



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS**

**SIMBIOSSES RADICULARES E A FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO  
CONTAMINADO POR RESÍDUOS OLEOSOS DE REFINARIA DE PETRÓLEO**

**RICARDO APARECIDO BENTO**

**SEROPÉDICA - RJ  
Fevereiro, 2008**

**RICARDO APARECIDO BENTO**

**SIMBIOSSES RADICULARES E A FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO  
CONTAMINADO POR RESÍDUOS OLEOSOS DE REFINARIA DE PETRÓLEO**

“Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.”

**Sob a orientação do Dr. Orivaldo José Saggin Júnior**

**Seropédica, RJ**

**2008**

**SIMBIOSES RADICULARES E A FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO  
CONTAMINADO POR RESÍDUOS OLEOSOS DE REFINARIA DE PETRÓLEO**

**RICARDO APARECIDO BENTO**

“Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.”

Aprovada em: 15/02/2008

Banca Examinadora

---

Orientador: Dr. Orivaldo José Saggin Júnior – Pesquisador Embrapa Agrobiologia

---

Titular: Dra. Eliane Maria Ribeiro da Silva – Pesquisadora Embrapa Agrobiologia

---

Titular: Dr. Paulo Sérgio dos Santos Leles – Prof. Adjunto UFRRJ

***DEDICO***

Aos meus pais: Sr. Antônio Emílio Bento e Sra. Neusa Aparecida Rodrigues.

Ao meu irmão: Jefferson Alexandre Rodrigues.

Aos meus familiares.

Aos meus amigos do bairro, do alojamento e turma.

Ao meu orientador e co-orientadores.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por estar sempre me acompanhando nos meus desafios da vida, reforçando minha fé e minha espiritualidade;

Aos meus pais orgulhosos: Antônio Emílio Bento e Neusa Aparecida Rodrigues e meu irmão e suas filhas: Jefferson Alexandre Rodrigues, Pamela Vieira Rodrigues e Bruna Vieira Rodrigues, por me apoiar, incentivar, acreditar e investir em mais uma conquista;

A toda minha família pelo incentivo e estimulação nos estudos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de estudo e toda a estrutura oferecida para minha formação acadêmica;

Aos professores da UFRuralRJ, principalmente, os do Instituto de Florestas, pela dedicação e ensino;

Ao professor Dr. Edvã Oliveira Brito pela orientação durante os dois projetos montados na área de Tecnologia da Madeira;

À Flora Júnior – Empresa Júnior de Engenharia Florestal pela oportunidade de fazer uma atividade extra-curricular, aumentando minha experiência profissional;

À Embrapa Agrobiologia pela oportunidade de estágio e iniciação científica;

Ao técnico do Laboratório de Micorrizas da Embrapa Agrobiologia Itamar Garcia Inácio pela ajuda, atenção e disposição nos momentos de trabalho árduo;

Aos amigos do Laboratório de Micorrizas: Ranusa Coffler, Cândido, Elias, Cristiane, Guilherme Angeline, Anita Bueno, Marinei Simões, Tatiana Ferreira e Raphael Anthero pelas trocas de experiências e descontração na hora do cafezinho e das confraternizações.

Às pesquisadoras da Embrapa Agrobiologia Rosa Pitart, Dra. Rosângela Straliootto e Dra. Eliane Maria Ribeiro da Silva pela co-orientação no desenvolvimento do projeto de pesquisa;

Ao meu orientador Dr. Orivaldo José Saggin Júnior pela paciência, dedicação, atenção, amizade e orientação durante os meus dois anos e sete meses de estágio na Embrapa Agrobiologia;

Ao pesquisador da Embrapa Solos Dr. Sílvio R. de L. Tavares e aos pesquisadores e técnico do CENPES/PETROBRAS – Dra. Antonia G. T. Volpon, Dr. Luíz Fernando Martins e Frederico H. T. G. de Landa pela troca de conhecimento e parceria durante a realização do projeto de pesquisa nº 01.02.1.02.09.07;

À Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento – FAPED pela gestão dos recursos financeiros originados do projeto;

À PETROBRAS pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa ao qual esteve inserido minha bolsa de iniciação científica;

Aos meus amigos do alojamento M4, principalmente os quartos 412 e 432 onde morei durante os cinco anos na Rural: Curumim (Curu) por ter cedido a vaga no alojamento, Gilsonley por ser o colega de quarto que mais tempo me aturou e aos meus amigos de turma Pedro Adnet e Felipe Cunha Neto pelo convívio e amizade no novo quarto;

A minha turma tão especial que juntos conseguimos vencer mais uma etapa de nossas vidas, a graduação em Engenharia Florestal; agradeço com orgulho os trabalhos que fizemos juntos, a companhia nos estudos de madrugada, as festas e momentos de descontração, pela estadia em suas casas, enfim, que de alguma forma foram os mais presentes: Pedro Adnet, Jolmerson Medeiros, Elisa Theodoro, Tharcia Ribeiro, Viviane Patrícia, Juliana Torres, Monise Aguilar, Júlia Kishida, Felipe Cunha Neto, Mariana Vilas Boas, Luana Bianquinni, Rafael Mayer, Patrícia Caldas, Rafaela Oliveira, Rafael (Zézinho), Piero, Kátia Ueoka, Renata Botelho, Renata Patrícia, Raquel, Alessandro de Paula e Gustavo Marton;

A minha namorada, Roselane Nascimento, pelo companheirismo e carinho nas horas mais importantes;

E a todos que não foram citados e de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica.

*“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”*

*Louis Pasteur*

*“O homem não morre quando deixa de viver, mas quando deixa de amar”*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

### SIMBIOSSES RADICULARES E A FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR RESÍDUOS OLEOSOS DE REFINARIA DE PETRÓLEO

A fitorremediação utiliza sistemas vegetais para recuperar águas e solos contaminados por poluentes orgânicos ou inorgânicos. Essa técnica, aliada à biorremediação, que tem por objetivo criar condições favoráveis para o crescimento e atividade de bactérias e fungos, foi aplicada em um experimento com solo contaminado por resíduos oleosos provenientes de Refinaria de Petróleo. O objetivo deste trabalho foi selecionar leguminosas arbóreas e microrganismos simbiotes com potencial para remover, degradar, reter e/ou imobilizar hidrocarbonetos de petróleo contaminantes no solo. Para isso foram testadas sete espécies de leguminosas arbóreas (*Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze, *Acacia auriculiformis* A. Cunn. Ex Benth, *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don, *Acacia mangium* Willd, *Mimosa artemisiana* Heringer & Paula, *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth e *Samanea saman* (Jacq.) Merr (sinonímia *Albizia saman*), em solo com cinco níveis de contaminação por petróleo bruto (0, 10, 30, 50, e 70 g.kg<sup>-1</sup>), todas inoculadas com uma mistura de cinco espécies de FMAs – Fungos Micorrízicos Arbusculares (*Gigaspora margarita*, *Entrophospora contigua*, *Scutellospora calospora*, *Scutellospora heterogama* e *Glomus clarum*) e um coquetel de 15 isolados de rizóbios (13 isolados de área contaminada na Refinaria Duque de Caxias e mais duas estirpes indicadas para cada leguminosa). Todos os vasos receberam 5g do condicionador de solo hidrogel (Stockosorb 500<sup>®</sup>). Das sete leguminosas arbóreas *S. saman* apresentou maior percentagem de remoção de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo - TPHs nos níveis 30, 50 e 70 g kg<sup>-1</sup> de contaminação por petróleo, seguida da *M. artemisiana* nos níveis 50 e 70 g kg<sup>-1</sup> de contaminação. A leguminosa *S. saman* apresentou a maior massa de nódulos em relação às demais espécies, confirmando a eficiência dos isolados identificados com L91, F1P6-5 e 27.1. As espécies de FMAs que predominaram nas sete leguminosas arbóreas estudadas foram em seqüência *G. clarum*, *S. heterogama* e *G. margarita*. As leguminosas *A. angustissima*, *A. auriculiformis*, *M. caesalpiniiifolia* e *A. holosericea* proporcionaram bons resultados no estabelecimento e crescimento em todos os níveis de contaminação por petróleo. Por esse motivo, podem ser indicadas para outras finalidades de uso, tais como reflorestamento e/ou revegetação dessas áreas. *A. mangium* e *M. artemisiana* foram as leguminosas que mais sentiram com os efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo presentes no solo no crescimento. O experimento confirmou o papel do condicionador de solo Stockosorb 500<sup>®</sup> como atuante na quebra da hidrofobia causada às partículas do solo pela contaminação do petróleo bruto e promotor do crescimento vegetal nestas condições.

Palavras-chave: Biorremediação, leguminosas arbóreas, rizóbios, FMAs.



## ABSTRACT

### ROOT SYMBIOSIS AND THE PHYTOREMEDIATION OF CONTAMINATED SOIL BY OIL RESIDUES OF PETROLEUM REFINERY

The phytoremediation and bioremediation were the technics applicable in this experiment with contaminate soil by oils residue of petroleum refinery. This study aimed to select legume trees and root symbiotic microorganisms with potential to remove, degrade, retain or immobilize hydrocarbons from petroleum contaminated soils. Seven species of legume trees were studied: *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze, *Acacia auriculiformis* A. Cunn. Ex Benth, *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don, *Acacia mangium* Willd, *Mimosa artemisiana* Heringer & Paula, *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth and *Samanea saman* (Jacq.) Merr (synonymy *Albizia saman*), on soil with five doses of contamination by raw petroleum (0, 10, 30, 50, e 70 g.kg<sup>-1</sup>), all species inoculated with a mixture of five species of Arbuscular Mycorrhizals Fungis - AMFs (*Gigaspora margarita*, *Entrophospora contigua*, *Scutellospora calospora*, *Scutellospora heterogama* e *Glomus clarum*) and a mixture of 15 isolated of rhizobium (13 isolated of contaminated area in the Duque de Caxias Refinery and plus two commercial isolated recommend of each legume). All the vases receive 5g of Stockosorb 500<sup>®</sup> conditioner soil. From the seven legume trees *S. saman* represented greater removal percentage of Totals Petroleum Hydrocarbons – TPHs in the doses 30, 50 and 70 g.kg<sup>-1</sup> of petroleum contamination soil, followed by *M. artemisiana* in the doses of contamination 50 and 70 g.kg<sup>-1</sup>. The legume *S. saman* represented the higher nodule mass comparing to the other species, what corroborate efficiency of the identified isolated with L91, F1P6-5 e 27.1. The species of AMFs that predominated between the seven legume trees studied were the *G. clarum*, followed by *S. heterogama* and *G. margarita*. The legumes *A. angustissima*, *A. auriculiformis*, *M. caesalpiniiifolia* and *A. holosericea* provided nice results in the establishment and growth in all the petroleum contamination doses. Inside of this, they can be indicated for others finality uses, for example afforestation or revegetate this contaminated areas by oils residue. The *A. mangium* and *M. artemisiana* was the legume that most felt the effects of petroleum hydrocarbons soil in the growth. The experiment confirm the function Stockosorb 500<sup>®</sup> conditioner soil as active in the fall of hydrophobia caused by contamination of raw petroleum in the soil's particle and promote the growth of legumes tree in this condition.

Key words: Bioremediation, legume trees, rhizobia, AMFs.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Incremento do diâmetro de colo para as diferentes espécies arbóreas. Letras iguais no topo das barras não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott 5%.....**18**
- Figura 2.** Massa da parte aérea seca das leguminosas arbóreas sobre o efeito dos níveis de contaminação por petróleo.....**19**
- Figura 3.** Massa de nódulos e número de esporos sobre o efeito dos níveis de contaminação por petróleo.....**21**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Propriedades químicas do material de solo utilizado no experimento de seleção de leguminosas arbóreas com potencial de fitorremediação de solos contaminados por resíduos oleosos.....	<b>11</b>
<b>Tabela 2.</b> Composição química e concentração final de compostos utilizados na solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada para uso em experimento com fungos micorrízicos em leguminosas arbóreas.....	<b>12</b>
<b>Tabela 3.</b> Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) das amostras de solo coletadas nos níveis 10, 30, 50 e 70 g kg <sup>-1</sup> de contaminação por petróleo no solo.....	<b>15</b>
<b>Tabela 4.</b> Porcentagem de remoção de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) das amostras de solo coletadas nos níveis 10, 30, 50 e 70 g kg <sup>-1</sup> de contaminação por petróleo em relação ao nível inicial do plantio.....	<b>16</b>
<b>Tabela 5.</b> Incremento do diâmetro aos 101 dias, em centímetro, no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas.....	<b>17</b>
<b>Tabela 6.</b> Massa da parte aérea seca, em gramas, no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas.....	<b>18</b>
<b>Tabela 7.</b> Número de nódulos no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas. Médias destransformadas por $(x+1)^{1/2}$ .....	<b>20</b>
<b>Tabela 8.</b> Comparação das médias de massa de nódulos e número de esporos das leguminosas arbóreas.....	<b>21</b>
<b>Tabela 9.</b> Porcentagem de colonização micorrízica no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas.....	<b>22</b>
<b>Tabela 10.</b> Teor de clorofila da segunda medição no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas.....	<b>23</b>
<b>Tabela 11.</b> Teor de clorofila da primeira medição no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas.....	<b>23</b>
<b>Tabela 12.</b> Teor de Cu, em mg kg <sup>-1</sup> , obtido da parte aérea das leguminosas arbóreas.....	<b>24</b>
<b>Tabela 13.</b> Resultado da análise de nutrientes e Al na parte aérea das leguminosas arbóreas.....	<b>24</b>
<b>Tabela 14.</b> Teor de Ca, em g kg <sup>-1</sup> , obtido da parte aérea das leguminosas arbóreas.....	<b>25</b>
<b>Tabela 15.</b> Teor de K, em g kg <sup>-1</sup> , obtido da parte aérea das leguminosas arbóreas.....	<b>25</b>
<b>Tabela 16.</b> Teor de Na, em g kg <sup>-1</sup> , obtido da parte aérea das leguminosas arbóreas.....	<b>26</b>

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTO</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XI</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1. Hidrocarbonetos de Petróleo no Solo	2
2.2. Importância da Biorremediação e Fitorremediação de Áreas Contaminadas	3
2.3. Importância das Leguminosas Arbóreas	5
2.4. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs)	6
2.5. Importância dos Rizóbios	7
2.6. Condicionador de Solo	8
2.7. Histórico dos Trabalhos Desenvolvidos	8
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>9</b>
3.1. Descrição dos Tratamentos	9
3.1.1. Espécies de leguminosas avaliadas quanto ao potencial fitorremediador	9
3.1.2. Aplicação e homogeneização dos tratamentos de contaminação por petróleo	10
3.2. Condições Experimentais	10
3.2.1. Localização	10
3.2.2. Condicionador de solo	10
3.2.3. Solo	10
3.2.4. Preparo e utilização do substrato	11
3.2.5. Pré – germinação das sementes e formação das mudas em viveiro	11
3.2.6. Inoculação de FMAs e rizóbios	11
3.3. Delineamento Experimental	12
3.4. Condução do Experimento	12
3.5. Avaliações	13
3.5.1. Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH)	13
3.5.2. Altura e diâmetro do colo	13
3.5.3. Clorofila	13
3.5.4. Parte aérea	13
3.5.5. Raízes	14
3.5.6. FMAs e nódulos	14
3.6. Análise Estatística	14
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>15</b>
4.1. Avaliação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs)	15
4.2. Crescimento Vegetativo	16
4.3. Nodulação e Micorrização	20
4.4. Clorofila	22
4.5. Análise de Nutrientes na Parte Aérea	23

<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>27</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>28</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O petróleo é um produto da decomposição de matéria orgânica armazenada em sedimentos, que migra através de aquíferos e fica aprisionado em reservatórios (RIZZO *et al.*, 2006). De acordo com CORRÊA (2003), aproximadamente 660 bilhões de barris de petróleo já foram extraídos do subsolo, e estima-se que, considerando todas as bacias sedimentares do mundo, algo em torno de 1.500 e 3.000 bilhões de barris de petróleo poderão ainda vir a serem descobertos.

Por esse motivo, a poluição de solos e de águas por petróleo e seus derivados vem sendo tratado com mais atenção nos vários segmentos da sociedade, principalmente os responsáveis pela gestão ambiental. Estes poluentes no ambiente representam riscos para os seres vivos, incluindo o próprio homem, e medidas visando a remediação dessas substâncias para a proteção própria e dos diversos ecossistemas vem sendo tomadas.

Segundo OLIVEIRA *et al.* (2006), a fitorremediação é uma tecnologia que utiliza sistemas vegetais como agente de descontaminação, a fim de remediar água e solos contaminados por poluentes de origem orgânica (hidrocarbonetos, pesticidas, compostos clorados, nitrogenados e explosivos) e inorgânica (metais e elementos radioativos). Para BERNOTH *et al.* (2000), tanto compostos orgânicos como inorgânicos podem ser biodegradados ou transformados através de processos microbianos. Nesse sentido, a biorremediação é definida como um método que emprega microrganismos ou suas enzimas para desintoxicar contaminantes no solo ou em outros ambientes (FERREIRA, 2007).

A desintoxicação do contaminante consiste em transformá-lo em formas que não oferecem riscos a saúde ou ambiente. Dentro deste contexto, a degradação envolve, direta e indiretamente, plantas e microrganismos, que transformam os hidrocarbonetos de petróleo em produtos como álcoois, ácidos, dióxido de carbono e água, que são geralmente menos tóxicos e menos persistentes no ambiente do que os compostos antecessores (EWEIS *et al.*, 1998).

Os sistemas vegetais se mostram eficientes na absorção e concentração de alguns contaminantes, recebendo atenção como sistema de baixo custo para a descontaminação de áreas e efluentes poluídos, associados ao fato de serem recuperados economicamente (NERBITT, 1994). Nesse contexto, as leguminosas arbóreas vêm sendo testadas em áreas contaminadas por apresentarem capacidade de adaptação nos solos pobres em nutriente, degradados ou contaminados. A maioria da leguminosas nodulam e fixam nitrogênio atmosférico (FARIA *et al.* 1999) e quase todas as espécies testadas se associam a fungos micorrízicos (SIQUEIRA, 1996; FARIA & CAMPELLO, 1999). A simbiose planta + bactérias diazotróficas + fungos micorrízicos adquire a capacidade de incorporar C e N ao solo, sendo mais eficientes na absorção de nutrientes e torna a planta mais tolerante aos estresses ambientais (FRANCO *et al.*, 1992, 1995, 1996; SOUZA & SILVA, 1996; FRANCO & BALIEIRO, 2000). Entretanto, para que possa ser recomendada uma espécie de leguminosa para seu emprego na recuperação de solos, há a necessidade de estudos específicos, visto a grande diversidade existente nesta família de plantas. Isto evidencia a necessidade da seleção de espécies de leguminosas promissoras para fitorremediação de resíduos oleosos.

A eficácia dos processos de biorremediação pode ser limitada por fatores como a baixa disponibilidade dos contaminantes e dos nutrientes aos microrganismos, bem como pela aeração insuficiente do solo. Uma baixa concentração de oxigênio pode limitar a biodegradação de resíduos oleosos, como tem sido comprovado por diversos autores (VASUDEVAN & RAJARAM, 2001; ALEXANDER, 1999). Isto acontece quando a permeabilidade do solo contaminado é baixa, sendo este parâmetro diretamente relacionado

aos elevados teores de argila e silte característicos da maioria dos solos brasileiros. Durante o processo biológico de tratamento, no entanto, a textura do solo, e conseqüentemente a sua permeabilidade, podem ser condicionadas através da adição de materiais estruturantes, tais como vermiculita, gel hidrorretentor, argila calcinada, areia, perlita, cascalho, casca de coco ou arroz, palha, serragem, farelo de trigo, dentre outros (BENTO *et al.*, 2007; DAVIS & WILSON, 2000; CHO *et al.*, 1997; STRAUBE *et al.*, 2003; ALEXANDER, 1999). Estes materiais estruturantes são chamados de, maneira geral, condicionadores de solo.

Segundo BENTO *et al.* (2007), a principal dificuldade encontrada para o desenvolvimento de plantas e microrganismos nos solos contaminados por petróleo tem sido a hidrofobia que esses hidrocarbonetos promovem às partículas do solo. O mesmo autor ressalta que além de absorver água e nutrientes, o gel hidrorretentor promoveu a hidratação do solo contaminado por petróleo e favoreceu a fitorremediação.

Desta forma, o objetivo desta monografia foi selecionar leguminosas arbóreas associadas a microrganismos simbiotes com potencial para remover, degradar, reter e/ou imobilizar hidrocarbonetos de petróleo de solo contaminado, condicionado com gel hidrorretentor.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Hidrocarbonetos de Petróleo no Solo

O petróleo bruto possui em sua composição uma cadeia de hidrocarbonetos, cujas frações leves formam os gases e as frações pesadas o óleo cru. Ao longo da história da Terra, grande quantidade de organismos animais e vegetais foram, lentamente, depositando-se no fundo dos lagos e mares. Pela ação do calor e da pressão, provocada pelo seguido empilhamento das camadas geológicas, estes depósitos orgânicos foram transformados, face às reações termoquímicas, em petróleo (óleo cru e gás) (RIZZO *et al.*, 2006). Segundo CORRÊA (2003) o petróleo é definido como uma mistura complexa de hidrocarbonetos sólidos, líquidos e gasosos.

Assim, o petróleo consiste de uma mistura de substâncias, que diferem em solubilidade, volatilidade e susceptibilidade à degradação por microrganismos. Embora os hidrocarbonetos aromáticos possam ser degradados, a taxa e/ou habilidade desse processo diminui na mesma proporção do aumento de anéis benzênicos, baixa disponibilidade de oxigênio, nutrientes, entre outros fatores (CRAPEZ, 2001).

Existem aproximadamente 200.000 compostos diferentes no óleo cru. Geralmente, todos aqueles que têm cadeias carbônicas curtas são facilmente degradados, já o aumento das cadeias implica em uma maior complexidade estrutural e, conseqüentemente, em uma diminuição do número de microrganismos capazes de degradar estes compostos. Algumas das maiores estruturas moleculares são insolúveis e a maioria dos microrganismos pode utilizar apenas os compostos dissolvidos em água (LEBLANC & FITZGERALD, 1990).

A indústria petroleira, como exemplo, refinarias e áreas de produção de petróleo, eventualmente se depara com vazamentos de substâncias oleosas (óleo cru e/ou seus derivados) que atingem tanto os recursos hídricos quanto os solos.

Os efeitos do petróleo sobre os seres vivos num ecossistema afetado podem ser diretos (contato com o óleo) e indiretos (afetando fatores bióticos e abióticos associados ao crescimento). Nas plantas, o contato direto do óleo afeta a solubilidade e a permeabilidade

seletiva das membranas celulares. A penetração de compostos aromáticos reduz a produção de sementes e/ou à inibição do desenvolvimento embriológico do endosperma, quando os tecidos reprodutivos são afetados (SCHOLTEN & LEENDERTSE, 1991). Plantas e microrganismos que conseguem resistir a estes efeitos da contaminação por petróleo apresentam potencial de serem utilizados na fitorremediação e biorremediação.

## 2.2. Importância da Biorremediação e Fitorremediação de Áreas Contaminadas

A biorremediação é fundamentada nos processos de degradação microbiana e reações químicas combinadas com processo de engenharia, criando condições para maximizar as transformações dos contaminantes orgânicos do solo. Os principais microrganismos usados neste processo são as bactérias e os fungos (FERREIRA, 2007).

Segundo MELO e AZEVEDO (1997), em solos contaminados os microrganismos podem se adaptar e adquirir a capacidade de utilizar o composto como fonte de carbono e energia para o seu metabolismo. Segundo estes mesmos autores, a entrada de hidrocarbonetos em um ecossistema pode ter como resultado o aumento ou decréscimo da população microbiana. O efeito do petróleo dependerá da composição química do óleo contaminante e das espécies de microrganismos que habitam a comunidade do ecossistema particular.

Além da biorremediação, na recuperação de áreas contaminadas por petróleo podem ser utilizados métodos físicos e químicos. Porém estas técnicas apresentam um alto custo e podem provocar contaminações secundárias. Desta maneira, as técnicas de descontaminação no ambiente (*in situ*) têm tido preferência, pois permitem que a área tratada não sofra nenhuma escavação ou transporte, tendo como resultado uma economia significativa de custos (FRICK *et al.*, 1999; BROCKMEYER *et al.*, 1997).

Para PROVIDENTI *et al.* (1993), as condições ambientais podem afetar o processo de biodegradação em dois níveis: influenciando o crescimento e a atividade microbiana e influenciando também as propriedades físicas e químicas dos poluentes. Os efeitos das diferentes condições ambientais impostas ao sistema solo/poluentes/microbiota podem ser interativos, o que torna difícil prever-se um modelo de comportamento deste sistema. A otimização das condições ambientais é, portanto, uma etapa fundamental no desenvolvimento de qualquer tecnologia a ser adotada no processo de biorremediação de solo contaminados. De acordo com SCHNOOR (1997), a biorremediação aeróbica na região da rizosfera mostra-se eficiente no ataque a substâncias químicas aromáticas como Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos - PHAs, Hidrocarbonetos Aromáticos, também chamados de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) e fenólicos.

Outra técnica que pode ser utilizada para recuperar águas e solos contaminados por poluentes orgânicos ou inorgânicos é fitorremediação. Dentro deste contexto, CUNNINGHAM *et al.*, (1996) diz em que a biotecnologia oferece a fitorremediação uma alternativa capaz de empregar sistemas vegetais fotossintetizantes e sua microbiota com o fim de desintoxicar ambientes degradados ou poluídos. Para NERBITT (1994), os sistemas vegetais se mostram eficientes na absorção e concentração de alguns contaminantes, recebendo atenção como sistema de baixo custo para a descontaminação de áreas e efluentes poluídos, associados ao fato de serem recuperados economicamente.

As substâncias alvos da fitorremediação incluem metais (Pb, Zn, Cu, Ni, Hg, Se), compostos inorgânicos ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), elementos químicos radioativos (U, Cs, Sr), hidrocarbonetos derivados de petróleo (BTEX), pesticidas e herbicidas (atrazine, bentazona, compostos clorados e nitroaromáticos), explosivos (TNT, DNT), solventes clorados (TCE,



PCE) e resíduos orgânicos industriais (PCPs, PAHs), entre outros (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

Segundo OLIVEIRA *et al.* (2006), a fitorremediação pode ser classificada dependendo da técnica a ser empregada, da natureza química ou da propriedade do poluente. Dessa maneira, pode ser compreendida em: fitoextração, fitoestimulação, fitovolatilização, fitodegradação, fitoestabilização, rizofiltração e a fitomineração.

A fitoextração é a técnica que envolve a absorção dos contaminantes pelas raízes, onde são armazenados ou transportados e acumulados em suas partes aéreas. É aplicada principalmente para metais como cádmio, níquel, cobre, zinco e chumbo, podendo ser usado também para compostos inorgânicos e compostos orgânicos (MCGRATH, 1998). A fitoextração só é eficiente se o contaminante for removido do solo. Em geral, é necessário colher as plantas antes da queda ou da sua decomposição, de modo que os contaminantes não se dispersem ou retornem ao solo.

A fitoestimulação é o estímulo à atividade microbiana, promovido pela liberação de exsudatos radiculares, tais como aminoácidos e polissacarídeos, que atuam na degradação de compostos no solo, caracteriza, em algumas plantas, a aptidão rizosférica para a biorremediação. Normalmente, o efeito rizosférico da interface solo-raiz resulta na proliferação da comunidade microbiana nessa região (ARTHUR *et al.*, 2000). Interações planta-microrganismos estendem-se pelo tempo (estágio de desenvolvimento da planta e época de cultivo), espaço (macro e microhabitat) e substrato (fonte de energia e disponibilidade). Segundo ANDERSON *et al.* (1993), o número de microrganismos nos solos rizosféricos é normalmente de 5 a 10 vezes maior em relação aos que não são rizosféricos, entretanto, esta diferença pode chegar a 100 vezes. Por essa razão, a rizosfera pode ser ótimo sítio de degradação de compostos orgânicos indesejáveis, graças à comunidade microbiana associada (bactérias, actinomicetos e fungos) que pode, em alguns casos, utilizar os contaminantes como nutrientes e fontes de carbono primário. Para BOVEY *et al.* (1982), é fundamental a identificação de espécies de plantas que estimulem a atividade e o crescimento microbiano na rizosfera. Outro ponto fundamental é que as espécies sejam de fácil aquisição, que ocorra rapidamente a multiplicação de seus propágulos e que não haja dificuldade na erradicação da espécie da área, uma vez que pode tornar-se espécie daninha. Para os autores SAGGIN JÚNIOR *et al.* (2006) e BENTO, *et al.* (2007), concluem que um aspecto importante da fitoestimulação é a associação das plantas e as simbioses radiculares como fungos micorrízicos e rizóbios. Estes microrganismos mesmo que não degradem diretamente contaminantes do solo estimulam o crescimento de leguminosas arbóreas e a atividade de outros microrganismos rizosféricos, levando a descontaminação.

A fitovolatilização é a técnica utilizada para remediação potencial de substâncias químicas orgânicas voláteis, sendo utilizados para compostos orgânicos, principalmente para mercúrio, selênio e arsênio, que são absorvidos pelas raízes, convertidos em formas menos tóxicas ou não tóxicas e posteriormente liberados na atmosfera (BROOKS, 1998).

A fitodegradação depende da captação direta dos contaminantes do solo ou de águas subterrâneas e sua conseqüente degradação dentro das células vegetais através da ação de enzimas específicas como, por exemplo, as nitroredutases (degradação de nitroaromáticos), desalogenases (degradação de solventes clorados e pesticidas) e lacases (degradação de anilinas) (CUNNINGHAM, 1996).

De acordo com ACCIOLY & SIQUEIRA (2000), a fitovolatilização e a fitodegradação, são também compreendidas como Fitotransformação, que é a técnica dada pela absorção com subsequente volatilização, ou degradação parcial ou completa, com

transformação em compostos menos tóxicos, combinados e/ou ligados nos tecidos das plantas.

A fitoestabilização é um termo que se refere à manutenção de solos e sedimentos contaminados através da utilização de sistemas vegetais e imobilização de contaminantes no solo. O estabelecimento das raízes impede que a ação de ventos fortes promova o espalhamento do material contido nos locais contaminados evitando, assim, maiores contaminações. O controle hidráulico é possível em alguns casos devido ao grande volume de água transpirada pelas plantas, que evita a migração do lixiviado para águas subterrâneas ou corpos receptores (SCHOOR, 1997).

A rizofiltração é uma técnica que utiliza sistemas vegetais como objetivo de promover a remoção dos contaminantes de um meio aquoso. Nesse processo, é utilizado um sistema hidropônico, no qual as raízes dos vegetais permanecem em contato com o efluente, através das quais os contaminantes são absorvidos e concentrados. Plantas aquáticas, hidrófitas, como as macrófitas providas de rizomas, têm sido utilizadas visando à melhoria da qualidade de efluentes e no tratamento de águas residuais, principalmente no que diz respeito à redução das concentrações de nitrogênio e fósforo (GRANATO, 1995).

A fitomineração surge como proposta promissora para remediação de áreas contaminadas com baixos teores no metal de interesse (<1%) ou exploração economicamente viável de minérios com concentrações, no metal de interesse, inferiores a 1% (BROOKS *et al.*, 1998).

Embora plantas e microrganismos possam adsorver e/ou degradar hidrocarbonetos de petróleo independentemente um do outro, a literatura sugere que a interação ou efeito da rizosfera é o mecanismo primário responsável pela degradação dos componentes do petróleo na fitorremediação (CUNNINGHAM *et al.*, 1996; CAMPBELL, 1985; VANCE, 1996).

### **2.3. Importância das Leguminosas Arbóreas**

A grande competitividade da leguminosa é atribuída, em parte, a sua capacidade de se associar simbioticamente às bactérias fixadoras de nitrogênio. Contudo, MOREIRA *et al.* (2006), estimam que a habilidade de fixar nitrogênio é desconhecida para cerca de 11.200 espécies de leguminosas espalhadas ao redor do mundo, indicando um potencial ainda não explorado de benefícios dessas espécies aos ecossistemas. A maioria das espécies que nodulam estão entre as Mimosoideae (90%) e Papilionoidae (96%), sendo que as Caesalpinioideae 24% nodulam.

Assim, quando essa estratégia de obtenção de nitrogênio, ocorre concomitantemente com a associação dessas plantas com fungos micorrízicos, que são capazes de aumentar a área de absorção de nutrientes pelas plantas, destacando-se aí o fósforo por sua limitação e baixa mobilidade nos solos tropicais, obtém-se, então, uma importante e eficiente estratégia para a produção de alimentos e recuperação ambiental (FRANCO *et al.*, 2000). Desta forma, as espécies vegetais que formam estas simbioses são as mais indicadas para aumentar o conteúdo de matéria orgânica de solos degradados ou mesmo de sistemas produtivos em condições de baixa fertilidade.

As leguminosas fixadoras de nitrogênio fornecem material formador de serrapilheira rico em N que além de melhorar a fertilidade do solo, reduzem a erosão, previnem a infestação de plantas competidoras e servem de substrato para melhorar a estruturação e as propriedades biológicas do solo (DOMMARGUES *et al.*, 1999).

Segundo FRANCO *et al.* (1992), as leguminosas arbóreas são utilizadas em trabalho de recuperação de áreas degradadas por apresentarem sistema radicular profuso, crescimento

rápido, tolerância à acidez do solo e estresse de temperatura, por contribuírem com deposição de matéria orgânica de baixa relação C/N. Vem demonstrando, ainda, serem ideais para um rápido restabelecimento da vida microbiana nos solos quando inoculadas com rizóbio que realizam a fixação biológica de nitrogênio eficientemente.

A família Leguminosae apresenta alta capacidade de adaptação aos mais diferentes biomas brasileiros, com seus mais distintos usos, sua associação com bactérias fixadoras de nitrogênio permite que em solos pobres em nutrientes, espécies capazes de obter significativas contribuições da fixação biológica de nitrogênio (FBN) podem se estabelecer e completar seu ciclo com bons níveis de produtividade (URQUIAGA & ZAPATA, 2000; RESENDE *et al.*, 2003).

#### **2.4. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs)**

Micorriza é a denominação para diferentes tipos de simbiose entre fungos de solo e raízes de plantas, sendo reconhecidos atualmente seis tipos diferentes: arbuscular, arbutóide, ecto, ericóide, monotropóide, orquidóide (SMITH & READ, 1997). Dentre os tipos de micorriza, a micorriza arbuscular (MA) é a mais ancestral e apresenta maior ocorrência entre plantas tropicais e de interesse agrícola.

As MAs são associações entre plantas e fungos do solo do filo Glomeromycota (SCHUBLER, 2001). Estes fungos são membros importantes do sistema solo-planta uma vez que a própria diversidade está intimamente ligada à diversidade e a produtividade de comunidades vegetais. Nesta simbiose, a planta supre o fungo com energia para crescimento e reprodução via fotossíntese e o fungo provê a planta e o solo com uma gama de serviços. O principal destes é realizado pelo micélio extra radicular do fungo e consiste na absorção de nutrientes obtidos de áreas localizadas além da zona de depleção da raiz, em especial fósforo, e a translocação e disponibilização destes nutrientes para células do córtex de raízes de plantas micotróficas (BOLAN, 1991; SMITH & READ, 1997; MIYASAKA & HABTE, 2001).

As MAs são de fundamental importância para 90% das espécies de plantas vasculares (SIQUEIRA, 1991), ou seja, colonizam as raízes de quase todos os gêneros das Gimnospermas e Angiospermas, além de alguns representantes das Briófitas e Pteridófitas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Estes fungos constituem um dos componentes importantes da biota do solo. Os benefícios desta simbiose para as plantas são muitos, sendo o mais evidente o nutricional (SIQUEIRA & SAGGIN JÚNIOR, 1995). Estes benefícios dependem da eficiência simbiótica dos fungos, do grau de dependência micorrízica da planta e de condições ambientais, razão por que as respostas das plantas à inoculação com FMAs são variáveis, indo de grandes estímulos no crescimento a respostas negativas ou ausência de respostas.

A identificação das espécies é em geral feita pelas características morfológicas dos esporos e a quantificação destes tem sido muito usada na avaliação da abundância e no número de espécies de FMAs. Isto se deve à alta resistência dos esporos às condições adversas (ABBOT & ROBSON, 1991), embora se saiba que algumas espécies podem estar presentes em outras formas que não seja a de esporos. As espécies de FMA têm diferentes tolerâncias e se comportam de maneiras distintas conforme as condições ambientais (KLIRONOMOS *et al.*, 1993).

## 2.5. Importância dos Rizóbios

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma das mais importantes funções do sistema solo-planta. A capacidade de fixar nitrogênio é restrita a algumas espécies de bactérias e parte delas se associa simbioticamente com as leguminosas e são, genericamente, chamadas de rizóbio.

Uma pequena parcela de procariotos possui a enzima nitrogenase que é capaz de reduzir o  $N_2$  para a forma inorgânica combinada  $NH_3$  tornando-se disponível para plantas e outros organismos, estes são chamados de fixadores de  $N_2$  ou diazotróficos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Segundo a DÖBEREINER (1992), as bactérias diazotróficas endofíticas são capazes de fixar nitrogênio atmosférico e colonizar o interior de tecidos vegetais e não geram sintomas de doenças. Do mesmo modo, FARIA *et al.* (2003) afirma que a fixação biológica de nitrogênio é realizada por bactérias denominadas rizóbios que se associam com as raízes das plantas formando estruturas denominadas nódulos. Entre os microrganismos mais utilizados, destaca-se a importância da simbiose formada pelas bactérias do grupo dos rizóbios, pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, entre outros.

Existem muitas famílias botânicas na natureza, porém poucas são as famílias capazes de estabelecer simbiose com as bactérias do grupo dos rizóbios, como a família Leguminosae. Espécies dessa família que estabelecem simbiose eficiente com bactérias fixadoras de  $N_2$  atmosférico apresentam uma vantagem adicional para plantios de reabilitação de áreas degradadas, considerando-se que em condições tropicais o nitrogênio é em geral, extremamente limitante (FRANCO *et al.*, 1992; FRANCO *et al.*, 1995; FRANCO & FARIA, 1997). Um número considerável de leguminosas conhecidas é capaz de formar nódulos com bactérias fixadoras de nitrogênio e tem potencial para uso em sistemas agroflorestais, para reabilitação de áreas degradadas e para ajudar a manutenção da sustentabilidade dos solos (HERRERA *et al.*, 1993; FRANCO & FARIA, 1997).

Em relação às espécies de bactérias que fixam nitrogênio em simbiose com as leguminosas, foram classificadas 47 espécies, pertencentes a 11 gêneros. Essas espécies se enquadram no Phylum  $\alpha$ -Proteobactéria e  $\beta$ -Proteobactéria (GOI & SOUZA, 2006). Em adição às espécies genericamente denominadas rizóbio, recentemente foram descritos novos gêneros de bactérias que fixam nitrogênio em associações com as leguminosas. *Burkholderia* sp (MOULIN *et al.*, 2001), *Ralstonia* (CHEN *et al.*, 2001), *Methylobacterium* (SY *et al.*, 2001) e *Blastobacter* (VAN BERKUN & EARDLY, 2002).

Em levantamento de diversidade de rizóbio feito entre leguminosas florestais no Brasil, MOREIRA *et al.* (1998) encontraram que embora as estirpes mostrassem uma variedade de seqüências, as estirpes isoladas de plantas taxonomicamente tão diversas em ambientes não explorados, foram muito similares às estirpes anteriormente descritas, muitas isoladas de agroecossistemas. MOREIRA (2006) cita que no Brasil, muitas ramificações filogenéticas de Leguminosae compreendem bactérias que nodulam legumes, que também são filogeneticamente diversas, o que corrobora a hipótese de que não teria ocorrido co-evolução entre simbiote e hospedeiro.

Os estudos de combinações simbióticas com capacidade de tolerar diversos estresses ambientais são essenciais para o sucesso do estabelecimento desta simbiose em solos contaminados com resíduos oleosos.

## 2.6. Condicionador do Solo

Materiais estruturantes do solo são aqueles de baixa densidade que, quando incorporados ao solo são responsáveis pela melhoria de algumas características físico-químicas do mesmo. Os materiais adicionados reduzem a densidade do solo, aumentando a sua porosidade e facilitando a difusão de oxigênio por entre as partículas sólidas. Adicionalmente pode ocorrer alteração na capacidade de retenção de água do solo. Todos esses fatores contribuem conjuntamente para o aumento da aeração do sistema solo-contaminante e, conseqüentemente, da atividade microbiana (VASUDEVAN & RAJARAM, 2001; RHYKERD *et al.*, 1999).

Dentro dos materiais estruturantes, destaca-se os géis hidrorretentores (hidrogel). Estes são polímeros hidroabsorventes que podem ser de origem natural (derivado do amido) ou sintéticos (derivados do petróleo), com grande capacidade de absorver e estocar água. Os hidrogéis mais freqüentemente usados são os polímeros sintéticos propenamidas (originalmente denominados poliacrilamida ou PAM) e os co-polímeros propenamida-propenoato (originalmente conhecidos com poliacrilamida-acrilato ou PAA), também comumente usados como flocculantes em fraldas e outros artigos sanitários de líquidos residuais (TERRACOTTEM, 1998). Segundo COTTHEM (1988), esses polímeros têm propriedades especiais, como diferente capacidade de retenção de água e diferentes possibilidades de reserva de água para as raízes das plantas. Estas propriedades tornam os hidrogéis capazes para a aplicação em diferentes tipos de solo, em diferentes condições ambientais e para diferentes espécies de plantas.

No entanto, os hidrogéis externamente podem parecer semelhantes, mas a sua constituição química e estrutura física podem ser muito diferentes e isto irá afetar a maneira como ele absorverá, reterá e irá liberar água e nutrientes. Os polímeros, por essa razão são classificados em três diferentes grupos: Grupo I - a água fica irreversivelmente confinada por uma forte ligação H-H, permanecendo, portanto, 100% dentro do hidrogel, ou seja, nenhuma água é liberada; Grupo II - tem a capacidade de absorver enorme quantidade de água, mas uma fraca ligação física evita a permanência da água no hidrogel por longos períodos. A água é perdida em poucos dias; Grupo III - a água é confinada por fraca ligação de hidrogênio. Portanto, absorve e libera a água por longos períodos de tempo (TERRACOTTEM, s.d.; VILJOEN, 1977).

Os polímeros utilizados na agricultura são pertencentes ao terceiro grupo, incluindo o gel hidrorretentor Stockosorb 500<sup>®</sup> ou hidrogel condicionante do solo. O hidrogel é um polímero comercializado como condicionador de solo por absorver e reter água e nutrientes, auxiliando no crescimento das plantas, e por minimizar perdas de água e nutrientes por infiltração e evaporação.

## 2.7. Histórico dos Trabalhos Desenvolvidos

O plantio de leguminosas arbóreas com simbioses radiculares em solos degradados é uma técnica desenvolvida pela Embrapa Agrobiologia (FARIA, 1998). Para a adaptação desta técnica às condições de contaminação de solo por hidrocarbonetos de petróleo há a necessidade de aumentar, nestas condições, o estabelecimento e o crescimento das leguminosas e microrganismos simbiotes.

O trabalho da presente monografia é um aprimoramento desta técnica, a partir de dois experimentos anteriores montados em casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia, buscando a fitorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos de petróleo. Estes

experimentos fazem parte de um projeto de pesquisa em parceria com o CENPES – Centro de Pesquisas da Petrobras, Embrapa Solos e Embrapa Agrobiologia. No primeiro experimento (SAGGIN JUNIOR *et al.*, 2006) foi avaliada a germinação e o crescimento das espécies *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don, *Mimosa caesalpinifolia* Benth e *Samanea saman* (Jacq.) Merr (sinonímia *Albizia saman*) sobre o efeito ou não das simbioses radiculares (FMAs – Fungos Micorrízicos Arbusculares e rizóbios isolados de áreas contaminados na REDUC – Refinaria Duque de Caxias) em solo com cinco níveis de contaminação por petróleo (0, 10, 30, 50 e 70 g.kg<sup>-1</sup>). Como resultado houve uma grande mortalidade das plantas devido, principalmente, à hidrofobia causada às partículas do solo pela oleosidade do petróleo (Tabela 1A) . Nas plantas que sobreviveram foram isolados rizóbios para testes de eficiência e eficácia (FERREIRA, 2007) e multiplicados para serem inoculados no segundo experimento. A micorrização das plantas foi avaliada pela extração de esporos e pela colonização radicular nas espécies vegetais estabelecidas nas doses de contaminação de petróleo. De forma geral, os simbioses radiculares auxiliaram as leguminosas a crescerem em altura. No segundo experimento, a partir do resultado do primeiro experimento, foram testadas as espécies vegetais que tiveram o melhor crescimento em altura sob as condições de estresse provocado pelos níveis de contaminação por petróleo, sendo estas *A. holosericea* e *M. caesalpinifolia*. Para resolver o problema de hidrofobia do solo contaminado testou-se dois tipos de condicionadores hidrorretentores de solo: o hidrogel e a vermiculita expandida (BENTO *et al.*, 2007). Os resultados mostraram que a utilização dos condicionadores de solo, principalmente o hidrogel, associada com as simbioses radiculares, promoveram estabelecimento e crescimento das plantas nos diferentes níveis de contaminações por petróleo no solo (Figs 1A, 2A, 3A, 4A, 5A e 6A). Esses dois experimentos realizados permitiram selecionar os rizóbios e FMAs tolerantes às condições de contaminação por petróleo e a indicar o uso do gel hidrorretentor Stockosorb 500<sup>®</sup> como condicionador de solo, eficaz na diminuição da hidrofobia causada às partículas do solo pelo petróleo. Diante desses resultados obtidos foi montado o terceiro experimento, foco desta monografia, testando a capacidade fitorremediadora de sete espécies de leguminosas arbóreas em solo com os mesmos cinco níveis de contaminação por petróleo bruto, tratado com o hidrogel condicionador.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Descrição dos Tratamentos

##### 3.1.1. Espécies de leguminosas avaliadas quanto ao potencial fitorremediador

Foram utilizadas sete espécies de leguminosas arbóreas: *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze, *Acacia auriculiformis* A. Cunn. Ex Benth, *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don, *Acacia mangium* Willd, *Mimosa artemisiana* Heringer & Paula, *Mimosa caesalpinifolia* Benth e *Samanea saman* (Jacq.) Merr (sinonímia *Albizia saman*). Nas tabelas e figuras foram adotadas as seguintes abreviações, de modo a otimizar os espaços gerados pelos dados:

- ang = *A. angustissima*
- aur = *A. auriculiformis*
- hol = *A. holosericea*
- man = *A. mangium*

- art = *M. artemisiana*
- cae = *M. caesalpiniifolia*
- sam = *S. saman*

### **3.1.2. Aplicação e homogeneização dos tratamentos de contaminação por petróleo**

Os níveis de contaminação por petróleo bruto no solo foram estabelecidos em 0, 10, 30, 50, e 70 g.kg<sup>-1</sup>. O petróleo utilizado foi o chamado óleo cabiúna de Macaé, RJ. O petróleo foi pesado e reservado em vidros e, em seguida, homogeneizado ao solo peneirado e seco ao ar. A mistura do solo e das doses de petróleo foi feita por agitação em saco plástico descartável até obter uma cor uniforme. O solo contaminado foi colocado em vasos e mantido em casa de vegetação para ser incubado por trinta dias para a evaporação dos compostos mais voláteis. O petróleo bruto foi manuseado em capela de exaustão, utilizando equipamentos de proteção individual para evitar contato e odores.

## **3.2. Condições Experimentais**

### **3.2.1. Localização**

O experimento foi conduzido na casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia situada no município de Seropédica, RJ, altitude média 27 m, 22° 45' 06" de latitude sul e 43° 40' 25" de longitude oeste. O clima local, definido segundo a classificação de KÖPPEN (1948), é Aw, ou seja, tropical com verão úmido e inverno seco.

### **3.2.2. Condicionador de solo**

Após a incubação da mistura solo-petróleo foi aplicado, como condicionador do solo, 5 g do gel hidrorretentor Stockosorb 500<sup>®</sup>, com a finalidade de diminuir a hidrofobia das partículas do solo promovida pelo petróleo. A mistura do gel hidrorretentor foi feita ao solo seco de cada vaso, contaminado com os diferentes níveis de petróleo, com a agitação do mesmo em um saco plástico até sua completa homogeneização. O solo foi devolvido aos vasos e hidratado antes do transplante das mudas.

### **3.2.3. Solo**

Utilizou-se como substrato o material de um Argissolo Amarelo, coletado no município de Pinheiral, RJ. O local da coleta foi a 22° 31' 17,2" de latitude sul e 43° 58' 51,5" de longitude oeste e a altitude de 469 metros. O solo foi seco, peneirado em malha de 5 mm e pesado a quantidade de 3,0 kg para colocar em casa vaso, para receber o tratamento de petróleo e o hidrogel condicionador de solo. O solo foi submetido a análise química antes e depois da contaminação por petróleo e depois da aplicação do hidrogel condicionador, sendo os resultados apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Propriedades químicas do material de solo utilizado no experimento de seleção de leguminosas arbóreas com potencial de fitorremediação de solos contaminados por resíduos oleosos.

Solo	pH em água	P*	K*	Ca**	Mg**	Al**
	(2:1)	-----mg dm <sup>-3</sup> -----		-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----		
Original	5,0	1,4	89	0,4	0,1	1,1
0 g de Petróleo + gel	5,0	6,6	357	0,4	0,1	1,1
10 g de Petróleo + gel	5,0	4,6	417	0,1	0,1	1,1
30 g de Petróleo + gel	5,3	9,6	557	0,2	0,0	0,9
50 g de Petróleo + gel	5,3	4,1	587	0,4	0,1	0,7
70 g de Petróleo + gel	5,2	6,5	977	0,4	0,1	0,5
+ gel	5,0	3,8	857	0,1	0,0	1,3

\* Extrator: Mehlich I

\*\* Extrator: KCl 1 mol L<sup>-1</sup>

### 3.2.4. Pré – germinação das sementes e formação das mudas em viveiro

A dormência das sementes das sete espécies estudadas foi quebrada deixando-as imersas em ácido sulfúrico concentrado entre 5 a 10 minutos. As sementes foram então lavadas e dispostas sobre uma bandeja forrada com uma manta de algodão umedecida com solução de hipoclorito de sódio 1%, para evitar a proliferação de fungos. Logo que emergiram as raízes primárias (1-5 mm), as sementes pré-germinadas foram selecionadas pela uniformidade e transplantadas diretamente para as bandejas de isopor de 72 células com capacidade para 100 cm<sup>3</sup>, sendo postas três sementes por célula. Depois de estabelecidas foi realizado um desbaste, deixando uma muda por célula.

As mudas das espécies leguminosas foram formadas em viveiro no Campo Experimental do Terraço na Embrapa Agrobiologia utilizando-se, como substrato, uma mistura de composto orgânico (restos vegetais + esterco), areia e solo de textura argilosa, na proporção 6:3:1 (v/v), sendo fertilizado com fosfato de Araxá (87,4 g dm<sup>-3</sup> de substrato) e calcário dolomítico com PRNT=90% (3,5 g dm<sup>-3</sup> de substrato). As mudas ficaram no viveiro por seis meses antes de serem transplantadas aos vasos do experimento.

### 3.2.5. Inoculação de FMAs e rizóbios

Todos os vasos foram inoculados com uma mistura de cinco espécies de FMAs e um coquetel de rizóbios. Os FMAs inoculados no experimento são provenientes da coleção de FMAs da Embrapa Agrobiologia. As espécies escolhidas foram as que apresentaram melhores respostas em promover o crescimento de diversas leguminosas arbóreas em áreas degradadas. As mudas foram inoculadas na formação em viveiro e, novamente, no transplante das mudas aos vasos na casa de vegetação. Em ambas as inoculações foi adicionado por muda 1,6 g de inoculante de FMAs contendo as seguintes esporos: 17 esporos de *Gigaspora margarita*; 21 esporos de *Entrophospora contigua*; 15 esporos de *Scutellospora calospora*; 34 esporos de *Scutellospora heterogama* e 25 esporos de *Glomus clarum*.

Os isolados de rizóbio utilizados para inoculação foram estirpes específicas de cada leguminosa arbórea, além de isolados obtidos de área contaminadas com resíduos oleosos na Refinaria Duque de Caxias – REDUC. Esses isolados de rizóbio mais duas estirpes conhecidas de cada espécie de leguminosa foram misturadas em um coquetel para a



inoculação das mudas no viveiro e, novamente, no transplante aos vasos na casa de vegetação. Para isso foram pipetados sobre as raízes 2 mL de meio de cultura 79 líquido (FRED E WAKSMAN, 1928), onde se multiplicou os seguintes isolados de rizóbios: L107; L84; S2P9-2; F1P6-5; L91; L79; M16; L8R; 23; 33; 31,1; 52,1 E 27-1.

### 3.3. Delineamento Experimental

O delineamento adotado foi blocos casualizado (DBC) em esquema fatorial 7 x 5, sendo 7 espécies de leguminosas arbóreas e 5 tratamentos de petróleo, com cinco repetições, totalizando 25 vasos por espécie arbórea e 175 vasos no experimento. A unidade experimental foi composta de um vaso com uma muda. Como testemunhas da fitorremediação foram utilizados dois vasos de cada nível de contaminação por petróleo, totalizando dez vasos, mantidos sem o plantio das espécies arbóreas, sendo irrigados e colocados nas mesmas condições que os vasos dos experimentos.

### 3.4. Condução do Experimento

As diferentes espécies arbóreas foram transplantadas para os vasos em um mesmo dia. Semanalmente após o plantio foi feita aplicação de 10 mL por vaso de solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950), modificada com pouco fósforo e nitrogênio, descrita na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição química e concentração final de compostos utilizados na solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada para uso em experimento com fungos micorrízicos em leguminosas arbóreas.

Reagente	Formula química	Concentração do reagente na solução
		final (g . L <sup>-1</sup> )
Fosfato de potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0004083
Cloreto de potássio	KCl	0,1118325
Sulfato de amônio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0330347
Nitrato de cálcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,1180756
Sulfato de cálcio	CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1721723
Sulfato de magnésio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1478886
EDTA-férrico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> FeN <sub>2</sub> NaO <sub>8</sub>	0,0110116
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0009275
Cloreto de manganês	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,0004948
Sulfato de zinco	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0000719
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0002497
Molibdato de sódio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0000048

Os vasos foram irrigados diariamente com água desmineralizada e o experimento foi conduzido por 105 dias (07/03/2007 a 22/06/2007). Os vasos sem plantas, testemunhas da fitorremediação, foram mantidos nas mesmas condições de umidades dos vasos com plantas.

### **3.5. Avaliações**

#### **3.5.1. Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs)**

Devido às análises de TPH serem demoradas e caras, não foram amostradas com repetições. Antes do transplante das mudas foi retirada de cada parcela experimental uma amostra de 1 g de solo formando uma amostra composta de cada nível de contaminação por petróleo. Esta amostra foi armazenada em recipiente inerte ao petróleo e congelada em *freezer* para posterior determinação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) no CENPES – PETROBRAS, pela metodologia EPA 8015 (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2007) . Outra amostragem semelhante tomada em cada tratamento e nos vasos sem plantas foi realizada ao final da condução do experimento para a mesma determinação. A comparação destas duas amostragens com o controle (sem planta) indicou as possíveis leguminosas arbóreas capazes de remoção de TPHs do solo.

#### **3.5.2. Altura e diâmetro do colo**

Durante a condução do experimento as plantas foram medidas quanto altura e diâmetro do colo a cada 15 dias. Utilizou-se uma fita métrica para medir a altura e um paquímetro para medir o diâmetro de colo. Na impossibilidade de obter mudas de diferentes espécies exatamente com mesma altura e diâmetro de colo para o plantio do experimento, optou-se nas análises estatísticas destas duas variáveis. Foi usada a taxa de crescimento diária, obtida pela diferença de crescimento entre a última e a primeira avaliação, dividida pelo número total de dias de condução.

#### **3.5.3. Clorofila**

Foi determinada a atividade fotossintética das plantas (determinação da clorofila) utilizando o medidor portátil de clorofila SPAD. Este aparelho realiza leituras instantâneas do teor de clorofila na folha sem haver a necessidade de sua destruição.

Foram realizadas duas medições finais do experimento, dias 19 e 21/06/2006. O processo de medição baseou-se na escolha de uma folha sadia e vigorosa posicionada na parte mediana da copa. Nessa mesma folha foram tomadas três medições (adimensional) e para as análises da clorofila, foi realizada a média das três leituras tomadas em cada dia. As avaliações de cada dia foram analisadas separadamente.

#### **3.5.4. Parte aérea**

Depois de colhidas, a parte aérea das plantas foi pesada para determinar a massa fresca. Logo em seguida foi submetida à estufa de circulação de ar forçada a 68 °C, até atingir peso constante e pesadas posteriormente para determinação da massa seca. A parte aérea depois de seca e pesada foi enviada a Embrapa Solos para ser moída e submetida à digestão nitro-perclórica para análise dos teores de nutrientes nos tecidos pela metodologia de SILVA (1999).

### **3.5.5. Raízes**

As raízes foram lavadas e então retiradas 0,5 g de raízes finas de cada planta, de forma aleatória, em toda a extensão do sistema radicular. Estas amostras de raízes foram armazenadas em álcool 50% até seu processamento para clarificação e coloração (KOSKE & GEMMA, 1989), para posterior avaliação da colonização micorrízica. Nesta avaliação, a cada amostra de raiz foi montada uma lâmina para microscopia, usando glicerina, e pelo menos 100 segmentos de raízes foram observados em microscópio, aumento de 200x, para avaliar a colonização por hifas, vesículas e arbúsculos, de acordo com McGONIGLE *et al.* (1990). A avaliação da massa fresca e seca da raiz não foi realizada devido à metodologia não ser adequada junto ao uso do condicionador de solo, pois os grânulos de gel ficam presos na raiz e podem superestimar os resultados.

### **3.5.6. FMAs e nódulos**

Do solo, amostras foram retiradas para avaliação da densidade de esporos de FMAs presentes após a condução do experimento. Para isso, 50 mL de solo foram peneirados úmidos em malha de 53  $\mu\text{m}$ , conforme a metodologia de GERDEMANN & NICOLSON (1963) e centrifugado em água e sacarose 45%, por 3000 rpm e 3 min, e 2000 rpm e 2 min, respectivamente. O sobrenadante foi coletado, lavado abundantemente, e os esporos quantificados em microscópio estereoscópico em aumento de 40x.

Após a contagem, lâminas permanentes para microscopia foram montadas com os esporos extraídos do solo visando à identificação das espécies de FMAs dominantes pela morfologia dos esporos, conforme o Manual de SCHENCK & PERES (1987).

Os nódulos presentes nas raízes foram lavados, separados manualmente, contados, colocados para secar e pesados para determinar a massa seca.

### **3.6. Análise Estatística**

Os dados obtidos das avaliações das alturas, diâmetro do colo, clorofila, massa e teores de nutrientes da parte aérea seca, número e massa de nódulos secos, número de esporos e colonização de FMAs das leguminosas foram testadas quanto a homogeneidade das variâncias e a distribuição normal. Os dados foram transformadas em raiz quadrada de  $x+1$  para as variáveis número e massa de nódulos secos e número de esporos de FMAs para a obtenção destas características. Foram então submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott 5%, utilizando o programa estatístico SISVAR 4.6 (FERREIRA,1999). Para os níveis de contaminação por petróleo foram estabelecidas regressões polinomiais utilizando o SISVAR 4.6. Para a massa da parte aérea seca, procurou-se ajustar curvas exponenciais ou logarítmicas utilizando o programa TableCurve 3.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs)

Os valores de TPH, em  $\text{mg.kg}^{-1}$ , são apresentados na Tabela 3 e o cálculo da porcentagem de remoção na Tabela 4. As leguminosas com maior capacidade de remoção de TPH foram *A. angustissima* no nível de contaminação  $10 \text{ g kg}^{-1}$ ; *A. auriculiformis* no nível  $30 \text{ g kg}^{-1}$ ; *M. artemisiana* nos níveis  $50 \text{ e } 70 \text{ g kg}^{-1}$  e, principalmente, *S. saman* nos níveis  $30, 50 \text{ e } 70 \text{ g kg}^{-1}$ , que apresentaram valores de porcentagem de remoção maior ou igual a média mais o desvio padrão. À medida que aumentou a concentração de petróleo no solo, menor foi a remoção de TPH pelas espécies vegetais estudadas. Os valores médios de redução de TPH em 101 dias de condução das plantas foram 5388, 8110, 8066 e  $3480 \text{ mg.kg}^{-1}$  nas concentrações de  $10, 30, 50 \text{ e } 70 \text{ g kg}^{-1}$  de petróleo, respectivamente.

**Tabela 3.** Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) das amostras de solo coletadas nos níveis  $10, 30, 50 \text{ e } 70 \text{ g kg}^{-1}$  de contaminação por petróleo no solo.

Espécie	TPH ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )			
	10	30	50	70
<i>A. angustissima</i>	4251	14885	23420	32115
<i>M. artemisiana</i>	4641	14155	20511	31288
<i>S. saman</i>	4598	13501	20848	30580
<i>A. holosericea</i>	4682	14968	23105	34662
<i>A. auriculiforme</i>	4652	13759	22072	32525
<i>A. mangium</i>	4744	14521	23838	32580
<i>M. caesalpinifolia</i>	4812	15136	23898	33522
Controle - sem planta	4472	14267	23222	33636
Inicial - antes do plantio	9994	22509	30680	36093

**Tabela 4.** Porcentagem de remoção de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) das amostras de solo coletadas nos níveis 10, 30, 50 e 70 g kg<sup>-1</sup> de contaminação por petróleo em relação ao nível inicial do plantio.

Espécies	Remoção (%) de TPH			
	10	30	50	70
<i>Acacia angustissima</i>	<b>57,5</b>	33,9	23,7	11,0
<i>Acacia auriculiformis</i>	53,5	<b>38,9</b>	28,1	9,9
<i>Acacia holosericea</i>	53,2	33,5	24,7	4,0
<i>Acacia mangium</i>	52,5	35,5	22,3	9,7
<i>Mimosa artemisiana</i>	53,6	37,1	<b>33,1</b>	<b>13,3</b>
<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	51,9	32,8	22,1	7,1
<i>Samanea saman</i>	54,0	<b>40,0</b>	<b>32,0</b>	<b>15,3</b>
<b>Controle sem planta</b>	55,3	36,6	24,3	6,8
Média	53,9	36,0	26,3	9,6
Desvio Padrão	1,76	2,59	4,29	3,66

Em negrito, valores maiores ou iguais à média mais o desvio padrão.

VASUDEVAN & RAJARAM (2001) em experimentos realizados para otimizar a biorremediação de solo contaminado com borra de petróleo, verificaram uma remoção, em 90 dias, de 76% dos hidrocarbonetos inicialmente presentes na condição onde foi adicionado farelo de trigo como material estruturante. Já na condição onde houve apenas o bioestímulo da microbiota nativa do solo contaminado, a remoção foi de 66%. A adição do material estruturante mostrou também ter um efeito fundamental na população microbiana nativa, uma vez que foi observado pelos autores um aumento de 120 vezes na concentração microbiana com relação à população inicial.

Neste caso, os autores destacam a importância da adição do material estruturante em solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. A adição do gel hidrorretentor Stockosorb 500<sup>®</sup> como condicionante do solo reduz a hidrofobia causada às partículas do solo pela contaminação por petróleo, aumentando a umidade (BENTO *et al.* (2007). No presente trabalho, utilizando este condicionador de solo, as leguminosas arbóreas puderam estabelecer e crescer, contribuindo para a remoção de TPH do solo.

Outros autores, como JORGENSEN *et al.* (2000) empregam cavaco de madeira como material estruturante para a biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante em biopilhas. Esta técnica foi associada à técnica de bioaumento, que é a extração de microrganismos do próprio solo contaminado, seu crescimento *in vitro* e re-introdução no ambiente contaminado em maior concentração (ROMANTSCHUK *et al.*, 2000; PROVIDENTI *et al.*, 1993). Os resultados obtidos indicam uma redução de 70% no teor de óleo contaminante, sendo este resultado atribuído pelos autores basicamente à adição de material estruturante, uma vez que, a adição de inóculo microbiano (bioaumento) não apresentou efeito positivo no processo de biodegradação do poluente.

#### 4.2. Crescimento Vegetativo

Dos 175 vasos com plantas somente dois apresentaram mortes no maior nível de contaminação por petróleo de 70 g kg<sup>-1</sup>, sendo um de *M. artemisiana* e outro de *A. mangium*.

Na Tabela 2A é apresentado para as variáveis avaliadas um resumo da análise de variância sendo apresentado o nível de significância obtido no teste F. A interação petróleo x espécie não apresentou nível de significância pelo teste de F para o incremento de diâmetro de colo, massa de nódulos e número de esporos.

O incremento da altura das plantas durante os 101 dias de condução do experimento é apresentado na Tabela 5. *A. auriculiforme* e *A. holosericea* apresentaram incrementos em altura em destaque, sempre superando a *M. artemisiana*, sendo este efeito foi mais consistente até o nível contaminação de 50 g kg<sup>-1</sup>. *M. artemisiana* e *S. saman* foram as espécies que tenderam apresentar o menor incremento em altura. Em relação aos níveis de contaminação, as espécies que foram mais sensíveis e apresentaram redução do incremento de altura foram *M. artemisiana*, *A. holosericea* e *A. mangium* com reduções lineares ou seguindo tendência quadrática. Os ajustes da regressão em função dos níveis de petróleo foram baixos ou não significativos para as variáveis.

**Tabela 5.** Incremento da altura aos 101 dias, em centímetro, no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas.

Petróleo (g.kg <sup>-1</sup> )	ang	art	aur	cae	hol	man	sam
0	0,19 b	0,21 b	0,36 a	0,11 b	0,35 a	0,30 a	0,21 b
10	0,20 a	0,06 b	0,23 a	0,22 a	0,28 a	0,18 a	0,05 b
30	0,23 a	0,06 b	0,31 a	0,10 b	0,28 a	0,10 b	0,08 b
50	0,20 a	0,00 b	0,31 a	0,12 b	0,24 a	0,06 b	0,15 b
70	0,17 b	0,00 c	0,14 b	0,34 a	0,22 b	0,07 c	0,19 b
R <sup>2</sup>	----	0,68	----	0,91	0,83	0,97	0,9
Ajuste	NS	linear	S.A.	cúbico	linear	quadrático	cúbico

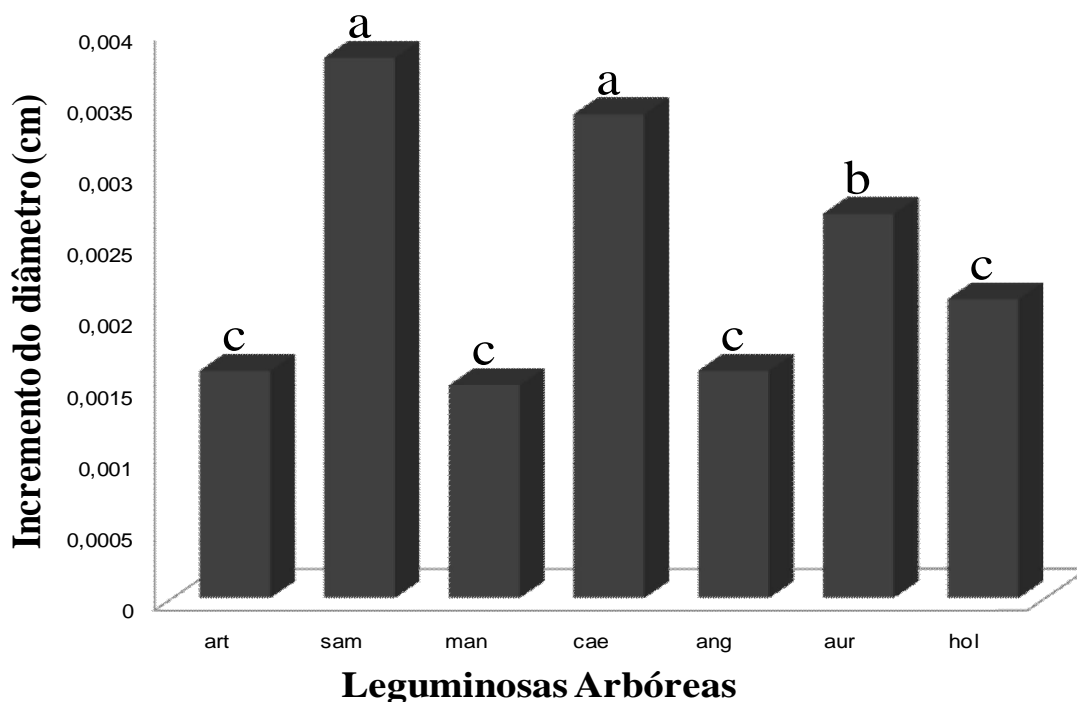
Letras iguais, na linha, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

NS – Regressão não significativa pelo teste de F (P≥0,10).

S.A. – Regressão sem ajustes aos modelos polinomiais.

O incremento em diâmetro do caule durante os 101 dias de condução das plantas não apresentou interação significativa entre os fatores estudados (Tabela 2A). As médias de incremento em diâmetro para as diferentes espécies arbóreas são apresentadas na Figura 1. *M. caesalpiniiifolia* e *S. saman* foram as espécies que apresentaram maior incremento de diâmetro do colo quando comparadas as outras espécies, seguida de *A. auriculiformis*.

A massa da parte aérea das espécies arbóreas é apresentada na Tabela 6. As espécies *A. angustissima*, *M. caesalpiniiifolia* e *S. saman* foram as espécies de maior crescimento na maioria das condições de contaminação estudadas. As espécies com menor acúmulo de massa foram *M. artemisiana* e *A. mangium*, particularmente nos solos contaminados. Os ajustes de regressão polinomial foram muito baixos. Assim para esta variável buscou-se ajustes exponenciais ou logarítmicos apresentados na Figura 2. Verifica-se que *S. saman*, *A. holosericea*, *A. mangium* e *M. artemisiana* apresentaram queda de massa exponencial ou logarítmica entre os níveis 0 e 10 g kg<sup>-1</sup> de contaminação por petróleo. *M. caesalpiniiifolia* e *S. saman* tenderam a aumentar a massa com o aumento de contaminação ao contrário de todas as demais leguminosas arbóreas. *A. angustissima* foi a única espécie que não sofreu efeito dos níveis de contaminação, não apresentando efeito significativo.



**Figura 1.** Incremento do diâmetro de colo para as diferentes espécies arbóreas. Letras iguais no topo das barras não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott 5%.

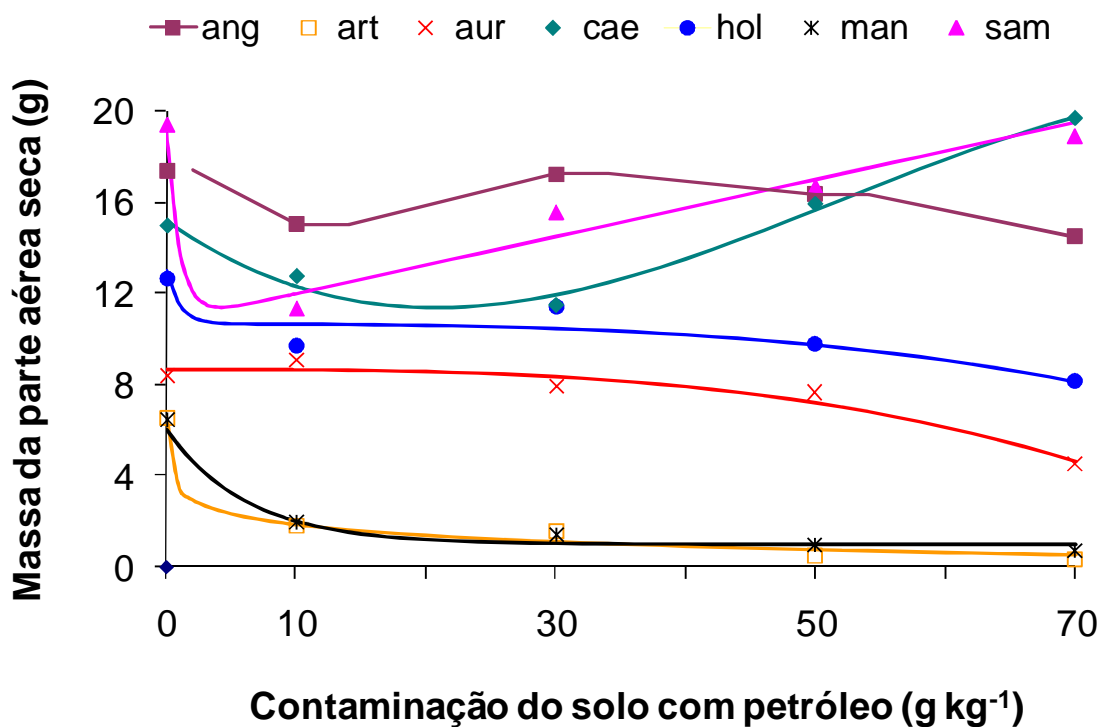
**Tabela 6.** Massa da parte aérea seca, em gramas, no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas.

Petróleo (g.kg <sup>-1</sup> )	ang	art	aur	cae	hol	man	sam
0	17,38 a	6,54 b	8,34 b	14,97 a	12,63 a	6,47 b	19,37 a
10	15,01 a	1,84 c	9,06 b	12,76 a	9,71 b	1,96 c	11,32 b
30	17,23 a	1,64 d	7,91 c	11,49 b	11,38 b	1,44 d	15,54 a
50	16,34 a	0,57 d	7,64 c	15,92 a	9,79 b	0,99 d	16,66 a
70	14,47 a	0,38 c	4,53 b	19,66 a	8,16 b	0,73 c	18,87 a
R <sup>2</sup>	----	0,63	0,74	0,93	0,62	----	0,69
Ajuste	S.A.	linear	linear	quadrático	linear	NS	cúbico

Letras iguais, na linha, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

NS – Regressão não significativa pelo teste de F ( $P \geq 0,10$ ).

S.A. – Regressão sem ajustes aos modelos polinomiais.



**Figura 2.** Massa da parte aérea seca das leguminosas arbóreas sobre o efeito dos níveis de contaminação por petróleo. ang: Não significativo; art:  $y=3,45-0,68\ln(x)$ ,  $R^2=0,98$ ; aur:  $y=8,65-1,16E-05x^3$ ,  $R^2=0,94$ ; cae:  $y=15,18-0,40x+0,012x^2-7,72E-05x^3$ ,  $R^2=0,98$ ; hol:  $y=10,66-7,4E-06x^3+2,36e^{-x}$ ,  $R^2=0,94$ ; man:  $y=0,98+5,02e^{-(x/6,23)}$ ,  $R^2=0,99$ ; sam:  $y=10,75+0,12x+8,33e^{-x}$ ,  $R^2=0,92$ , onde  $e$  é o número neperiano=2,72.

BENTO *et al.* (2007), estudando o crescimento de *M. caesalpiniiifolia* e *A. holosericea* em solo contaminado por diferentes níveis de petróleo, verificaram que a utilização do condicionador hidrogel favoreceu seus crescimentos. SAGGIN JÚNIOR *et al.* (2006) em experimentos sem aplicação de condicionador de solo, verificou que a contaminação por petróleo afetou grandemente a área foliar e a sobrevivência de *S. saman*, *A. holosericea* e *M. caesalpiniiifolia*.

A *A. angustissima*, *M. caesalpiniiifolia*, *A. holosericea* e *A. auriculiformis* apresentaram bons resultados no estabelecimento e crescimento nos maiores níveis de contaminação por petróleo. Apesar dessas espécies arbóreas terem esse comportamento perante a contaminação do solo por resíduos oleosos, elas apresentaram menor capacidade de remoção dos TPHs do solo contaminado (Tabela 4). No entanto, por possuir essa capacidade de estabelecimento e crescimento nas áreas com a presença de petróleo, podem ser indicadas para outras finalidades, tais como, reflorestamento e/ou revegetação dessas áreas; produção de fitomassa e biomassa por serem espécies de rápido crescimento e proporcionarem aumento da microbiota do solo pela deposição da serapilheira; aumento da ciclagem de nutrientes; proteção do solo contra ação do vento, chuva, insolação, além de outras aplicações no sentido de recuperar uma área degradada por petróleo. As Figuras 7A até 13A mostram as sete espécies de leguminosas estudadas, podendo ser comparadas quanto ao seu desenvolvimento vegetativo nos diferentes níveis de contaminação por petróleo. Observando-se estas figuras, verifica que a *A. mangium* e *M. artemisiana* foram as espécies com maior redução com o incremento da contaminação do solo por petróleo (Fig. A7 e A11). As demais espécies foram



pouco afetadas pela contaminação, apresentando crescimento similar entre os níveis de petróleo (Figs A8, A9, A10, A12 e A13).

### 4.3. Nodulação e Micorrização

Na Tabela 7 é verificado o número de nódulos que cada leguminosa arbórea formou em seu sistema radicular dentro dos diferentes níveis de petróleo no solo. A *S. saman* e *A. angustissima* foram as leguminosas que apresentaram maior número de nódulos na ausência de contaminações por petróleo, porém, mantiveram números de nódulos em destaque mesmo nos demais níveis de contaminação, onde também se destacaram a nodulação de *A. auriculiformis*, *M. caesalpiniiifolia* e *A. holosericea*.

**Tabela 7.** Número de nódulos no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas. Médias destransformadas por  $(x+1)^{1/2}$ .

Petróleo (g.kg <sup>-1</sup> )	ang	art	aur	cae	hol	man	sam
0	230,2 a	122,8 b	91,8 b	118,4 b	137,0 b	104,6 b	292,4 a
10	157,8 a	50,4 a	88,0 a	37,8 a	87,8 a	81,0 a	73,0 a
30	108,4 a	20,4 b	92,2 a	49,8 b	40,6 b	26,0 b	179,6 a
50	143,8 a	5,2 b	120,2 a	132,2 a	107,0 a	34,6 b	185,8 a
70	80,2 a	4,3 b	45,0 b	100,8 a	48,8 b	8,3 b	141,0 a
R <sup>2</sup>	0,93	0,86	----	1	0,86	0,84	0,65
Ajuste	cúbico	linear	S.A.	cúbico	cúbico	linear	cúbico

Letras iguais, na linha, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

NS – Regressão não significativa pelo teste de F ( $P \geq 0,10$ ).

S.A. – Regressão sem ajustes aos modelos polinomiais.

FERREIRA (2007) estudou os mesmos isolados de bactéria fixadora de nitrogênio inoculados nos experimentos de SAGGIN JÚNIOR *et al.* (2006) e BENTO *et al.* (2007) e no presente experimento. A autora verificou a eficiência na capacidade de fixação biológica de nitrogênio de 13 isolados de áreas contaminadas por petróleo, por meio de experimento com vasos de Leonard (VINCENT, 1970), com três espécies arbóreas testadas (*M. caesalpiniiifolia*, *A. holosericea* e *S. saman*). Os resultados do teste de eficiência e eficácia mostraram que houve diferenças de desempenho dos isolados nas espécies arbóreas testadas, revelando seis isolados com potencial para uso em simbiose com duas das espécies testadas (*M. caesalpiniiifolia* e *S. saman*) apresentando eficiência superior aos isolados atualmente recomendados para estas espécies.

Para a mesma autora, dentre os 13 isolados testados, os que foram mais eficientes para *M. caesalpiniiifolia* foram os identificados com 23 e 31.1, e para *S. saman*, foram os identificados com L91, F1P6-5, e 27.1, sendo que todos foram utilizados no coquetel inoculado no presente experimento, justificando a maior nodulação destas espécies nos tratamentos com contaminação de petróleo.

Confirmando estes resultados, a massa de nódulos produzidos é apresentada na Tabela 8. Verifica-se que realmente *S. saman* apresentou a maior massa de nódulos em relação às demais espécies, enquanto que *M. artemisiana* e *A. mangium* apresentaram as menores massas de nódulos.

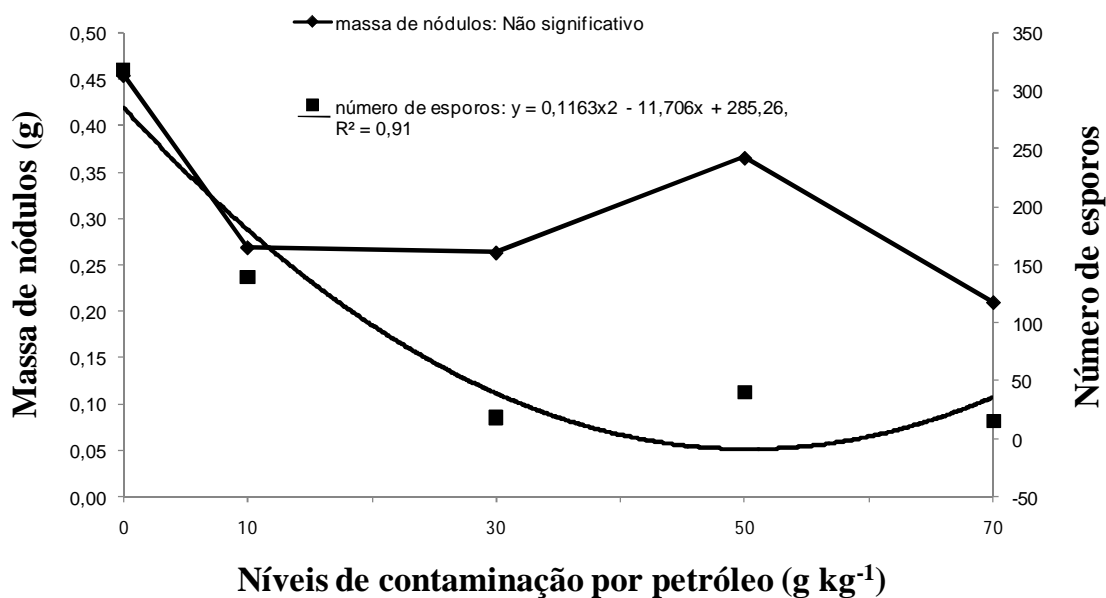
A esporulação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) na rizosfera das plantas é apresentada na Tabela 8. As espécies arbóreas que promoveram maior esporulação foram *M. artemisiana*, *A. mangium*, *A. angustissima* e *A. auriculiformis*.

**Tabela 8.** Comparação das médias de massa de nódulos e número de esporos das leguminosas arbóreas.

Leguminosas arbóreas	massa de nódulo	número de esporos		
	(g)		(unid)	
<i>A. angustissima</i>	0,33	b	166	a
<i>A. auriculiformis</i>	0,22	b	132	a
<i>A. holosericea</i>	0,22	b	56	b
<i>A. mangium</i>	0,12	c	119	a
<i>M. artemisiana</i>	0,12	c	135	a
<i>M. caesalpinifolia</i>	0,21	b	79	b
<i>S. saman</i>	0,92	a	57	b

Letras iguais, na coluna, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

Tanto a massa de nódulos quanto a esporulação de FMAs apresentaram redução com os níveis de contaminação por petróleo. A massa de nódulos não obteve um ajuste de regressão polinomial, mas para a esporulação de FMAs, a redução seguiu um modelo quadrático (Figura 3).



**Figura 3.** Massa de nódulos e número de esporos sobre o efeito dos níveis de contaminação por petróleo.

Na Tabela 9 observa-se a porcentagem de colonização micorrízica das leguminosas nos diferentes níveis de petróleo no solo. *M. artemisiana* e *A. angustissima* foram as espécies que promoveram maiores porcentagens de colonização micorrízica nas suas raízes, superiores as demais leguminosas no solo não contaminado petróleo. No maior nível de contaminação, a colonização foi superior em *M. artemisiana*, *M. caesalpinifolia* e *A. mangium*.

**Tabela 9.** Porcentagem de colonização micorrízica no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas.

Petróleo (g.kg <sup>-1</sup> )	ang	art	aur	cae	hol	man	sam							
0	71	a	77	a	52	b	48	b	43	b	48	b	52	b
10	17	c	62	a	43	b	73	a	78	a	67	a	41	b
30	44	b	68	a	59	b	84	a	78	a	80	a	45	b
50	79	a	76	a	56	b	56	b	43	b	66	a	49	b
70	68	b	83	a	60	b	83	a	57	b	81	a	51	b
R <sup>2</sup>	0,93	----	----	0,95	0,99	0,97	----							
Ajuste	cúbico	S.A.	S.A.	cúbico	cúbico	cúbico	S.A.							

Letras iguais, na linha, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

NS – Regressão não significativa pelo teste de F ( $P \geq 0,10$ ).

S.A. – Regressão sem ajustes aos modelos polinomiais.

A espécie de FMA que predominou nas rizosfera das sete leguminosas arbóreas estudadas foi *G. clarum*. Esta espécie prevaleceu sobre as outras espécies de FMAs inoculadas no coquetel de cinco. Foi seguida pelas espécies *S. heterogama* e *G. margarita*.

CARENHO (1998) justifica a maior presença do gênero *Glomus* em diversos ambientes por apresentar maior capacidade de adaptação a solos submetidos a diferentes variações nos teores de matéria orgânica, calagem, textura, entre outros fatores, demonstrando ter espécies resistentes a perturbações ambientais.

O emprego das FMAs e rizóbios fixadores de nitrogênio, mesmo que não degradem diretamente contaminantes do solo, estimulam muito a atividade de outros microrganismos rizosféricos que levam a biorremediação, além disso, promovem, através das simbioses radiculares, o estabelecimento e crescimento das leguminosas no solo contaminado por petróleo. SAGGIN JÚNIOR *et al.*(2006) concluem que as simbioses radiculares auxiliaram sabiá, acácia e saman a crescerem mais em altura em solos contaminados por petróleo. Para BENTO *et al.*(2007), a inoculação da mudas de acácia e sabiá com FMAs afetou pouco o crescimento destas plantas no solo contaminado que já possuía FMAs. Nesse sentido, o autor evidencia que os FMAs presentes no solo contaminado por petróleo são mais adaptados ou tolerantes aos hidrocarbonetos no solo, apresentando maior capacidade de colonização.

#### 4.4. Clorofila

Nas Tabelas 10 e 11 são observados os teores de clorofila nas leguminosas arbóreas em duas medições. Em ambas as medições as que se destacaram no teor de clorofila foram *A. auriculiformis*, *S. saman*, *M. caesalpiniiifolia* e *A. holosericea*. Na maior contaminação por petróleo, *A. auriculiformis* e *M. caesalpiniiifolia* apresentaram os maiores teores na primeira medição e *S. saman* os maiores teores na segunda medição. Isto sugere que estas espécies possivelmente tenham neste nível de petróleo maior taxa fotossintética e maiores teores de nitrogênio como relatado por (CHAPMAN & BARRETO, 1997).

Segundo os autores VARVEL *et al.* (1997) e BLACKMER & SCHEPERS (1995), o desenvolvimento do medidor portátil de clorofila (SPAD) surge como uma nova ferramenta para avaliação do nível de N nas plantas em cereais. O teor de clorofila da folha também se correlaciona positivamente com o teor de N na planta (SCHADCHINA & DMITRIEVA, 1995) e com o rendimento das culturas (SMEAL & ZHANG, 1994; PIEKIELEK & FOX, 1992). Esta relação é atribuída, principalmente, ao fato de que 50 a 70% do N total das folhas

ser integrante de enzimas (CHAPMAN & BARRETO, 1997) que estão associadas aos cloroplastos (STOCKING & ONGUN, 1962).

**Tabela 10.** Teor de clorofila da primeira medição no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas.

Petróleo (g.kg <sup>-1</sup> )	ang	art	aur	cae	hol	man	sam							
0	20	d	50	b	63	a	49	b	48	b	32	c	53	b
10	18	c	47	a	55	a	47	a	45	a	31	b	48	a
30	16	d	40	b	57	a	48	b	42	b	31	c	55	a
50	15	c	27	b	57	a	51	a	45	a	35	b	56	a
70	26	c	24	c	51	a	52	a	42	b	38	b	50	b
R <sup>2</sup>	----	0,97	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Ajuste	S.A.	linear	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.

Letras iguais, na linha, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

NS – Regressão não significativa pelo teste de F ( $P \geq 0,10$ ).

S.A. – Regressão sem ajustes aos modelos polinomiais.

**Tabela 11.** Teor de clorofila da segunda medição no desdobramento dos níveis de contaminação por petróleo dentro das leguminosas arbóreas.

Petróleo (g.kg <sup>-1</sup> )	ang	art	aur	cae	hol	man	sam							
0	11	a	38	a	42	a	45	a	38	a	27	b	38	a
10	14	c	27	b	43	a	42	a	38	a	24	b	42	a
30	13	d	35	b	31	c	45	a	40	b	24	c	50	a
50	13	c	23	b	39	a	48	a	42	a	28	b	48	a
70	16	c	19	c	43	b	41	b	42	b	34	b	50	a
R <sup>2</sup>	----	0,64	0,61	----	----	----	77**							
Ajuste	S.A.	linear	quadrático	S.A.	S.A.	S.A.	linear							

Letras iguais, na linha, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

NS – Regressão não significativa pelo teste de F ( $P \geq 0,10$ ).

S.A. – Regressão sem ajustes aos modelos polinomiais.

#### 4.5. Análise de Nutrientes na Parte Aérea

O resumo da análise de variância dos teores de nutrientes na parte aérea é apresentado na Tabela 3A. Como para este tipo de dado costuma-se ter efeitos muito variáveis, efetuou-se o desdobramento da interação somente nas variáveis, cujo este efeito foi altamente significativo ( $P < 0,01$ ), sendo estas os teores de potássio (K), cálcio (Ca) e sódio (Na). Os demais teores analisados são apresentados na Tabela 13 para as diferentes espécies de leguminosas, sendo pouco influenciados pelos níveis de petróleo no solo, exceto o cobre (Cu) que apresentou um teor médio do micronutriente de 10,7 mg kg<sup>-1</sup> para *M. artemisiana*, sendo este teor superior para essa espécie até o nível 50 g kg<sup>-1</sup> de contaminação por petróleo (Tabela 12). Segundo EPSTEIN (1975), o Cu é um ativador, especialmente de várias enzimas de oxidação-redução, como nos metabolismos do ácido ascórbico, das oxidases do citocromo, das enzimas da fotossíntese, como a plastocianina e rubisco, da SOD – Superóxido dismutase (enzima que remove radicais superóxidos formados a partir do O<sub>2</sub>), de polifenóis e do Ácido Abscísico.

**Tabela 12.** Teor de Cu, em mg kg<sup>-1</sup>, obtido da parte aérea das leguminosas arbóreas.

Petróleo (g.kg-1)	ang	art	aur	cae	hol	man	sam							
0	3,1	c	10,6	a	7,5	b	6,7	b	5,3	c	7,7	b	3,0	c
10	3,7	b	15,1	a	4,8	b	6,2	b	5,7	b	5,9	b	5,7	b
30	2,8	b	11,5	a	4,2	b	5,7	b	5,1	b	3,7	b	2,7	b
50	2,9	b	10,4	a	3,6	b	4,3	b	4,8	b	4,1	b	4,3	b
70	2,3	a	4,4	a	3,1	a	3,6	a	3,2	a	5,9	a	2,9	a
R <sup>2</sup>	---		0,86		0,73		0,98		0,78		0,99		---	
Ajuste	S.A.		quadrático		linear		linear		linear		quadrático		S.A.	

Letras iguais, na linha, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

NS – Regressão não significativa pelo teste de F (P≥0,10).

S.A. – Regressão sem ajustes aos modelos polinomiais.

Os teores de ferro (Fe) e magnésio (Mg) não apresentaram diferenças significativas nas médias entre as leguminosas estudadas. *M. artemisiana* foi a leguminosa que proporcionou os maiores teores do macronutriente fósforo (P), e dos teores dos micronutrientes cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) e do elemento mineral alumínio (Al). Como esta espécie foi uma das mais colonizadas por FMAs, acredita-se que este fungo esteja promovendo esta melhor nutrição nesta espécie.

**Tabela 13.** Resultado da análise de nutrientes e Al na parte aérea das leguminosas arbóreas.

Espécie	P		Mg		Cu		Zn		Mn		Fe		Al	
	g.kg <sup>-1</sup>				mg.kg <sup>-1</sup>									
art	3,1	a	0,3	a	10,7	a	50,0	a	98,0	a	309,0	a	659,1	a
sam	1,3	b	0,2	a	3,7	c	8,1	d	22,3	c	231,1	a	266,7	b
man	1,8	b	0,1	a	5,6	b	23,8	c	61,4	b	153,6	a	237,5	b
cae	1,8	b	0,2	a	5,3	b	16,9	c	53,9	b	140,6	a	190,9	b
ang	1,7	b	0,1	a	3,0	c	33,7	b	62,6	b	165,9	a	211,2	b
aur	1,8	b	0,2	a	4,7	b	21,3	c	66,9	b	177,8	a	218,8	b
hol	2,2	b	0,2	a	4,9	b	22,1	c	53,6	b	214,4	a	189,5	b

Letras iguais na coluna não diferenciam pelo teste Scott knott 5%.

Na Tabela 14 é apresentado os teores de Ca obtidos da parte aérea das leguminosas sobre o efeito dos diferentes níveis de petróleo. O Ca foi evidente para a *M. caesalpiniiifolia*, que a fez destacar das demais leguminosas pelo teor obtido do elemento de 1,6 g kg<sup>-1</sup>. Segundo OLIVEIRA (2006), o Ca é normalmente encontrado em maior proporção na parede celular e na lamela média das células, fazendo ligações entre os radicais dos ácidos poligiaracturônicos (pectinas) da parede celular e auxiliando, assim, na sua estabilização. A presença em maiores quantidades de Ca na *M. caesalpiniiifolia* indica uma estratégia da espécie para o fortalecimento no solo contaminado por petróleo.

**Tabela 14.** Teor de Ca, em g kg<sup>-1</sup>, obtido da parte aérea das leguminosas arbóreas.

Petróleo (gkg <sup>-1</sup> )	ang		art		aur		cae		hol		man		sam	
0	0,43	c	0,78	b	0,77	b	1,27	a	0,55	c	0,59	c	0,41	c
10	0,67	b	0,75	b	0,58	b	1,46	a	0,71	b	0,57	b	0,64	b
30	0,65	c	1,01	b	0,72	c	1,93	a	0,84	b	0,40	d	0,66	c
50	0,70	b	0,64	b	0,62	b	1,89	a	0,78	b	0,59	b	0,71	b
70	0,63	b	0,38	c	0,70	b	1,61	a	0,87	b	0,85	b	0,72	b
R <sup>2</sup>	0,72		0,85		----		0,98		0,70		0,93		0,64	
Ajuste	quadrático		quadrático		S.A.		quadrático		linear		quadrático		linear	

Letras iguais, na linha, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

NS – Regressão não significativa pelo teste de F (P≥0,10).

S.A. – Regressão sem ajustes aos modelos polinomiais.

Os teores de K provenientes da parte aérea das leguminosas sobre o efeito dos diferentes níveis de contaminação no solo por petróleo é apresentado na Tabela 15. O teor médio obtido do K para *A. mangium* foi de 12,3 g kg<sup>-1</sup>, sendo no nível 10 g kg<sup>-1</sup> de contaminação por petróleo o maior teor do macronutriente adquirido. *M. artemisiana*, *A. auriculiformis*, *A. holosericea* e *A. mangium* foram as espécies que apresentaram maiores teores do macronutriente no nível 30 g kg<sup>-1</sup> de contaminação por petróleo. Segundo MELO (1995), o potássio é considerado o principal ativador enzimático em vegetais, atuando em diversos tipos de reação de fosforilação, na síntese de ATP, na síntese de carboidratos, na migração de fotoassimilados, na respiração, na síntese de proteínas e na regulação osmótica.

**Tabela 15.** Teor de K, em g kg<sup>-1</sup>, obtido da parte aérea das leguminosas arbóreas.

Petróleo (g kg <sup>-1</sup> )	ang		art		aur		cae		hol		man		sam	
0	4,1	d	9,4	b	13,0	a	7,5	c	10,1	b	15,0	a	4,5	d
10	6,7	c	10,3	b	11,6	b	5,4	c	7,4	c	16,6	a	3,6	c
30	4,7	b	10,0	a	7,1	a	4,5	b	7,3	a	7,7	a	3,3	b
50	3,8	b	3,8	b	9,6	a	3,9	b	7,3	a	11,5	a	3,7	b
70	4,1	b	3,0	b	9,6	a	3,7	b	6,0	b	9,6	a	3,5	b
R <sup>2</sup>	----		0,98		0,78		0,78		----		----		----	
Ajuste	S.A.		cúbico		quadrático		linear		S.A.		S.A.		S.A.	

Letras iguais, na linha, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

NS – Regressão não significativa pelo teste de F (P≥0,10).

S.A. – Regressão sem ajustes aos modelos polinomiais.

Na tabela 16 é apresentados os teores de Na da parte aérea das leguminosas arbóreas sobre o efeito dos níveis de contaminação por petróleo. *A. mangium* foi a espécie que proporcionou maior teor do micronutriente no nível 10 g kg<sup>-1</sup> de contaminação por petróleo. *M. artemisiana*, *A. auriculiformis*, *A. holosericea* e *A. mangium* foram as espécies que apresentaram maiores teores do micronutriente no nível 50 e 70 g kg<sup>-1</sup> de contaminação por petróleo. Segundo WATAB *et al.* (1991), o Na atua como um competidor na absorção de K, pelo fato de os mecanismos de absorção de ambos os cátions serem semelhantes. Provavelmente, a absorção de Na nos efeitos das doses 50 e 70 g kg<sup>-1</sup> de petróleo no solo impediu que as leguminosas *M. artemisiana*, *A. auriculiformis*, *A. holosericea* e *A. mangium* pudesse absorver o macronutriente K nestes níveis de contaminação por petróleo, já que para as mesmas espécies, isso foi possível no nível 30 g kg<sup>-1</sup> de contaminação por petróleo.

**Tabela 16.** Teor de Na, em g kg<sup>-1</sup>, obtido da parte aérea das leguminosas arbóreas.

Petróleo (g,kg-1)	ang	art	aur	cae	hol	man	sam							
0	0,61	c	0,13	c	0,64	a	0,10	c	0,47	b	0,72	a	0,08	c
10	0,09	c	0,15	c	0,65	b	0,11	c	0,53	b	0,78	a	0,14	c
30	0,25	c	0,17	c	0,80	a	0,14	c	0,79	a	0,43	b	0,11	c
50	0,10	b	0,44	a	0,67	a	0,15	b	0,54	a	0,46	a	0,10	b
70	0,24	b	0,42	a	0,44	a	0,15	b	0,60	a	0,41	a	0,11	b
R <sup>2</sup>	----	0,84	0,93	----	----	0,73	----							
Ajuste	S.A.	linear	quadrático	S.A.	S.A.	linear	S.A.							

Letras iguais, na linha, indicam ausência de diferença significativa entre as espécies por Scott Knott 5%.

NS – Regressão não significativa pelo teste de F ( $P \geq 0,10$ ).

S.A. – Regressão sem ajustes aos modelos polinomiais.

Segundo EPSTEIN (1975), o manganês (Mn) é um dos ativadores enzimáticos da síntese protéica, do Ciclo de Crebs, da fotossíntese e da formação de clorofila, ele garante o funcionamento do cloroplasto. Na síntese de proteínas, ele exerce a função estrutural, garantindo a manutenção dos ribossomos e tem também função regulatória, ordenando a atividade de RNA polimerase. Para o mesmo autor, o zinco (Zn) é um ativador de várias enzimas de síntese de triptofano, que além de aminoácido essencial é também precursor das auxinas e SOD.

A micorrização favoreceu a *M. artemisiana* para o estabelecimento no solo contaminado por petróleo, colaborando para o aumento da absorção dos nutrientes, principalmente o fósforo. PEOPLES & CRASWELL (1992) relata que o fósforo, além de pouco disponível na maioria dos solos, é o principal nutriente limitante da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e da produção de biomassa nos sistemas naturais tropicais. Isso corrobora na hipótese da associação das micorrizas arbusculares com as leguminosas arbóreas para o estabelecimento e crescimento das mesmas em solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Para os autores SIQUEIRA & FRANCO (1998); SIQUEIRA (1996) a maior eficiência do uso de P em solos muito intemperizados, pode ser alcançada pela maior disponibilidade de matéria orgânica e através da simbiose que a maioria das espécies vegetais destas regiões formam com fungos micorrízicos. Esses autores destacam a importância dos FMAs no aumento da absorção de nutrientes no solo e a disponibilidade desses elementos na formação da serapilheira produzida.

OLIVEIRA *et al.* (1999) verificaram correlações positivas entre a colonização radicular e os teores de Ca, Mg, P e K no tecido foliar de oito espécies florestais da Amazônia, nutrientes considerados vitais para o crescimento e desenvolvimento das bananeiras (ALVES, 1991).

## 5. CONCLUSÃO

*S. saman* é a espécie mais promissora e indicada para ser recomendada com fins de fitorremediação de áreas contaminadas por petróleo e por remover mais hidrocarbonetos no solo, seguida da *M. artemisiana*.

As espécies de FMAs que predominaram nas sete leguminosas arbóreas estudadas foram em seqüência *G. clarum*, *S. heterogama* e *G. margarita*, que são indicadas em coquetel (mistura) de inóculos para ser utilizado como inoculantes de FMAs nas mudas para áreas com contaminação por petróleo.

*S. saman* apresentou a maior massa de nódulos em relação às demais leguminosas arbóreas, confirmando a eficiência dos isolados identificados com L91, F1P6-5 e 27.1.

A *A. angustissima*, *M. caesalpinifolia*, *A. holosericea* e *A. auriculiformis* proporcionaram bons resultados no estabelecimento e crescimento em todos os níveis de contaminação por petróleo. Por esse motivo, podem ser recomendadas para outras finalidades de uso, tais como rápido reflorestamento e/ou revegetação dessas áreas e restabelecimento da ciclagem de nutrientes.

Das sete leguminosas estudadas, a *A. mangium* e *M. artemisiana* foram as que mais sentiram com os efeitos dos hidrocarbonetos presentes no solo no crescimento.

O experimento confirmou o papel do condicionador de solo Stockosorb 500<sup>®</sup> como atuante na quebra da hidrofobia causada às partículas do solo pela contaminação do petróleo bruto e promotor do crescimento vegetal nestas condições.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOT, L. K. & ROBSON, A. D. **Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas.** *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v. 35, p.121-150, 1991.
- ACCIOLY, A. M. A. & SIQUEIRA, J. O. **Contaminação Química e Biorremediação do Solo.** In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V. V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. *Tópicos em Ciência do Solo.* Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, V.1, p. 299-352, 2000.
- ALEXANDER, M. **In: Biodegradation and Bioremediation.** *Academic Press*, 2<sup>nd</sup> ed., San Diego, U. S. A., 453p, 1999.
- ALVES, E.J. **A cultura da banana no Brasil e proposições para o seu melhoramento.** EMBRAPA/CNPMP, Cruz das Almas, BA. 40p, 1991.
- ANDERSON, T. A.; GUTHRIE, E. A. & WALTON, B. T. **Biorremediation In The Rhizosphere: Plant Roots and Associated Microbes Clean Contaminated Soil.** *Environ. Sci. Technol.*, 27: 2630-2636, 1993.
- ARTHUR, E. L.; PERKOVICH, B. S.; ANDERSON, T. A. & COATS, J. R. **Degradation of an atrazine and metolachor herbicide mixture in pesticide – contaminated soils from two agrochemical dealerships in Iowa.** *Water, air, soil poll.*, 119:75-90, 2000.
- BENTO, R. A.; FERREIRA, T. C.; SIMÕES, M. A.; MIRANDA, R. A.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; PITARD, R. M., STRALIOTTO, R., RIBEIRO DA SILVA, E. M.; TAVARES, S. R. L.; LANDA, F. H. T. G. & VOLPON, A. G. T. Desenvolvimento de mudas de sabiá e acácia micorrizadas e noduladas em solo contaminado por petróleo e condicionado por dois hidrorretentores. **XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo-Conquistas e Desafios da Ciência do Solo Brasileiro**, CD-ROM, doc. 3163. Anais..., 2007.
- BERNETH, L.; FIRTH, I.; McALLISTER, P. & RHODES, S. Biotechnologies for Remediation and Pollution Control in the Mining Industry. *Minerals & Metallurgical Processing*, 17 (2): 105-111, 2000.
- BLACKMER, T. M. & SCHEPERS, J. S. Techniques for monitoring crop nitrogen status in corn. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, n.9/10. 1791-1800 p., 1995.
- BOLAN, N. S. A. Critical-Review on the Role of Mycorrhizal Fungi in the Uptake of Phosphorus by Plants. **Plant and Soil**, V. 134, p. 189-207, 1991.
- BOVEY, R. W.; MEYER, R. E. & HEIN, JR. H. **Soil Persistence of Tebuthiuron In The Clypan Resource Area of Texas.** *Weed Sci.*, 30:140-144, 1982.

BROOKS, R. R. Phytoremediation By Volatilisation. In Brooks, R. R. Ed, **Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals**. CAB International, Wallingford, p. 289, 1998.

BROOKS, R. R.; CHAMBERS, M. F.; NICKS, L. J. & ROBINSON, B. H. **Phytomining**. *Trends In Plant Science*, V. 3, (9):359-362, 1998.

BROCKMEYER, R.E. JR; REY, J.R; VIRNSTEIN, R.W; GILMORE, R.G. & ERNEST, L. **Wetlands Ecology and Management**, 4(2) 1997, p 93-109.

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

CARRENHO, R. Influência de Diferentes Espécies de Plantas Hospedeiras e Fatores Edáficos no Desenvolvimento de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA). Rio Claro, UNESP. **Tese de Doutorado**, p.227, 1998.

CHAPMAN, S.C. & BARRETO, H.J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, Madison, v.89, n.4, p.557-562, 1997.

CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. Nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, V.51, p. 1729-1735, 2001.

CHO, B.; CHINO, H.; TSUJI, H.; KUNITO, T.; NAGAOKA, K.; OTSUKA, S.; YAMASHITA, K., MATSUMOTO, S. E OYAIZU, H. Laboratory-scale Bioremediation of Oil-contaminated Soil of Kuwait with Soil Amendment Materials. **Chemosphere**, 35 (7): 1599-1611, 1997.

CORRÊA, O. L. S. In: **Petróleo: Noções sobre Exploração, Perfuração, Produção e Microbiologia**. Rio de Janeiro. Ed. Interciência, 2003.

COTTHEM W. V. **O Papel de Terracottem como um Absorvente Universal**. Ghent. Bélgica, 1988.

CRAPEZ, Mirian. Efeitos dos Hidrocarbonetos de Petróleo na Biota Marinha. **Efeito de Poluentes em Organismos Marinhos**, Moraes, R. *et al.* (Eds) São Paulo, Arte e Ciência, Villipress, p 253-267. 2001.

CUNNINGHAM, S. D., ANDERSON, T. A., SCHWAB, P. AND HSU, F. C., **Phytoremediation of Oils Contaminated with Organic Pollutants**. *Adv. Agron.* (56) p.55 (1996).

DAVIS, J. G. & WILSON, C. R. **In: Choosing a soil Amendment**. Gardening Series n. 7.235, Colorado State University, Cooperative Extension 6/00, 2000.

DIAS, L. E. & GRIFFITH, J. J. Conceituação e Caracterização de Áreas Degradadas. **In: DIAS, L. E. & MELLO, J. W. V. DE (Eds) Recuperação de Áreas Degradadas**. Viçosa:

Depto de Solos UFV/ Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, p.251, 1998.

DÖBEREINER, J. Recent Changes in Concepts of Plant Bacteria Interactions: Endophytic N<sub>2</sub> Fixing Bacteria. **Ci. Cult.**, 44:310-313, 1992.

DOMMARGUES, Y.; DUHOUX, E.; DIEM, H. G. **Les Arbres Fixateurs D'azote – Caractéristiques Fondamentales et Raz Dans L'aménagement des30Razilian30 Méditerranéens et Tropicaux Avec Razilian Particulière Aux Zones Subhumides et Arides**. Rome: CIRAD, 499 p., 1999.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA 8015. Disponível em: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8015b.pdf>. Acessado em: 07/10/2007.

EPSTEIN, E. **Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas**. Rio de Janeiro. Livros Técnicos e Científicos. 341p.,1975.

EWEIS, J. B., ERGAS, S. J., CHANG, D. P. Y. & SCHROEDER, E. D. **Bioremediation Principles**. McGraw-Hill, Inc.: Toronto. 1998.

FARIA, S. M. de; OLIVARES, F. L. de; LIMA, H. C.; MELO, R. B.; XAVIER, R. Nodulação em espécies florestais, especificidade hospedeira e as implicações na sistemática de Leguminosae. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G., (Ed.). **Inter-relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, p. 667-686, 1999.

FARIA, S. M. de; LEWIS, G. P.; SPRENT, J. I.; SUTHERLAND, J. M. **Occurrence of Nodulation in the Leguminosae**. New Phytologist, Oxford, v. 111, p. 607-619, 1999b.

FARIA, S. M. de; CAMPELLO, E. F. C. **Algumas Leguminosas Fixadoras de Nitrogênio Recomendadas para Áreas Degradadas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 4 p. (Embrapa – CNPAB. Recomendação Técnica, 7).

FARIA, S. M. de; MOREIRA JF.; CORDEIRO FC.; MACHADO R.L.**Obtenção de Estirpes de Rizóbio para Leguminosas Florestais (aproximação de 2004)**. Dezembro 2003.10p. (Embrapa- CNPAB. Comunicado Técnico,61).

FERREIRA D.F. (1999) [Online] **Programa Sisvar Versão 4.6** (Build 61). Page home: <<http://www.dex.ufla.br/danielff/dff02.htm>>.

FERREIRA, T. C. Caracterização e Seleção de Rizóbios Noduladores de Leguminosas Florestais para Recuperação de Áreas Contaminadas por Petróleo. **Monografia** – UFRRJ, Rio de Janeiro, Instituto de Florestas, 2007.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F.; SILVA, E. M. R. da; FARIA, S. M. de. **Revegetação de Solos Degradados**. Seropédica: EMBRAPA-CNPBS. Comunicado Técnico, 9. P.11, 1992.

FRANCO, A. A., CAMPELLO, E. F. C., DIAS, L. E., FARIA, S. M. Revegetation of acidic residues from bauxite mining using nodulated and mycorrhizal legume trees. **Nitrogen Fixing Trees for Acid Soils**, Ed: Evans, D. O. & Szott, L. T., p.313-320, 1995.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 897-903, 1997.

FRANCO, A. A.; BALIEIRO, F. de C. The Role of biological nitrogen fixation in land reclamation, agroecology and sustainability of tropical agriculture. In: ROCHA-MIRANDA, C. E., (Ed.). **Transition to Global Sustainability: The Contribution of Brazilian Science**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, P. 209-234, 2000.

FRED, E. B. & WAKSMAN, S.A. **Laboratory Manual of General Microbiology With special reference to the microorganisms of the soil**. Mc-Graw-hill book company, Inc. New York 145 pp. 1928.

FRICK, C.M; FARRELL, R.E; & GERMIDA, J.J. **Petroleum Technology Alliance of Canada (PTAC) Calgary, AB**. P 88, 1999.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. **Spores of Mycorrhizal Endogone Species Extracted from Soil by Wet Sieving and Decanting**. Transactions of British Mycological Society, Cambridge, v.46, n.2, p.235-244, June 1963.

GRANATO, M. **Utilização do Aguapé no Tratamento de Efluentes com Cianetos**. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq, Série Tecnologia Ambiental v.5, p1, 1995.

GOI, S. R. & A. de SOUZA, F. **Diversidade de Microrganismos do Solo**. Floresta e Ambiente, Instituto de Florestas-UFRRJ. Seropédica, RJ. V. 13, n 2, p. 46-65, 2006

HERRERA, M. A.; SALAMANCA, C. P.; BAREA, J. M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 129-133, 1993.

HOAGLAND, O.R.; ARNON, O.I. **The Water – Culture Method for Growing Plants without Soil**. California, Agric. Exp. ST., 32p. (Circular 37),1950.

JORGENSEN, K. S.; PUSTINEN, J. & SUORTTI, A. M. **Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Composting in Biopiles**. Environmental Pollution, 107:245-254, 2000.

KLIRONOMOS, J. N.; MOUTOGOLIS, P.; KENDRICK, B.; WIDDEN, P. **A Comparison of Spatial Heterogeneity of Vesicular – Arbuscular Mycorrhizal Fungi in two Maple-Forest Soils**. Canadian Journal of Botany. Ottawa, v. 71. P. 1472-1480, 1993.

KOPPEN, W. climatologia: **Em em Studio de Los Climas de La Tierra**. Fondo de Cultura Económica, México. P. 479, 1948.

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. **A modified Procedure for Staining Roots to Detect VA Mycorrhizas.** Mycological Research, Cambridge, v.92, n.4, p.486-488, June 1989.

LEBLANC, L. & FITZGERALD, A. **Bioremediation: Striking Successes in Spill Cleanup, but Obstacles Remain.** *Offshore*, September, 26-30, 1990.

McGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L.; SWAN, J.A. **A New Method Which Gives an Objective Measure of Colonization of Roots by Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi.** The New Phytologist, Oxford, v.115, n.3, p.495-501, July 1990.

MCGRATH, S. P. Phytoextraction For Soil Remediation. In: Brooks, R. R. Ed. **Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals.** CAB International, Wallingford, p. 261, 1998.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J.L. de. **Microbiologia Ambiental.** Jaguariúna: Embrapa-CNMA, 1997. 440p.

MELO, V. F. **Balço Nutricional, Eficiência de Utilização e Avaliação da Fertilidade do Solo em P, K, Ca e Mg em Plantios de Eucalipto no Rio Grande do Sul.** IPEF, v. 48/49, p. 8-127, 1995.

MIYASAKA, S. C.; HABTE, M. Plant mechanisms and mycorrhizal symbiosis to increase phosphorus uptake efficiency. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, V. 32, p. 1101 – 1147, 2001.

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brasil. **Molecular Ecology**. V. 7, p. 889-895, 1998.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2002. 625p.

MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating Bacteria. In: **Soil Biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems.** Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O.; Brussard, L. Eds. CABI Publishing, pp1-12, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. Soil organisms in tropical Ecosystems: a Key role for Brazil in the global quest for the conservation and sustainable use of biodiversity. In: **Soil Biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems.** Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O.; Brussard, L. Eds. CABI Publishing, pp1-12, 2006.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$  sub-class of *Proteobacteria*. **Nature**, V. 411, p. 948-950, 2001.

NERBITT, C. C. & DAVIS, T. E. **Miner. Met. Mater. Soc.**, 331, 1994.

OLIVEIRA, D. M.; CARA, D. V. C.; XAVIER, P. G.; SOBRAL, L. G. S.; LIMA, R. B. & ALMEIDA, A. L. **Fitorremediação: O Estado da Arte**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, Série Tecnologia Ambiental, STA – 39. Versão Provisória, 1996.

OLIVEIRA, L.A.; GUITTON, L.T.; MOREIRA, F.W. Relações entre as colonizações por fungos micorrízicos arbusculares e teores de nutrientes foliares em oito espécies florestais da Amazônia. **Acta Amazonica**, 29:183-193, 1999.

PIEKIELEK, W.P. & FOX, R.H. Use of a chlorophyll meter to predict sidedress nitrogen requirements for maize. **Agronomy Journal**, Madison, v.84, n.1, p.59-65, 1992.

POLHILL R.M.; RAVEN P.H. & STIRTON C.H. Evolution and systematic of the Leguminosae. In: **Advances in Legume Systematics**, ed. Polhil L.M.& Raven, P.H. 1-26p. 1981.

PROVIDENTI, M. A.; LEE, H. e TREVORS, J. T. Selected Factors Limiting the Microbial Degradation of recalcitrant Compounds. **Journal of Industrial Microbiology**, 12:379-395, 1993.

RHYKERD, R. L.; CREWS, B.; MCINNES, K. J. & WEAVER, R. W. **Impact of Bulking agents, Forced Aeration, and Tillage on Remediation of Oil-contaminated Soil**. *Bioresource Technology*, 67:279-285, 1999.

RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; CORRÊA dos SANTOS, R. L.; SOBRAL, L. G. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. Série Tecnologia ambiental, STA – 37. Versão Provisória. CETEM/MCT, 2006.

ROMANTSCHUK, M.; SARAND, I.; PETÄNEN, T.; PELTOLA, R.; JONSSON-VIHANNE, M.; KOIVULA, T.; YRJÄLÄ, K. & HAAHTELA, K. **Means to improve the Effect of *In Situ* Bioremediation of Contaminated Soil: an Overview of Novel Approaches**. *Environmental Pollution*, 107:179-185, 2000.

SAGGIN JÚNIOR, O. J.; BENTO, R. A.; RIBEIRO da SILVA, E. M.; PITART, R. M.; STRALIOTTO, R.; VOLPON, A. G. T.; LANDA, F. H. T. G. & TAVARES, S. R. Efeito de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de leguminosas arbóreas em solo contaminado com petróleo. **In: Fertbio 2006 – A Busca das Raízes**, Bonito, MS. Anais...,2006.

SCHADCHINA, T.M. & DMITRIEVA, V.V. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.18, p.1427-1437, 1995.

SCHENCK, N.C.; PEREZ, Y. **Manual for Identification of VA Mycorrhizal Fungi**. Gainesville: INVAM/University of Florida, 1987. 245p.

SCHNOOR J. L. & DEE, P. E. **Phytoremediation**. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center, 1997.

SCHOLTEN, M. C. & LEENDERTSE, P. C. In **Ecological Responses to Environmental Stresses**, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. P. 184-190, 1991.

SHUBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, L. A. **A New Fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and Evolution**. *Mycological Research* 105 (12): 1413-1421.

SILVA, FÁBIO CÉSAR da; **Manual de Análises Químicas de Solos, Planta e Fertilizantes**. Embrapa Solos. Embrapa Informática Agropecuária – Brasília; 173-184p. 1999.

SIQUEIRA, J. O. **Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas**. Lavras: UFLA/DCS e DCF. P. 290, 1996.

SIQUEIRA, J. O. Fisiologia e bioquímica da micorrizas vesícula – arbusculares: alguns aspectos de relação fungo-planta e absorção de fósforo. In: **Reunião Brasileira sobre Micorrizas**, 4. Mendes, 1991. Programas e recursos... Mendes: Embrapa – CNPDS/UFRRJ, 1991. P. 105-131.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotechnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 1988. 236 p.

SIQUEIRA, O. J.; SAGGIN JUNIOR, O. J. The importance of mycorrhizae association in natural low-fertility soils. In: MACHADO, A. T.; MAGNAVACA, R.; SILVA, A. F. (Eds). **Proceedings International Symposium on Environmental Stress: Maize in Perspective**. Brazil/México: EMBRAPA/CYMMYT/UNDT, 1995. P. 240-280.

SMEAL, D., ZHANG, H. Chlorophyll meter evaluation for nitrogen management in corn. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.25, n.9/10, p.1495-1503, 1994.

SMITH, S. E. & READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. Academic Press, London, UK, p. 470-489, 1997.

SOUZA, F. A. de; SILVA, E. M. R. da. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: SIQUEIRA, J. O., (Ed.). **Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas**. Lavras: UFLA/DCS e DCF, 1996. P. 255-290.

STOKING, C.R. & ONGUN, A. The intracellular distribution of some metallic elements in leaves. **American Journal of Botany**, Columbus, v.49, n.3, p.284-289, 1962.

STRAUBE, W. L.; NESTLER, C. C.; HANSEN, L. D.; RINGLEBERG, D.; PRITHARD, P. H. & JONES-MEEHAN, J. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PHAs) through landfarming with biostimulations and bioaugmentation. **Acta Biotechnologica**, 23 (2-3): 179-196, 2003.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A. DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOLVIN-MOSSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. **Journal of Bacteriology**. V 183, p. 214-220, 2001.

URQUIAGA S. & ZAPATA F. 2000. **Manejo Eficiente de 35e Fertilización Nitrogenada de Cultivos Anuales em América Latina y 35e Caribe**. Porto Alegre: Ed. Gênese. 110p. v. 29, p. 97-03, 1997.

TERRACOTTEM. **Guia Técnico1.0**. Pinhais-PR. 1998. 45p.

VAN BERKUN, P.; EARDLY, B. D. The Aquatic Budding Bacterium *Blastobacter denitrificans* is a Nitrogen-fixing Symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, V.68,p. 1132-1136, 2002.

VANCE, D. B. **National Environmental Journal**. 6, 1996, p 30-31.

VARVEL, G. E.; SCHEPERS, J. S.; FRANCIS, D. D. Ability for In-sensor Correction of Nitrogen Deficiency in Corn Using Chlorophyll Meters. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.61, n.4, p. 1233-1239, 1997.

VASUDEVAN, N. & RAJARAM, P. **Bioremediation of Oil Sludge Contaminated Soil**. *Environmental International*, 26:409-411p, 2001.

VICENT, J. M. **A Manual for the Pratical Study of Root Nodules Bacteria**. Oxford: Blachwell Scientific. (IBP Handbook, 15), p. 164, 1970.

VILJOEN, D. J.. **Superabsorbent Polymers in the Forestry Industry**. In: Commanwealth forestry conference. South Africa, 1977.

WATAB, A. A.; REUVENI, M; BRESSAN, R.A. & HASEGAWA, P.M. Enhanced Net K<sup>+</sup> Update Capacity of NaCl-adapted cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.95, n.4, p.1265-1269, 1991.



## 7. ANEXOS

### ANEXO I – HISTÓRICO DOS TRABALHOS DESENVOLVIDOS.....38

**Tabela A1.** Porcentagem de plantas sobreviventes em função dos níveis de contaminação do solo por petróleo, após 90 dias de condução dos experimentos.....38

**Figura A1.** Peso da parte aérea seca de acácia transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando localizadas onde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo.....38

**Figura A2.** Peso da parte aérea seca de sabiá transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando localizadas onde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo.....39

**Figura A3.** Número de nódulos de acácia transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando localizadas onde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo. Médias transformadas por raiz quadrada de  $(x+1)$ .....39

**Figura A4.** Número de nódulos de sabiá transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando localizadas onde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo. Médias transformadas por raiz quadrada de  $(x+1)$ .....40

**Figura A5.** Altura de acácia transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando localizadas onde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo.....40

**Figura A6.** Altura de sabiá transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando

locadas aonde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo.....41

**ANEXO II – CRESCIMENTO VEGETATIVO.....41**

**Figura A7.** Comparação das alturas de *A. mangium* (man) nos diferentes níveis de petróleo.....41

**Figura A8.** Comparação das alturas de *M. caesalpinifolia* (cae) nos diferentes níveis de petróleo.....42

**Figura A9.** Comparação das alturas de *S. saman* (sam) nos diferentes níveis de petróleo.....42

**Figura A10.** Comparação das alturas de *A. angustissima* (ang) nos diferentes níveis de petróleo.....43

**Figura A11.** Comparação das alturas de *M. artemisiana* (art) nos diferentes níveis de petróleo.....43

**Figura A12.** Comparação das alturas de *A. auriculiformis* (aur) nos diferentes níveis de petróleo.....44

**Figura A13.** Comparação das alturas de *A. holosericea* (hol) nos diferentes níveis de petróleo.....44

**ANEXO III – RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA.....45**

**Tabela A2.** Resumo das análises de variância referente as variáveis estudadas das leguminosas arbóreas.....45

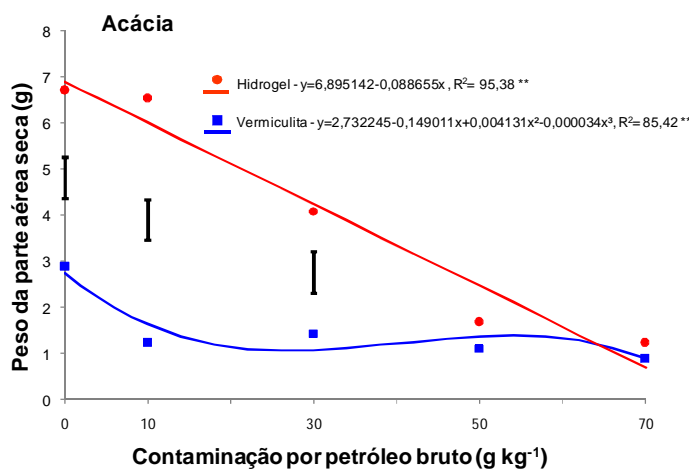
**Tabela A3.** Resumo das análises de variância dos nutrientes e Al da parte aérea das leguminosas arbóreas.....45

## ANEXO I – HISTÓRICO DOS TRABALHOS DESENVOLVIDOS

**Tabela A1.** Porcentagem de plantas sobreviventes em função dos níveis de contaminação do solo por petróleo, após 90 dias de condução dos experimentos.

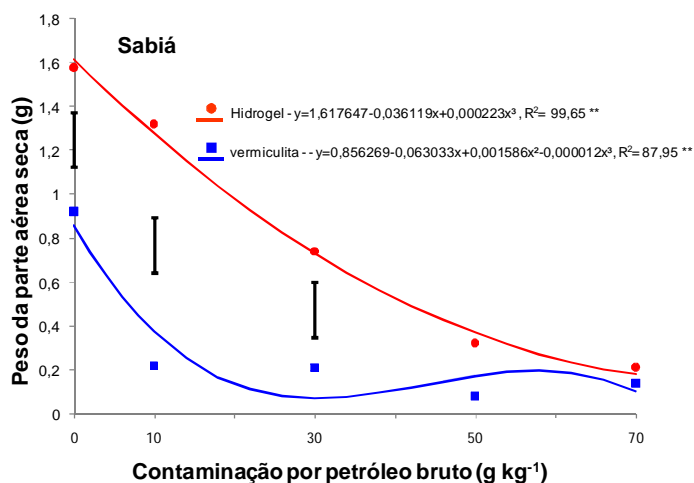
Níveis de Petróleo ( $\text{g.kg}^{-1}$ )	Sabiá (%)	Saman (%)	Acácia (%)
0	100	100	100
10	75	75	75
30	35	60	5
50	25	35	5
70	45	30	5

Fonte: SAGGIN JUNIOR, *et al.* (2006)



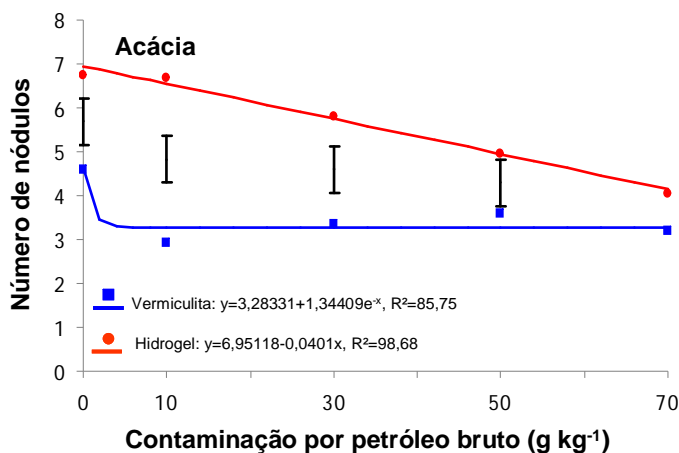
Fonte: BENTO *et al.* (2007)

**Figura A1.** Peso da parte aérea seca de acácia transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando localizadas aonde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo.



Fonte: BENTO *et al.* (2007)

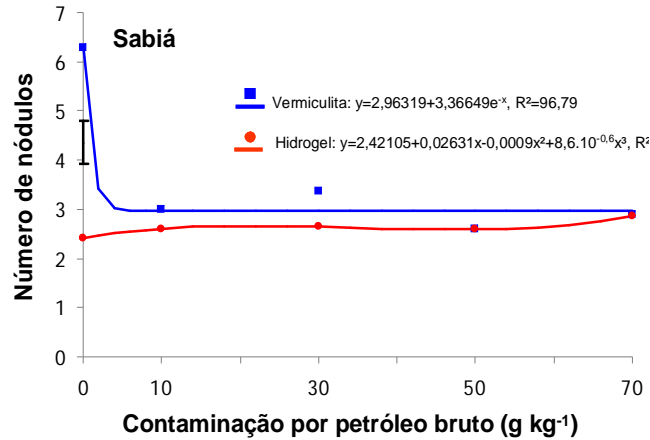
**Figura A2.** Peso da parte aérea seca de sabiá transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando localizadas aonde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo.



Fonte: BENTO *et al.* (2007)

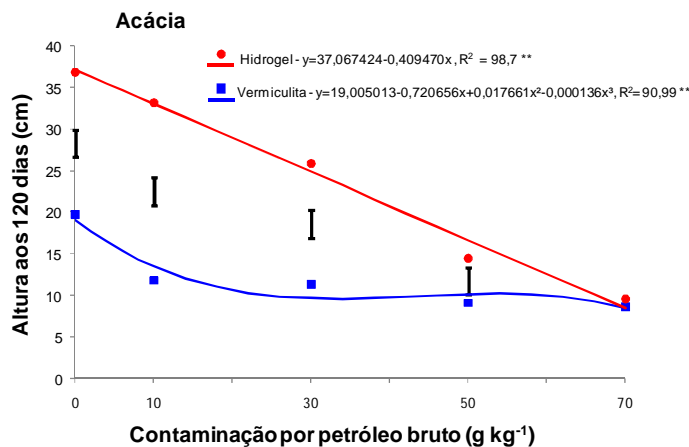
**Figura A3.** Número de nódulos de acácia transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey

5%, estando localadas aonde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo. Médias transformadas por raiz quadrada de (x+1).



Fonte: BENTO *et al.* (2007)

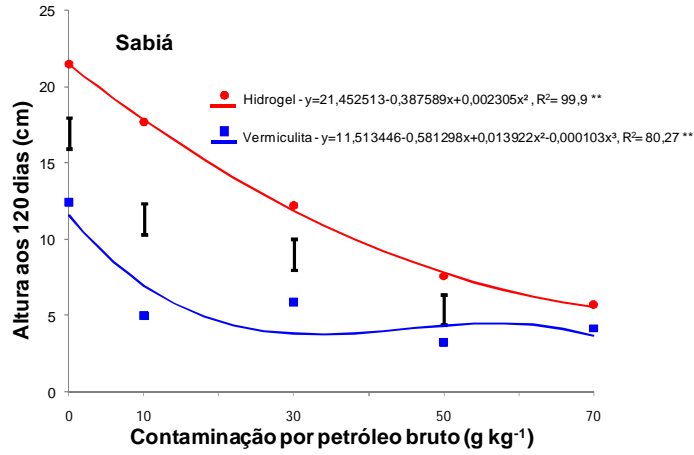
**Figura A4.** Número de nódulos de sabiá transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando localadas aonde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo. Médias transformadas por raiz quadrada de (x+1).



Fonte: BENTO *et al.* (2007)

**Figura A5.** Altura de acácia transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras

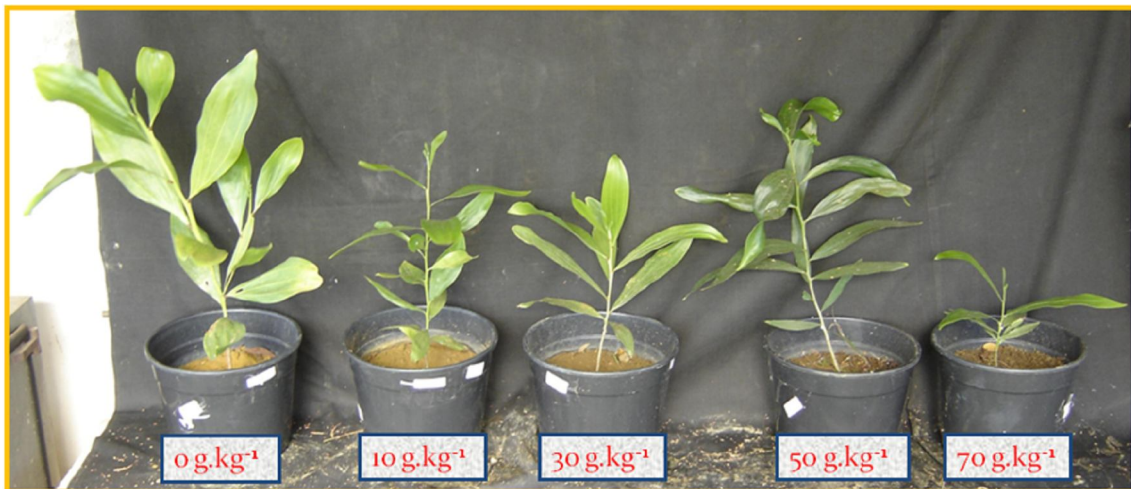
verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando localadas aonde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo.



Fonte: BENTO *et al.* (2007)

**Figura A6.** Altura de sabiá transplantada para solo com cinco níveis de contaminação por petróleo, tratados com dois condicionadores hidrorretentores (vermiculita e hidrogel). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Tukey 5%, estando localadas aonde as médias diferem entre si, dentro de cada nível de contaminação por petróleo.

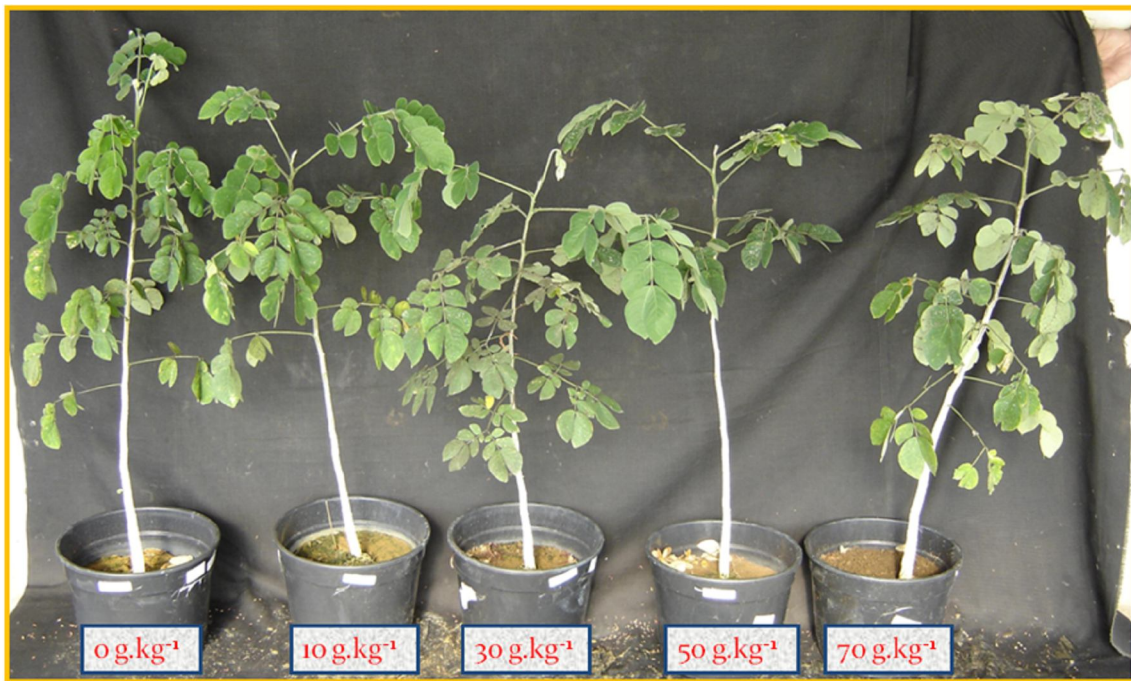
## ANEXO II – CRESCIMENTO VEGETATIVO



**Figura A7.** Comparação das alturas de *A. mangium* (man) nos diferentes níveis de petróleo.



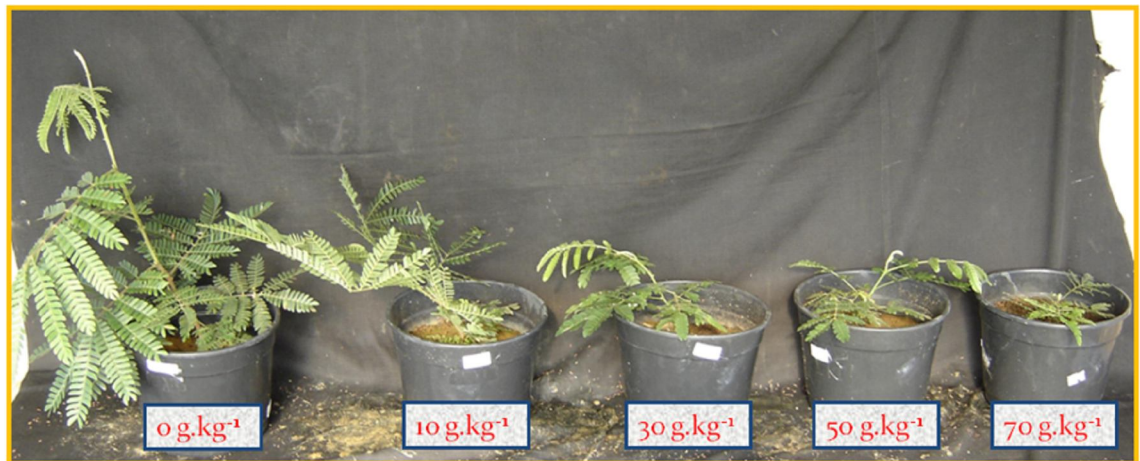
**Figura A8.** Comparação das alturas de *M. caesalpinifolia* (cae) nos diferentes níveis de petróleo.



**Figura A9.** Comparação das alturas de *S. saman* (sam) nos diferentes níveis de petróleo.



**Figura A10.** Comparação das alturas de *A. angustissima* (ang) nos diferentes níveis de petróleo.

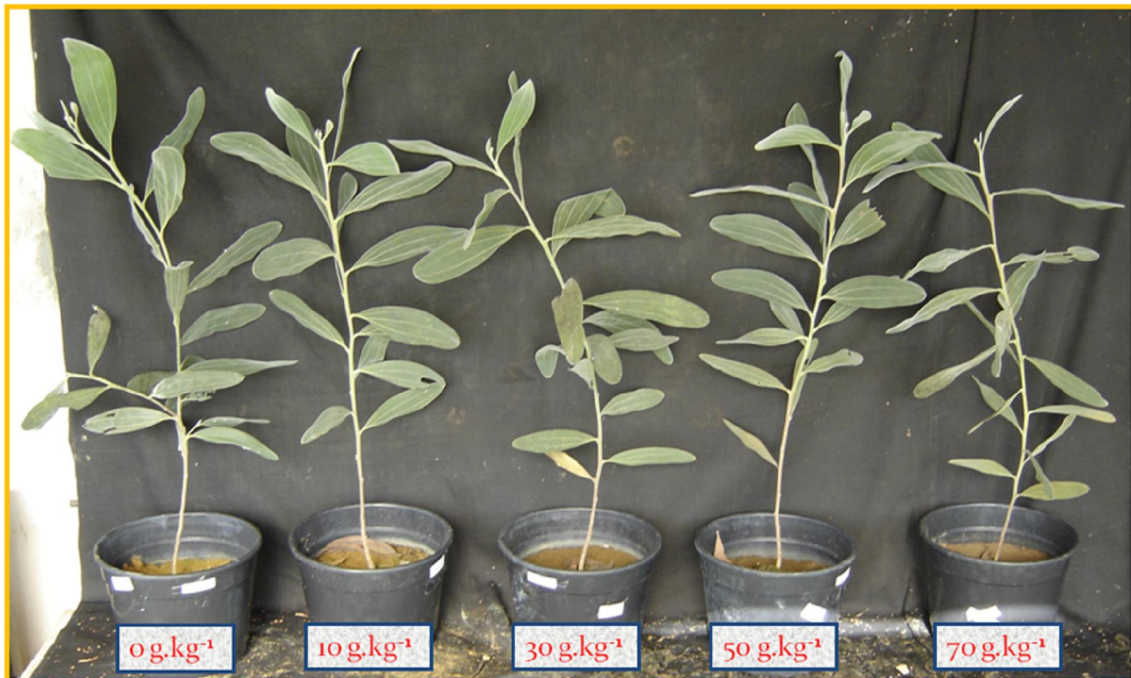


**Figura A11.** Comparação das alturas de *M. artemisiana* (art) nos diferentes níveis de petróleo.





**Figura A12.** Comparação das alturas de *A. auriculiformis* (aur) nos diferentes níveis de petróleo.



**Figura A13.** Comparação das alturas de *A. holosericea* (hol) nos diferentes níveis de petróleo.

### ANEXO III – RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA

**Tabela 2A.** Resumo das análises de variância referente as variáveis estudadas das leguminosas arbóreas.

Variável	Fontes de Variação		
	Petróleo	Espécie	Petróleo x Espécie
Incremento da altura	< 0,01*	< 0,01	< 0,01
Incremento do diâmetro	< 0,01	< 0,01	0,11
Massa da parte aérea seca	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Número de nódulos	< 0,01	< 0,01	< 0,05
Massa de nódulos	< 0,01	< 0,01	0,12
Número de esporos	< 0,01	< 0,05	0,65
Colonização micorrízica	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Clorofila 1	0,21	< 0,01	< 0,01
Clorofila 2	0,71	< 0,01	< 0,01

\*Nível de significância pelo teste de F na análise de variância.

**Tabela 3A.** Resumo das análises de variância dos nutrientes e Al na parte aérea das leguminosas arbóreas.

Variável	Fontes de Variação		
	Petróleo	Espécie	Petróleo x Espécie
Fósforo	< 0,05*	< 0,01	0,08
Potássio	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Cálcio	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Magnésio	0,11	0,11	< 0,05
Cobre	< 0,01	< 0,01	< 0,05
Zinco	< 0,05	< 0,01	0,11
Manganês	0,80	< 0,01	< 0,05
Ferro	0,43	0,18	0,81
Sódio	0,16	< 0,01	< 0,01
Alumínio	0,41	0,14	0,85

\*Nível de significância pelo teste de F na análise de variância.