: epiderme; Epd: epiderme da face adaxial; Epb: epiderme da face abaxial; Fl: floema; Fv: feixe vascular; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico; Xl: xilema)..... 46

Figura 20 e 21 - *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). 20 - diâmetro do hipocótilo. 21- espessura do cotilédone. Cada coluna representa a média de cinco repetições e as barras indicam o desvio padrão. <sup>ns</sup> - não significativo..... 47

Figuras 22-32 - Eofilo de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da semeadura. 22-23- tricomas dos eofilos em solo não contaminado. 24-26 - vista frontal da epiderme da face adaxial. 27-29 - vista frontal da epiderme da face abaxial. 30-32 - secções transversais. 24, 27 e 30 - solo não contaminado. 25, 28 e 31 - solo biorremediado. 26, 29 e 32 - solo contaminado por petróleo. (Epb: epiderme da face abaxial; Epd: epiderme da face adaxial; Fv: feixe vascular; Id: idioblasto; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico)..... 51

Figuras 33 e 34 - Índice estomático do eofilo de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC), das faces adaxial (28) e abaxial (29). Cada coluna representa a média de cinco repetições e as barras indicam o desvio padrão. <sup>ns</sup>- não significativo..... 52

Figura 35 - Espessura do eofilo de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). Cada coluna representa a média de cinco repetições e as barras indicam o desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes baseadas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ) 52

## 1. Resumo

Nas últimas décadas têm ocorrido vários acidentes com petróleo e seus derivados, contaminando extensas áreas do planeta. A biorremediação é uma das técnicas empregadas para minimizar os efeitos danosos do contaminante e facilitar a recomposição da vegetação natural. Apesar de ser amplamente utilizado, pouco se sabe sobre o efeito do solo biorremediado na germinação e desenvolvimento de plantas. Deste modo, o presente estudo tem como objetivo analisar o efeito do solo contaminado por petróleo e do solo biorremediado na germinação, no desenvolvimento e na morfoanatomia de *Mimosa pilulifera* Benth. O experimento foi realizado com solo proveniente da área da REPAR/PETROBRÁS, município de Araucária-PR, que foi contaminada por petróleo, e parte desta área vem sendo biorremediada com microorganismos. O experimento constou de três tratamentos: solo contaminado com petróleo (SC) - TPH = 13.651 mg kg<sup>-1</sup>; solo biorremediado (SB) - TPH = 2.004 mg kg<sup>-1</sup> e solo não contaminado (SNC) - TPH= 1.354 mg kg<sup>-1</sup>, que foram montados em bandejas, mantidas em estufa com nebulização. Para cada tratamento foram feitas cinco repetições com 50 sementes cada. Após a semeadura, o experimento foi monitorado diariamente para avaliar a porcentagem e a velocidade de germinação. Para a análise do desenvolvimento, plantas após 30, 60 e 90 dias da semeadura tiveram suas raízes, parte aérea e eofilo mensurados e pesados. Para a avaliação anatômica foram coletadas e fixadas amostras de raiz, hipocótilo, cotilédone e eofilo das plântulas após 30 dias da semeadura. Estas foram processadas para microscopia fotônica e eletrônica de varredura. A porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e biomassa radicular não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. Por outro lado, a biomassa aérea do SC foi estatisticamente menor em relação aos demais tratamentos, após 30 e 90 dias. O comprimento aéreo foi menor no SC, após 30, 60 e 90 dias e no SB foi menor somente após 90 dias. Após 30 dias da semeadura, a biomassa e a área foliar do eofilo foram significativamente menores no tratamento SC. O comprimento radicular das plantas do tratamento SC foi menor somente após 60 dias, e o do tratamento SB foi maior após 30 dias. Após 90 dias, não foi observada diferença significativa no comprimento radicial entre os tratamentos. Anatômica, foram observadas redução no ápice meristemático e maior quantidade de pêlos radiciais nas plantas do tratamento com solo contaminado. O solo contaminado e solo biorremediado não interferiram na germinação de *Mimosa pilulifera*, mas reduziram o desenvolvimento da planta.

Palavras-chave: hidrocarbonetos, biomassa, plântula.

## 2. Abstract

In the last few decades some accidents with oil and its derivatives have occurred, contaminating extensive areas of the planet. The biorremediation is one of the techniques used to minimize the harmful effect of the contaminant and to facilitate the resetting of the natural vegetation. Although widely used, little is known on the effect of the bioremediated ground in the germination and development of plants. For this purpose, the present study aims to analyse the effect of the oil contaminated ground and the bioremediated ground in the germination, development and morphoanatomy of *Mimosa pilulifera* Benth. The experiment was carried through with ground proceeding from the area of the REPAR/PETROBRÁS, in Araucária-PR, that was contaminated by oil and part of this area is being remediated with microorganisms. The experiment consisted of three treatments: ground contaminated with oil (SC) - 13,651 TPH = mg kg<sup>-1</sup>; bioremediated ground (SB) - 2,004 TPH = mg kg<sup>-1</sup> and noncontaminated ground (SNC) - 1,354 TPH = mg kg<sup>-1</sup>, that was mounted in trays and kept in a greenhouse with nebulization. For each treatment five repetitions with 50 seeds each had been made. After the sowing, the experiment was monitored daily to evaluate the percentage and the speed of germination. For the analysis of the development, plants 30, 60 and 90 days after sowing had their roots, aerial part and eophyll measured and weighed. For the anatomical evaluation, samples of root, hypocotyl, cotyledon and eophyll of seedlings 30 days after sowing were collected and fixed. These were processed for photonic and electronic scanning microscopy. The percentage of germination, the index of germination speed and the biomass of the roots did not differ statistically between the treatments. On the other hand, the aerial biomass of the SC was statistically lesser in relation to the other treatments, after 30 and 90 days. The aerial length was lesser in the SC, after 30, 60 and 90 days and in the SB it was lesser only after 90 days. And 30 days after the sowing, the biomass and the foliar area of the eophyll was significantly lesser in treatment SC. The length of the roots of the plants in treatment SC was lesser only after 60 days, and in treatment SB it was bigger after 30 days. After 90 days, significant difference in the length of the roots between the treatments was not observed. Anatomically, reduction in the meristematic apex and bigger amount of radicular hairs in the plants of the treatment with contaminated ground were observed. The contaminated ground and the bioremediated ground did not interfere in the the germination of *Mimosa pilulifera*, but it the development of the plant was reduced.

Key words: hydrocarbons, biomass, seedlings.

### 3. Introdução Geral

Todos os anos, cerca de 600 mil toneladas de petróleo são derramados em acidentes ou descargas ilegais, com graves conseqüências econômicas e ambientais (AMBICENTER, 2004). Em relação aos vazamentos de óleo no Brasil, os acidentes vêm acontecendo há muitos anos. Em 1975, cerca de seis milhões de litros de petróleo contaminaram a baía de Guanabara. Outro episódio aconteceu em 1983, quando um milhão e meio de litros de óleo vazaram do oleoduto Rio-Santos, atingindo o canal Bertioga e mais 17 praias. Na recente história dos desastres das companhias de petróleo, o afundamento da P<sub>36</sub>, no litoral do Rio de Janeiro, a maior plataforma flutuante do mundo, lançou em 2001 aproximadamente 1,3 milhões de litros de petróleo na superfície da água, intoxicando a fauna e a flora da região (LIBRERIA, 2004). Em 2002, regiões próximas à empresa INGRAX, município de Pinhais-PR, foram contaminadas por 15 mil litros de óleo (SOUZA FILHO, 2006). Em 2004, o rio Guaecá, em São Sebastião-SP, foi contaminado por óleo devido ao rompimento de um oleoduto (SOUZA FILHO, 2006). Apesar de a maioria dos acidentes com petróleo ocorrer em áreas litorâneas, em 2000 houve um grave acidente continental na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR/PETROBRÁS), localizada no município de Araucária, Paraná (AMBICENTER, 2004). Esse episódio provocou a contaminação dos rios Barigüi e Iguazu e do solo, afetando a flora e a fauna da região. Em grande parte da área contaminada na REPAR, o petróleo superficial e a vegetação morta foram removidos mecanicamente e desde então o solo vem sendo biorremediado com microorganismos.

O petróleo é constituído por uma grande diversidade de compostos que formam mistura bastante complexa. Entre os principais componentes do petróleo destacam-se os hidrocarbonetos, que podem atingir até 98% da composição (CLARK e BROWN, 1977). O petróleo é ainda composto por alcanos, cicloalcanos, pequenas quantidades de alcenos, ácidos naftênicos, enxofre, nitrogênio, oxigênio e menores quantidades de vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio (BAKER, 1970; POSTHUMA, 1997). Acredita-se que quanto maior a concentração de compostos aromáticos nos derivados de petróleo, maior a toxicidade em relação à planta (BAKER, 1970). Isso acontece porque a viscosidade, a tensão superficial do óleo e a solubilidade em relação à água influenciam na quantidade de óleo que se propagará e penetrará na planta, determinando o grau da toxicidade (BAKER, 1970). Moléculas pequenas de hidrocarbonetos apresentam baixa viscosidade e podem penetrar com maior facilidade nos tecidos vegetais, impedindo a regeneração das folhas e das raízes (BAKER, 1970; PEZESHKI *et al.*, 2000). Por outro lado, moléculas de hidrocarbonetos

grandes apresentam maior viscosidade, com conseqüente menor penetração nos tecidos vegetais (BAKER, 1970). Deste modo, petróleo mais pesado apresenta menor toxicidade às plantas quando comparado ao petróleo mais leve (DORN *et al.*, 1998).

O impacto causado por derramamento de óleo é, muitas vezes, difícil de interpretar, devido à falta de caracterização do local antes do derramamento e da metodologia empregada para a retirada do óleo (PEZESHKI *et al.*, 2000). Segundo BAKER (1970) e PEZESHKI *et al.* (2000), a estação do ano, o tipo de solo e óleo e o tempo que os vegetais ficam expostos ao óleo interferem nos impactos causados nas plantas. O efeito do óleo em diferentes estações do ano foi registrado por ALEXANDER e WEBB (1984), que observaram redução da biomassa de *Spartina alterniflora* Loisel somente quando a contaminação ocorreu durante a estação de crescimento. Segundo TAIZ e ZEIGER (1998), durante a estação de crescimento, as plantas estão ativas e, desse modo, qualquer interrupção nos processos fisiológicos básicos e/ou danos nos tecidos vegetais podem gerar uma redução no crescimento e baixa produção de biomassa.

A penetração do óleo no solo está relacionada com a capacidade de permeabilidade do contaminante e o tipo de solo (BAKER, 1970; HUGUENIN *et al.*, 1996). Alguns estudos indicaram que a granulometria e a composição do solo (areia, argila, silte) influenciam no grau de degradação do petróleo. Segundo PEZESHKI *et al.* (2000), a resposta diferencial ao tipo de substrato está relacionada à área dos espaços entre os grãos. Dessa forma, substrato arenoso permite a penetração mais rápida e mais profunda do óleo do que substratos argilosos (PEZESHKI *et al.*, 2000). Se ocorrer alta permeabilidade, a resistência do ambiente reduzirá e haverá aumento do efeito tóxico (HUGUENIN *et al.*, 1996). Depois que o óleo penetra no solo, a temperatura do solo, especialmente em regiões árticas e tropicais, pode ser alterada. O aumento da temperatura, em solo tropical, pode resultar em déficit hídrico e redução no crescimento das plantas (HUGUENIN *et al.*, 1996).

O óleo também pode interferir na disponibilidade de água, de oxigênio e de nitrogênio do solo (RANWELL, 1968; COWELL, 1969; BAKER, 1970; De JONG, 1980; BOSSERT e BARTHA, 1985; HUGUENIN *et al.*, 1996; MARTINEZ e LÓPEZ, 2001; ROY *et al.*, 2003). De acordo com ROY *et al.* (2003), os hidrocarbonetos presentes no solo tornam este hidrofóbico e hidrorrepelente por décadas, diminuindo a capacidade de retenção de água. A baixa disponibilidade de água é uma conseqüência importante, que pode interferir na germinação e no crescimento das plantas (RACINE, 1994). O óleo, que cobre a superfície do solo, também restringe o movimento do oxigênio e pode resultar em condições

anaeróbicas e degradação microbiana lenta, provocando maior persistência do óleo no solo (HUGUENIN *et al.*, 1996). Também existe interação entre o óleo e o teor de nitrogênio disponível no solo, ou seja, com o aumento da contaminação pelo óleo, os níveis de nitrogênio no solo diminuem, pois, provavelmente, os microorganismos decompositores de óleo imobilizam esse nutriente (De JONG, 1980).

Hidrocarbonetos de petróleo são fontes quase puras de carbono e, durante a degradação microbiana, os microorganismos competem com as plantas pelos nutrientes disponíveis (MERKL *et al.*, 2004). Sendo assim, nas primeiras semanas do crescimento vegetal, a quantidade de nutrientes e de energia armazenadas na semente pode ter papel importante na sobrevivência e no crescimento da planta (MERKL *et al.*, 2004). Entretanto, componentes do óleo também podem penetrar na semente e alterar reações metabólicas ou matar o embrião (BAKER, 1970; ADAM e DUNCAN, 2002; ACHUBA, 2006). Além disso, o óleo pode formar uma camada hidrofóbica ao redor da semente, dificultando e/ou impedindo a absorção de água e oxigênio, que são essenciais para a germinação (BAKER, 1970; LARCHER, 2000; MERKL *et al.*, 2005). De modo geral, a presença de petróleo e óleo diesel pode gerar baixa germinação e baixa velocidade de germinação (ADAM e DUNCAN, 2002; BONA e SANTOS, 2003; CHUPAKHINA e MASLENNIKOV, 2004; MÉNDEZ-NATERA *et al.*, 2004; BARDELLI-DA-SILVA, 2006; REZENDE, 2006). Entretanto, ADAM e DUNCAN (2002) e REZENDE *et al.* (2005) não observaram interferência do contaminante na germinação.

Plantas sob influência de solo contaminado por petróleo e seus derivados podem apresentar tendência a desenvolver características xeromórficas (SANTOS *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2004; MARANHO, 2004; MARANHO *et al.*, 2006). Nas raízes de plantas em solo contaminado por petróleo e óleo diesel foi observada maior ramificação (ADAM e DUNCAN, 1999; OLIVEIRA, 2004; MAYER *et al.*, 2005), maior área de espaços intercelulares (BARDELLI-DA-SILVA, 2006 e REZENDE, 2006), o que pode demonstrar falta de oxigênio e ainda diminuição do comprimento (MERKL *et al.*, 2005). Também foram detectados, nas plantas em solo contaminado por petróleo, diminuição do diâmetro e comprimento das traqueídes (MARANHO, 2004) e menor comprimento e diâmetro dos elementos de vaso (GARCIA *et al.*, 2004 e RODRIGUES, 2005). Em folhas, foi relatada diminuição da área foliar (SILVA *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2004; MARANHO *et al.*, 2006; BARDELLI-DA-SILVA, 2006 e REZENDE, 2006), aumento do índice estomático e da espessura da cutícula (MARANHO *et al.*, 2006).

A diminuição no desenvolvimento e a baixa produção de biomassa, de plantas em solo contaminado por petróleo e seus derivados, foram registradas por ADAM e DUNCAN (1999), CHUPAKHINA e MASLENNIKOV (2004), GALLEGOS MARTINEZ *et al.*, (2000), MERKL *et al.* (2004), BARDELLI-DA-SILVA (2006), REZENDE (2006) e WHITE *et al.*, (2006). A inibição do crescimento e da biomassa das plantas pode ser causada pela absorção de pequenas moléculas tóxicas do petróleo (BOSSERT e BARTHA, 1985) que podem alterar a integridade da membrana plasmática das células (BAKER, 1970; REIS, 1996), e/ou estresse hídrico (TAIZ e ZEIGER, 1998; PEÑA-CASTRO, 2006). Segundo ALKIO *et al.* (2005), a absorção de fenantreno pela planta pode ocasionar redução do crescimento das raízes, inibição do desenvolvimento de pêlos radiciais, diminuição do tamanho e do número de folhas, deformação dos tricomas e necrose foliar.

A biorremediação é definida como o uso de organismos vivos para remover poluentes ambientais do solo, água e ar (PANDEY *et al.*, 2000; COLLIN, 2001). Segundo MERKL *et al.* (2004), a biorremediação, em geral, é uma tecnologia promissora para os trópicos devido ao fato de as condições climáticas favorecerem o aumento da atividade microbiana. DORN e SALANITRO (2000) demonstraram redução na toxicidade de solos contaminados com petróleo que foram biorremediados. Segundo os autores, a diminuição da toxicidade facilitou a colonização de invertebrados e a reintrodução das plantas. GOGOSZ *et al.* (2006) relataram que o processo de biorremediação reduziu os efeitos do solo contaminado com petróleo sobre o desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa*. O. Berg. BAEK *et al.* (2004) detectaram menor interferência no crescimento de *Zea mays* L. e *Phaseolus nipponensis* Ohwi do solo biorremediado quando comparado com o solo contaminado por óleo cru.

Dentre as muitas espécies utilizadas para revegetar áreas contaminadas com petróleo, as Fabaceae (Leguminosae) são consideradas as mais adequadas, devido à interação com microorganismos fixadores de nitrogênio (GUDIN e SYRATT, 1975; MERKL *et al.*, 2005). Espécies dessa família são freqüentemente utilizadas no processo de recuperação de solo contaminado com petróleo e seus derivados (ADAM e DUNCAN, 2002), sendo encontradas em solo contaminado da Europa (GUDIN e SYRATT, 1975). *Mimosa pilulifera* Bentham pertence à família Fabaceae (Leguminosae) (APG II, 2003) e é conhecida popularmente como bracinga-de-arapoti (FOWLER e CARPANEZZI, 1998). Esta espécie caracteriza-se por ser um arbusto de até cinco m de altura e apresentar copa densa, a qual cobre rapidamente o solo (FOWLER e CARPANEZZI, 1998) (Fig. 1 e 2). *Mimosa pilulifera*

coloniza terrenos úmidos, rasos e muito alterados mecanicamente. Ocorre de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e regiões adjuntas do Uruguai e Argentina (BARNEBY, 1991).

As plantas são bons indicadores da qualidade do ambiente (LARCHER, 2000) e há poucas informações do efeito de solos contaminados e solos biorremediados sobre espécies nativas do Brasil. Desse modo, o presente estudo tem como objetivo analisar a germinação, o crescimento e a estrutura morfoanatômica das plântulas de *Mimosa pilulifera* crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado.



Figuras 1 e 2: *Mimosa pilulifera* Benth. 1: Vista geral; 2: Detalhe de ramos floridos.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Apresentação da dissertação

Os resultados serão apresentados em forma de capítulo, cada capítulo sendo um artigo, que está organizado de acordo com as normas da revista à qual será submetido. O capítulo I, ‘Germinação e desenvolvimento de *Mimosa pilulifera* Benth. (Leguminosae) em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado’, está de acordo com as normas da revista inglesa Chemosphere (anexo I), ISSN: 0045-6535, com fator de impacto de 2,297. O capítulo II, ‘Estrutura das plântulas de *Mimosa pilulifera* Benth. (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado’, está de acordo com as normas da revista Rodriguésia (anexo II), ISSN: 0370-6583. A revista é brasileira e está classificada como Qualis A. Dessa forma, o item material e métodos, que aqui segue, está descrito de maneira sucinta, pois os detalhes estão inseridos nos materiais e métodos dos capítulos.

### 3.2. Experimento

O solo foi coletado na Refinaria Presidente Getúlio Vargas, REPAR/PETROBRÁS, localizada no Município de Araucária-Paraná. Essa área, onde se encontram remanescentes da Floresta Ombrófila Mista, em 2000 foi contaminada por quatro milhões de litros de petróleo (Fig. 3). Após a contaminação do solo na REPAR, o excesso de petróleo foi retirado mecanicamente, sendo que algumas áreas ficaram isoladas e não sofreram intervenção (Fig. 4 e 5). Na maior parte do local, o petróleo superficial e a vegetação morta foram removidos mecanicamente e desde então o solo vem sendo biorremediado com microorganismos (Fig. 6). Para a montagem do experimento foi coletado solo da área da REPAR (Fig. 7, 8 e 9), após cinco anos da contaminação em áreas próximas, cerca de cinco metros uma da outra. A coleta do solo contaminado foi realizada na área que não sofreu intervenção, o solo biorremediado foi coletado na área onde a vegetação foi retirada e aplicada a técnica de biorremediação e o solo não contaminado, em uma área recoberta pela vegetação nativa (Fig. 8). O solo foi peneirado, homogeneizado e distribuído em bandejas plásticas (Fig. 9). O teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) foi determinado pelo LACTEC (Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento).

O experimento teve um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições (bandejas), sendo que cada repetição possuía 50 sementes. O experimento ficou em casa de vegetação com nebulização intermitente (Fig. 10), no Departamento de Botânica da UFPR, onde a temperatura variou de 9,6°C a 33,2°C.

Para a obtenção dos dados sobre a germinação foram calculados a porcentagem de germinação (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG). Para a mensuração das variáveis morfológicas e a análise do desenvolvimento das plântulas, foram coletados seis exemplares de cada repetição após 30, 60 e 90 dias da semeadura. A morfologia das plântulas foi descrita de acordo com SOUZA (2003). Para as análises morfoanatômicas, as plântulas foram coletadas 30 dias após a semeadura, fixadas e processadas de acordo com técnicas convencionais para microscopia fotônica e eletrônica.

A análise dos dados obtidos foi realizada através do programa MSTAT-C®. Inicialmente foi realizada análise de variância dos tratamentos, pelo teste de Bartlett, para verificar a homogeneidade. As variáveis homogêneas tiveram as médias dos tratamentos testadas pelo teste de F. Quando as médias apresentavam diferença estatística entre os tratamentos, elas foram comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%. Para a confecção dos gráficos, utilizou-se o programa Excel 2003 para Windows XP.



Figura 3: Imagem via satélite do petróleo invadindo o rio Barigüi. 4: Área que foi isolada para a não-intervenção. 5: Detalhe do solo contaminado por petróleo. 6: Área biorremediada. 7: Coleta do solo. 8: Coleta do solo não contaminado. 9: Bandejas com solo. 10: Experimento montado em estufa.

## *Capítulo I*

# GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE *Mimosa pilulifera* Bentham (LEGUMINOSAE) EM SOLO CONTAMINADO POR PETRÓLEO E SOLO BIORREMEDIADO

## RESUMO

Germinação e desenvolvimento de *Mimosa pilulifera* Bentham, (Leguminosae) em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado.

A contaminação de ambientes por petróleo e seus derivados vem acontecendo há décadas. A biorremediação é uma técnica que visa remover o contaminante através de organismos vivos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do solo contaminado por petróleo e do solo biorremediado na germinação e desenvolvimento de *Mimosa pilulifera* Bentham (Fabaceae/Leguminosae). O experimento foi realizado com solo proveniente da área da REPAR/PETROBRÁS, município de Araucária-PR, Brasil, que em 2000 foi contaminado por petróleo, e parte da área vem sendo biorremediada com microorganismos. Em casa de vegetação, foram montados três tratamentos (solo contaminado com petróleo-SC, solo biorremediado-SB e solo não contaminado-SNC), com cinco repetições. Avaliaram-se a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, biomassa e área foliar dos eofilos, biomassa e comprimento da parte aérea e da raiz, após 30, 60 e 90 dias da semeadura. A porcentagem e velocidade de germinação não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. A biomassa e a área foliar do eofilo foram menores em solo contaminado por petróleo. O comprimento e a biomassa aérea foram menores após 30, 60 e 90 dias nas plantas do tratamento com solo contaminado, enquanto que no solo biorremediado foram menores após 90 dias da semeadura. O comprimento radicial das plantas em solo contaminado foi menor após 60 dias, enquanto que no solo biorremediado foi maior após 30 dias e igual após 60 e 90 dias. A biomassa radicial foi igual em todos os tratamentos. A germinação das sementes não foi afetada pelo solo contaminado nem pelo solo biorremediado. Por outro lado, o desenvolvimento das plântulas foi mais afetado pelo solo contaminado do que pelo solo biorremediado.

Palavras-chave: biomassa, hidrocarbonetos, hipocótilo, plântula, raiz.

## ABSTRACT

Germination and development of *Mimosa pilulifera* Bentham (Leguminosae) in ground contaminated by oil and bioremediated ground.

The environmental contamination by oil and its derivatives has been happening for decades. The bioremediation is a technique that aims to remove the contaminant through living organisms. The objective of this work was to evaluate the effect of the ground contaminated by oil and the bioremediated ground in the germination and development of *Mimosa pilulifera* Bentham (Fabaceae/Leguminosae). The experiment was carried through with ground proceeding from the area of the REPAR/PETROBRÁS, in Araucária-PR, Brazil, which in 2000 was contaminated by oil and part of the area is being bioremediated with microorganisms. In a vegetation house, three treatments were mounted (petroleum contaminated soil-SC, bioremediated soil -SB and noncontaminated soil -SNC), with five repetitions. The percentage of germination, the index of germination speed, the biomass and the foliar area of the eophylls, the biomass and the length of the aerial part and of the root were evaluated 30, 60 and 90 days after sowing. The percentage and the speed of germination did not differ statistically in the treatments. The biomass and the foliar area of the eophyll were lesser in ground contaminated by oil. The length and the aerial biomass were lesser in the plants of the treatment with contaminated ground after 30, 60 and 90 days, whereas in the bioremediated ground, after 90 days were lesser. The length to the roots of the plants in contaminated ground was lesser after 60 days, whereas in the bioremediated ground it was bigger 30 days and equal after 60 and 90 days. The biomass of the roots was equal in all treatments. The germination of the seeds was not affected by the contaminated nor by the nocontaminated ground. On the other hand, the development of seedlings was more affected by the contaminated ground than on the bioremediated ground.

Key words: biomass, hydrocarbons, hipocotyl, seedling, root.

## 1. Introdução

A demanda da exploração de petróleo e de seus derivados aumenta concomitantemente ao desenvolvimento da sociedade. Isso acarreta um maior número de acidentes ambientais, os quais contaminam extensas áreas do planeta (Hutchinson et al., 2001). Apesar de a maioria dos acidentes com petróleo ocorrer em áreas litorâneas, em 2000 ocorreu um grave acidente continental na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR/PETROBRÁS), localizada no município de Araucária, Paraná, Brasil. Após um ano e meio da contaminação, parte da área vem sendo biorremediada com microorganismos.

A biorremediação é uma técnica desenvolvida para remoção de contaminantes do solo, ar e água, por meio de organismos vivos (Pandey et al., 2000; Collin, 2001). Os microorganismos degradam hidrocarbonetos e utilizam o carbono como fonte de energia para seu crescimento (Merkl et al., 2004). Essa técnica pode ser efetiva no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (Al-Zalzaleh e Shabbir, 2004), principalmente nas regiões tropicais, em razão de as condições climáticas favorecerem o aumento da atividade microbiana (Merkl et al., 2004). Alguns estudos confirmam a diminuição da toxicidade do solo contaminado por petróleo depois de biorremediado (Dorn e Salanitro, 2000; Baek et al., 2004).

Os efeitos do solo contaminado por petróleo e seus derivados nas plantas variam muito de acordo com a concentração do petróleo, o tempo de exposição ao contaminante e a espécie vegetal (Baker, 1970; Kinako, 1981; Webb, 1994; Lin e Mendelssohn, 1996; Dorn e Salanitro, 2000; Pezeshki et al., 2000; Adam e Duncan, 2002; Baek et al., 2004; Merkl et al., 2004; Merkl et al., 2005; Rezende, 2006; Bardelli-da-Silva, 2006; Santos, 2006). De maneira geral, o solo contaminado por petróleo ou seus derivados tem efeito negativo na germinação de sementes (Adam e Duncan, 2002; Méndez-Natera et al., 2004; Rezende, 2006; Bardelli-da-Silva, 2006; Achuba, 2006). A interferência negativa do solo contaminado na germinação

pode ser ocasionada pelo efeito tóxico do petróleo, que pode inibir as atividades da amilase e amido fosforilase e, desse modo, afetar a assimilação do amido (Achuba, 2006), ou por condições desfavoráveis do solo (Racine, 1994; Merkl et al., 2004). Algumas espécies de gramíneas apresentam tegumento seminal resistente à penetração do óleo diesel, fazendo com que a contaminação do solo não interfira no processo de germinação (Adam e Duncan, 2002).

A maioria das pesquisas relata diminuição do crescimento e da produção de biomassa de plantas em solo com petróleo (Kinako, 1981; Chaîneau et al., 1997; Li et al., 1997; Adam e Duncan, 2002; Chupakhina e Maslennikov, 2004; Merkl et al., 2004; Merkl et al., 2005). A absorção de moléculas tóxicas do petróleo por plantas em solo contaminado (Bossert e Bartha, 1985) pode modificar a permeabilidade e a estrutura da membrana citoplasmática (Peña-Castro et al., 2006). A perda da capacidade seletiva da membrana impede a planta de absorver água, causando estresse hídrico (Taiz e Zeiger, 1998). Entretanto, a presença de petróleo no solo pode estimular o crescimento e a produção de biomassa de algumas espécies de plantas (Merkl et al., 2004), uma vez que o estresse causado pelo petróleo pode estimular a síntese de substâncias reguladoras de crescimento (Baker, 1970).

Além dos efeitos diretos do petróleo nas plantas, o petróleo também altera as propriedades do solo, tendo como conseqüência a redução da disponibilidade de água, nutrientes e oxigênio (Ranwell, 1968; Cowell, 1969; Baker, 1970; De Jong, 1980; Bossert e Bartha, 1985; Pezeshki et al., 2000; Martinez e López, 2001). Os compostos orgânicos polares, presentes no petróleo, são os prováveis responsáveis pela hidrorrepelência dos solos contaminados (Morley et al., 2005). Os microorganismos e as plantas competem pelos nutrientes disponíveis no solo (Dindal, 1990) e em solos contaminados com hidrocarbonetos, a população de microorganismos aumenta, com conseqüente redução na disponibilidade de nutrientes para as plantas (De Jong, 1980; Merkl et al., 2004). Desse modo, solos

biorremediados com microorganismos devem apresentar teores reduzidos para muitos nutrientes, entre os quais se destaca o nitrogênio, o qual é um dos nutrientes mais restritivos ao crescimento das plantas (Marschner, 1995). O movimento do oxigênio pode ser restringido pela camada de óleo que cobre a superfície do solo, resultando em condições anaeróbicas para as raízes (Pezeshki et al., 2000). O oxigênio é determinante no crescimento e na atividade dos microorganismos aeróbicos do solo, os quais degradam vários compostos orgânicos (Yateem et al., 1999). Portanto, em solos contaminados com baixa aeração a degradação microbiana deve ser lenta.

Fabaceae/Leguminosae se caracteriza por apresentar uma associação simbiótica com microorganismos fixadores de nitrogênio, e por essa razão é considerada adequada para revegetar áreas contaminadas com petróleo (Gudin e Syrratt, 1975; Adam e Duncan, 2002). *Mimosa pilulifera* Bentham (Fabaceae/Leguminosae) é nativa da área de estudo e caracteriza-se por colonizar terrenos úmidos, rasos e muito alterados mecanicamente (Fowler e Carpanezzi, 1998).

Ainda há poucas informações sobre o impacto da contaminação do solo com petróleo na germinação, desenvolvimento e estabelecimento de espécies nativas do Brasil. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo testar o grau de toxicidade do solo contaminado e do solo biorremediado na germinação e no desenvolvimento de *Mimosa pilulifera*.

## 2. Material e Métodos

Para a montagem do experimento, o solo foi coletado na área da REPAR/PETROBRÁS, município de Araucária, Paraná, Brasil. Esta área, em 2000, foi contaminada com quatro milhões de litros de petróleo. Na maior parte do local, o petróleo superficial e a vegetação morta foram removidos mecanicamente e desde então o solo vem sendo biorremediado com microorganismos. Porém, algumas áreas contaminadas ficaram

isoladas e não foram submetidas à biorremediação. O solo da área é caracterizado por ser gleisolo hidromórfico que apresenta horizonte glei e caráter franco argilo siltoso (Carvalho et al., 2003). Algumas características físico-químicas do solo estão presentes na Tabela 1. O petróleo que vazou na área é caracterizado como tipo cusiana com perfil parafínico, na faixa predominante de compostos de C<sub>10</sub> a C<sub>14</sub> (Petrobrás, 2003) e é um petróleo pesado (informações pessoais).

Tabela 1

Atributos físico-químicos e teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) do solo contaminado por petróleo (SC), solo biorremediado (SB) e solo não contaminado (SNC).

		SC	SB	SNC
	Areia	24,8	19,7	26,1
Textura (%)	Silte	50,0	45,0	52,5
	Argila	25,2	35,2	21,3
pH		4,20	5,80	3,70
Alumínio (cmolc dm <sup>-3</sup> )		4,10	0,00	6,00
Cálcio (cmolc dm <sup>-3</sup> )		2,00	16,80	0,40
Magnésio (cmolc dm <sup>-3</sup> )		1,50	1,80	0,20
Potássio (cmolc dm <sup>-3</sup> )		0,24	0,21	0,10
Fósforo (mg dm <sup>-3</sup> )		1,60	1,20	3,50
Carbono (g dm <sup>-3</sup> )		26,9	19,6	23,8
TPH (mg kg <sup>-1</sup> )		13.651	2.004	1.354

Para a montagem do experimento foi coletado solo contaminado com petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado em áreas próximas, cerca de cinco metros uma da outra. A coleta foi realizada em 2005 (cinco anos após a contaminação), numa profundidade de zero a 30 cm. O solo foi peneirado, homogeneizado e distribuído em bandejas plásticas.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com três tratamentos (solo contaminado por petróleo (SC); solo biorremediado (SB) e solo não contaminado (SNC)) e cinco repetições (bandejas) com 50 sementes cada, totalizando 750 sementes. As sementes

de *M. pilulifera* foram fornecidas pela Embrapa Floresta, Município de Colombo-PR, Brasil. Para a superação da dormência tegumentar, as sementes foram imersas em água, com temperatura inicial de 80° C, durante 18 horas (Fowler e Carpanezzi, 1998). Após a semeadura o experimento foi mantido em casa de vegetação com nebulização intermitente (15 segundos a cada 30 minutos) e temperatura média de 22° C (mínima 9,6° C e máxima 33,2° C).

Para a análise da germinação foram calculados a porcentagem de germinação (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG), considerando o início da germinação após a emissão da raiz primária (Souza, 2003). O IVG foi calculado através da fórmula sugerida por Maguire (1962):  $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$ ; Onde: IVG = índice de velocidade de germinação;  $G_1$ ,  $G_2$  e  $G_n$  = número de plântulas computadas na primeira, segunda e última contagem;  $N_1$ ,  $N_2$  e  $N_n$  = número de dias após o plantio das sementes.

Para a análise do desenvolvimento das plantas foram coletados seis exemplares de cada repetição após 30, 60 e 90 dias da semeadura. Para cada planta foram mensurados: a biomassa e área foliar do primeiro eófilo, o comprimento da parte aérea (base do hipocótilo até a gema apical), o comprimento da raiz principal e a biomassa da parte aérea e da raiz. A área foliar dos eófilos foi calculada com o material desidratado utilizando-se o programa Sigma-Pro Versão 2.1 com a imagem escaneada das folhas. Para mensurar o comprimento foi utilizada uma régua milimetrada. Para obter a biomassa, as plantas foram prensadas em papel jornal, desidratadas em estufa e pesadas em balança de precisão. A morfologia das plantas foi descrita de acordo com Souza (2003).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente no programa MSTAT-C® . Primeiramente verificou-se a variância dos tratamentos quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett. Posteriormente as variáveis foram testadas pelo teste F. Quando as análises dos

resultados demonstraram diferença estatística entre as médias dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey num nível de significância de 5%.

### 3. Resultados e Discussão

A porcentagem e a velocidade de germinação (IVG) de *M. pilulifera* não foram afetadas significativamente pelo solo contaminado e nem pelo solo biorremediado ( $p>0,05$ ) (Fig. 1 e 2). Embora existam muitos estudos que relatam redução da germinação (Adam e Duncan, 2002; Chupakhina e Maslennikov, 2004; Méndez-Natera et al., 2004; Baek et al., 2004) e do IVG (Bardelli-da-Silva, 2006 e Rezende, 2006) em solo contaminado por petróleo e seus derivados, os resultados podem diferir de acordo com a espécie, a concentração e o tipo de óleo (Adam e Duncan, 2002; Merkl et al., 2004).

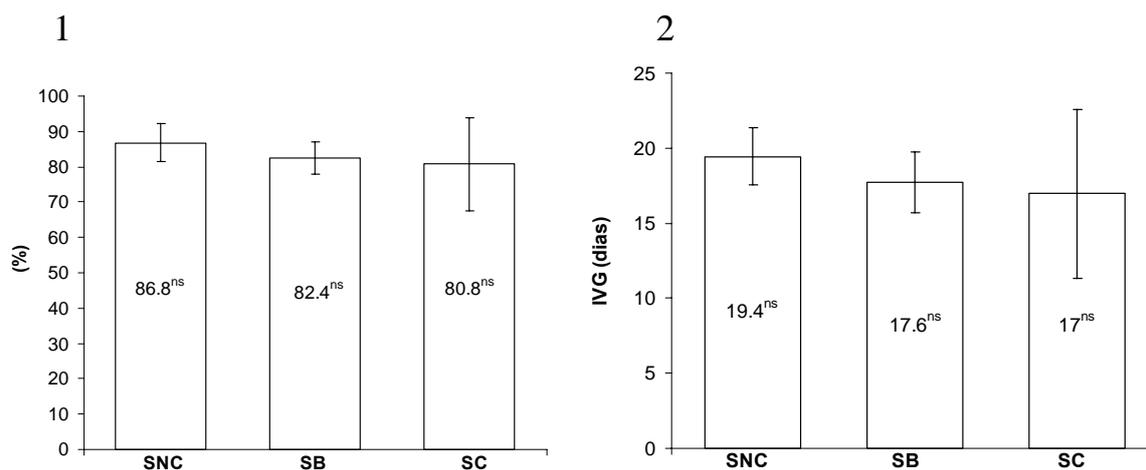


Fig. 1 e 2. Germinação de *Mimosa pilulifera* Bentham em solo não contaminado - controle (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). 1. Porcentagem de germinação. 2. Índice de velocidade de germinação. Cada coluna representa a média de cinco repetições  $\pm$  desvio padrão. <sup>ns</sup>- não significativo.

Achuba (2006) acredita que a baixa germinação de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., em solo contaminado por petróleo, pode estar associada à redução de atividades enzimáticas. Baker (1970) relaciona a redução na germinação à barreira física formada pelo contaminante nas sementes, impedindo a passagem de oxigênio e água ao embrião. Adam e Duncan (1999; 2002) relataram baixa porcentagem de germinação em algumas espécies de gramíneas em solo contaminado por óleo diesel; entretanto, não registraram interferência na germinação

para outras espécies. Os autores acreditam que a presença de tegumento resistente nas sementes pode ser uma barreira física à penetração do óleo. Redução na porcentagem de germinação e IVG em solo contaminado por óleo diesel, 30 dias antes do experimento, foram relatados por Bardelli-da-Silva (2006) em *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L.B. Sm. & Downs e por Rezende (2006) em *Schinus terebinthifolius* Raddi. Segundo esses autores, a fração volátil do contaminante interferiu negativamente na germinação, tanto que esse efeito foi reduzido 180 dias após a contaminação. Além disso, Rezende et al. (2005) não detectaram alteração na porcentagem e IVG de *S. terebinthifolius* em solo com petróleo. Dorn e Salanitro (2000) constataram que a germinação de *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L. e *Avena sativa* L. foi mais afetada em solo contaminado por óleo leve quando comparada à contaminação por óleo pesado e menos afetada em solo biorremediado.

O fato de o solo contaminado e de o solo biorremediado da área da REPAR não alterar a porcentagem e a velocidade de germinação de *M. pilulifera*, provavelmente, se deve: (1) ao teor de o TPH não ser fitotóxico; (2) ao tipo de petróleo e (3) à ausência de compostos voláteis, pois o solo foi contaminado há cerca de cinco anos. Outro fator que pode ter contribuído para esses resultados é a rápida germinação de *M. pilulifera*, já que as sementes ficaram pouco tempo em contato com o solo contaminado e o solo biorremediado, o que pode minimizar o efeito tóxico do petróleo. Ainda, acredita-se que, tanto tempo após a contaminação, as moléculas de hidrocarbonetos restantes estão adsorvidas às partículas do solo e dificilmente penetrariam na semente.

*Mimosa pilulifera* apresentou desenvolvimento mais lento em solo contaminado por petróleo quando comparado ao tratamento com solo biorremediado e com solo não contaminado (Tabela 2 e Fig. 3, 4 e 5). O desenvolvimento das plantas de *M. pilulifera*, em solo contaminado foi prejudicado a partir do sétimo dia da semeadura, durante a expansão do primeiro eófilo. No decorrer do experimento a interferência no desenvolvimento das plantas

em solo contaminado ficou mais evidente. Em solo biorremediado, as plantas tiveram o desenvolvimento afetado apenas após o 15º dia da sementeira, durante a expansão do terceiro par de eofilos (Tab. 2).

Tabela 2

Desenvolvimento das plântulas de *Mimosa pilulifera* Bentham, em solo contaminado por petróleo (SC), solo biorremediado (SB) e solo não contaminado (SNC), 90 dias após a sementeira.

		SC	SB	SNC
		Dias		
Protrusão da radícula		2	2	2
Epicótilo	Início da expansão	15	10	10
Cotilédones	Início da expansão	3	3	3
	Expansão completa	5	5	5
Primeiro eofilo	Início da expansão	7	7	7
	Expansão completa	18	10	10
Segundo eofilo	Início da expansão	16	9	9
	Expansão completa	60	30	30
Terceiro eofilo	Início da expansão	40	17	15
	Expansão completa	70	50	40
Quarto eofilo	Início da expansão	90	70	50
	Expansão completa	—	85	70
Quinto eofilo	Início da expansão	—	80	65
	Expansão completa	—	—	90
Sexto eofilo	Início da expansão	—	—	80

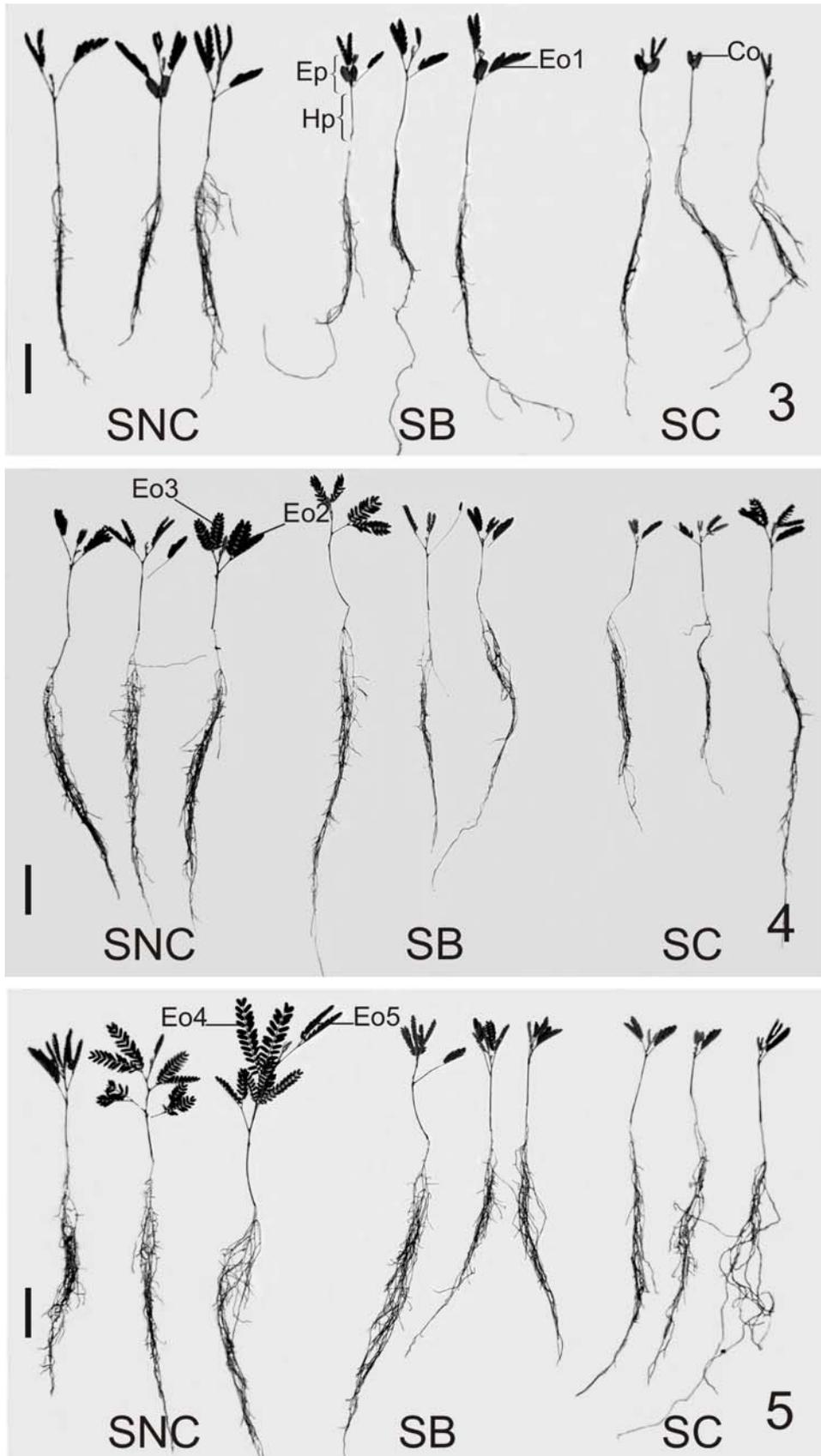


Fig. 3-5. Plântulas de *Mimosa pilulifera* Benthams, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado (SC). 3, 4 e 5. 30, 60 e 90 dias após a sementeira, respectivamente. (Co: cotilédone; Eo1: primeiro eofilo; Eo2: segundo eofilo, Eo3: terceiro eofilo; Eo4: quarto eofilo; Ep: epicótilo, Hp: hipocótilo). Barra: 5cm.

Chupakhina e Maslennikov (2004) detectaram desenvolvimento tardio da primeira e segunda folha de *Vicia sativa* L., *Panicum miliaceum* L. e *Hordeum vulgare* L. em solo contaminado por óleo bruto, e relacionaram este resultado com a concentração do poluente. Bardelli-da-Silva (2006) registrou que após 30 dias da contaminação do solo por óleo diesel, *Sebastiania commersoniana* teve desenvolvimento lento e que algumas plantas não desenvolveram o eofilo e metafilo. Dorn e Salanitro (2000) observaram que o desenvolvimento de *Zea mays*, *Triticum aestivum* e *Avena sativa* foi menos afetado em solo biorremediado, quando comparado com o solo contaminado.

O solo contaminado e o solo biorremediado não interferiram no desenvolvimento dos cotilédones de *M. pilulifera*. Segundo Bardelli-da-Silva (2006), em plântulas de *Sebastiania commersoniana*, houve necroses cotiledonares ocasionadas pela volatilização dos compostos tóxicos do óleo diesel. Alkio et al. (2005) observaram necroses cotiledonares e foliares em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. causados pela absorção de fenantreno. Chupakhina e Maslennikov (2004) verificaram que plantas submetidas ao solo contaminado por óleo diesel tendem acumular antocianina, ácido ascórbico e riboflavinóides, sendo que a antocianina é fortemente associada ao estresse causado pelo óleo no solo. Rezende (2006) observou em *Schinus terebinthifolius*, em solo contaminado por óleo diesel, eofilos e cotilédones com coloração levemente avermelhada, que se deve ao acúmulo de antocianinas. Todavia, não foi observada alteração na coloração dos cotilédones e eofilos de *M. pilulifera* em solo contaminado.

A biomassa e a área foliar do primeiro eofilo de *M. pilulifera* foram significativamente menores nas plantas do solo contaminado, após 30 dias do plantio ( $p < 0,05$ ) (Fig. 6 e 7). O primeiro eofilo do tratamento com solo contaminado apresentou redução de 85,5% na biomassa ( $p < 0,05$ ) (Fig. 6), quando comparado ao tratamento com solo não contaminado. Por outro lado, a biomassa do primeiro eofilo das plantas do solo

biorremediado foi estatisticamente semelhante ao tratamento com solo contaminado e ao tratamento com solo não contaminado ( $p>0,05$ ) (Fig. 6). A área foliar do primeiro eofilo foi 40% menor nas plantas do tratamento com solo contaminado e 35% menor nas plantas do tratamento com solo biorremediado, quando comparadas às plantas do tratamento com solo não contaminado ( $p<0,05$ ) (Fig. 7). Após 60 dias da semeadura, a maioria das plantas do solo não contaminado, já não apresentava o primeiro eofilo e, por este motivo, não foi mensurada a biomassa e área foliar.

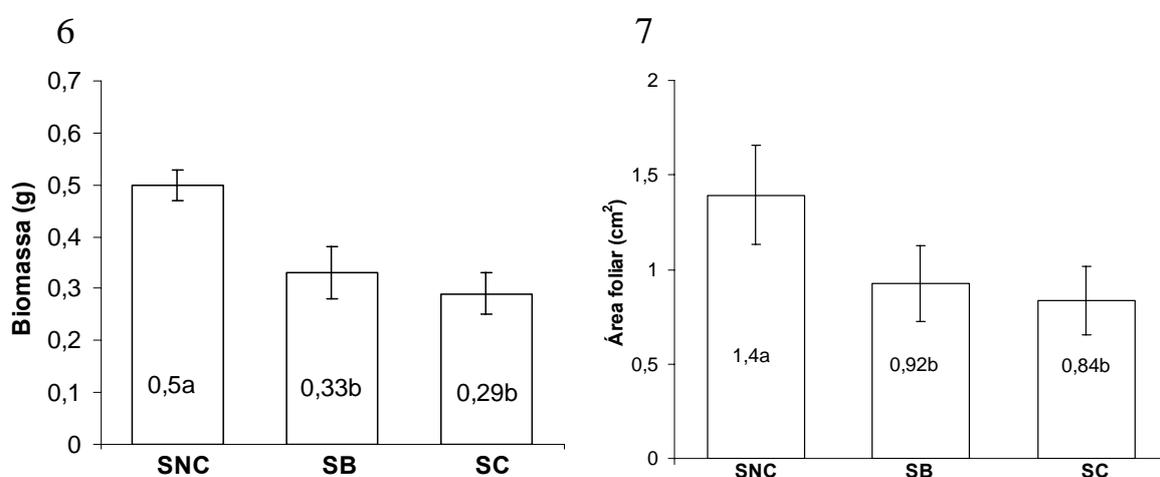


Fig. 6 e 7. Eofilo de *Mimosa pilulifera* Benth em solo não contaminado - controle (SNC), solo biorremediado (SB), solo contaminado por petróleo (SC), após 30 dias da semeadura. 6. Biomassa. 7. Área foliar. Cada coluna representa a média de cinco repetições  $\pm$  desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes baseadas pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

Rezende (2006) observou em plântulas de *Schinus terebinthifolius* e Bardelli-da-Silva (2006) em plântulas de *Sebastiania commersoniana* redução da área e da biomassa foliar, quando submetidas ao solo contaminado com óleo diesel. Merkl et al. (2005) registraram redução do tamanho das folhas de *Calopogonium mucunoides* Desv., *Centrosema brasilianum* (L.) Benth. e *Stylosanthes capitata* Vogel (Fabaceae/Leguminosae), quando germinadas em solo contaminado com petróleo. Proffitt et al. (1995) relataram diminuição da área foliar e da área foliar específica em mudas de *Rizophora mangle* L. crescendo em solo contaminado por petróleo. Exemplos adultos de *S. commersoniana* (Silva et al., 2004)

e de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl. (Maranho et al., 2006), que sofreram diretamente o impacto do derramamento de óleo, apresentaram menor área foliar. Proffitt et al. (1995), Silva et al. (2004), Merkl et al. (2005), Rezende (2006), Bardelli-da-Silva (2006) e Maranhão et al. (2006) sugerem que a baixa disponibilidade de água e de nutrientes, em solo contaminado, foi a maior responsável pela redução na diminuição da biomassa e da área foliar. Contudo Alkio et al. (2005) sugerem que a diminuição do tamanho e número de folhas de *Arabidopsis thaliana*, em solo com fenantreno foi causada pelo efeito tóxico do contaminante absorvido pela planta. Entretanto, não foram observadas alterações na área foliar em plantas de *S. terebinthifolius* (Oliveira, 2004), *Campomanesia xanthocarpa* (Mayer et al., 2005) e *Rhynchospora corymbosa* (L.) Britton (Farias, 2005) em solo contaminado por petróleo.

*Mimosa pilulifera* apresentou menor comprimento da parte aérea em solo contaminado por petróleo, quando comparada às plantas do solo não contaminado (Fig. 8). As plantas em solo contaminado apresentaram redução de 17% após 30 dias da semeadura, 33,4% após 60 dias e 40,5% após 90 dias, em relação às plantas do tratamento com solo não contaminado ( $p < 0,05$ ) (Fig. 8). Por outro lado, as plantas do solo biorremediado apresentaram redução no comprimento aéreo (20,1%) somente após 90 dias da semeadura, quando comparadas às plantas do tratamento com solo não contaminado ( $p < 0,05$ ) (Fig. 8).

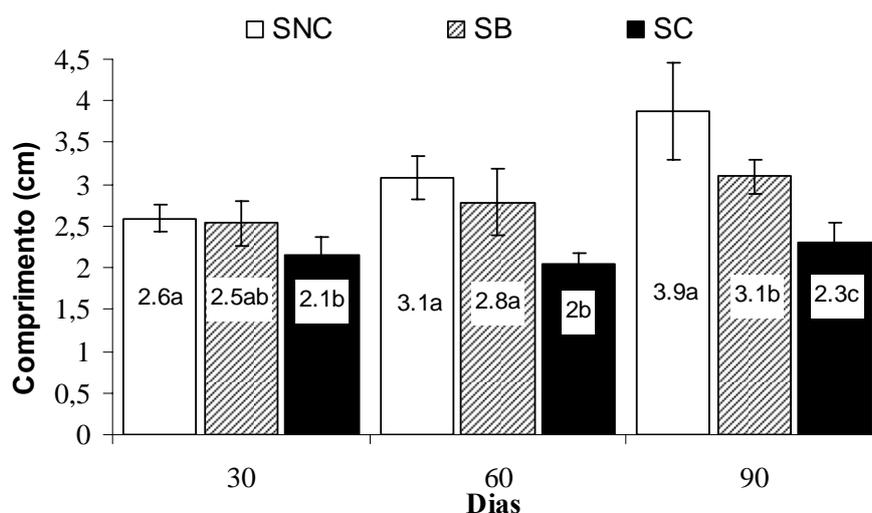


Fig. 8. Comprimento da parte aérea de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30, 60 e 90 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). Cada coluna representa a média de cinco repetições  $\pm$  desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes baseadas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

O menor comprimento da parte aérea de *M. pilulifera* em solo contaminado resultou na redução da biomassa aérea (Fig. 9). A biomassa aérea de *M. pilulifera* no tratamento com solo contaminado reduziu em 50,4% após 30 dias da semeadura, 61,5% após 60 dias e 67,5% após 90 dias, em relação às plantas do solo não contaminado ( $p < 0,05$ ) (Fig. 9). As plantas do solo biorremediado apresentaram redução significativa na biomassa aérea de 25,3% após 30 dias e 32,5% após 90 dias da semeadura, em relação às plantas do solo não contaminado ( $p < 0,05$ ) (Fig. 9).

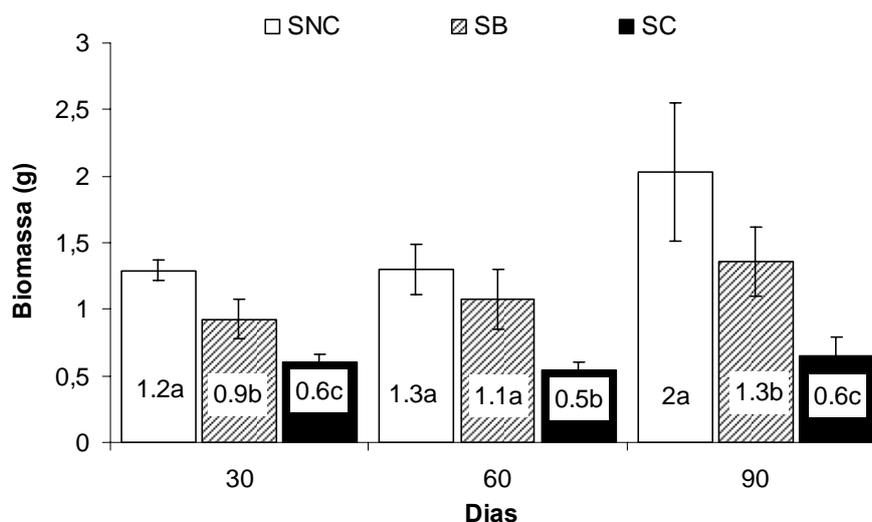


Fig. 9. Biomassa da parte aérea de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30, 60 e 90 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). Cada coluna representa a média de cinco repetições  $\pm$  desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes baseadas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

A redução no desenvolvimento aéreo de plantas em solo contaminado com petróleo e seus derivados foi relatada por vários pesquisadores (De Jong, 1980; Adam e Duncan, 1999; Chupakhina e Maslennikov, 2004; Merkl et al., 2004; Bardelli-da-Silva, 2006; Rezende, 2006). Os diferentes níveis de interferência do solo contaminado no desenvolvimento aéreo podem estar relacionados à espécie, à concentração do óleo e ao tempo de exposição ao contaminante (Baker, 1970; Kinako, 1981; Webb, 1994; Lin e Mendelssohn, 1996; Dorn e Salanitro, 2000; Pezeshki et al., 2000; Adam e Duncan, 2002; Rezende, 2006; Bardelli-da-Silva, 2006; Santos, 2006). Baek et al. (2004) observaram que *Zea mays* foi mais sensível à contaminação do solo por óleo cru que *Phaseolus nipponensi* Ohwi. Merkl et al. (2004) observaram que gramíneas são mais sensíveis à contaminação do solo por petróleo que as leguminosas. Segundo os mesmos autores, o crescimento aéreo é pouco afetado em baixas concentrações do contaminante. Mayer et al. (2005) registraram a recuperação do comprimento aéreo de *Campomanesia xanthocarpa*, em solo contaminado com petróleo, após um ano do plantio. Merkl et al. (2005) relataram diminuição de 48% do comprimento

da parte aérea em *Calopogonium muconoides*, 75% em *Centrosema brasilianum* e 26% em *Stylosanthes capitata* e que *Cyperus aggregatus* (Willd.) Endl. recuperou a biomassa aérea após 180 dias. Santos (2006) verificou que *Mimosa scabrella* Benth. recuperou a biomassa aérea, após a fertilização com nitrogênio, fósforo e potássio no solo contaminado com petróleo e que o crescimento de *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. não foi alterado pelo petróleo. De Jong (1980) acredita que o baixo crescimento das plantas em solo contaminado se deve à baixa infiltração de água no solo e à pouca disponibilidade de nitrogênio, provocada pela imobilização dos microorganismos decompositores de óleo.

O comprimento da raiz de *M. pilulifera*, em solo contaminado foi significativamente menor, após 30 e 60 dias da semeadura ( $p < 0,05$ ), enquanto em solo biorremediado e em solo não contaminado não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) (Fig. 10). Após 90 dias da semeadura, o comprimento radicial não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Fig. 10). A biomassa da raiz de *M. pilulifera* também não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Fig. 11).

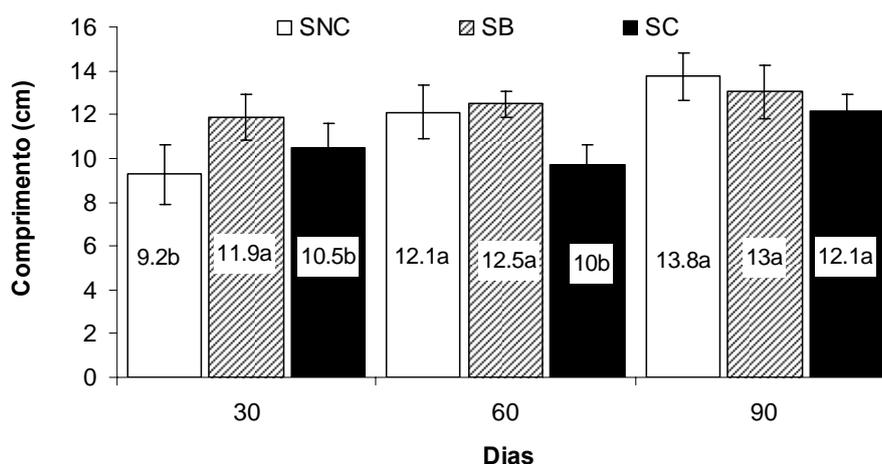


Fig. 10. Comprimento da raiz de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30, 60 e 90 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). Cada coluna representa a média de cinco repetições  $\pm$  desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes baseadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

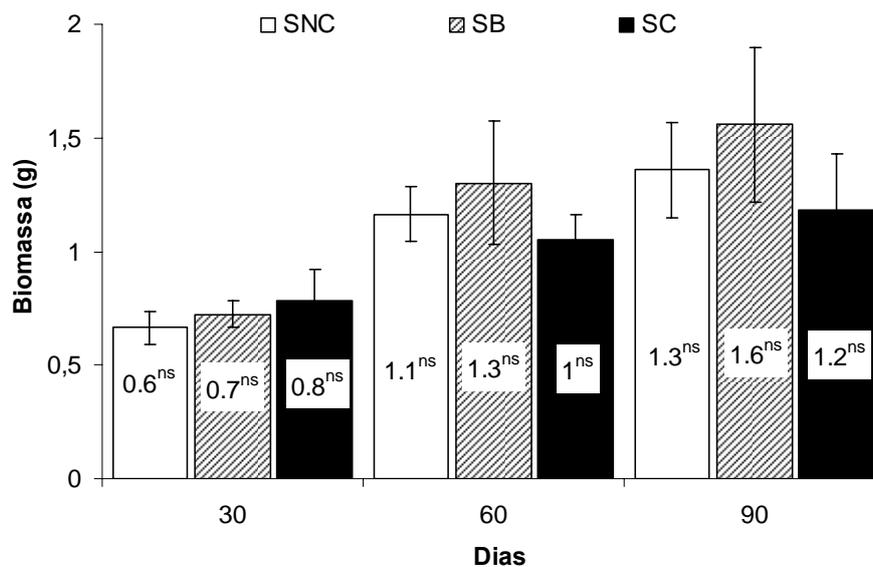


Fig. 11. Biomassa da raiz de *Mimosa pilulifera* Benth., após 30, 60 e 90 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). Cada coluna representa a média de cinco repetições  $\pm$  desvio padrão. <sup>ns</sup> - não significativo.

Merkl et al. (2004) relataram, em solo com óleo cru, menor comprimento e biomassa nas raízes das leguminosas *Centrosema brasilianum*, *Stylosanthes capitata* e *Mimosa orthocarpa* Spruce ex Benth., enquanto que *Desmodium glabrum* (Mill.) DC. e *Mimosa camporum* Benth. apresentaram redução na biomassa da raiz. Os autores acreditam que o óleo no solo pode proporcionar condições que, dependendo da espécie, podem ser favoráveis ao desenvolvimento radicial. Baker (1970) relatou aumento no comprimento radicial de *Festuca rubra* L. e *Puccinellia maritima* (Huds.) Parl., em solo contaminado por óleo bruto, que, segundo o autor, se deve provavelmente ao aumento de nutrientes acrescidos pelo óleo e/ou pela matéria orgânica dos organismos em decomposição, mortos em consequência da contaminação. Dorn e Salanitro (2000) observaram em *Triticum aestivum* e em *Avena sativa*, e Baek et al. (2004) em *Phaseolus nipponensis* e *Zea mays*, reduções severas no comprimento das raízes, em solo contaminado com óleo, enquanto que a diminuição do comprimento radicial foi menos acentuada em solo biorremediado.

Santos (2006) acredita que a diminuição da biomassa radicial de *Mimosa scabrella*, em solo contaminado por petróleo, foi causada pela falta de micronutrientes e/ou à baixa capacidade do solo de reter água. Mayer et al. (2005) observaram, em solo contaminado por petróleo, maior biomassa nas raízes de *Campomanesia xanthocarpa*, o que provavelmente está relacionado com a maior ramificação do sistema radicial. Maior formação de raízes adventícias também foi observada por Adam e Duncan (1999) em gramíneas crescendo em solo com óleo diesel, o que pode estar relacionado tanto à falta de oxigênio e água (Larcher, 2000) quanto à redução de nutrientes como foi sugerida por Mayer et al. (2005).

De modo geral, o estresse no solo aumenta a alocação de carbono da parte aérea das plantas para as raízes, resultando num maior desenvolvimento das raízes e reduzindo o desenvolvimento da parte aérea (Li et al., 1994; Li et al., 1997). Segundo Kechavarzi et al. (2007), esta alocação é uma estratégia para que as raízes alcancem áreas não contaminadas. *Mimosa pilulifera* teve o desenvolvimento da parte aérea mais afetado pela presença do petróleo no solo do que o desenvolvimento radicial. A alocação de carbono para o sistema radicial foi registrada por Li et al. (1997) em *Hordeum vulgare*, e por Merkl et al., (2005) em *Cyperus aggregatus*.

#### 4. Conclusão

O solo contaminado e o solo biorremediado, da área da REPAR, não foram fitotóxico para germinação de *Mimosa pilulifera*, porém, fora fitotóxico para o desenvolvimento da plântula, embora o solo biorremediado apresentasse menor fitotoxicidade que o solo contaminado.

#### 5. Agradecimentos

Agradecemos à Petrobrás pelo fornecimento do solo contaminado e solo biorremediado e à Embrapa-Florestas pelo fornecimento das sementes.

## 6. Referências

- Achuba, F. I., 2006. The effect of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of Cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Environmental*. 26, 17-20.
- Adam, G., Duncan, H. J., 1999. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environ Geochem Hlth*. 21, 353-357.
- Adam, G., Duncan, H. J., 2002. Influence on diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut*. 120, 363-370.
- Alkio, M., Tabuchi, T. M., Wang, X.; Colón-Carmona, A., 2005. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J. Exp. Bot*. 56 (421), 2983-2994.
- Al-Zalzaleh, H., Shabbir, G., 2004. Effect of bioremediate soil on growth of different plant species. *Kuwait J. Eci. Eng*. 31 (1), 107-118.
- Baek, K. H., Kim, H. S., Oh, H. M., Yoon, B. D., Kim, J., Lee, I. S., 2004. Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *J. Environ. Sci. Heal. A*. 39 (9), 2465-2472.
- Baker, J. M., 1970. The effects of oils on plants. *Environ. Pollut*. 1 (1), 27-44.
- Bardelli-da-Silva, M. Y., 2006. Influência do solo contaminado com óleo diesel na germinação, crescimento e morfo-anatomia de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. & Downs (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Bossert, J., Bartha, R., 1985. Plant growth in soils with a history of oily sludge disposal. *Soil sci*. 140 (1), 75-77.
- Carvalho, F. J. P. C., Castro, R. A. C., Abdanur, A., Krenczynki, M. C., Teixeira, S. C., Coneglian, D., 2003. Relatório sobre o monitoramento do solo contaminado. Repar/SMS.

- Chaîneau, C. H., Morel, J. L., Oudot, J., 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.* 26, 1478-1483.
- Chupakhina, G. N., Maslennikov, P. V., 2004. Plant adaptation to oil stress. *J. Ecol.* 35 (5), 290-295.
- Collin, P. H., 2001. *Dictionary of Ecology and the Environment*. London: Peter Collin Publishing.
- Cowell, E. B., 1969. The effects of oil pollution on salt-marsh communities in pembrokehire and cornwall. *J. Appl. Ecol.* 6 (2), 133-142.
- De Jong, E., 1980. The effect of a crude oil spill on cereals. *Environ. Pollut.* 22, 187-196.
- Dindal, D. L., 1990. *Soil biology guide*. New York: J. Wiley.
- Dorn, P. B., Salanitro, J. P., 2000. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere.* 40, 419-426.
- Farias, L. H. M., 2005. Efeitos do solo contaminado por petróleo nas folhas e raízes de *Rhynchospora corymbosa* (L.) Britt. (Cyperaceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Fowler, J. A. P., Carpanezzi, A. A., 1998. Tratamento para superação da dormência de *Mimosa pilulifera* Benth. *Embrapa Com.Tec.* 30, 1-3.
- Gudin, C., Syrratt, W. J., 1975. Biological aspects of land rehabilitation following hydrocarbon contamination. *Environ. Pollut.* 8 (1), 107-112.
- Hutchinson, S. L., Banks, M. K., Schwab, A. P., 2001. Phytoremediation of age petroleum sludge: Effects of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* 30 (2), 395-403.
- Kechavarzi, C., Pettersson, K., leeds-Harrison, P., Ritche, L., Ledin, S., 2007. Root establishment of perenniam rygrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. *Environ. Pollut.* 20, 1-7.

- Kinako, P. D. S., 1981. Short-Term Effects of Oil Pollution on Species Numbers and productivity of a Simple Terrestrial Ecosystem. *Environ. Pollut.* 25, 87-91.
- Larcher, W., 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. RiMa: São Carlos.
- Li, X., Feng, Y., Boersma, L., 1994. Partition of photosynthates between shoot and root in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) as a function on soil water potential and root temperature. *Plant Soil.* 164 (1), 4-50.
- Li, X., Feng, Y., Sawatsky, N., 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. I. Plant growth. *Plant Soil.* 192, 219-226.
- Lin, Q., Mendelsohn, I. A., 1996. A comparative investigation of the effects of South Louisiana crude oil on the vegetation of fresh, brackish, and salt marshes. *Mar. Pollut. Bull.* 32 (2), 202-209.
- Maguire, J. D., 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2 (2), 176-177.
- Maranho, L. T., Galvão, F., Preussler, K. H., Muñoz, G., Kuniyoshi, Y. S., 2006. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endll., Podocarpaceae. *Acta Bot. Bras.* 20 (3), 615-624.
- Marschner, H., 1995. *Mineral nutrition on higher plants*. London: Academic Press.
- Martinez, V. E., López, M. F., 2001. Efecto de hidrocarburos em las propiedades físicas y químicas de suelo argiloso. *Terra.* 19 (1), 9-16.
- Mayer, J. L. S., Bona, C., Santos, G, de O., Koehler, H. S., 2005. Impacto do solo contaminado com petróleo no crescimento e desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). In IV Simpósio Nacional e Congresso Latino-americano de Recuperação de Áreas Degradadas, Curitiba, Brasil, Outubro 2005, p. 299-305.

- Méndez-Natera, J. R., Roque, C., Zapata, K., Otahola-Gómez, V., 2004. Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95. Rev. UDO Agr. 4 (1), 66-71.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C., 2004. Phytoremediation in tropics- the effect of crude oil on the growth on tropical plants. Biorremed. J. 8 (3-4), 177-184.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C., 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. Water Air Soil Poll. 165, 195-209.
- Morley, C. P., Mainwaring, K. A., Doerr, S. H., Douglas, P., Llewellyn, C. T., Dekker, L. W., 2005. Organic Compounds at different depths in a sand soil and their role in water repellency. Aust. J. Soil Res. 43 (3), 239-249.
- Oliveira, L. S., 2004. Influência do solo contaminado com petróleo na morfologia e fisiologia de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D., 2000. New development in solid state fermentation: I – bioprocesses and products. Process. Biochem. 35 (10), 1153-1169.
- Peña-Castro, J. M., Barrera-Figueroa, E. B., Fernández-Linares, L., Ruizmedrano, R., 2006. Isolation and identification of up-regulate genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. Plant Sci. 170 (4), p. 724-731.
- Petrobrás, 2003. Caracterização físico-químico preliminar do óleo derramado da REPAR em julho de 2000. Relatório Técnico, Petrobrás, Curitiba, Paraná, Brasil.
- 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. Environ. Pollut. 108 (2), 129-139.
- Proffitt, C. E., Devlin, D. J., Lindsey, M., 1995. Effects of oil on mangrove seedlings grown under different environmental conditions. Mar. Pollut. Bull. 30 (12), 788-793.

- Racine, C. H., 1994. Long-term recovery of vegetation on two experimental crude oil spills in interior Alaska black spruce taiga. *Canad. J. Botany*. 72 (8), 1171-1177.
- Ranwell, D. S., 1968. Extent of damage to coastal habitats due to the torrey canyon incident', In: the biological effects of oil pollution in litoral communities. Field Studies Council. London.
- Rezende, I. M. de, Bona, C., Santos, G. de O., 2005. Efeito do solo contaminado por petróleo na germinação de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). In: cd-rom, 56º Congresso Nacional de Botânica, Curitiba, Brasil, Outubro 2005.
- Rezende, I. M. de., 2006. Efeito do solo contaminado por óleo diesel na germinação de sementes e morfoanatomia de plântulas e tirodendron de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Santos, G. de O., 2006. Crescimento, nutrição e estrutura do lenho juvenil de três espécies florestais com potencial de fitorremediação em solos contaminados com petróleo. Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/7408>
- Silva, M. P., Preussler, K. H., Ribas de Oliveira, C. M., Maranhão, L. T., 2004. monitoramento da influência do derramamento de petróleo por meio da estrutura da folha de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae). In: 55º Congresso Nacional de Botânica, Viçosa, Brasil, Novembro, 2004.
- Souza, L., A., 2003. Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântulas. Editora UEPG, Ponta Grossa.
- Taiz, L., Zeiger, E., 1998. Plant Physiology. Sunderland: Sinauer Associates, Inc Publishers.

Webb, J. W., 1994. Effects of oil on saltmarshes. In: Assessing. Effects, natural recovery, and progress in remediation reserach. Symp. Proc. Gulf of México and Caribbean oil spill in Coastal Ecosystems. 55-61.

Yateem, A., Balba, M. T., El-Nawawy, A. S., Al-Awadhi, N., 1999. Biodegradation on petroleum hydrocarbon in soil as affected by heating and forced aeration. J. Environ. Qual. 26 (4), 1511-1516.

## *Capítulo II*

ESTRUTURA DAS PLÂNTULAS DE *Mimosa pilulifera* Benth  
(LEGUMINOSAE) CRESCENDO EM SOLO CONTAMINADO  
COM PETRÓLEO E SOLO BIORREMEDIADO

## RESUMO

Estrutura das plântulas de *Mimosa pilulifera* Bentham (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado.

A intensidade dos acidentes causados por derramamentos de petróleo tem levado pesquisadores a estudar os efeitos desse poluente sobre os vegetais. A maioria desses trabalhos se refere aos efeitos na germinação e desenvolvimento vegetal. Pouco se sabe sobre os efeitos na estrutura de tecidos e células. Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito do solo contaminado por petróleo e solo biorremediado na anatomia de plântulas de *Mimosa pilulifera* Bentham (Leguminosae). O experimento foi realizado com solo da área da REPAR/PETROBRÁS, município de Araucária-PR, onde ocorreu um vazamento de petróleo. O experimento constou de três tratamentos: solo contaminado com petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado, com cinco repetições. Após 30 dias da semeadura foram coletadas 10 plântulas por tratamento. Foram analisados anatomicamente a raiz, hipocótilo, cotilédone e eofilo e foram realizados testes microquímicos com sudan III, lugol e cloreto férrico. Mensuraram-se o diâmetro do cilindro vascular e a espessura do córtex da raiz, o diâmetro do hipocótilo e a espessura dos cotilédones e eofilos. Constatou-se que a estrutura da raiz e do eofilo de *M. pilulifera* sofreu interferência do solo contaminado e do solo biorremediado, porém as alterações foram menores em solo biorremediado do que em solo contaminado.

Palavras-chave: raiz, hipocótilo, cotilédone, eofilo, hidrocarbonetos.

## ABSTRACT

Structure of the *Mimosa pilulifera* Bentham (Leguminosae) seedling growing in petroleum contaminated soil and bioremediated soil.

The demand and transport of oil and its derivatives have provoked accidents, contaminating extensive areas of the planet. There are some studies on the plants in the contaminated environment. However, the majority of them are relative to the effect in the germination of the seed and the vegetal development. Little is known on the effect of the hydrocarbons in the structure of the tissues and vegetal cells. This work intends to analyse the effect of the ground contaminated by oil and the bioremediated ground on the anatomy of seedlings of *Mimosa pilulifera* Bentham (Leguminosae). The experiment was carried through with ground proceeding from the area of the REPAR/PETROBRÁS, located in Araucária-PR, where a leak of oil occurred in 2000. The experiment consisted of three treatments: petroleum contaminated soil (SC), bioremediated soil (SB) and noncontaminated soil (SNC), with five repetitions. Thirty days after sowing, 10 seedlings were collected for treatment. The root, the hypocotyl, the cotyledon and the eophyll were analysed anatomically and were submitted to microchemical tests with Sudan III, lugol and ferric chloride. The diameter of the vascular cylinder and the thickness of the cortex of the root, the diameter of the hypocotyl and the thickness of the cotyledons and eophylls were measured. It was observed that the structure of the root and of the eophyll of *M. pilulifera* had suffered interference from the contaminated soil and the bioremediated soil, however the alterations were lesser in bioremediated soil than in contaminated soil.

Key words: root, hypocotyl, cotyledon, eophyll, hydrocarbons.

## Introdução

A composição química do petróleo é bastante complexa devido à diversidade de compostos, porém entre os seus principais componentes estão os hidrocarbonetos (Clark & Brown 1977). O petróleo também é constituído por alcanos, cicloalcanos, alcenos, ácidos naftênicos, enxofre, nitrogênio, oxigênio, e menores quantidades de vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio (Baker 1970; Posthuma 1997). Sabe-se que moléculas de hidrocarbonetos pequenas, com baixa viscosidade, penetram com maior facilidade nos tecidos vegetais. Por outro lado, moléculas grandes apresentam maior viscosidade com conseqüente menor penetração nos tecidos vegetais (Baker 1970). Deste modo, o petróleo mais pesado apresenta menor toxicidade às plantas quando comparado ao petróleo mais leve (Dorn *et al.* 1998). A toxicidade do petróleo em relação às plantas pode ocorrer através do contato direto ou absorção de algum composto, como foi registrado por Alkio *et al.* (2005). Estes autores detectaram fenantreno (composto presente no petróleo) no interior de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., e registraram redução no crescimento das raízes, diminuição no tamanho e número de folhas, deformação de tricomas, redução de pêlos radiciais e áreas necrosadas com morte celular.

Muitos outros fatores, ocasionados pela contaminação do ambiente por petróleo, podem interferir na toxicidade às plantas, como por exemplo o tipo de solo, a estação do ano e o tempo que as plantas ficam expostas ao óleo (Baker 1970; Webb 1994; Lin & Mendelsohn 1996; Pezeshki *et al.* 2000). O petróleo também altera as propriedades do solo, reduzindo a disponibilidade de água, de nutrientes e de oxigênio (Ranwell 1968; Cowell 1969; Baker 1970; De Jong 1980; Bossert & Bartha 1985; Pezeshki *et al.* 2000; Martinez & López 2001). Os compostos orgânicos polares, presentes nos hidrocarbonetos, são os prováveis responsáveis pela hidrorrepelência dos solos contaminados (Morley *et al.* 2005), limitando dessa maneira a absorção de água e de nutrientes pela planta. Características

relacionadas à baixa disponibilidade de água, como maior ramificação da raiz, aumento da espessura da parede celular, maior área de espaços intercelulares, redução da área foliar, maior espessura dos tecidos foliares e maior densidade estomática foram registradas nas plantas em solo contaminado por petróleo e seus derivados (Adam & Duncan 1999; Maranhão 2004; Garcia *et al.* 2004; Oliveira 2004; Rodrigues 2005; Santos 2006; Bardelli-da-Silva 2006; Rezende 2006; Maranhão *et al.* 2006). A baixa disponibilidade de nutrientes também está relacionada com a degradação dos hidrocarbonetos por microorganismos, pois durante esse processo os microorganismos competem com as plantas por nutrientes (De Jong 1980; Merkl *et al.* 2004). Desse modo, solos biorremediados com microorganismos devem apresentar teores reduzidos para muitos nutrientes. O petróleo também pode formar uma camada hidrofóbica na superfície do solo, restringindo o movimento de oxigênio, resultando em condições anaeróbicas para as raízes (Pezeshki *et al.* 2000). Mayer *et al.* (2005) sugerem a maior ramificação das raízes com a falta de oxigênio e Larcher (2000), com a redução da disponibilidade de nutrientes.

Existem algumas formas de diminuir o impacto causado pela contaminação ambiental por petróleo e seus derivados, sendo uma delas a biorremediação. A biorremediação tem como objetivo retirar o contaminante do ambiente (solo, ar e água) por meio de organismos vivos (Pandey *et al.* 2000; Collin 2001). Há relatos da diminuição da toxicidade do solo biorremediado, na germinação e desenvolvimento de plantas (Dorn & Salanitro 2000), porém são raros os estudos que relatam a interferência do solo biorremediado em nível celular.

O presente trabalho foi desenvolvido com *Mimosa pilulifera* Bentham, Fabaceae/Leguminosae, que coloniza terrenos úmidos, rasos ou muito alterados mecanicamente (Fowler & Carpanezzi 1998). Essa espécie foi selecionada porque é nativa do local de estudo, que pertence à REPAR/PETROBRÁS, município de Araucária-PR. O

estudo da estrutura da plântula poderá indicar o grau de estresse provocado pelo solo contaminado e pelo solo biorremediado. Diante disso, e considerando-se a escassez de estudos anatômicos em plantas submetidas à contaminação por petróleo, o presente trabalho tem o objetivo de averiguar se há alterações na estrutura da raiz, hipocótilo, cotilédone e eofilo de *M. pilulifera*, sob a influência do solo contaminado por petróleo e do solo biorremediado.

### Material e Métodos

O solo para montagem do experimento foi coletado na área da REPAR/PETROBRÁS que, no ano 2000, foi contaminado com quatro milhões de litros de petróleo. Em 2005, foi coletado solo contaminado com petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado, numa profundidade de zero a 30 cm, em áreas próximas cerca de 5 m uma da outra. O solo contaminado foi coletado de uma área em que se retirou mecanicamente o excesso de petróleo e posteriormente foi isolada, não sofrendo intervenção. Nas áreas com solo biorremediado o petróleo superficial e a vegetação morta foram removidos mecanicamente e o solo vem sendo biorremediado com microorganismos. O solo não contaminado foi coletado de uma área que não foi atingida pelo óleo e é recoberta pela vegetação nativa.

O solo coletado é caracterizado como gleisolo hidromórfico, que apresenta horizonte glei com caráter franco argilo siltoso (Carvalho *et al.* 2003). Informações mais detalhadas sobre as características físico-químicas e o teor de hidrocarbonetos totais do solo estão presentes na Tabela 1. O petróleo existente nesse solo foi caracterizado como do tipo cusiana com perfil parafínico, na faixa predominante de compostos de C<sub>10</sub> a C<sub>14</sub> (Petrobrás 2003) e é um petróleo pesado (informações pessoais).

**Tabela 1** - Atributos físico-químicos e teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) do solo contaminado por petróleo (SC), solo biorremediado (SB) e solo não contaminado (SNC).

	SC	SB	SNC
Areia	24,8	19,7	26,1
Textura (%) Silte	50,0	45,0	52,5
Argila	25,2	35,2	21,3
pH	4,20	5,80	3,70
Alumínio (cmolc dm <sup>-3</sup> )	4,10	0,00	6,00
Cálcio (cmolc dm <sup>-3</sup> )	2,00	16,80	0,40
Magnésio (cmolc dm <sup>-3</sup> )	1,50	1,80	0,20
Potássio (cmolc dm <sup>-3</sup> )	0,24	0,21	0,10
Fósforo (mg dm <sup>-3</sup> )	1,60	1,20	3,50
Carbono (g dm <sup>-3</sup> )	26,9	19,6	23,8
TPH (mg kg <sup>-1</sup> )	13.651	2.004	1.354

O solo coletado foi peneirado, homogeneizado e distribuído em bandejas plásticas. As bandejas foram vedadas e levadas para casa de vegetação, com nebulização intermitente de 15 segundos a cada 30 minutos. As temperaturas máximas e mínimas foram registradas diariamente, tendo a média de 22° C (mínima 9,6° C e máxima 33,2° C). O experimento foi analisado através de um delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos consistiam de solo contaminado por petróleo (SC), solo biorremediado (SB) e solo não contaminado (SNC) e em cada repetição foram semeadas 50 sementes, totalizando 750 sementes. As sementes de *M. pilulifera* foram fornecidas pela Embrapa Florestas, Município de Colombo-PR. Para a superação da dormência tegumentar, as sementes foram imersas em água, com temperatura inicial de 80° C, durante 18 horas (Fowler & Capanezzi 1998), e em seguida semeadas. As plantas foram coletadas 30 dias após a semeadura, quando a maioria apresentava o eofilo completamente expandido. Foram analisadas duas plantas por bandeja, totalizando 10 plantas por tratamento.

As amostras foram fixadas parte em FAA 50 (Johansen 1940) e parte em fixador de Trump (McDowell & Trump 1976). Raízes laterais, incluindo a região pilífera, foram clarificadas em solução de hipoclorito a 20%, coradas com azul de astra (Bukatsch 1972 *apud* Kraus & Arduin 1997) (1% em solução aquosa) e montadas em gelatina glicerinada, entre lâmina e lamínula, para observação dos pêlos radiciais. Para análise anatômica foram processadas amostras da raiz principal (ápice radicial e a um centímetro do ápice), da região mediana do hipocótilo e do terço médio do cotilédone e eofilo.

As amostras foram processadas segundo técnicas usuais para inclusão em hidroxietilmetacrilato (historresina - Leica®). As secções foram obtidas em micrótomo de rotação, distendidas em lâminas e coradas com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1965), azul de astra e safranina (Bukatsch 1972 *apud* Kraus & Arduin 1997) e, em seguida, montadas em resina Permount®. Também foram feitas secções para testes microquímicos com lugol para detecção de amido (Johansen 1940), cloreto férrico para compostos fenólicos (Johansen 1940) e Sudam III para substâncias graxas (Sass 1951). A partir das lâminas permanentes foram mensurados: o raio do córtex e o diâmetro do cilindro vascular da raiz a 1 cm do ápice; o diâmetro do hipocótilo e a espessura dos cotilédones e eofilos. As mensurações foram feitas com auxílio de microscópio com ocular micrometrada.

Para análise da superfície foliar e avaliação do índice estomático, foram preparadas amostras do terço médio do eofilo e processadas para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram fixadas em FAA50 e desidratadas em série etílica. Em seguida, o material foi submetido ao método do ponto crítico no equipamento Balzers CPC 10. Após o ponto crítico, foi efetuada a metalização com ouro no equipamento Balzers Sputtering SCD 030. A análise e o registro eletromicrográfico do material foram efetuados no MEV Jeol JSM-6360LV. A contagem estomática foi feita em imagens com ampliação de 300x.

Os dados morfométricos obtidos foram analisados estatisticamente no programa MSTAT-C<sup>®</sup>. Primeiramente verificou-se a variância dos tratamentos quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett. Posteriormente, as variáveis foram testadas pelo teste F. Quando as análises dos resultados demonstraram diferença estatística entre as médias dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

## Resultados e Discussão

As raízes de *M. pilulifera*, em solo contaminado por petróleo, apresentaram maior densidade de pêlos, sem relação às raízes de solo biorremediado e de solo não contaminado (Fig. 1, 2 e 3). A maior quantidade de pêlos radiciais de *M. pilulifera* pode indicar que houve deficiência na absorção de água, uma vez que a função dos pêlos radiciais é, justamente, aumentar a superfície de absorção da planta (Esau 1998). De acordo com Rosane (1954 *apud* Cutter 1986), a vantagem biológica dos pêlos radiciais é proporcionar o contato com fontes diferentes de água. A maior densidade de pêlos radiciais em *M. pilulifera* também pode estar relacionada à baixa disponibilidade de fósforo. Segundo Ma *et al.* (2001), em *Aradopsis thaliana*, a baixa disponibilidade de fósforo está relacionada à maior densidade de pêlos radiciais, que são importantes para a absorção de fósforo. Bardelli-da-Silva (2006) observou maior formação de pêlos radiciais em *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. & Downs, em solo contaminado por óleo diesel, que relacionou à baixa disponibilidade de água no solo. Alkio *et al.* (2005), através de análises em microscopia de fluorescência, constataram a presença de fenantreno no interior das raízes de *Arabidopsis thaliana*, sugerindo que a absorção do contaminante ocasionou deformação nos pêlos radiciais.

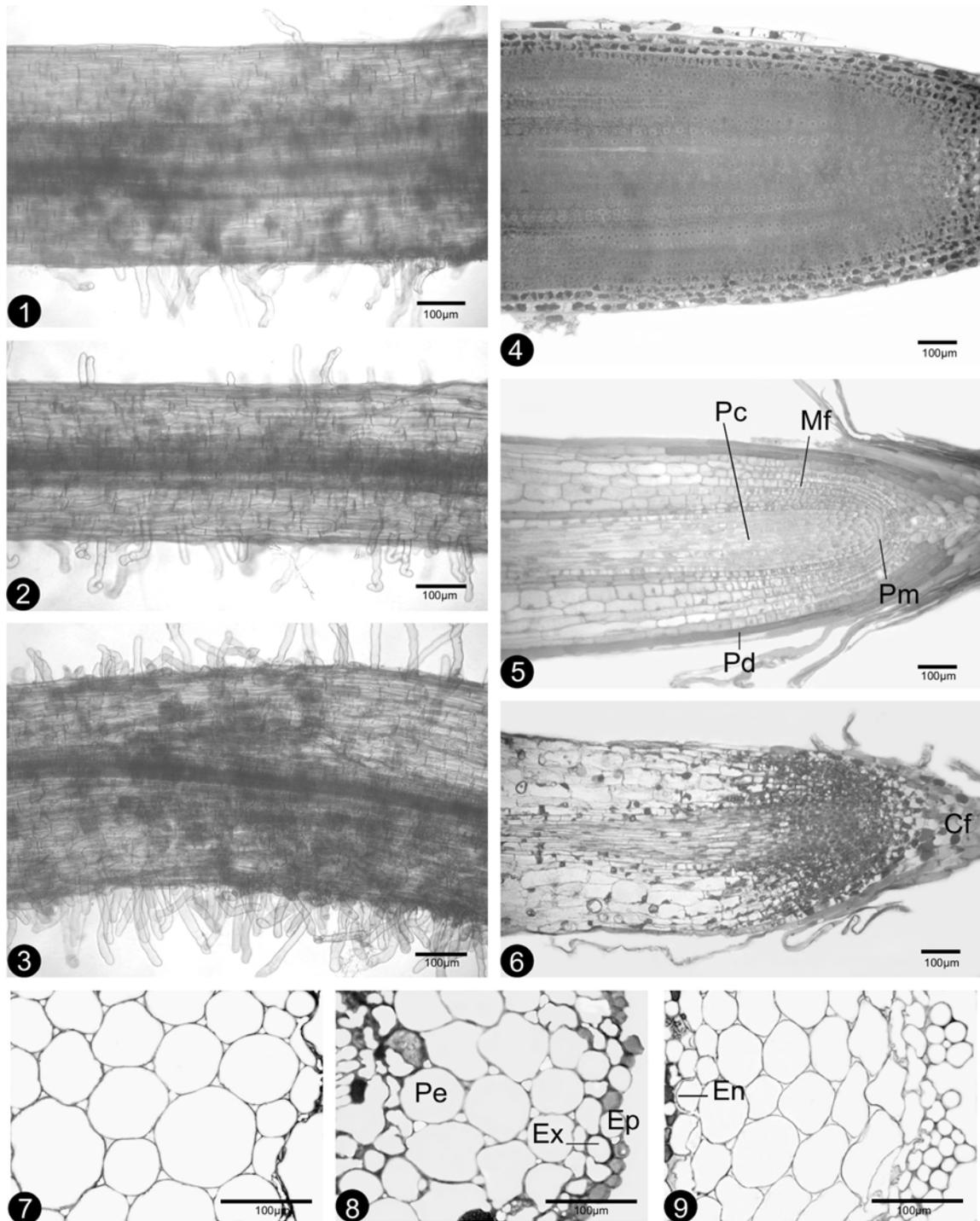
Em secções longitudinais do ápice radicial de *M. pilulifera* observou-se que a região meristemática é menor nas plantas em solo contaminado por petróleo. Por outro lado, nas

plantas que se desenvolveram em solo não contaminado e solo biorremediado, a região meristemática é mais extensa a partir do promeristema e mostra maior número de células em mitose (Fig. 4, 5 e 6). Resultados semelhantes também foram encontrados em *S. commersoniana*, que cresceram em solo contaminado por óleo diesel (Bardelli-da-Silva 2006). Achuba (2006) registrou redução no tamanho das células e na atividade mitótica no meristema apical radicial de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. em solo com petróleo. O autor acredita que esse efeito foi causado por partículas tóxicas presentes no petróleo.

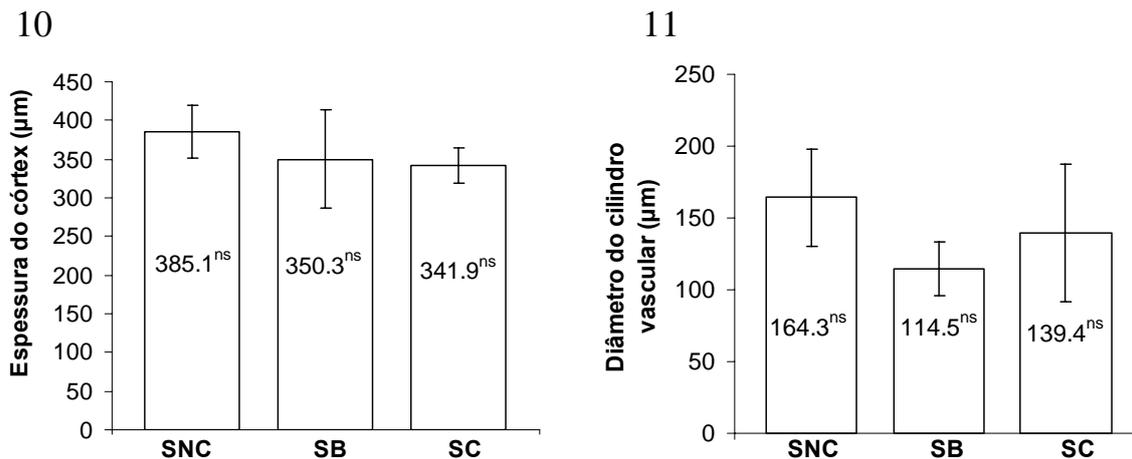
A raiz principal de *M. pilulifera*, cerca de 1 cm do ápice, apresenta epiderme unisseriada (Fig. 7). O córtex é formado por parênquima com reduzidos espaços intercelulares e endoderme com paredes delgadas e estrias de Caspary. O cilindro vascular é tetrarco e as células parenquimáticas do floema apresentam grãos de amido (Fig. 7). Após 30 dias da semeadura, as plantas de todos os tratamentos já apresentavam início de instalação do câmbio na raiz principal (Fig. 7). Na raiz, na região próxima ao colo, a epiderme é gradativamente eliminada, o córtex parenquimático apresenta poucos espaços intercelulares e cilindro vascular com crescimento secundário completamente desenvolvido (Fig. 7).

A raiz de *M. pilulifera* a 1 cm do ápice, em solo contaminado por petróleo e em solo biorremediado, não apresentou alterações na disposição, conteúdo e formato das células (Fig. 7, 8 e 9). O raio do córtex e o diâmetro do cilindro vascular das raízes também não foram alterados pela presença do petróleo no solo ( $p > 0,05$ ) (Fig. 10 e 11). Em solo contaminado por petróleo, as raízes de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Oliveira 2004) e de *Rynchospora corymbosa* (L.) Britton (Farias 2005) também não apresentaram diferenças na disposição dos tecidos e nem danos celulares. Já as raízes de *S. commersoniana* (Bardelli-da-Silva 2006) e de *S. terebinthifolius* (Rezende 2006), em solo com óleo diesel, apresentaram maior diâmetro, maior porcentagem de área lacunar cortical e cilindro vascular mais desenvolvido na mesma região, ou seja, a 1 cm do ápice. De acordo com os mesmos autores, a formação de

aerênquima nas raízes provavelmente deve à falta de oxigênio nos solos contaminados, uma vez que o acúmulo de ar no parênquima cortical está relacionado à diminuição de oxigênio do ambiente, o que resulta na biossíntese de etileno nas raízes (Drew et al. 1979; Drew 1987). Kawase & Whitmoyer (1980) citam que a presença de etileno é fundamental no desenvolvimento de aerênquima do tipo lisígeno, pelo fato de o gás aumentar a atividade da celulase, que atua na desestruturação da parede celular.



**Figuras 1 - 9 -** Raiz de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da sementeira. 1 - 3 – raiz com pêlos radiciais. 4 - 6 – ápices da raiz em seções longitudinais. 7 – 9 – detalhes das raízes em seções transversais. 1, 4 e 7 - solo não contaminado. 2, 5 e 8 - solo biorremediado. 3, 6 e 9 - solo contaminado com petróleo. (Cf: coifa; En: endoderme; Ep: epiderme; Ex: exoderme; Mf: meristema fundamental; Pc: procâmbio; Pm: promeristema).



**Figura 10 e 11** - Raiz de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da semeadura, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). 10 - espessura do córtex. 11 - diâmetro do cilindro vascular. Cada coluna representa a média de cinco repetições e as barras indicam o desvio padrão. <sup>ns</sup>- não significativo.

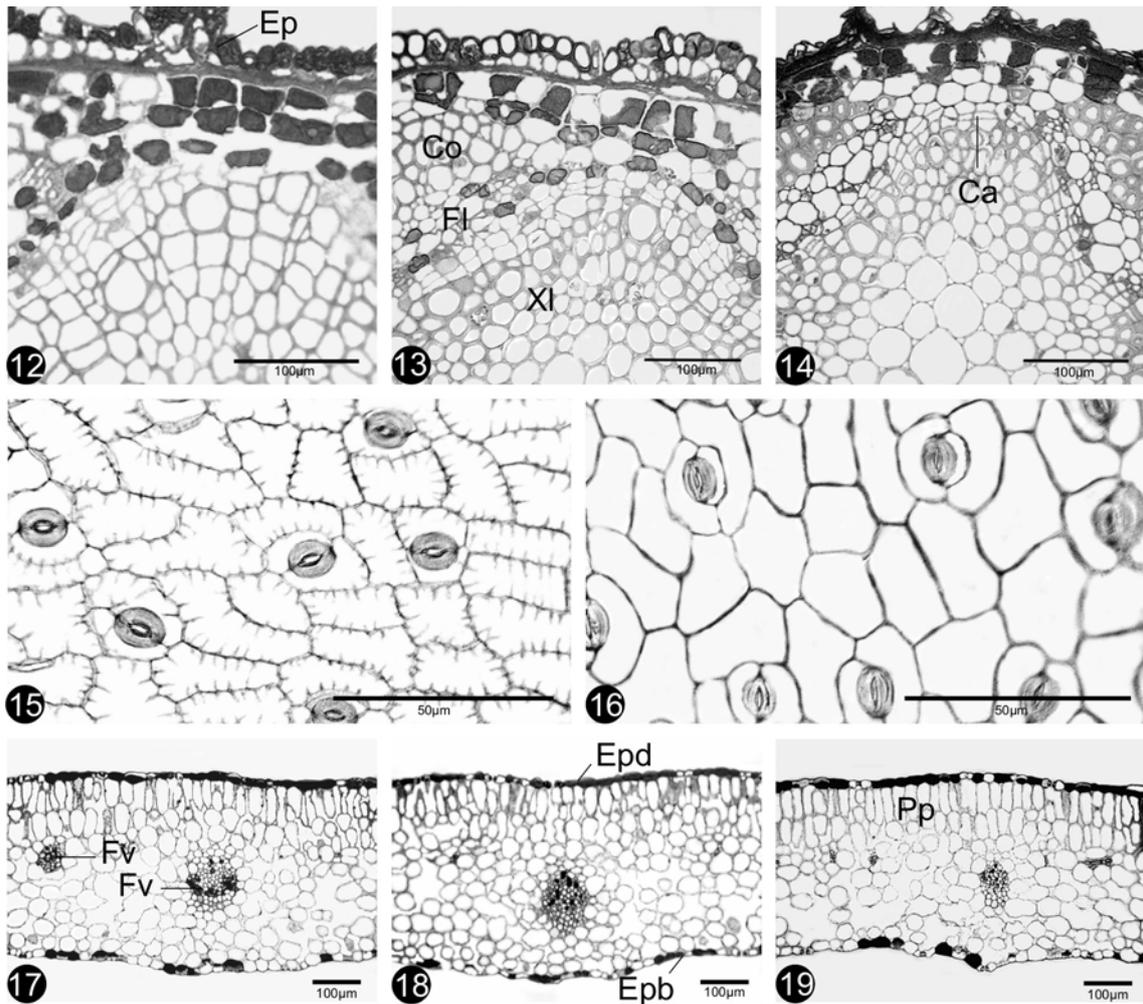
Para *M. pilulifera*, o estresse causado pelo solo contaminado e solo biorremediado da área da REPAR não alterou a quantidade de compostos fenólicos nas plantas, provavelmente devido ao baixo teor de TPH presente nesses solos. Segundo Larcher (2000), os compostos fenólicos são característicos nas plantas que crescem em ambientes estressados. *Schinus terebinthifolius*, desenvolvida em solo contaminado por petróleo há três anos, também na área da REPAR (Oliveira 2004) e por óleo diesel (Rezende 2006), apresentou maiores quantidades de células contendo compostos fenólicos no floema, parênquima axial e radial e nas raízes. Mayer (2005) também registrou um provável aumento de compostos fenólicos e redução de amido nas raízes de plantas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg que cresceram em solo contaminado com petróleo, na área da REPAR. Os diferentes efeitos da contaminação do ambiente nas plantas podem estar relacionados ao intervalo de tempo após a contaminação. Provavelmente, com o passar do tempo, o teor de TPH do solo diminui devido à atividade microbiana (Merkl *et al.* 2004), bem como diminuem os compostos voláteis presentes no óleo diesel (Adam e Duncan 2002), e com isso também diminui o estresse sobre as plantas.

Em secção transversal, o hipocótilo tem contorno sinuoso, a epiderme é unisseriada, finamente cuticularizada e apresenta tricomas tectores simples (Fig. 12). O córtex é composto de colênquima nos ângulos e parênquima circundando todo o cilindro vascular. O parênquima cortical é rico em células secretoras com compostos fenólicos, porém não foi observada diferença na concentração desses compostos entre os tratamentos. Na região do hipocótilo, o câmbio está completamente instalado e há tecido secundário vascular diferenciado (Fig. 12). As células parenquimáticas do xilema e floema apresentam pequena quantidade de grãos de amido, que é semelhante nas plantas de todos os tratamentos. A estrutura celular do hipocótilo de *M. pilulifera* não sofreu alteração no solo contaminado por petróleo nem no solo biorremediado (Fig. 12-14). O diâmetro do hipocótilo das plantas de *M. pilulifera* não apresentou diferença estatística entre os tratamentos ( $p>0,05$ ) (Fig. 20).

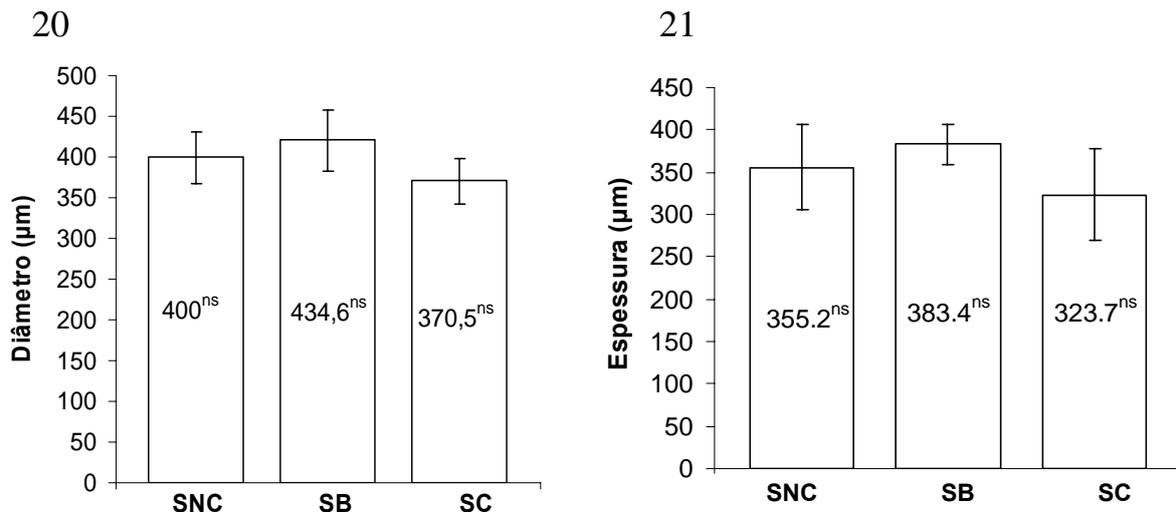
Exemplares adultos de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl. (Maranho 2004) e *S. commersoniana* (Garcia *et al.* 2004), que sofreram o impacto direto do petróleo, apresentaram traqueídes com menor comprimento e diâmetro, menor espessura e grau de lignificação da parede celular. Mudanças de *Mimosa scabrella* Benth., em solo contaminado por petróleo, tiveram menor diâmetro do caule, redução do comprimento de vaso, do diâmetro e da espessura da parede celular de traqueídes, enquanto que essas alterações não foram registradas em *Allophylus edulis* (Saint Hilaire) Radlkofer (Santos 2006). O lenho jovem de *S. commersoniana* e *C. xanthocarpa*, em solo contaminado por petróleo, apresentou redução no comprimento dos elementos de vasos, redução no número de vasos por milímetro quadrado compensada pelo aumento no diâmetro dos vasos, além de maiores concentrações de compostos fenólicos e menores concentrações de amido em *C. xanthocarpa* (Rodrigues 2005). Plantas de *C. xanthocarpa*, com cinco meses de idade, cultivadas em solo contaminado por petróleo, não sofreram alteração no diâmetro do caule (Mayer *et al.* 2005).

Como constatado por Adam & Duncan (2002), o efeito do óleo nas plantas é específico, isto é, cada espécie responde diferentemente à contaminação do ambiente por petróleo.

As células epidérmicas, tanto da face adaxial quanto da face abaxial do cotilédone de *M. pilulifera*, apresentam paredes anticlinais retas a levemente curvas (Fig. 15 e 16). Porém, as células epidérmicas da face adaxial apresentam projeções na parede anticlinal. Ao contrário do que foi descrito por Parras (1984) para *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir, *M. pilulifera* não apresenta tricomas nos cotilédones. O cotilédone é anfiestomático com estômatos paracíticos (Fig. 15 e 16). A região da nervura central é plana na face adaxial e ligeiramente saliente na face abaxial. A epiderme é unisseriada, com conteúdo mucilaginoso abundante e a cutícula é lisa e delgada. O mesofilo apresenta duas camadas de células de parênquima paliçádico e seis a sete camadas de parênquima lacunoso, onde ocorre grande quantidade de grãos de amido e idioblastos lipofílicos (Fig. 17). A vascularização do cotilédone é feita pela nervura central, que possui um único feixe vascular de maior porte, e duas nervuras laterais, cada uma com um feixe de pequeno porte (Fig. 17). Não foram registradas alterações na estrutura dos cotilédones nas plantas dos diferentes tratamentos (Fig. 17-19), e a espessura dos cotilédones também não foi alterada pelo solo contaminado nem pelo solo biorremediado ( $p>0,05$ ) (Fig. 21).



**Figuras 12-19** – *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da sementeira. 12- 14 - Hipocótilo em secção transversal. 12 - solo não contaminado. 13 - solo biorremediado. 14 - solo contaminado por petróleo. 15-19 – cotilédono. 15 e 16 – epiderme das faces adaxial e abaxial, em vista frontal, de solo não contaminado. 17-19 – limbo em secção transversal de solo não contaminado, de solo biorremediado e de solo contaminado por petróleo, respectivamente. (Ca: câmbio; Co: colênquima; Ep: epiderme; Epd: epiderme da face adaxial; Epb: epiderme da face abaxial; Fl: floema; Fv: feixe vascular; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico; Xl: xilema).

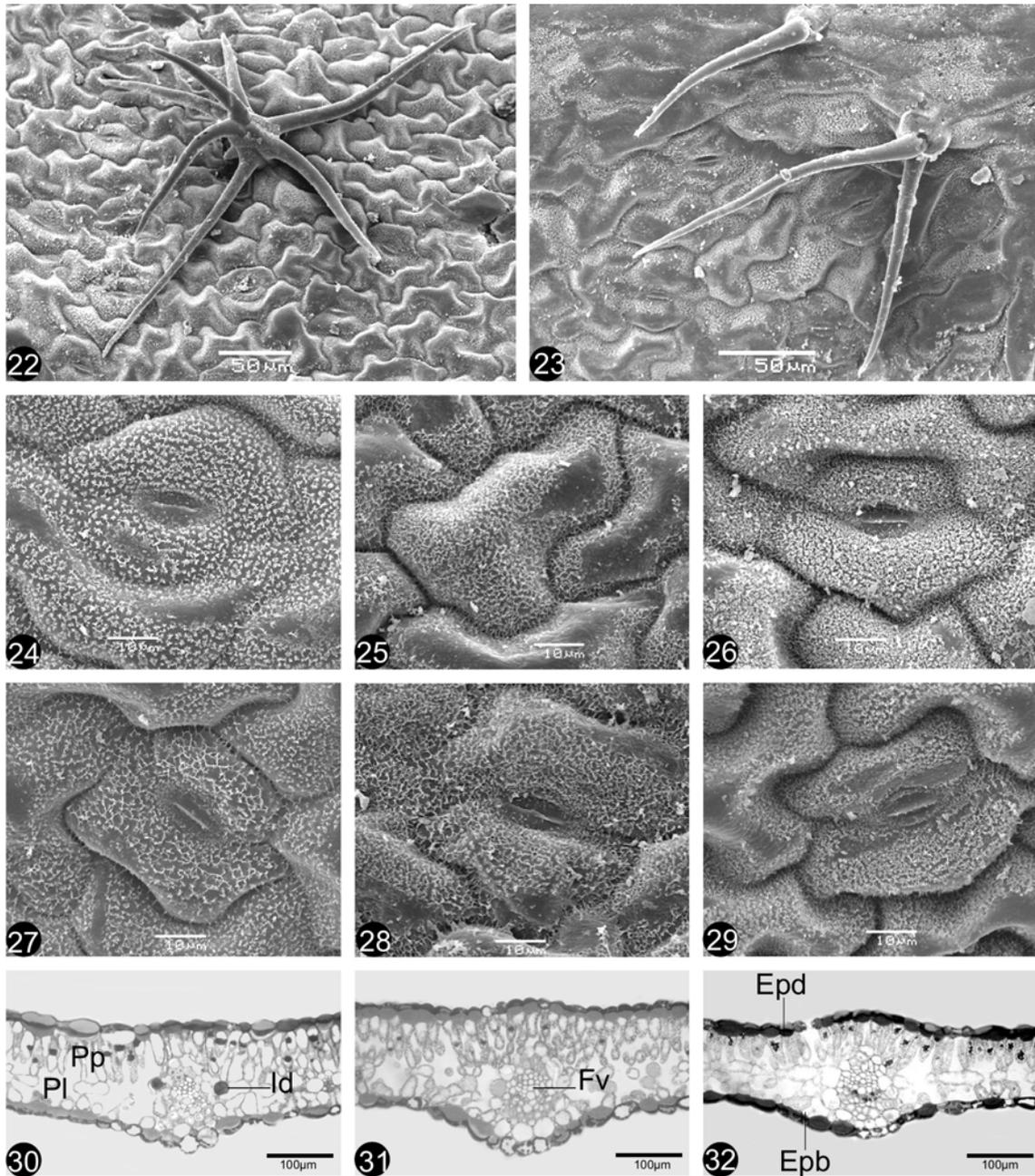


**Figura 20 e 21** - *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da sementeira, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). 20 - diâmetro do hipocótilo. 21- espessura do cotilédone. Cada coluna representa a média de cinco repetições e as barras indicam o desvio padrão. <sup>ns</sup>- não significativo.

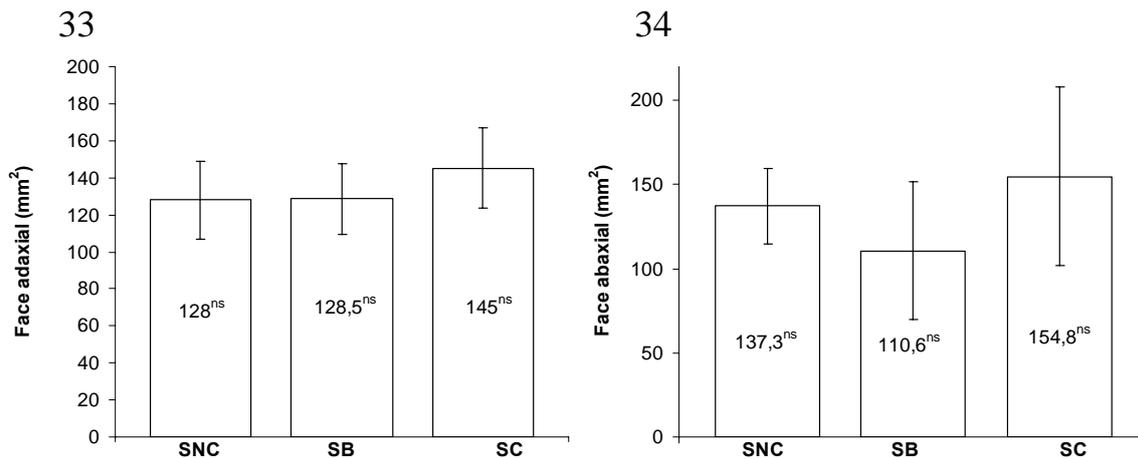
Os eofilos de *M. pilulifera* apresentam estômatos paracíticos (Fig. 22-29) em ambas as faces e maior quantidade de tricomas na face abaxial. Esses tricomas são pluricelulares, ramificados ou não (Fig. 22 e 23), e raramente glandulares. A presença de tricomas estrelados, em folhas adultas de *M. pilulifera*, é citada por Cabrera & Zardini (1978). A estrutura da cera epicuticular (Fig. 24-27) e dos tricomas foram visualmente semelhante entre os tratamentos.

O eofilo de *M. pilulifera* possui epiderme unisseriada, cuticularizada, com células que apresentam conteúdo mucilaginoso, em ambas as faces. A espessura da cutícula foi semelhante entre os tratamentos (Fig. 30-32). O mesofilo é dorsiventral, composto de duas a três camadas de células, sendo uma camada de parênquima paliçádico e uma a duas de parênquima lacunoso (Fig. 30-32). O eofilo apresenta pequena curvatura na face adaxial, sobre a nervura central, e uma proeminência na face abaxial. O sistema vascular é constituído por um feixe colateral maior na nervura central e feixes colaterais menores no restante do limbo. No eofilo também ocorrem idioblastos lipofílicos (Fig. 30).

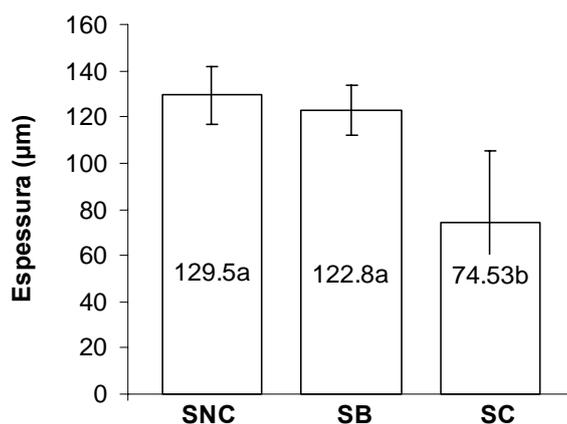
A estrutura celular dos eofilos (Fig. 24-32) e o índice estomático, tanto da face abaxial quanto da face adaxial de *M. pilulifera*, não foram alterados em solo contaminado nem em solo biorremediado ( $p < 0,05$ ) (Fig. 33 e 34). A espessura dos eofilos de *M. pilulifera* foi 42,44% menor em solo contaminado por petróleo, quando comparada com as plantas em solo não contaminado ( $p > 0,05$ ) (Fig. 35). A espessura dos eofilos das plantas em solo biorremediado foi estatisticamente semelhante ao tratamento com solo não contaminado ( $p < 0,05$ ) (Fig. 35). A diminuição na espessura do eofilo de *M. pilulifera*, em solo contaminado, provavelmente se deve ao menor crescimento e biomassa da parte aérea, além da menor área (Capítulo I).



**Figuras 22-32** - Eofilo de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da sementeira. 22-23 - tricomas dos eofilos em solo não contaminado. 24-26 - vista frontal da epiderme da face adaxial. 27-29 - vista frontal da epiderme da face abaxial. 30-32 - secções transversais. 24, 27 e 30 - solo não contaminado. 25, 28 e 31 - solo biorremediado. 26, 29 e 32 - solo contaminado por petróleo. (Epb: epiderme da face abaxial; Epd: epiderme da face adaxial; Fv: feixe vascular; Id: idioblasto; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico).



**Figuras 33 e 34** - Índice estomático do eofilo de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da sementeira, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC), das faces adaxial (28) e abaxial (29). Cada coluna representa a média de cinco repetições e as barras indicam o desvio padrão. <sup>ns</sup> - não significativo.



**Figura 35** - Espessura do eofilo de *Mimosa pilulifera* Bentham, após 30 dias da sementeira, em solo não contaminado (SNC), solo biorremediado (SB) e solo contaminado por petróleo (SC). Cada coluna representa a média de cinco repetições e as barras indicam o desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes baseadas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Como não foram detectadas alterações nas células, nos tricomas e nas cêras epicuticulares de *M. pilulifera*, é provável que o nível de toxicidade do solo contaminado por petróleo seja baixo para essa espécie. Alkio *et al.* (2005) detectaram deformações nos tricomas e lesões nas folhas de *Arabidopsis thaliana*, provocadas pela penetração do fenantreno na planta. Os eofilos de *S. commersoniana* que cresceram em solo recém-

contaminado por óleo diesel apresentaram deformações epidérmicas e redução das ceras epicuticulares (Bardelli-da-Silva 2006). O referido autor acredita que esse efeito se deve aos componentes voláteis do óleo diesel. Eofilos de *S. terebinthifolius*, em solo contaminado com óleo diesel, apresentaram, principalmente na face abaxial, células deformadas, cutícula alterada e maior número de camadas de células de parênquima lacunoso, além de algumas células do mesofilo com compostos fenólicos (Rezende 2006). Segundo Adam & Duncan (2002), os compostos voláteis presentes no óleo diesel são os prováveis responsáveis pela maior alteração nas células da face abaxial. Provavelmente, o solo contaminado utilizado no experimento com *M. pilulifera* não apresenta composto voláteis. Este fato pode estar relacionado à ausência de alterações na superfície epidérmica. Folhas adultas de *P. lambertii*, expostas à contaminação do solo por petróleo, sofreram aumento na espessura do limbo devido ao aumento no tamanho e número de células do parênquima, além de maior índice estomático (Maranho *et al.* 2006). Folhas de *S. commersoniana*, expostas ao derramamento de petróleo, apresentaram maior índice estomático, maior espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial e ocorrência de canais traumáticos, sendo essas alterações, de acordo com os autores, respostas adaptativas às condições de estresse hídrico causado pela contaminação do solo por petróleo (Silva *et al.* 2004).

A menor espessura do primeiro eofilo de *M. pilulifera*, em solo contaminado por petróleo, relacionada à menor biomassa e área foliar (Capítulo I), pode estar evidenciando mais uma deficiência nutricional do que estresse hídrico. Isso porque o experimento foi desenvolvido em ambiente constantemente úmido e pela ausência de características anatômicas xeromórficas nos eofilos.

## Conclusão

O solo contaminado por petróleo e o solo biorremediado da área da REPAR afetaram negativamente a estrutura da raiz e do eofilo das plântulas de *M. pilulifera*, evidenciando-se, entretanto, que o solo biorremediado foi menos fitotóxico.

## Agradecimentos

Agradecemos à EMBRAPA pela doação das sementes e à PETROBRÁS pelo fornecimento do solo.

## Referências bibliográficas

- Achuba, F. I. 2006. The effect of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of Cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *The Environmentalist*. 26: 17-20.
- Adam, G. & Duncan, H. J. 1999. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health*. 21: 353-357.
- Adam, G. & Duncan, H. J. 2002. Influence on diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*. 120: 363-370.
- Alkio, M.; Tabuchi, T. M.; Wang, X.; Colón-Carmona, A. 2005. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany*, 56 (421): 2983-2994.
- Baker, J. M. 1970. The effects of oils on plants. *Environmental Pollution*. 1 (1): 27-44.
- Bardelli-da-Silva, M. Y. 2006. Influência do solo contaminado com óleo diesel na germinação, crescimento e morfo-anatomia de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. & Downs (Euphorbiaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- Bossert, J. & Bartha, R. 1985. Plant growth in soils with a history of oily sludge disposal. *Soil Science*. 140 (1): 75-77.
- Cabrera, A. L. & Zardini, E. M. 1978. Manual de la Flora de los Alrededores de Buenos Aires. ACME, Buenos Aires, 755p.
- Carvalho, F. J. P. C.; Castro, R. A. C.; Abdanur, A.; Krenczynki, M. C.; Teixeira, S. C.; Coneglian, D. 2003. Relatório sobre o monitoramento do solo contaminado. Repar/SMS.

- Clark, JR. R. C. & Brown, D. N. 1977. Petroleum properties and analyses in biotic and abiotic systems. In: Malis, D. C. Effects of petroleum on Arctic and Subarctic environments in organisms. 1 Nature and fate of petroleum. New York: Academic Press.
- Collin, P. H. 2001. Dictionary of Ecology and the Environment. London: Peter Collin Publishing. 560p.
- Cowell, E. B. 1969. The effects of oil pollution on salt-marsh communities in pembrokeshire and cornwall. Journal of Applied Ecology. 6 (2): 133-142.
- Cutter, E. 1986. Anatomia Vegetal: Parte I – Células e tecidos. 2 ed. Roca, São Paulo.
- De Jong, E. 1980. The effect of a crude oil spill on cereals. Environmental Pollution. 22: 187-196.
- Dorn, P. B. & Salanitro, J. P. 2000. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. Chemosphere. 40: 419-426.
- Dorn, P. B.; Vipond, T. E.; Salanitro, J. P.; Wisniewski, H. L. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox and plants. Chemosphere. 35: 845-860.
- Drew, M. C. 1987. Mechanisms of acclimation to flooding and oxygen shortage in non-wetland species In: R. M. M. Crawford, "Plant life in aquatic and amphibious habitats", Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Drew, M. C.; Jacson, M. B.; Giffard, S. 1979. Ethylene promoted adventitious root and the development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. Planta. 147: 83-88.
- Farias, L. H. M. 2005. Efeitos do solo contaminado por petróleo nas folhas e raízes de *Rhynchospora corymbosa* (L.) Britt. (Cyperaceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Fowler, J. A. P. & Carpanezzi, A. A. 1998. Tratamento para superação da dormência de *Mimosa pilulifera* Benth. Comunicado Técnico. 30: 1-3.
- Garcia, F. A.; Rocha, B. C.; Preussler, K. H.; Oliveira, C. M. R.; Maranhão, L. T. 2004. Monitoramento dos efeitos da poluição por petróleo pela estrutura do lenho de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae). In: 55º Congresso Nacional de Botânica (Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES), 2004, Viçosa, MG: UFV, CD-ROM.
- Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Kawase, M.; Whitmoyer, R.E. 1980. Aerenchyma development in waterlogged plants. American Journal of Botany. 67: 18-22.
- Kawase, M. & Whitmoyer, R.E. 1980. Aerenchyma development in waterlogged plants. American Journal of Botany. 67: 18-22.

Kraus, E. J. & Arduin, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Edur, Rio de Janeiro.

Larcher, W. 2000. Ecofisiologia Vegetal. RiMa, São Carlos, 335p.

Lin, Q. & Mendelssohn, I. A. 1996. A comparative investigation of the effects of South Louisiana crude oil on the vegetation of fresh, brackish, and salt marshes. Marine Pollution Bulletin. 32 (2): 202-209.

Ma, Z.; Bielenberg, D. G.; Brown, K. M.; Lynch, J. P. 2001. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. Plant, Cell and Environmentalist. 24, 459-467.

Maranho, L. T. 2004. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha e do lenho de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl. (Podocarpaceae). Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Maranho, L. T.; Galvão, F.; Preussler, K. H.; Muñiz, G.; Kuniyoshi, Y. S. 2006. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. Acta Botanica Brasilica. 20 (3): 615-624.

Martinez, V. E. & López, M. F. 2001. Efecto de hidrocarburos em lãs propiedades físicas y químicas de suelo argiloso. Terra. 19 (1): 9-16.

Mayer, J. L. S.; Bona, C.; Santos, G, de O.; Koehler, H. S. 2005. Impacto do solo contaminado com petróleo no crescimento e desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). In: IV Simpósio Nacional e Congresso Latino-americano de Recuperação de Áreas Degradadas, Curitiba, Brasil, Outubro 2005, p. 299-305.

Mayer, J. L. S. 2005. Impacto do solo contaminado com petróleo no crescimento e desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae). Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade federal do Paraná.

McDowell, E. M. & Trump, B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 100: 405-414.

Merkl, N.; Schultze-Kraft, R.; Infante, C. 2004. Phytoremediation in tropics- the effect of crude oil on the growth on tropical plants. Biorremediation Journal. 8 (3-4): 177-184.

Merkl, N.; Schultze-Kraft, R.; Infante, C. 2005. Assesment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. Water Air Soil Pollution. 165: 195-209.

Morley, C. P.; Mainwaring, K. A.; Doerr, S. H.; Douglas, P.; Llewellyn, C. T.; Dekker, L. W. 2005. Organic Compounds at different depths in a sand soil and their role in water repellency. Australian Journal of Soil Research. 43 (3): 239-249.

- O'Brien, T.P.; Feder, N.; McCully, M.E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. 59 (2): 368-373.
- Oliveira, L. S. 2004. Influência do solo contaminado com petróleo na morfologia e fisiologia de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Pandey, A.; Soccol, C. R.; Mitchell, D. 2000. New development in solid state fermentation: I – bioprocesses and products. *Process biochemistry*, Vandoeuvre-les-Nancy. 35 (10): 1153-1169.
- Parras, P. G. 1984. Estudio de la morfología externa de plantulas de *Calliandra gracilis*, *Mimosa albida*, *Mimosa arenosa*, *Mimosa camporum* y *Mimosa tenuiflora*. *Revista da Faculdade Agrônômica*. 8 (1-4): 311-350.
- Petrobrás. 2003. Caracterização físico-químico preliminar do óleo derramado da REPAR em julho de 2000. Relatório Técnico, Petrobrás, Curitiba, Paraná, Brasil.
- 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 (2): 129-139.
- Posthuma, J. 1997. The composition of petroleum. *Rapp. P. V. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 171 (1): 7-16.
- Ranwell, D. S. 1968. Extent of damage to coastal habitats due to the torrey canyon incident', in: the biological effects of oil pollution in litoral communities. *Field Studies Council*. 39- 47p.
- Rezende, I. M. de. 2006. Efeito do solo contaminado por óleo diesel na germinação de sementes e morfoanatomia de plântulas e tirodendron de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- Rodrigues, T. T. 2005. Os efeitos do solo contaminado por petróleo na estrutura anatômica e estado nutricional do lenho jovem de *Campomanesia xanthocarpa* (Euphorbiaceae) e *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm & Downs (Euphorbiaceae). Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- Santos, G. de O. 2006. Crescimento, nutrição e estrutura do lenho juvenil de três espécies florestais com potencial de fitorremediação em solos contaminados com petróleo. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/7408>
- Sass, J. E. 1951. *Botanical microtechnique*. 2ed. Iowa State College Press, Iowa, 228p.
- Silva, M. P.; Preussler, K. H.; Ribas de Oliveira, C. M.; Maranhão, L. T. 2004. Monitoramento da Influência do derramamento de petróleo por meio da estrutura da folha de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae). In: 55º Congresso Nacional (Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES), Viçosa, MG: UFV, CD-ROM.

Webb, J. W. 1994. Effects of oil on saltmarshes. In: Assessing. Effects, natural recovery, and progress in remediation reserach. Symp. Proc. Gulf of México and Caribbean oil spill in Coastal Ecosystems. 55-61.

## 5. Referências Bibliográficas

- ACHUBA, F. I. The effect of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of Cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. **The Environmentalist**, v. 26, p. 17-20, 2006.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. J. Effect of diessel fuel on growth of selected plant species. **Enviromenment Geochemistry and Health**, v. 21, p. 353-357, 1999.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. J. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 363-370, 2002.
- ALEXANDER, S. K. WEBB JR., J. W. Seasonal response of *Spartina alterniflora* to oil. In: OIL SPILL CONFERENCE (PREVENTION, BEHAVOIR, CONTROL, CLEANUP. **Proceedings in American Petroleum Institute**. Los Angeles, 1984. p. 355-357.
- ALKIO, M., TABUCHI, T. M., WANG, X., COLÓN-CARMONA, A. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2983-2994, 2005.
- APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnaean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.
- BAEK, K.; KIM, H.; OH H.; YOOM, B.; KIM, J.; LEE, I. Effects of crude oil, oil components and bioremediation on plant growth. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 39, n. 9, p. 2465-2476, 2004.
- BAKER, J. M. The effects of oils on plants. **Environmental Pollution**, v. 1, n. 1, p. 27-44, 1970.
- BARDELLI-DA-SILVA, M. Y. **Influência do solo contaminado com óleo diesel na germinação, crescimento e morfo-anatomia de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. & Downs (Euphorbiaceae)**. Curitiba, 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- BARNEBY, R. C. Sensitivae censitae; a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the New World. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 65, p. 1 – 835, 1991.
- BONA, C.; SANTOS, G. O. **Adaptações morfo-fisiológicas de espécies vegetais crescendo em solo contaminado com petróleo**. Curitiba: FUNPAR – UFPR, 2003. Relatório Técnico.
- BOSSERT, J., BARTHA, R. Plant growth in soils with a history of oily sludge disposal. **Soil Science**, v. 140, n. 1, p. 75-77, 1985.

BUSCA 2004. **Folha do Paraná e Gazeta do Povo**. Busca sobre poluição por óleo diesel no Paraná. Disponível em: <<http://www.ambicenter.com.br/petrobras.htm>>. Acesso em 24 de novembro de 2004.

BUSCA 2004. **Libreria**. Busca por poluição por petróleo. Disponível em: <[http://www.libreria.com.br/ortal/artigos/ambiente/pol\\_mares/05.shtml](http://www.libreria.com.br/ortal/artigos/ambiente/pol_mares/05.shtml)>. Acesso em 5 de dezembro de 2004.

CHUPAKHINA, G. N.; MASLENNIKOV, P. V. Plant adaptation to oil stress. **Russian Journal of Ecology**, v. 35, n. 5, p. 290-295, 2004.

CLARK, JR. R. C., BROWN, D. N. Petroleum properties and analyses in biotic and abiotic systems. In: MALIS, D. C. **Effects of petroleum on Arctic and Subarctic environments in organisms. 1 Nature and fate of petroleum**. New York: Academic Press, 1977.

COLLIN, P. H. **Dictionary of Ecology and the Environment**. London: Peter Collin Publishing, 2001, 560p.

COWELL, E. B. The effects of oil pollution on salt-marsh communities in Pembrokeshire and Cornwall. **Journal of Applied Ecology**, v. 6, n. 2, p. 133-142, 1969.

De JONG, E. The effect of a crude oil spill on cereals. **Environmental Pollution**, v. 22, p. 187-196, 1980.

DORN, P. B.; SALANITRO, J. P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. **Chemosphere**, v. 40, p. 419-426, 2000.

DORN, P. B.; VIPOND, T. E.; SALANITRO, J. P.; WISNIEWSKI, H. L. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox and plants. **Chemosphere**, v. 35, p. 845-860, 1998.

FOWLER, J. A. P.; CARPANEZZI, A. A. Tratamento para superação da dormência de *Mimosa pilulifera* Benth. **Comunicado Técnico**. v. 30, p. 1-3, 1998.

GALLEGOS MATRINEZ, M.; GÓMEZ, SANTOS, A.; ZÁLES CRUZ, L.; MONTES DE OCA GARCIA, M. A.; YANEZ TRUJILLO, L.; ZERMENO EGUIA LIZ, J. A.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swamp. **Water Science Technology**, v. 42, n. 5-6, p. 377-384, 2000.

GARCIA, F. A.; ROCHA, B. C.; PREUSSLER, K. H.; OLIVEIRA, C. M. R.; MARANHO, L. T. Monitoramento dos efeitos da poluição por petróleo pela estrutura do lenho de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae). In: **55º Congresso Nacional de Botânica (Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES)**, 2004, Viçosa, MG: UFV, CD-ROM.

GOGOSZ, A. M.; BONA, C.; BOTOSSO, P. C.; SANTOS, G. de O. Análise da germinação de sementes e crescimento inicial de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. In: **57º Congresso Nacional de Botânica**, 2006, Gramado, RS: UFRS, CD-ROM.

GUDIN, C.; SYRATT, W. J. Biological aspects of land rehabilitation following hydrocarbon contamination. **Environmental Pollution**, v. 8, n. 1, p. 107-112, 1975.

HUGUENIN, M. T.; HAURY, D. H.; WEISS, J. C.; HELTON, D.; MANEN, C.; REINHARZ, E.; MICHEL, J. **Injury assessment – guidance document for natural resource damage assessment under the oil pollution act of 1990**. Damage Assessment and restoration Program National oceanic and Atmospheric Administration Maryland, 1996. 222p. Disponível em: <<http://ntl.bts.gov/lib/2000/2000/2028/iad.pdf>> Acesso em ago. de 2005.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000.

MARANHO, L. T. **Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha e do lenho de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl. (Podocarpaceae)**. Curitiba, 2004. 201 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

MARANHO, L. T.; GALVÃO, F.; PREUSSLER, K. H.; MUÑIZ, G.; KUNIYOSHI, Y. S. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 615-624, 2006.

MARTINEZ, V. E.; LÓPEZ, M. F. Efecto de hidrocarburos em las propiedades físicas y químicas de suelo argiloso. **Terra**, v. 19, n. 1, p. 9-16, 2001.

MAYER, J. L. S. BONA, C. B.; SANTOS, G. de O.; KOEHLER, H. S. Impacto do solo contaminado com petróleo no crescimento e desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). In: IV Simpósio Nacional e Congresso Latino-americano de Recuperação de Áreas Degradadas, p 299- 305, 2005, Curitiba, Paraná.

MÉNDEZ-NATERA, J. R., ROQUE, C.; ZAPATA, K.; OTAHOLA-GÓMEZ, V. A. Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95. **Revista UDO Agrícola**, v. 4, n. 1, p. 66-71, 2004.

MERKL, N., SCHULTZE-KRAFT, R., INFANTE, C. Phytoremediation in tropics- the effect of crude oil on the growth of tropical plants. **Biorremediation Journal**, v. 8, n. 3-4, p. 177-184, 2004.

MERKL, N., SCHULTZE-KRAFT, R., INFANTE, C. Assesment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 165, p. 195-209, 2005.

OLIVEIRA, L. S. **Influência do solo contaminado com petróleo na morfologia e fisiologia de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)**. Curitiba, 2004. 63 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New development in solid state fermentation: I – bioprocesses and products. **Process biochemistry**, Vandoeuvre-les-Nancy, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PEÑA-CASTRO, J. M.; BARRERA-FIGUEROA, E. B.; FERNÁNDEZ-LINARES, L.; RUIZMEDRANO, R. Isolation and identification of up-regulate genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. **Plant Science**, v. 170, n. 4, p. 724-731, 2006.

PEZESHKI, S. R., HESTER, M. W., LIN, Q., NYMAN, J. A. The effects of oil spill and clean-up on dominant Us Gulf coast marsh macrophytes: a review. **Environmental Pollution**, v. 108, n. 2, p. 129-139, 2000.

POSTHUMA, J. The composition of petroleum. **Rapp. P. V. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.**, v. 171, n. 1, p. 7-16, 1997.

RACINE, C. H. Long-term recovery of vegetation on two experimental crude oil spills in interior Alaska black spruce taiga. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, n. 8, p. 1171-1177, 1994.

RANWELL, D. S. Extent of demange to coastal habitats due to the Torrey Canyon incident. In: The Biological Effects of Oil Pollution in Litoral Communities. **Field Studies Council**. London, n. 39, p. 47, 1968.

REIS, J. C. **Environmental control in petroleum Engineering**. Haunton: Gulg Prof. Publ. 1996, 400 p.

REZENDE, I. M. de. **Efeito do solo contaminado por óleo diesel na germinação de sementes e morfoanatomia de plântulas e tirodendron de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae)**. Curitiba, 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

REZENDE, I. M. de.; BONA, C. SANTOS, G. de O. Efeito do solo contaminado por petróleo na germinação de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae). In: **56° Congresso Nacional de Botânica**, 2005, Curitiba, PR: UFPR, CD-ROM.

RODRIGUES, T. T. **Os efeitos do solo contaminado por petróleo na estrutura anatômica e estado nutricional do lenho jovem de *Campomanesia xanthocarpa* (Euphorbiaceae) e *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm & Downs (Euphorbiaceae)**. Curitiba, 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade federal do Paraná.

ROY, J. L.; MCGILL, W. BH. A.; JOHNSON, RL. L. Relationship between water repellency and native and petroleum-derived organic carbon in soils. **Journal Environmental Quality**, v. 32, n. 2, p. 583-590, 2003.

SANTOS, G. de O.; REISSMANN, C. B.; BONA, C.; BOBKO, A. J. Crescimento e desenvolvimento de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.) em solo contaminado por petróleo. In: **55° Congresso Nacional (Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES)**, 2004, Viçosa, MG: UFV, CD-ROM.

SILVA, M. P.; PREUSSLER, K. H.; RIBAS DE OLIVEIRA, C. M.; MARANHO, L. T. Monitoramento da Influência do derramamento de petróleo por meio da estrutura da folha de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae). In: **55º Congresso Nacional (Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES)**, 2004, Viçosa, MG: UFV, CD-ROM.

SOUZA FILHO, A. M. **Planos Nacionais de Contingência para Atendimento a derramamento de Óleo: Análises de Países representativos das Américas para Implantação no caso do Brasil**. Rio de Janeiro, 2006. 217f. Tse (Dissertação de mestrado em Engenharia). Universidade Federal do rio de Janeiro – COPPE.

SOUZA, L., A. **Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântulas**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc Publishers, 1998. 792p.

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

## **ANEXO I**

---

## Guide for Authors

### Submission of Papers

All manuscripts should be submitted electronically through Elsevier Editorial System (EES) which can be accessed at <http://ees.elsevier.com/chem>.

With the submitted manuscript authors are requested to **provide full contact details of four potential reviewers** including email addresses. The suggested reviewers should not be people at the same institution as the author, Chemosphere Editors or Editorial Board members, and at least two should be from other geographic regions.

**During submission papers should be marked for the attention of a subject Editor or the relevant section, if possible. Failure to provide this information will significantly delay processing of the manuscript.**

### IMPORTANT INFORMATION BEFORE SUBMISSION.

1. Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, and/or similar content, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher. By the same token, papers previously published in proceedings or any other journal in any other language should not be submitted without significant modification.

2. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out.

3. It is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects, and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

4. Conflict of Interest/Full Disclosure: To allow scientists, the public and policy makers to make more informed judgements about published research, Chemosphere adopts a strong

policy on conflicts of interest and disclosure. Authors should acknowledge all sources of funding and any direct financial benefits that could result from publication. Editors likewise require reviewers to disclose current or recent association with authors and any other special interest in this work.

### **Types of Contributions**

*Chemosphere* accepts Research Papers, Review Papers, Short Communications, Letters to the Editor, Replies and Discussion Papers. Please note that papers with a routine nature and lacking originality, novelty and uniqueness will not be accepted for publication. A Short Communication should be of significant scientific merit (a novel finding that warrants immediate publication).

### **Manuscript Preparation**

**General:** Manuscripts must be in double-spaced form with wide margins. A font size of 12 pt is required. The corresponding author should be identified (include a Full postal address, Fax number and E-mail address). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

**Line Numbers:** To facilitate the review process continuous line numbers should be inserted in the text of the manuscript.

**Paper Length:** The Editors generally encourage brevity for all Research Papers. Short Communications must not exceed 4 printed pages and will be given priority for rapid publication. Research papers should not exceed 6000 words. Word counts include text, references, figures and tables. Each figure or table should be considered equal to 300 words. The number of figures and/or tables should not exceed seven. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections.

**Abstracts:** Abstracts should not exceed 250 words, and should not contain any references.

**Keywords:** 4-6 keywords must be included on a separate line below the main abstract and labelled 'Keywords'. To optimise searching, avoid key words already used in the title.

**Text:** Follow this order when composing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Text, Acknowledgements, Appendix, References, Figure Captions, Figures and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

**Units:** Use SI Units. If other units are necessary, include the conversion factor and add the non-standard unit in parenthesis. Units should be in the form, e.g.  $\text{g cm}^{-1}$  rather than  $\text{g/cm}$ .

**Symbols:** Define in text. Place extensive list of symbols in an appendix.

**Maths:** Avoid double suffix. Punctuate carefully. Stack numerators over denominators e.g.  $\frac{dy}{dx}$  and not  $dy/dx = a + bx$ .

**Abbreviations:** Please follow the standard guide for abbreviation as given in "Guidelines for use of technical abbreviations and acronyms in Chemosphere" at [http://www.elsevier.com/framework\\_products/promis\\_misc/362abbreviations.htm](http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/362abbreviations.htm).

**References:** All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to: The author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Since Peterson (1993) has shown that..." or "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1994; Tusseau-Vuillemin et al., 1998; Brito and Melo, 1999)"). Please follow the chronological order. For three or more authors use the first author followed by "et al." in the text.

The list of references should be arranged alphabetically by authors' names. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. The Harvard system of references must be used. International abbreviations should be used for journal names as determined by ISI. For a listing please refer to: <http://library.caltech.edu/reference/abbreviations>. If the journal is not included in the ISI list, a second consultation on <http://in-cites.com/journal-list/index.html> is recommended. References should therefore be given in the following form: *Journal article:* Tusseau-Vuillemin, M., Mortier, L., Herbaut, L., 1998. Modeling nitrate

fluxes in an open coastal environment: Transport versus biogeochemical processes. *J. Geophys. Res.* 103, 7693-7708.

*Book:* Cressie, N., 1991. *Statistics for Spatial Data*. John Wiley, New York.  
*Article or chapter in edited book:* Jeffries, P., Barea, J.M., 1994. Biochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil systems. In: Gianinazzi, S., Schuepp, H. (Eds.). *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Systems*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 101-115.

Format for personal communication: Smith, J., Personal communication. References to personal correspondence or to unarchived material obtained from the World Wide Web are discouraged. "Anonymous" is not acceptable as an author. Citations in other languages are discouraged.

#### **Illustrations:**

- All illustrations must be readable when reduced to a width of 75 mm (single column figure) or 160 mm (double column figure)

- Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text.

- All illustrations should be clearly marked with the figure number. All figures are to have a caption.

- *Line drawings:* Lines should be black, of an adequate thickness (around 1 pt) and curves should be smooth. Particularly, lines of spectra should be of sufficient thickness. Shading (tints) that simulate grey should not be used and replaced by line shading (hatched)

*Photographs:* Photographs are to be avoided, if possible. Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

*Colour:* Colour illustrations will be accepted; however, the authors will be expected to make a contribution towards the extra printing cost. Apply to the Author Services at the Publisher for details of cost. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on

the web (e.g., Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

**Tables:** Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

**Multimedia Files:** Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article on Science Direct:  <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Miscellaneous**

Be careful about the use of significant figures; provide concise description about QA/QC of your data; use periods for your decimal points; define acronyms when they first appear in the text; be consistent in the format of your unit expressions.

### **Language editing**

Information on author-paid and pre-accept language editing services available to authors can be found at <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing>.

Authors in Japan kindly note: upon request Elsevier Japan will provide a list of people who can check and improve the English of an article (before submission). Please contact our

Tokyo office: Elsevier Japan K.K., 1-9-15 Higashi Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; tel.: +81-3-5561-5032; fax: +81-3-5561-5045; e-mail: [jp.info@elsevier.com](mailto:jp.info@elsevier.com).

### **Proofs**

PDF proofs will be sent by e-mail to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and corrections should be returned promptly.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

### **Copyright**

All authors must sign the "Transfer of Copyright" agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, without the author relinquishing his/her proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of a similar nature, and translations. It also includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any material for which copyright already exists.

### **Disclosure Politics**

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com)) that your work has received NIH funding and that you

intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

### **Online Publication**

Your article will appear on Elsevier's online journal database ScienceDirect as an "Article in Press" within approximately 4-6 weeks of acceptance. Articles in Press for this journal can be viewed at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00456535>. An Article in Press may be cited prior to its publication by means of its unique digital object identifier (DOI) number, which does not change throughout the publication process.

### **Author Services**

For queries relating to the submission of articles (including electronic submission) and the status of accepted manuscripts, please contact Author Services, Log-in Department, Elsevier, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK. E-mail: [authors@elsevier.co.uk](mailto:authors@elsevier.co.uk), Fax: +44 (0) 1865 843905, Tel: +44 (0) 1865 843900. Authors can also keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature.

## **ANEXO II**

---

### **Encaminhamento dos manuscritos**

Os manuscritos devem ser enviados em 3 vias impressas e em CD-ROM à:

*Revista Rodriguésia*

*Rua Pacheco Leão 915*

*Rio de Janeiro – RJ*

*CEP: 22460-030*

*Brasil*

*e-mail: rodriguesia@jbrj.gov.br*

Os artigos devem ter no máximo 30 páginas digitadas, aqueles que ultrapassem este limite poderão ser publicados após avaliação do Corpo Editorial. O aceite dos trabalhos depende da decisão do Corpo Editorial.

Todos os artigos serão submetidos a 2 consultores *ad hoc*.

Aos autores será solicitado, quando necessário, modificações de forma a adequar o trabalho às sugestões dos revisores e editores. Artigos que não estiverem nas normas descritas serão devolvidos.

Serão enviadas aos autores as provas de página, que deverão ser devolvidas ao Corpo Editorial em no máximo 5 dias úteis a partir da data do recebimento. Os trabalhos, após a publicação, ficarão disponíveis em formato digital (PDF, AdobeAcrobat) no site do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (<http://rodriguesia.jbrj.gov.br>).

### **Formato dos manuscritos**

Os autores devem utilizar o editor do texto Microsoft Word, versão 6.0 ou superior, fonte Times New Roman, corpo 12, em espaço duplo.

O manuscrito deve ser formatado em tamanho A4, com margens de 2,5 cm e alinhamento justificado, exceto nos casos indicados abaixo, e impresso em apenas um lado do papel. Todas as páginas, exceto a do título, devem ser numeradas, consecutivamente, no canto superior direito. Letras maiúsculas devem ser utilizadas apenas se as palavras exigem iniciais maiúsculas, de acordo com a respectiva língua do manuscrito. Não serão considerados manuscritos escritos inteiramente em maiúsculas.

Palavras em latim devem estar em itálico, bem como os nomes científicos genéricos e infragenéricos.

Utilizar nomes científicos completos (gênero, espécie e autor) na primeira menção, abreviando o nome genérico subsequente, exceto onde referência a outros gêneros cause confusão. Os nomes dos autores de táxons devem ser citados segundo Brummitt & Powell (1992), na obra “Authors of Plant Names”.

**Primeira página** - deve incluir o título, autores, instituições, apoio financeiro, autor e endereço para correspondência e título abreviado. O título deverá ser conciso e objetivo, expressando a idéia geral do conteúdo do trabalho. Deve ser escrito em negrito com letras maiúsculas utilizadas apenas onde as letras e as palavras devam ser publicadas em maiúsculas.

**Segunda página** - deve conter Resumo (incluindo título em português ou espanhol), Abstract (incluindo título em inglês) e palavras-chave (até 5, em português ou espanhol e inglês). Resumos e abstracts devem conter até 200 palavras cada. O Corpo Editorial pode redigir o Resumo a partir da tradução do Abstract em trabalhos de autores não fluentes em português.

**Texto** – Iniciar em nova página de acordo com seqüência apresentada a seguir: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências Bibliográficas. Estes itens podem ser omitidos em trabalhos sobre a descrição de novos táxons, mudanças nomenclaturais ou similares. O item Resultados pode ser agrupado com Discussão quando mais adequado. Os títulos (Introdução, Material e Métodos etc.) e subtítulos deverão ser em negrito. Enumere as figuras e tabelas em arábico de acordo com a seqüência em que as mesmas aparecem no texto. As citações de referências no texto devem seguir os seguintes exemplos: Miller (1993), Miller & Maier (1994), Baker *et al.* (1996) para três ou mais autores ou (Miller 1993), (Miller & Maier 1994), (Baker *et al.* 1996).

Referência a dados ainda não publicados ou trabalhos submetidos deve ser citada conforme o exemplo: (R.C. Vieira, dados não publicados). Cite resumos de trabalhos apresentados em Congressos, Encontros e Simpósios se estritamente necessário.

O material examinado nos trabalhos taxonômicos deve ser citado obedecendo a seguinte ordem: local e data de coleta, fl., fr., bot. (para as fases fenológicas), nome e número do coletor (utilizando *et al.* quando houver mais de dois) e sigla(s) do(s) herbário(s) entre parêntesis, segundo o *Index Herbariorum*.

Quando não houver número de coletor, o número de registro do espécime, juntamente com a sigla do herbário, deverá ser citado. Os nomes dos países e dos estados/províncias deverão ser citados por extenso, em letras maiúsculas e em ordem alfabética, seguidos dos respectivos materiais estudados.

Exemplo:

BRASIL. BAHIA: Ilhéus, Reserva da CEPEC, 15.XII.1996, fl. e fr., *R. C. Vieira et al.* 10987 (MBM, RB, SP).

Para números decimais, use vírgula nos artigos em Português e Espanhol (exemplo: 10,5 m) e ponto em artigos em Inglês (exemplo: 10.5 m). Separe as unidades dos valores por um espaço (exceto em porcentagens, graus, minutos e segundos).

Use abreviações para unidades métricas do Systeme International d'Unités (SI) e símbolos químicos amplamente aceitos. Demais abreviações podem ser utilizadas, devendo ser precedidas de seu significado por extenso na primeira menção.

**Referências Bibliográficas** - Todas as referências citadas no texto devem estar listadas neste item. As referências bibliográficas devem ser relacionadas em ordem alfabética, pelo sobrenome do primeiro autor, com apenas a primeira letra em caixa alta, seguido de todos os demais autores. Quando houver repetição do(s) mesmo(s) autor(es), o nome do mesmo deverá ser substituído por um travessão; quando o mesmo autor publicar vários trabalhos num mesmo ano, deverão ser acrescentadas letras alfabéticas após a data. Os títulos de periódicos não devem ser abreviados.

Exemplos:

Tolbert, R. J. & Johnson, M. A. 1966. A survey of the vegetative shoot apices in the family Malvaceae. *American Journal of Botany* 53(10): 961-970.

Engler, H. G. A. 1878. Araceae. *In*: Martius, C. F. P. von; Eichler, A. W. & Urban, I. *Flora brasiliensis*. Munchen, Wien, Leipzig, 3(2): 26-223.

\_\_\_\_\_. 1930. Liliaceae. *In*: Engler, H. G. A. & Plantl, K. A. E. *Die Naturlichen Pflanzenfamilien*. 2. Aufl. Leipzig (Wilhelm Engelmann). 15: 227-386.

Sass, J. E. 1951. *Botanical microtechnique*. 2ed. Iowa State College Press, Iowa, 228p.

Cite teses e dissertações se estritamente necessário, isto é, quando as informações requeridas para o bom entendimento do texto ainda não foram publicadas em artigos científicos.

Tabelas - devem ser apresentadas em preto e branco, no formato Word for Windows. No texto as tabelas devem ser sempre citadas de acordo com os exemplos abaixo:

“Apenas algumas espécies apresentam indumento (Tab. 1)...”

“Os resultados das análises fitoquímicas são apresentados na Tabela 2...”

**Figuras** - não devem ser inseridas no arquivo de texto. Submeter originais em preto e branco e três cópias de alta resolução para fotos e ilustrações, que também podem ser enviadas em formato eletrônico, com alta resolução, desde que estejam em formato TIF ou compatível com CorelDraw, versão 10 ou superior. Ilustrações de baixa qualidade resultarão na devolução do manuscrito.

No caso do envio das cópias impressas a numeração das figuras, bem como textos nelas inseridos, devem ser assinalados com Letraset ou similar em papel transparente (tipo manteiga), colado na parte superior da prancha, de maneira a sobrepor o papel transparente à prancha, permitindo que os detalhes apareçam nos locais desejados pelo autor. Os gráficos devem ser em preto e branco, possuir bom contraste e estar gravados em arquivos separados em disquete (formato TIF ou outro compatível com CorelDraw 10). As pranchas devem possuir no máximo 15 cm larg. x 22 cm comp. (também serão aceitas figuras que caibam em uma coluna, ou seja, 7,2 cm larg.x 22 cm comp.). As figuras que excederem mais de duas vezes estas medidas serão recusadas.

As imagens digitalizadas devem ter pelo menos 600 dpi de resolução.

No texto as figuras devem ser sempre citadas de acordo com os exemplos abaixo:

“Evidencia-se pela análise das Figuras 25 e 26...”

“Lindman (Fig. 3) destacou as seguintes características para as espécies...”

Após feitas as correções sugeridas pelos assessores e aceito para a publicação, o autor deve enviar a versão final do manuscrito em duas vias impressas e em uma eletrônica.

## **ANEXO III**

---

Tabela AIII. 1: Número de sementes germinadas por dia e a soma de sementes germinadas por repetição de *Mimosa pilulifera* em solo contaminado com petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado.

	Solo Contaminado					Solo Biorremediado					Solo não Contaminado				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	2	2	2	0	5	1	1	5	0	1	1	5	2	3	4
2	25	27	4	10	23	23	24	19	14	24	20	23	19	25	21
3	13	15	2	19	13	12	11	15	16	16	18	9	14	14	11
4	3	2	13	4	1	0	1	2	8	3	1	7	4	1	4
5	0	0	2	2	2	3	1	0	2	0	0	0	1	4	0
6	1	0	2	1	2	0	0	1	0	0	0	1	2	0	1
7	0	0	2	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1
8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Soma	40	45	43	47	42	40	38	42	42	44	40	45	43	47	42

Tabela AIII. 2: Porcentagem de germinação (%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de *Mimosa pilulifera* em solo contaminado com petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado.

	Solo Contaminado		Solo Biorremediado		Solo não Contaminado	
	%	IVG	%	IVG	%	IVG
1	90	21,96	88	19,08	84	19,475
2	72	12,9	84	15,02	94	21,217
3	62	9,179	84	20,167	86	17,8
4	92	21	76	17,117	90	21,417
5	88	19,75	80	17,2	80	17,250
Média	80,8	16,958	82,4	17,717	86,8	19,432
EP	3,86	1,61	3,86	1,61	3,86	1,61
DP	13,16	5,62	4,56	1,99	5,40	1,91

Tabela AIII. 3: Análise de variância dos dados referentes as variáveis de germinação de *Mimosa pilulifera*.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio	
		Porcentagem de germinação	Índice de velocidade de germinação
Tratamento	2	48,267	8,032
Erro	12	74,4	13,037
Total	14	-----	-----
	Coefficiente de variação (%)	10,35	20,02
	Qui-quadrado ( $\chi^2$ )	4,913	5,723

Tabela AIII. 4: Área foliar (cm<sup>2</sup>) e biomassa foliar (g) do primeiro eofilo de *Mimosa pilulifera*, após 30 dias da semeadura, em solo contaminado com petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado.

	Solo Contaminado		Solo Biorremediado		Solo não Contaminado	
	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Biomassa foliar (g)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Biomassa foliar (g)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Biomassa foliar (g)
1	0,74	0,28	0,87	0,283	1,86	0,532
2	0,86	0,196	0,90	0,406	1,40	0,510
3	1,14	0,258	0,64	0,274	1,41	0,496
4	0,57	0,243	0,94	0,332	1,09	0,450
5	0,79	0,288	1,27	0,336	1,20	0,472
Média	0,82	0,253	0,92	0,326	1,39	0,492
EP	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02
DP	0,02	0,04	0,02	0,05	0,03	0,03

Tabela AIII. 5: Análise de variância dos dados referentes as variáveis: área foliar e biomassa do eofilo de *Mimosa pilulifera*.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio	
		Área foliar	Biomassa
Tratamento	2	0,005	0,075
Erro	12	0,001	0,002
Total	14	-----	-----
	Coefficiente de variação (%)	23,52	11,58
	Qui-quadrado ( $\chi^2$ )	0,493	0,999

Tabela AIII. 6: Comprimento aéreo (cm) e biomassa aérea (g), de *Mimosa pilulifera*, após 30, 60 e 90 dias da semeadura, em solo contaminado com petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado.

	Solo Contaminado						Solo Biorremediado						Solo não Contaminado					
	Comprimento aéreo (cm)			Biomassa aérea (g)			Comprimento aéreo (cm)			Biomassa aérea (g)			Comprimento aéreo (cm)			Biomassa aérea (g)		
	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90
1	2,30	2,12	2,43	0,6	0,51	0,64	2,63	3,32	3,26	1,00	1,37	1,58	2,55	3,47	3,66	1,16	1,25	2,56
2	2,08	1,93	2,57	0,63	0,49	0,81	2,57	2,60	2,80	0,75	1,06	1,21	2,58	2,98	3,40	1,31	1,54	1,64
3	2,42	1,93	1,95	0,64	0,51	0,47	2,68	2,93	3,33	1,01	1,17	1,64	2,78	2,80	4,75	1,39	1,10	2,00
4	1,85	2,18	2,16	0,53	0,61	0,55	2,05	2,23	3,03	0,72	1,00	1,00	2,68	3,02	4,15	1,31	1,15	2,50
5	2,10	2,10	2,40	0,64	0,60	0,75	2,70	2,83	3,03	1,02	0,77	1,38	2,35	3,12	3,40	1,28	1,47	1,39
Média	2,15	2,05	2,30	0,61	0,54	0,64	2,53	2,78	3,09	0,90	1,07	1,36	2,59	3,08	3,87	1,29	1,30	2,02
EP	0,10	0,13	0,17	0,05	0,08	0,15	0,10	0,13	0,17	0,05	0,08	0,15	0,10	0,13	0,17	0,05	0,08	0,15
DP	0,22	0,12	0,25	0,05	0,19	0,14	0,27	0,40	0,21	0,15	0,22	0,26	0,16	0,25	0,58	0,08	0,06	0,52

Tabela AIII. 7: Análise de variância dos dados referentes as variáveis ao desenvolvimento da parte aérea de *Mimosa pilulifera*.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio					
		Comprimento aéreo			Biomassa aérea		
		30 dias	60 dias	90 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Tratamento	2	0,281	1,394	3,081	0,585	0,756	2,361
Erro	12	0,049	0,079	0,147	0,011	0,036	0,118
Total	14	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Coefficiente de variação (%)	9,15	10,67	12,40	11,07	119,43	25,65
	Qui-quadrado ( $\chi^2$ )	0,937	4,749	4,507	4,522	4,577	5,486

Tabela AIII. 8: Comprimento (cm) e biomassa radicular (g) de *Mimosa pilulifera*, após 30, 60 e 90 dias da semeadura, em solo contaminado com petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado.

	Solo Contaminado						Solo Biorremediado						Solo não Contaminado					
	Comprimento radicular (cm)			Biomassa radicular (g)			Comprimento radicular (cm)			Biomassa radicular (g)			Comprimento radicular (cm)			Biomassa radicular (g)		
	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90
1	11,37	9,32	12,8	0,84	1,22	1,14	12,95	11,88	12,63	0,73	1,07	1,38	10,43	10,98	15,50	0,64	1,28	1,08
2	11,42	9,58	13,0	0,86	0,95	1,08	12,45	12,07	11,45	0,79	1,14	1,25	10,52	13,67	14,00	0,69	1,10	1,40
3	11,05	11,2	11,0	0,67	1,02	1,10	12,17	13,10	14,00	0,64	1,42	2,11	9,03	13,18	12,80	0,68	1,04	1,66
4	9,68	9,00	12,0	0,60	1,06	0,96	11,63	13,15	14,50	0,75	1,15	1,40	9,22	10,95	13,50	0,71	1,30	1,40
5	9,05	9,58	11,9	0,92	0,96	1,61	10,25	12,32	12,60	0,70	1,71	1,61	7,12	11,83	13,00	0,53	1,07	1,25
Média	10,51	9,74	12,14	0,78	1,04	1,18	11,89	12,5	13,04	0,72	1,30	1,55	9,26	12,12	13,76	0,65	1,16	1,36
EP	0,53	0,42	0,47	0,04	0,08	0,12	0,53	0,42	0,47	0,04	0,08	0,12	0,53	0,42	0,47	0,04	0,08	0,12
DP	1,08	0,85	0,8	0,14	0,11	0,25	1,03	0,59	1,22	0,06	0,27	0,34	1,38	1,25	1,08	0,07	0,12	0,21

Tabela AIII. 9: Análise de variância dos dados referentes as variáveis ao desenvolvimento radicular de *Mimosa pilulifera*.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio					
		Comprimento radicular			Biomassa radicular		
		30 dias	60 dias	90 dias	30 dias	60 dias	90 dias
<b>Tratamento</b>	2	8,626	11,251	3,293	0,021	0,082	0,173
<b>Erro</b>	12	1,379	0,881	1,096	0,009	0,033	0,074
<b>Total</b>	14	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	<b>Coefficiente de variação (%)</b>	11,12	8,19	8,06	13,2	15,49	20,04
	<b>Qui-quadrado (<math>\chi^2</math>)</b>	0,359	1,976	0,635	3,104	3,617	0,799

Tabela AIII. 10: Espessura do córtex da raiz (EC), diâmetro do cilindro vascular da raiz (DCV) e diâmetro total do hipocótilo (DT) de *Mimosa pilulifera* após 30 dias da semeadura, em solo contaminado com petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado.

	Solo Contaminado			Solo Biorremediado			Solo não Contaminado		
	EC	DCV	DT	EC	DCV	DT	EC	DCV	DT
	$\mu\text{m}$								
1	323,7	107,9	380,0	332,0	116,2	439,9	340,3	149,4	403,4
2	373,5	132,8	406,7	448,2	116,2	431,6	373,5	141,1	346,8
3	332,0	116,2	375,2	273,9	83,00	421,5	423,,3	149,4	400,1
4	356,0	116,2	356,9	340,3	132,8	356,9	373,5	157,7	413,2
5	323,7	224,1	333,5	356,9	124,5	453,2	415,0	224,10	433,3
Média	341,88	139,44	370,5	350,26	114,54	420,6	385,12	164,34	399,4
EP	19,37	15,98	14,56	19,37	15,98	14,56	19,37	15,98	14,56
DP	22,2	48,18	27,28	63,05	18,93	37,47	34,02	33,92	32,10

Tabela AIII. 11: Espessura do cotilédone (EC), espessura do eofilo (EE), índice estomático (IE) da epiderme da face adaxial (AD) e da epiderme da face abaxial (AB) de *Mimosa pilulifera* após 30 dias da semeadura, em solo contaminado com petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado.

	Solo Contaminado				Solo Biorremediado				Solo não Contaminado			
	EC	EE	IE		EC	EE	IE		EC	EE	IE	
			AD	AB			AD	AB			AD	AB
		$\mu\text{m}$	$\text{mm}^2$			$\mu\text{m}$	$\text{mm}^2$			$\mu\text{m}$	$\text{mm}^2$	
1	315,4	19,47	133,3	120	390,1	116,2	143,3	153,3	381,8	124,5	163,3	153,3
2	381,8	90,3	160	173,3	381,8	107,9	120	113,3	298,8	116,2	96,6	133,3
3	356,9	116,2	193,3	237,3	415,0	132,8	146	86,6	307,1	149,4	146,6	120
4	323,7	107,9	120	1106,6	381,6	124,5	100	133,3	415,0	132,8	133,3	113,3
5	240,7	132,8	120	133,3	348,6	132,8	133,3	48,6	375,5	124,5	100	166,6
Média	323,7	74,53	145,3	154,8	383,42	122,84	128,53	110,6	355,24	129,48	128	137,3
EP	19,92	9,07	1,81	2,74	19,92	9,07	1,81	2,74	19,92	9,07	1,81	2,74
DP	53,47	30,94	21,39	53,13	23,77	10,82	18,93	40,9	50,28	12,59	21,13	22,39

Tabela AIII. 12: Análise de variância dos dados referentes as variáveis: espessura do córtex da raiz, diâmetro do cilindro vascular da raiz e diâmetro do hipocótilo, espessura do cotilédone, espessura do eofilo e índice estomático da epiderme da face adaxial e da face abaxial de *Mimosa pilulifera*.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio						
		Espessura do córtex	Diâmetro do cilindro vascular	Diâmetro do hipocótilo	Espessura do cotilédone	Espessura do eofilo	Índice estomático	
							Adaxial	Abaxial
<b>Tratamento</b>	2	2629,28	3100,05	3169,352	4462,803	4497,185	72,873	437,453
<b>Erro</b>	12	1875,11	1276,762	1059,531	1984,090	410,890	109,646	249,8
<b>Total</b>	14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	<b>Coefficiente de variação (%)</b>	12,06	25,63	8,20	12,58	18,61	20,18	30,67
	<b>Qui-quadrado (<math>\chi^2</math>)</b>	3,841	2,798	0,359	2,334	4,905	0,951	2,401