

DIMITRI DE QUADROS WILBERG

**A ESPÉCIE *Trifolium repens* L. COMO BIOINDICADORA DE  
ESTADO DE BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM  
ÓLEO DIESEL.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia do Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Solos da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título e grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Francisco José Pereira de Campos Carvalho Ph.D.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Celina Wisniewski

CURITIBA  
2006



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
 SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
 DEPARTAMENTO DE SOLOS E ENGENHARIA AGRÍCOLA  
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA: CIÊNCIA DO SOLO(MESTRADO)  
 Rua dos Funcionários, 1540-Curitiba/PR-80035-050-Fone/Fax 41-350-5648  
 Página: [www.pgcsolo.agrarias.ufpr.br/](http://www.pgcsolo.agrarias.ufpr.br/)  
 E-mail: [pgcsolo@ufpr.br](mailto:pgcsolo@ufpr.br)

## PARECER

Os Membros da Comissão Examinadora, designados pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo" para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pelo candidato **DIMITRI DE QUADROS WILBERG**, sob o título: "**A espécie *Trifolium repens* L. como bioindicadora de estado de biorremediação do solo contaminado com óleo diesel**", requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo" do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, após haverem analisado o referido trabalho e argüido o candidato, são de Parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação, completando assim, os requisitos necessários para receber o diploma de **Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo"**.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo", em Curitiba, 27 de janeiro de 2006.

Prof. Dr. Francisco José Pereira de Campos Carvalho, Presidente.

Prof. Dr. Ernani Francisco da Rosa Filho, I<sup>o</sup>. Examinador.

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Maria Muratori, II<sup>a</sup>. Examinadora.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Durval Nascimento Neto e à ALL América Latina Logística por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio (ralação) em campo, bem como pelo custeio de grande parte das análises laboratoriais efetuadas.

Agradeço de coração à Déborah Mariana pela ajuda na formatação e pelas idéias no que diz respeito à apresentação deste trabalho.

Agradeço à ANTROPOSPHERA pela utilização do laboratório, casa de vegetação e reagentes e, em especial, ao meu amigo e orientador Prof. Francisco José Pereira de Campos Carvalho, pelas valiosas orientações, à Michele Cristine Krenczynski e Rodrigo Azevedo Castro pelo apoio técnico para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à minha família e, em especial à minha mãe Eunice de Quadros Wilberg, por toda a ajuda e apoio em todos os aspectos imagináveis, à minha irmã Katia de Quadros Wilberg pelas aulas ligadas ao assunto, do qual é uma profunda conhecedora. Agradeço à Silvia Keil, pelo apoio incondicional e pela amizade.

Agradeço à Rafaela Ghellere Dal Forno por ter sido uma grande companheira quando da execução deste trabalho, aos Agrônomos Luiz Rafael Büttner e Andressa Cristhy Buch, que compõem a minha equipe da FUNPAR na REPAR-PETROBRAS, e que me ajudaram nos procedimentos analíticos que lá foram realizados.

E, finalmente, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Valeu Galera !!!

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>SUMÁRIO</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	2
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
<b>3.1 Hidrocarbonetos de Petróleo</b> .....	3
<b>3.2 - Fitoindicadores de Solos Contaminados</b> .....	5
<b>3.3 O Trifolium repens L</b> .....	11
<b>3.4 Biorremediação</b> .....	12
<b>3.4.1 População Microbiana Degradadora de Hidrocarbonatos</b> .....	15
<b>3.4.2 Fatores que Interferem na Degradação de Hidrocarbonetos</b> .....	21
<b>3.4.2.1 As Características do Contaminante</b> .....	21
<b>3.4.2.2 Os nutrientes Minerais</b> .....	22
<b>3.4.2.3 A Temperatura</b> .....	23
<b>3.4.2.4 A umidade</b> .....	23
<b>3.4.2.5 O pH</b> .....	24
<b>3.4.2.6 Os metais pesados</b> .....	24
<b>3.4.2.7 A aeração</b> .....	24
<b>3.4.3 A Respiração do Solo</b> .....	25
<b>3.4.4 TPH e Cromatogramas</b> .....	36
<b>3.4.5 O Nitrato de Potássio</b> .....	26
<b>3.4.6 O Peróxido de Hidrogênio</b> .....	28
<b>3.5 Fitorremediação</b> .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
<b>4.1 Caracterização da Área Impactada</b> .....	31

4.2 O Local do Acidente.....	31
4.3 - A Amostragem do Solo.....	35
4.4 O Local do Experimento.....	37
4.5 Preparo das Amostras.....	38
4.6 Sementes.....	41
4.6.1 Preparo das Sementes.....	41
4.6.2 A Semeadura.....	42
4.6.3 Desmonte das Bandejas para Retirada das Plantas.....	43
4.6.4 O Preparo da Plantas Para o Registro Fotográfico.....	44
4.6.5 O Preparo da Plantas Para o Peso Seco.....	44
4.6.6 Parâmetros a Serem Avaliados.....	44
4.6.6.1 Fitotoxicidade do solo.....	44
4.6.6.2 Fertilidade do solo.....	44
4.6.6.3 Granulomeria.....	45
4.6.6.4 Respirometria.....	45
4.6.6.5 pH.....	45
4.6.6.6 THP (Total de hidrocarbonetos de petróleo). ....	46
4.5.6.7- Metais Pesados no solo.....	46
4.7 Análises Estatísticas Dos Resultados.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Coordenadas dos Pontos Amostrados.....	48
5.2 Análise Química e Física do Solo.....	48
5.2.1 Fertilidade.....	48
5.3 Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH).....	52
5.4 Fitoxidade.....	53
5.4.1 Germinação.....	53
5.4.2 Sobrevivência.....	57
5.4.3 Peso Seco.....	57
5.5 Respiração Potencial Microbiana.....	64
6 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	89

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01</b>	Vagões Tanque Descarrilhados e Amontoados.....	31
<b>FIGURA 02</b>	Vagões Tanque Rasgados Culminando no Vazamento de óleo Diesel..	32
<b>FIGURA 03</b>	Vagões Tanque Descarrilhados.....	32
<b>FIGURA 04</b>	Local do Acidente e o Caminho Percorrido pelo Óleo até o Trecho de Floresta.....	33
<b>FIGURA 05</b>	Local do Acidente e o Caminho Percorrido pelo Óleo até o Trecho de Floresta.....	33
<b>FIGURA 06</b>	Trecho de Floresta Contaminado Pelo Acidente.....	34
<b>FIGURA 07</b>	Área Alagada Pelas Chuvas no Período Relativo à Amostragem.....	34
<b>FIGURA 08</b>	Amostragem de Solo Contaminado (SCF).....	36
<b>FIGURA 09</b>	Amostragem de Solo Testemunho (SVF).....	36
<b>FIGURA 10</b>	Marcação das Coordenadas com GPS.....	37
<b>FIGURA 11</b>	Germinação Relativa em Todas as Repetições e Tratamentos 24 Hs Após o Plantio.....	54
<b>FIGURA 12</b>	Germinação Relativa em Todas as Repetições e Tratamentos 7 Dias Após o Plantio.....	54
<b>FIGURA 13</b>	Germinação Relativa em Todas as Repetições e Tratamentos 7 Dias Após o Plantio.....	55
<b>FIGURA 14</b>	Médias de Germinação Relativa 24 Hs, 7 Dias e 16 Dias Após o Plantio.	56
<b>FIGURA 15</b>	Sobrevivência das Plantas no “T6”.....	57
<b>FIGURA 16</b>	Peso Seco Total ao Final do Experimento “T6”.....	58
<b>FIGURA 17</b>	Peso Seco Total dos Tratamentos Relativos ao SCF.....	59
<b>FIGURA 18</b>	Peso Seco Final dos Tratamentos SVF e SCF.....	60
<b>FIGURA 19</b>	Peso Seco Final dos Tratamentos SVF+I e SCF+I.....	60
<b>FIGURA 20</b>	Peso Seco Final dos Tratamentos SVF+I+N e SCF+I+N.....	61

<b>FIGURA 21</b>	Peso Seco Final dos Tratamentos SVF+I+P e SCF+I+P.....	61
<b>FIGURA 22</b>	Média do Peso Seco Final das Repetições Finais.....	62
<b>FIGURA 23</b>	Média do Peso Seco Final nos Tratamentos do SCF.....	63
<b>FIGURA 24</b>	Proporção Entre a Parte Aérea e o Sistema Radicular nos Tratamentos do SVF e SCF.....	64
<b>FIGURA 25</b>	Respiração Potencial do "T0".....	65
<b>FIGURA 26</b>	Temperaturas no Período de Incubação do "T0".....	65
<b>FIGURA 27</b>	Respiração Potencial do "T1".....	66
<b>FIGURA 28</b>	Temperaturas no Período de Incubação do "T1".....	66
<b>FIGURA 29</b>	Respiração Potencial do "T2".....	67
<b>FIGURA 30</b>	Temperaturas no Período de Incubação do "T2".....	67
<b>FIGURA 31</b>	Respiração Potencial do "T3".....	68
<b>FIGURA 32</b>	Temperaturas no Período de Incubação do "T3".....	68
<b>FIGURA 33</b>	Respiração Potencial do "T4".....	69
<b>FIGURA 34</b>	Temperaturas no Período de Incubação do "T4".....	69
<b>FIGURA 35</b>	Respiração Potencial do "T5".....	70
<b>FIGURA 36</b>	Temperaturas no Período de Incubação do "T5".....	70
<b>FIGURA 37</b>	Respiração Potencial do "T6".....	71
<b>FIGURA 38</b>	Temperaturas no Período de Incubação do "T5".....	71
<b>FIGURA 39</b>	Relação do TPH e da Atividade Respiratória do SVF e SCF.....	73

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 01</b>	Tratamentos Com as Respectivas Doses de Água Peróxido Nitrato e Inoculo no Preparo Inicial.....	40
<b>TABELA 02</b>	Nova Denominação Para as Repetições Desmanchadas no T6.....	43
<b>TABELA 03</b>	As Metodologias Utilizadas Para Análises de Metais Pesados no Solo.....	47
<b>TABELA 04</b>	Resultado de Fertilidade das Amostras Iniciais.....	48
<b>TABELA 05</b>	Resultados de pH nas Amostras Relativas aos Tempos 1,2,3,4,5 e 6.....	49
<b>TABELA 06</b>	Laudo de Análise Granulométrica das Amostras Iniciais.....	50
<b>TABELA 07</b>	Composição e Concentração de Metais nas Amostras Relativas ao T1.....	50
<b>TABELA 08</b>	Valores Orientadores Para teor de Metais em Solos Agrícolas Conforme o relatório de Estabelecimento de Valores Orientadores Para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo - CETESB/2001.....	51
<b>TABELA 09</b>	Resultados de TPH nos tempos T0 ao T6.....	52

## RESUMO

Bioindicadores são organismos ou comunidades, cujas funções vitais se correlacionam tão estreitamente com determinados fatores ambientais, que podem ser empregados como indicadores na avaliação ambiental de uma dada área. Biorremediação é o processo de tratamento que utiliza de organismos vivos (microrganismos e/ou plantas) para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos tóxicas, ou não tóxicas.

O presente trabalho teve dois objetivos: 1) a avaliação potencial da espécie *Trifolium repens* L. como bioindicador vegetal do estado de remediação de solo contaminado com óleo diesel (fitotoxicidade); 2) a avaliação da remediação do solo em questão, mediante a utilização de três tratamentos distintos, empregando: a) inóculo; b) inóculo e nitrato de potássio; c) inóculo e peróxido de hidrogênio.

As amostras de solo contaminado com óleo diesel (SCF) e de solo não contaminado (solo controle - SVF) foram provenientes da área do acidente ferroviário ocorrido em Mafra, Santa Catarina, no dia 14 de setembro de 2004. O inóculo utilizado foram os microorganismos da *landfarming* da PETROBRÁS - Refinaria Presidente Bernardes – RPBC, Cubatão – SP. As análises empregadas: 1) para a avaliação do potencial da espécie como bioindicadora foram a germinação, a sobrevivência e a massa seca; e 2) para a avaliação da remediação do solo foram a Respiração Potencial Microbiana e a variação no Total de Hidrocarbonetos de Petróleo (TPH).

Relativo ao potencial bioindicador observou-se que a espécie *Trifolium repens* L. apresentou melhores resultados no solo controle do que no solo contaminado. Observou-se, também, que a espécie não foi negativamente afetada quando sujeita aos três tratamentos utilizados para a biorremediação.

A biorremediação do solo apresentou efeitos moderados quando submetida aos três tratamentos empregados, e respondeu de forma mais acentuada na ausência deles. Os três tratamentos responderam de forma equivalente, apresentando, entre eles, apenas diferenças sutis.

Os resultados obtidos permitiram estabelecer as seguintes conclusões: 1) a espécie *Trifolium repens* L. possui potencial como bioindicadora de solos contaminados com óleo diesel; 2) a biorremediação do solo foi influenciada

apenas levemente pelos três tratamentos utilizados e foi mais significativa para o solo livre dos tratamentos.

## ABSTRACT

Bioindicator are organisms or communities, of which vitals functions related so strictly with some environmental factors that can be used as indicators of environmental evaluation. Bioremediation is the treatment process that uses lived organisms (microorganisms and or plants) to degrade toxically harmful substances by transforming them into less or non toxic substances.

The present work has two objectives: 1) the evaluation of the *Trifolium repens* L. specie as a potential vegetable bioindicator for the remediation condition of a diesel oil contaminated soil (fitotoxicity); 2) the evaluation of soil remediation of the same soil using three distinct treatments employing: a) inoculums, b) inoculums and potassium nitrate; and c) inoculums and hydrogen peroxide.

Samples of soil contaminated with diesel oil (SCF) and non contaminated soil (control soil SVF) were from the train crash occurred in Mafra, Santa Catarina, on September 14 2004. The inoculums were microorganisms from PETROBRAS landfarming – Preseidente Bernardes Refinery – RPBC, Cubatão, São Paulo. Analytical procedures used: 1) for the evaluation of the specie as bioindicator were Germination, Survival and Dry Weight; and 2) for the evaluation of the soil remediation were Microbial Potential Respiration e Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) variation.

Related to the bioindicator potential it was observed that the *Trifolium repens* L. specie presented better results over control soil than over contaminated soil. It was also observed that the specie was not negatively affected when exposed to all three treatments used for bioremediation.

The soil bioremediation presented moderated effects when submits to all three treatments employed and responded more accurately in the absence of them. The three treatments responded in a similar way. They presented, among them, only subtle differences.

Results obtained permitted the establishing of the following conclusions: 1) the *Trifolium repens* L. species has potential as bioindicator for soils contaminated with diesel oil; 2) soil bioremediation was only slightly influenced by the three treatments used. Bioremediation was more efficient for the soil free of treatments.

## 1 INTRODUÇÃO

No dia 14 de setembro de 2004 ocorreu no Município de Mafra, Santa Catarina, um acidente com um dos trens da ALL - América Latina Logística, sendo que o acidente ocorreu a aproximadamente 10 Km da Cidade de Mafra. Como consequência deste acidente, vazaram 20.000 litros de óleo diesel em uma área de floresta ao lado da ferrovia. Devido às condições topográficas do local, o óleo diesel ficou empoçado no mesmo local do derrame, em uma área de aproximadamente 150 m<sup>2</sup>. Parte deste óleo diesel foi retirada pela ALL durante os trabalhos de recuperação da área, porém uma grande e desconhecida quantidade de óleo ainda ficou no solo.

A área afetada foi isolada e, foram colocadas placas informativas avisando que o local estava sendo monitorado para o desenvolvimento de estudos sobre os impactos causados pelo acidente. Este trabalho faz parte de um projeto maior que contempla a caracterização e monitoramento da área afetada pelo derrame de óleo diesel. O projeto busca o desenvolvimento de novas tecnologias, bem como a adaptação e aplicação de tecnologias já conhecidas no processo de biorremediação de áreas contaminadas com derivados de petróleo.

O trabalho tem como objetivo a utilização da espécie *Trifolium repens* L. (trevo-branco) como possível bioindicadora de estado de remediação do solo contaminado com o óleo diesel. A espécie possui características adequadas para ser utilizada como bioindicadora, devido a sua rusticidade e resistência ao frio. CARNEIRO *et al* (2002) verificaram a tolerância da espécie em relação ao excesso de Cd e Zn no solo, onde o trevo-branco apresentou crescimento satisfatório, sendo promissora para estudos adicionais sobre a reabilitação de áreas contaminadas com metais pesados.

PEREIRA (2001), através da EMBRAPA também realizou estudos sobre o trevo-branco em que buscou avaliar a fixação simbiótica do nitrogênio (realizada pelo rizóbio na rizosfera), pela espécie em solos contaminados com metais pesados.

Com a crescente utilização dos combustíveis fósseis, surge a necessidade de desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias que possam amenizar ou eliminar os possíveis impactos causados pelos derrames de resíduos

derivados do petróleo.

## 2 OBJETIVOS

### -Objetivo Geral

Avaliar a possibilidade de utilização da espécie *Trifolium repens* L. como possível bioindicadora de estado de remediação do solo contaminado com óleo diesel.

### -Objetivos Específicos

Caracterizar e monitorar a atividade respiratória dos microrganismos nos diferentes tratamentos propostos através de ensaios de incubação do solo em laboratório.

Monitorar por um período de 06 meses o estado de remediação do solo contaminado, através de três tratamentos distintos e conhecidos: Inóculo da Refinaria Presidente Bernardes de Cubatão – RPBC, consorciado com nitrato de potássio, Inóculo da RPBC consorciado com peróxido de hidrogênio e apenas inóculo da RPBC, visando principalmente testar a eficiência do inóculo da RPBC de Cubatão.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Hidrocarbonetos de Petróleo

O petróleo é uma mistura complexa de ocorrência natural formada por diversos componentes orgânicos e inorgânicos. Entre os compostos orgânicos encontram-se principalmente hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos. As propriedades físicas e termodinâmicas e o comportamento de uma mistura desse tipo dependem principalmente de seus constituintes, das quantidades relativas desses constituintes e das condições termodinâmicas nas quais ela se encontra (RAHOMA, 1989).

O óleo diesel é um combustível derivado do petróleo, constituído basicamente por hidrocarbonetos. Trata-se de composto formado principalmente por átomos de carbono, hidrogênio e em baixas concentrações por enxofre, nitrogênio e oxigênio, selecionados de acordo com as características de ignição e de escoamento adequadas ao funcionamento dos motores diesel. É um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico. Recebeu este nome em homenagem ao engenheiro alemão Rudolf Diesel (WIKIPEDIA, 2006)

O diesel derivado de petróleo é composto por aproximadamente 75% de hidrocarbonetos saturados, principalmente, parafinas ou alcanos, incluindo *n*, *iso* e cicloparafinas; e 25% de hidrocarbonetos aromáticos, incluindo naftalenos e alquibenzenos (WIKIPEDIA, 2006).

Os hidrocarbonetos são compostos constituídos apenas por hidrogênio e carbono (RUSSELL, 1994). O termo hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) é usado para descrever uma grande família de várias centenas de compostos químicos originados do refino do petróleo cru (PATNAIK, 1996).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são poluentes orgânicos de importância ambiental e interesse toxicológico, pois muitos apresentam propriedades pré-carcinogênicas e/ou mutagênicas para homens e animais (BOFFETTA *et al.*, 1997; PEREIRA NETTO *et al.*, 2000; WHO, 1988).

Há relação com o mecanismo de carcinogênese e a estrutura molecular dos HPAs que, portanto, têm potencial carcinogênico diferenciado. A International

Agency for Research on Cancer (IARC, 2002) estabeleceu uma classificação de HPAs e de alguns materiais que os contêm, conforme os dados disponíveis sobre a carcinogenicidade destes materiais ou substâncias.

HPAs são oriundos de derramamento de petróleo, queima de combustíveis, resíduos industriais, etc. Mas também são emitidos por fontes naturais (vulcões, por exemplo), e muitos processos térmicos dão origem a essas substâncias conforme LOPES e ANDRADE (1996); VO DINH *et al.*, (1998).

A Environmental Protection Agency (EPA) estabeleceu uma lista de 16 HPAs considerados prioritários para monitoramento ambiental, em função de sua carcinogenicidade e ocorrência.

A ingestão de HPAs por seres humanos ocorre por diversas vias como a inalação de ar, a ingestão de águas, solos, poeiras e alimentos, contato através da pele etc., que têm importância relativa diferente (WHO, 1988). O anexo D - listagem nº 4 da NBR 10.004 (ABNT, 1987b), relaciona substâncias e espécies químicas que conferem periculosidade aos resíduos. Dentre estas, estão incluídos diversos HPAs como benzo[a]pireno, fluoranteno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k] fluoranteno, criseno. etc. A presença de um desses compostos no resíduo é suficiente para classificá-lo como resíduo perigoso sendo os de maior periculosidade os benzo[a]pireno, fluoranteno e criseno, (PEREIRA NETTO *et al.*,2000).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), fazem parte de um grupo particular de contaminantes do meio ambiente, tratam-se dos poluentes mais preocupantes no que se refere a poluição ambiental. A preocupação relativa à contaminação com PAHs é devido ao fato de que são conhecidos como potentes cancerígenos como por exemplo o benzo(a)pireno, o mais extensivamente PAH estudado, que produz metabólitos cancerígenos quando agem nas enzimas do corpo. Outra preocupação crescente é a contaminação do solo e águas subterrâneas por PAH (CUTRINGHT e LEE, 1994).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são produzidos atualmente através dos processos industriais da refinação de petróleo, produção de coque (carvão) e estação de tratamento de esgotos. O aumento nas ocorrências de vazamentos subterrâneos em tanques de armazenamento e vazamentos acidentais, tal como o do Exxon Valdez no Alaska (EUA), também contribuem para o aumento de PAH no meio ambiente (CUTRINGHT e LEE, 1994).

Quando hidrocarbonetos aromáticos são incorporados pela flora e fauna, ligam-se às moléculas protéicas e ao tecido gorduroso, sendo transferidos através da cadeia alimentar sem alterações em sua estrutura. Muitos seres expõem-se à contaminação por hidrocarbonetos derivados do petróleo através da ingestão de cadáveres, animais ou plantas que tenham acumulado hidrocarbonetos no seu organismo (TIBURTIUS e ZAMORA, 2004).

O benzeno é um dos hidrocarbonetos aromáticos mais difíceis de degradação sob condições anóxicas. Embora um grande número de artigos relate a degradação anaeróbia de outros hidrocarbonetos aromáticos, dentre eles tolueno e xilenos, muitas investigações têm descrito o benzeno como recalcitrante (PHELPS; KAZUMI; YOUNG citado por TIBURTIUS e ZAMORA, 2004).

Estudos sobre a biodegradação de poluentes voláteis, como benzeno, tolueno e xilenos em reatores seqüenciais anóxicos/microaeróbios têm mostrado que tolueno e p-xilenos são tratáveis sob condições anóxicas (nitrificação), enquanto benzeno, orto e para-xilenos somente são biodegradáveis sob condições microaeróbias, (MA e LOVE 2001).

Muitas das substâncias do petróleo são voláteis e instáveis sobre condições normais, o óleo está sujeito à evaporação, fotodecomposição, adsorção, percolação e biodegradação (CASARINI *et al.*, 1988)

Ainda existe uma atitude generalizada de subestimar os riscos de poluição do solo e das águas subterrâneas, devido à falta de políticas e de ações voltadas para sua proteção (CETESB, 2001). As frações do petróleo compostas pelos aromáticos são os principais causadores de morte por toxicidade. Entre os aromáticos mais tóxicos estão o benzeno, tolueno e xileno (BTEX) (CETESB, 2004c).

### **3.2 Fitoindicadores de Solos Contaminados**

Bioindicadores de poluição são organismos ou uma comunidade de organismos sensíveis à poluição como fator de estresse e respondem por meio de alterações dos seus processos vitais (indicadores por meio de resposta) ou pela acumulação do poluente (indicadores por meio de acumulação). Como organismos sedentários, as plantas estão sempre expostas ao estresse das emissões locais, e em maior intensidade que os animais. Por esta razão as plantas podem ser

usadas como bioindicadores em relação a uma variedade de substâncias tóxicas.

Organismos indicadores respondem às mudanças no meio, de acordo com suas necessidades específicas, por intermédio do declínio, do desaparecimento, ou ao contrário, pela abundância no crescimento e no aumento da capacidade de reprodução. Alterações na composição florística e o declínio de algumas espécies são bons indicadores da ocorrência de um estresse de longa duração (LARCHER, 2000).

MALAVOLTA (1994) descreve o sistema solo-planta como um conjunto de compartimentos que se comunicam mediante reações de transferência reversíveis, sendo que a fase sólida é representada pelo complexo organomineral do solo, ou seja, da associação de argila com o húmus.

O outro elemento, segundo o citado autor, pode ser: a) Essencial: sem o qual a planta não vive, faz parte dos compostos vitais ou de reações cruciais para a vida da planta, pode ser um macronutriente ou um micronutriente, de acordo com a quantia exigida. b) Benéfico ou Útil: não é essencial, ou seja, a planta pode viver sem ele, porém sua presença contribui para o crescimento, produção ou para a resistência às condições desfavoráveis do meio (clima, pragas, moléstias, compostos tóxicos do solo, da água e do ar) e c) Tóxico: prejudicial à planta e não enquadrado em nenhuma das duas categorias anteriores.

BAUMEISTER e ERNEST (1978) afirmaram que a toxicidade de um determinado elemento não se manifesta unicamente pelo seu teor total no solo, mas sim pelo que é disponível às plantas.

Segundo PORTO (1986), existe uma correlação entre o conteúdo de metais encontrado no substrato e aquele acumulado pelas plantas, portanto, baixas concentrações de metais no substrato correspondem a baixas concentrações nas plantas e vice-versa, o autor ressalta também que a quantidade e a distribuição dos metais nas plantas depende da disponibilidade do metal no substrato, da capacidade de absorção e troca de íons e da capacidade de transporte.

O termo “metal pesado” é aplicado a elementos com peso específico maior que 5 g/cm<sup>3</sup> ou que possuem um número atômico maior do que 20. Este critério acaba englobando metais, semi-metais e mesmo não metais como o selênio (Se). MALAVOLTA (1994) ressalta que embora o termo pareça inadequado, é usado

para designar elementos classificados como poluentes do ar, água, solo, alimentos e forragens.

BAUMEISTER e ERNEST (1978) consideram a existência de diferenças na absorção dos metais pesados que estão ligados de forma inorgânica e orgânica, elementos como cobre e chumbo que quase sempre são encontrados na forma orgânica, não apresentam relações ou interações diretas entre seus teores no solo e nas plantas, embora as plantas que se desenvolvem em áreas ricas nestes elementos possam apresentar níveis elevados destes elementos.

OLSEN (1983) afirma que, as interações entre os metais pesados, e destes com os macro-nutrientes, também geram modificações na nutrição das plantas, podendo estas ocorrer tanto no solo como na planta.

A absorção dos elementos metálicos pelas células das plantas e particularmente pelas raízes é facilitada por mecanismos próprios de transporte e acumulação, pois vários metais pesados são necessários às plantas como micronutrientes. Contudo, as plantas não podem evitar a entrada de elementos tóxicos pelos mesmos mecanismos. Os metais pesados exercem um efeito tóxico principalmente em função de sua interferência no transporte eletrônico da respiração e da fotossíntese e na inativação de enzimas vitais. Como consequência do baixo nível energético, há uma redução na absorção dos nutrientes minerais e do crescimento da planta (LARCHER, 2000).

Há casos em que a planta pode absorver grandes quantidades de um nutriente disponível, chegando a níveis excessivos ou tóxicos, interferindo nas funções metabólicas normais de outro nutriente disponível. OLSEN (1983) cita, ainda, como exemplo o caso da absorção excessiva de zinco por uma planta, alterando a função metabólica do ferro, e causando clorose de ferro na mesma, mesmo que o ferro esteja presente em concentrações normais na planta. Da mesma forma, pode ocorrer a interação entre o ferro e o manganês, esta interação antagônica ocorre principalmente em solos ácidos e que contém grandes quantidades de manganês disponível.

No interior da planta, podem ocorrer outras interações antagônicas, como aquelas que ocorrem entre: zinco e cobre, molibdênio e zinco, manganês e cromo, ferro e cobre, ferro e cromo, ferro e molibdênio, cobalto e manganês, cobalto e ferro (KABATA PENDIAS e PENDIAS, 1985).

ANTONOVICS *et al.* (1971), citam que a maioria das espécies de plantas tolerantes a níveis elevados de metal pesado são representantes das famílias *Leguminosae* e *Gramineae*.

TURNER (1969) e ANTONOVICS *et al.* (1971), afirmam que a tolerância a metais pesados nas plantas pode-se dar de diversas formas, como, por exemplo, impedindo que o metal seja usado no metabolismo, ou não permitindo que este atinja os locais metal-susceptíveis, ou envolvendo um metabolismo interno especializado de forma a permitir que as enzimas funcionem normalmente na presença de quantidades tóxicas de metais, ou ainda envolvendo fatores externos que impedem os metais de entrarem nas plantas.

TURNER (1969), também observou que nas plantas, a tolerância a um determinado metal pesado não confere tolerância a outro metal pesado. Afirma que uma notável e intrigante característica das plantas tolerantes é a sua rígida especificidade a um determinado metal pesado. Por exemplo, uma planta tolerante a cobre, não é tolerante a zinco e vice-versa. Todavia, diferentes tolerâncias individuais podem ocorrer conjuntamente quando na ocorrência simultânea de diferentes metais em quantidades tóxicas no solo. Esta combinação de tolerância aos metais é conhecida como tolerância múltipla.

Segundo MALAVOLTA (1994) a toxidez é a manifestação externa de anormalidade que pode ser devida a qualquer elemento, essencial ou benéfico, macro ou micronutriente.

De acordo com BECKET (1991), referenciado por MALAVOLTA (1994), a toxidez de um elemento deve ser acompanhada e medida pelas seguintes variáveis:

- 1- diminuição no crescimento ou redução na colheita;
- 2- sintomas visíveis;
- 3- concentração no tecido.

BECKET (1991) afirma que o primeiro efeito ou manifestação pode ser devido à interferência provocada pelo elemento na absorção, transporte ou funções de outro. O sintoma visível é o resultado de uma cadeia de acontecimentos que começa com uma alteração ao nível molecular, seguida de uma modificação sub-celular, que por sua vez, conduz a uma alteração celular, a

qual, finalmente, resulta em modificação no tecido, ou seja, no sintoma apresentado pela planta (MALAVOLTA, 1994).

Segundo NASCIMENTO (2000), o surgimento de necroses e cloroses, redução da clorofila e do crescimento e produtividade da massa seca, podem estar associados a altos teores de metais pesados no substrato. Quando os sintomas causados pelo excesso desses metais não são visíveis, sua presença pode ser determinada através de análises químicas dos tecidos. O autor supracitado utilizou-se ainda de critérios baseados em características morfológicas como coloração, morfologia foliar, deformações e inibições de desenvolvimento radicular da espécie *Avena strigosa* L. para avaliar a fitotoxicidade de áreas impactadas com hidrocarbonetos de petróleo, aferindo notas de um a cem para as plantas utilizadas nesse experimento de acordo com as variações morfológicas apresentadas.

De acordo com MALAVOLTA (1994), ocorrem três processos de contato do metal pesado com a raiz:

1- Intercepção Radicular. Neste processo, a raiz, ao se desenvolver encontra o elemento na solução do solo, o qual ocupa os poros grandes (diâmetro médio maior que dez micrómeros), e médios (diâmetro entre 0,2 e 10 micrómeros) dos quais o elemento é absorvido.

2- Fluxo de Massa. Neste processo o elemento se move com uma fase aquosa, a solução do solo, a qual se desloca de uma região mais úmida para outra mais seca junto da raiz.

3- Difusão. Neste processo ocorre o caminhar do "metal pesado" por distâncias curtas dentro de uma fase aquosa estacionária, indo de uma região de maior concentração para outra de menor concentração na superfície da raiz.

DEKOK (1956), estudando a toxidez do cobre, níquel, cobalto, zinco, cromo e manganês em plantas de mostarda (*Senapis alba*), cultivadas em hidroponia, observou que o principal efeito da toxicidade dos metais manifesta-se na raiz. Certos metais são exigidos pelas plantas em quantidades muito pequenas

para que estas apresentem um crescimento saudável. Alguns aumentos acentuados causam distúrbios fisiológicos, dos quais o amarelecimento das folhas (clorose), constitui-se geralmente em um sintoma visível. Ainda de acordo com esse autor, o efeito do excesso de metal sobre as plantas parece ser duplicado, pois além de ocorrer a produção de clorose, há ainda um efeito específico do próprio metal. O excesso de metais pesados apresenta do mesmo modo um efeito acentuado sobre o crescimento da raiz e sobre o sistema radicular como um todo, ocasionando má formação, com raízes curtas e lateralmente curvas, podendo apresentar coloração marrom.

De acordo com McDOWELL *et al.*, (1983), existem plantas acumuladoras para a maioria dos minerais existentes. Relacionando forrageiras com a absorção de zinco verifica-se que estas plantas são altamente eficientes na absorção deste elemento (MALAVOLTA, 1980).

SOUSA *et al.*, (1982), em experimento desenvolvido em área de biorremediação onde foram dispostos hidrocarbonetos, observou que as forrageiras nativas apresentavam apenas 11 ppm de zinco, enquanto que o capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq.), capim-jaraguá (*Hyparrhenia rufa* (Ness) Stapf.) e capim-gordura (*Melinis minutiflora*, Beauv.), apresentavam, respectivamente, 31 ppm, 23 ppm e 21 ppm.

De acordo com CUNNINGHAM (1996), Plantas que acumulam metais entre 1 a 3% de seu peso seco, podem ser consideradas como hiper-acumuladoras, possuindo potencialidade em relação à extração de metais pesados em solos contaminados.

Espécies arbóreas como *Betula* sp, *Alnus* sp, *Salix* sp. são tolerantes aos metais pesados e possuem potencialidades para descontaminar áreas poluídas por indústrias. A aplicação desta técnica ainda é restringida pelo conhecimento somente parcial dos efeitos dos metais no ecossistema (GLIMMERVEEN, 1996).

A concentração de nutrientes nas plantas depende da interação de uma série de fatores, estes são: o tipo de solo, a espécie de planta em questão, o estágio de maturidade da mesma, o rendimento, o manejo da planta e o clima (McDOWELL *et al.*, 1993). O principal fator é o potencial de absorção da planta a ser utilizada, este é específico e geneticamente fixado para os diferentes nutrientes (MENGEL e KIRKBY, 1987). O segundo fator é a disponibilidade

destes nutrientes no solo, que dependem da concentração de cada um na solução do solo (MCDOWEL *et al.*, 1993).

Os critérios de essencialidade para os elementos inorgânicos foram estabelecidos por ARNON e STOUT (1939) e reafirmados por EPSTEIN, (1975), que sugerem como essencial direto, o elemento que faz parte de um composto ou participa de uma reação crucial para o metabolismo da planta. Também foi considerado essencial de forma indireta, aquele elemento que quando ausente, não permite à planta completar seu ciclo de vida, apresentando sintomas de carência e morrendo.

No grupo dos metais pesados, MALAVOLTA (1994) apresenta como essenciais o Cu, Fe, Mn, Mo, Zn. Como benéficos o Co, Ni e V. Não essenciais ou sem função o Al, Cd, Cr, Hg, Pb. Os elementos do grupo dos essenciais e benéficos possuem cada qual a sua função, portanto, podem também ser considerados como micronutrientes.

Após a adoção de meios nutritivos como técnica experimental, verificou-se que as plantas não se desenvolviam sem os nutrientes N, P, K, Ca, Mg, S e Fe. Foram, então, denominados de macronutrientes, pois são exigidos em quantidades relativamente altas. Na medida em que foram desenvolvendo-se as pesquisas dentro da nutrição de plantas, novos elementos foram sendo incorporados na lista dos essenciais.

Entretanto, como as quantidades exigidas pelas plantas eram muito inferiores aos dos macronutrientes, foram então chamados de micronutrientes (EPSTEIN, 1975).

### **3.3 O *Trifolium repens* L.**

Trata-se de uma planta perene, herbácea, ereta, glabra, pouco ramificada, de 20 à 30 cm de altura. A planta é exótica, originária da Europa. Esta leguminosa foi introduzida no sul do Brasil para fins forrageiros, e como consequência, naturalizou-se em todo o planalto meridional. Também conhecida como trevo-branco, a planta é indesejável em gramados, jardins e praças devido a sua grande resistência ao pisoteio e a cortes freqüentes (LORENZI, 2000).

O *Trifolium repens* L. possui características que o tornam no mínimo adequado ao experimento, são estas; a rusticidade, prolificidade, não exigência quanto às condições do solo, e resistência ao inverno.

CARNEIRO *et al.* (2002) verificaram a tolerância da espécie na avaliação do comportamento de espécies herbáceas em relação ao excesso de Cd e Zn no solo, a espécie apresentou crescimento satisfatório, sendo promissora para estudos adicionais sobre a reabilitação de áreas contaminadas com metais pesados.

### 3.4 Biorremediação

O mercado mundial de aplicação de modelos denominados “Biorremediação” segue uma rota direcionada pelas agencias ambientais dos próprios países que utilizam as ITT`s (Tecnologias Inovadoras de Tratamento). O maior mercado na área de remediações é o norte americano, responsável por 35 à 45 % do mercado mundial, e detendo o mais completo modelo de controle ambiental em execução. Segundo o levantamento realizado pela USEPA, em estudo denominado “Innovative Technology Evaluation Report” (1995), mais de 95% dos processos de biorremediação são utilizados para descontaminação de água e solos. ( BROETZMAN, 1997).

A utilização de tecnologias inovadoras de tratamento (ITT`s) contempla a biorremediação como uma forma de tratamento dentre tantas outras. O termo biorremediação refere-se à utilização de microrganismos indígenas ou não, para a degradação de contaminantes orgânicos. Estes microrganismos quebram esses compostos orgânicos a fim de utilizá-los como fonte de alimento, (BROETZMAN, 1997). Nestes sistemas a biorremediação do solo é realizada através de microrganismos do próprio solo (autóctones) ou inoculados (alóctones), que promovem a degradação dos resíduos orgânicos biodegradáveis (BARTHA, 1981).

O processo de biorremediação dos solos compreende a utilização de diferentes tecnologias, na superfície, sub-superfície, e zona vazódica ( situada logo acima do lençol freático), neste processo são utilizados bactérias e fungos, bem como nutrientes e fontes de oxigênio, que podem ser injetados através de orifícios no solo (FERNANDES, 1998).

A biorremediação compreende uma variedade de processos de biotratamentos que variam significativamente em seus mecanismos de ação, como a mineralização, transformação parcial, humificação e alteração do potencial redox. Técnicas como a inoculação de microrganismos hábeis na degradação de compostos oleosos, aplicação de enzimas imobilizadas e o uso de plantas para conter e transformar poluentes, são utilizadas para melhorar a capacidade de degradação dos resíduos oleosos no solo (BOLLAG; MERTZ; OTJEN, 1994).

ALEXANDER, (1980). Completa a definição acima afirmando que a biorremediação, ou biodegradação no solo consiste na utilização de microrganismos que, através de vias metabólicas, promovem reações químicas e processos físicos que transformam compostos de difícil degradação em subprodutos mais facilmente degradáveis. A completa biodegradação de um substrato, como os resíduos oleosos, é chamada de mineralização e resulta na formação de biomassa microbiana, CO<sub>2</sub>, água e produtos inorgânicos GROVE (1978), THOMAS and WARD (1989) e DINEEN *et al.* (1992) acrescentam além de CO<sub>2</sub>, água, biomassa e materiais húmicos, a produção de CH<sub>4</sub> e sais inorgânicos.

A biorremediação é uma tecnologia que apresenta um nível de vantagens, no entanto, ainda existem impedimentos para o seu uso mais generalizado, destacando-se: a) A falta de resultados experimentais validados em escala comercial e de métodos de monitoramento do processo “*in loco*” e dos seus riscos; b) A falta de conhecimento sobre os processos biológicos envolvidos e, c) Regulamentação dos limites de seu uso.

A Biorremediação pode ainda ser: “*in situ*” e “*ex situ*”. Como o próprio nome já diz, a biorremediação “*in situ*” visa tratar o solo no próprio lugar onde ocorreu a contaminação, com a utilização de tecnologias que vão desde a introdução de nutrientes, até a adição de microrganismos selecionados para diferentes tipos de contaminante. Para o sucesso do sistema é necessário o monitoramento das condições de temperatura, umidade e pH, sendo estes fatores limitantes para a obtenção de bons resultados. Já na biorremediação “*ex situ*” o resíduo ou o solo contaminado é removido de seu local original e transportado para ser tratado em locais específicos como, por exemplo, reatores e biopilhas. No sistema de tratamento *ex situ* existe uma maior abrangência no que diz respeito ao controle e manuseio das técnicas a serem utilizadas, afinal por se tratar de um sistema

fechado (ao contrario do sistema *in situ*) não há riscos de contaminação ao meio ambiente, (HADLEY *et al.* 1997).

Muitos dos produtos químicos introduzidos no ambiente são biodegradáveis por ação de enzimas previamente existentes na natureza. Outros produtos, porém, não são sujeitos à ação destas enzimas e persistem e podem acumular-se gradativamente no ambiente (LANGENBACH, 1994).

A grande motivação de todos os pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação é, sem dúvida, a busca de microorganismos versáteis capazes de degradarem, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes a baixo custo operacional, (KUNZ *et al.*, TIBURTIUS e ZAMORA, 2004).

Os tratamentos de descontaminação biológica requerem a combinação de conhecimentos da ecologia microbiana e dos processos de engenharia, pois o envolvimento destes processos visa criar condições favoráveis de crescimento e atividade microbiana capazes de promover a descontaminação do solo sem prejuízos ambientais (METTING, 1993).

SKALANDANY e METTING (1992), citado por METTING (1993), dizem que de acordo com o American Petroleum Institute, contaminações de petróleo no solo podem ser reduzidos de 10.000 ppm. (7% por peso), para menos de 100-200 ppm, em poucos meses através dos processos de biorremediação.

Uma nova abordagem para a descontaminação de solos e águas subterrâneas é chamada de atenuação natural ou remediação natural, esta vem ganhando aceitação nos últimos anos, principalmente em locais contaminados por derramamentos de derivados de petróleo. A atenuação natural refere-se aos processos físicos, químicos e biológicos que facilitam a remediação natural, (WIEDMEIER *et al.* 1996). Este processo limita bastante o deslocamento dos contaminantes e, portanto, reduz a extensão da contaminação no meio ambiente.

Dados de campo de diversos pesquisadores (BARKER, *et al.*, 1987; CHIANG *et al.*, 1989; CHAPELLE, 1994; DAVIS e KLIER 1994; WIEDEMEIER, *et al.*, 1995) têm comprovado que a atenuação natural limita bastante o deslocamento dos contaminantes e, portanto reduz a extensão da contaminação ao meio ambiente.

A remediação natural não é uma alternativa de “nenhuma ação de tratamento”, mas uma forma de minimizar os riscos para a saúde humana e para o meio ambiente, monitorando o deslocamento do contaminante para assegurar

que os pontos receptores (postos de abastecimento de água, rios, lagos, etc), não sejam contaminados.

### 3.4.1 População Microbiana Degradadora de Hidrocarbonetos

Um número considerável de microrganismos encontrados no solo possui a capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo (CONCAWE, 1980; ENGLERT *et al.* 1993; KÄMPFER *et al.*, 1993; API, 1995). ROSEMBERG (1993) cita que 1% da população do solo possui capacidade de degradar hidrocarbonetos, sendo que este valor é muito mais alto em solos contaminados com hidrocarbonetos.

HARRIS (1976); SKALADANY e METTING (1993), citam a existência de microrganismos do solo capazes de degradar hidrocarbonetos, CONCAWE (1980) cita ainda que a população de microrganismos do solo pode tornar-se especializada na degradação de hidrocarbonetos, quando estes são adicionados ao solo.

Estudos têm revelado efeito da biodegradação pela inoculação. ZOBELL (1946) citado por HAIMAN (1995), notou que várias espécies representando 30 gêneros de microrganismos utilizam-se de hidrocarbonetos.

ATLAS e BARTHA (1972) citados por HAIMAM (1995) assinalaram 22 gêneros de bactérias, 1 gênero de alga e 14 de fungos, todos capazes de se utilizarem de hidrocarbonetos.

Pesquisas desenvolvidas em regiões frias ou temperadas mostraram que diversos grupos de bactérias e fungos têm habilidade para degradar componentes do petróleo (MILLS *et al.*; NOCENTINI *et al.*, citados por TIBURTIUS e ZAMORA, 2004)

KADRI *et al.* (1986) citado por FISCHER *et al.* (1995) identificaram *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter spp* e *Escherichia coli*, como sendo bactérias que biodegradam óleo na Baía do Kuwait.

A complexidade dos processos metabólicos necessários à degradação de hidrocarbonetos leva à formação de consórcios, com bactérias de diferentes gêneros e espécies, cada uma especializada em degradar uma ou várias frações do óleo derramado (CRAPEZ *et al.*, TIBURTIUS e ZAMORA, 2004)

Os compostos orgânicos podem não ser degradados prontamente quando a população microbiana, ou é baixa, ou o balanço de nutrientes é inadequado, ou ocorrem altas taxas do contaminante, ou existe a influência de outros hidrocarbonetos envolvidos(ATLAS e BARTHA, 1973).

Processos de tratamentos biológicos baseados em bactérias têm demonstrado sucesso em alguns compostos xenobióticos. Existem outros compostos xenobióticos que parecem ser recalcitrantes para a degradação por bactérias. Estes compostos tendem a ser complexos moleculares orgânicos, com um ou mais anéis aromáticos ou substituição halógena. Estes compostos também são persistentes em ambientes naturais.

Alguns trabalhos que se utilizaram processos biológicos têm mostrado que certos fungos degradantes de lignina são capazes de degradar estes complexos compostos xenobióticos, que são recalcitrantes à degradação por bactérias. Investigações no campo, onde um determinado solo foi inoculado com o fungo branco macerador, pertencente a uma classe de fungos os quais incluem muitos gêneros capazes de degradar lignina e celulosas, mostrou a degradação de hidrocarbonos policíclicos aromáticos (PAH) no solo. O fungo branco macerador pode degradar com sucesso complexos xenobióticos no solo, se esses forem apropriadamente inoculados e condições apropriadas forem mantidas (HAIMANN, 1995).

Os microrganismos são encontrados em todos os ambientes, desde o solo superficial até camadas a centenas de metros de profundidade, em regiões úmidas ou desérticas, em água doce ou salgada de qualquer profundidade, no ar, em ambientes domésticos ou industriais, em altas ou baixas temperaturas e em ambientes poluídos ou não. Assim a biodegradação pode ocorrer em toda esta gama de ambientes. Animais e plantas sobrevivem em ambientes muito mais restritos. Os microrganismos têm vias metabólicas muito diversificadas, algumas inexistentes em animais e vegetais, como a fermentação, alguns tipos de metabolismo anaeróbico, metabolismo quimioautotrófico, e o metabolismo através de isoenzimas (EMBRAPA, 1994).

SHANNON e UTERMAN (1993); KOBAYASCHI e RITTMANN (1982), citados por METTING (1993), afirmam que a microbiologia encontra-se à frente dos estudos com poluentes e da tecnologia ambiental. A capacidade dos microrganismos de transformar elementos metálicos, bem como a existência de

consórcio microbiano no solo capaz de transformar ou metabolizar misturas de poluentes orgânicos, cujos componentes apresentam características químicas relacionadas àquelas de precursores ou intermediários bioquímicos (alcanos, hidrocarbonetos aromáticos e outros), oferecem grande oportunidade na remediação de áreas contaminadas (McGILL *et al.* 1981; BOLLAG *et al.* 1994).

BUSHNELL e HAAS (1941), relatam o isolamento de microrganismos hidrocarbonoclasticos desde 1896. Os mesmos autores citam que estes microrganismos podem ser isolados em locais como solos com óleo, tanques de sedimentação e águas de fundo de tanques de armazenamento de petróleo.

RIDGWAY *et al.* (1990) obtiveram 244 bactérias isoladas de um material contaminado com gasolina onde 86,9% eram do gênero *Pseudomonas*, sendo que também foram encontradas bactérias dos gêneros, *Alcaligenes*, *Nocardia* e *Micrococcus*.

ALEXANDER (1977), afirma que os microrganismos heterotróficos são os mais importantes para a degradação de contaminantes orgânicos e podem obter energia da fermentação, respiração aeróbica e anaeróbica.

Muitos estudos relatam sobre a habilidade de culturas puras em degradar hidrocarbonetos específicos, porém determinados compostos resistentes a um microrganismo, podem ser degradados por populações mistas de microrganismos (ATLAS, 1981).

METTING, (1993); BOLLAG *et al.* (1994) afirmam que para que ocorra a degradação de compostos poluentes com estruturas químicas não relacionadas aos substratos típicos, como por exemplo, os hidrocarbonetos clorados e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, é necessária a adaptação das populações existentes no solo. Solos e microrganismos previamente expostos aos contaminantes não possuem ou possuem menor período de aclimação do que aqueles sem prévia exposição (WALKER e COLWELL, 1976a; MIHELIC e LUTHY, 1988 a e b).

O tempo de aclimação também é conhecido como fase “lag”, no qual os microrganismos indígenas adquirem habilidade de degradação de novos compostos. Já a adaptação é a modificação das características dos organismos para facilitar e aumentar a capacidade de sobrevivência e reprodução em um meio particular (HERBES e SCHWALL, 1978). METTING (1993) complementa que “Aclimação” é definida, neste contexto, como o tempo que os

microrganismos nativos precisam para adquirir a capacidade de degradar compostos novos, enquanto “adaptação” refere-se à modificação de características dos organismos que facilitam ou aumentam sua capacidade de sobreviver e reproduzir em determinado ambiente. Assim, o solo pode ser visto como um sistema ecológico que tem mecanismos próprios de auto-regulação funcional, que agem no nível celular ajustando suas funções às condições ambientais.

KOCK (1993), citado por LANGENBACH (1994), afirma que quando o ambiente é muito adverso, parece que a taxa de mutagenicidade aumenta entre os microrganismos sob intenso estresse, os microrganismos não têm mais a possibilidade de atender à grande demanda energética para realizar o reparo de seu DNA, persistindo todos os tipos de defeitos genéticos, o que aumenta a taxa de mutação. Conseqüentemente, a probabilidade de aparecimento de um mutante adaptado àquelas condições inicialmente adversas é maior, e com isso, as possibilidades de sobrevivência da população aumentam “formando biomassas muito superiores àquelas formadas por animais ou plantas no mesmo período”.

SHANNON e UTERMAN (1993), citados por METTING (1993), afirmam que para conseguir uma efetiva biodegradação são necessárias a presença de microrganismos ou de consórcios apropriados e as condições ambientais adequadas para a atividade biológica. A proporção e a disponibilidade de contaminantes, substratos e nutrientes, as condições de umidade, a aeração, a temperatura e a presença ou não de compostos inibitórios são fatores que geralmente limitam a biorremediação.

CATALLO e PORTIER (1992), também citados por METTING (1993), enunciam que a força geradora do processo de biorremediação é a atividade biológica capaz de promover a destoxificação do solo contaminado, sendo muitas vezes necessário aumentar a população de microrganismos responsáveis pelas transformações específicas dos elementos poluentes. Para isso, torna-se necessário a procura de genes específicos em populações autóctones, e de tecnologia de aplicação dos organismos remediadores selecionados. Esse processo é conhecido como bioaugmentação, que corresponde á inoculação, no solo ou local contaminado, de microrganismos (nativos ou mutantes), com competência para a despoluição. Isto pode ser conseguido através de três maneiras: 1) Estimulação da população existente através de alterações no

ambiente ou aplicação de nutrientes; 2) Isolamento e seleção de organismos competentes e posterior aplicação no solo; 3) Uso de microrganismos clonados pela engenharia genética.

Apesar da ocorrência generalizada de microrganismos capazes de degradar compostos orgânicos, existem fatores limitantes da biorremediação, devendo a biotratabilidade (refere-se à medida do potencial de efetividade da biorremediação) do resíduo ou do solo a ser avaliada (METTING, 1993).

Por outro lado, GONÇALVEZ (1997) observou em seus experimentos *in vitro*, a aceleração acima de 236% na degradação de resíduos de refinaria com a inoculação de microrganismos especializados.

A utilização de inóculos de microrganismos é recomendada em solos recentemente contaminados, quando o contaminante é de difícil degradação, quando possui elevados teores de metal pesado, quando é exigida uma rápida descontaminação e quando a concentração do contaminante é baixa (PIOTROWSKI, 1991, citado por BEWLEY, 1992).

Dentro da grande variabilidade de microrganismos encontrados no solo, 3% a 17% são capazes de sintetizar resíduos oleosos e outros compostos de cadeia longa. Os hidrocarbonetos são consumidos por uma variedade de microrganismos como *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter* e *Bacillus* (ALEXANDER, 1980). As técnicas de contagem microbiana em placas e determinação do pH no solo podem indicar a presença de algum fator limitante no processo de biodegradação (ECKENFELDER e NORRIS, 1993).

ENGLERT *et al.* (1992), afirmam que a biodegradação de cicloalcanos ocorre apenas com a cooperação sinérgica de duas ou mais espécies de microrganismos. BAUER e CAPONE (1985) ao investigarem a degradação dos hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH's), antraceno e naftaleno, não observaram a degradação dos dois compostos quando na ausência do oxigênio molecular.

Cicloalcanos são mais resistentes ao ataque microbiano do que os alcanos de cadeia linear. Isso provavelmente em função da ausência de um grupo metil terminal exposto para a oxidação inicial. (ATLAS, 1981).

SIMON *et al.* (1999) não notaram diferenças na taxa da degradação de PAH's entre um solo controle (sem tratamento) e outro tratado com bioaugmentação, devido ao desenvolvimento de uma população aclimatada aos

hidrocarbonetos em um sitio com histórico de exposição pelo contaminante.

SKALADANY e METTING (1993) afirmam que nem todos os compostos xenobióticos são susceptíveis a biodegradações rápidas e completas, sendo necessária uma população metabolicamente capaz, condições de crescimento e concentração apropriada de substrato e nutriente. Os autores citam ainda que para a biodegradação de compostos mais complexos é necessária a ação de diferentes organismos que agem de maneira seqüencial

FREDRICKSON *et al.* (1991) ao utilizar uma bactéria capaz de degradar uma variedade de compostos aromáticos, concluíram que microrganismos indígenas (nativos do solo em questão) podem possuir potencial para a degradação “*in situ*” no caso de contaminantes orgânicos. AL-HADHRAMI *et al.* (1995) citam que a utilização de bactérias nativas pode ser vantajoso em função destas estarem adaptadas ao meio, possuindo então maior efetividade em qualquer processo de biodegradação.

HERBES (1981) obteve resultados que indicam que a aplicação continua de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos, resultam no aumento da habilidade das comunidades microbianas em utilizar estes compostos.

GOLDSTEIN *et al.* (1985) concluíram que a utilização de preparos comerciais de bactérias para (bioaugmentação) não tem sido confirmada nem em condições de campo, nem em laboratório. Resultados parecidos foram encontrados por NOVAK *et al.* (1992).

GOLDSTEIN *et al.* (1985) alegam que em condições extremas de pH e temperatura, toxinas, predadores, alta concentração de contaminantes, origens de carbono alternativas, manutenção da atividade das células durante o transporte para o sitio contaminado, bem como desvantagens na competição com as populações indígenas, pode ocorrer a inativação metabólica das células microbianas introduzidas, prejudicando-as irreversivelmente.

DOBSON e WILSON (1964) trabalharam com amostras de solo contaminado e não contaminado com óleo, observaram que as bactérias aeróbicas eram mais numerosas que as anaeróbicas. Porém, ALDRETT *et al.* (1997), afirmam que contagens elevadas de microrganismos não são indicativas de altas taxas de degradação. Os mesmos autores não encontraram correlações positivas entre o tamanho da população microbiana e o percentual de óleo degradado.

DOBSON e WILSON (1964) dizem também que, o maior consumo de  $O_2$  encontrado nas amostras que sofreram distúrbio, provavelmente foi consequência da aeração promovida pela mistura, que também propiciou uma distribuição mais uniforme dos microrganismos do solo. Além disso, concluíram que existem no solo microrganismos capazes de degradar não somente o óleo cru, como também as frações mais refinadas.

AL-AWADHI *et al.* (1996) estudaram a biorremediação de solos contaminados com óleo no Kuwait enfocando os efeitos da fertilização, irrigação e inoculação para a degradação do óleo. Os autores observaram um aparente efeito positivo na degradação do óleo, três meses após a adição de solos contaminados com bactérias que utilizam hidrocarbonetos. No entanto seis meses após a inoculação, o efeito positivo não fora mais observado quando comparado com os solos não inoculados.

IVSHINA *et al.* (1998) ressaltam ainda que em solos argilosos pode ocorrer a indisponibilidade do contaminante oleoso. Quando estes resíduos oleosos interagem com as partículas de argila, promovem um efeito hidrofóbico, o óleo pode ser adsorvido pelos complexos argilo-orgânicos e eventualmente formar agregados do solo hidrofóbico. Como consequência o hidrocarbonetos são adsorvidos ou capturados nos poros do solo por ação da capilaridade, tornando-se temporariamente indisponíveis aos microrganismos.

DEL'ARCO e FRANÇA (1999) obtiveram 42,9% de degradação da fração pesada de óleo diesel com a inoculação de microrganismos de *landfarming* e adição de fosfatos e nitratos. Nos solos com presença da fauna nativa foram encontrados 11,9% de remoção destes compostos.

### **3.4.2 Fatores que Interferem na Degradação de Hidrocarbonetos**

#### **3.4.2.1 As Características do Contaminante**

As características físico-químicas como densidade, solubilidade e volatilidade dos resíduos devem ser consideradas no processo de biorremediação. Compostos menos densos que a água são mais facilmente degradados devido à dificuldade de lixiviação. Altas taxas de degradação são conseguidas quando o contaminante possui baixo peso molecular (SKLADANY e

METTING, 1993). A concentração é determinante na degradação de um composto, onde concentrações elevadas podem ser tóxicas e concentrações baixas podem estar abaixo do “*threshold*” crítico no qual a degradação aconteceria, principalmente na presença de substratos alternativos (ALEXANDER, 1985; SWINDOLL *et al.*, 1989).

### 3.4.2.2 Os nutrientes Minerais

GUDIN e SYRATT (1975) comprovaram o aumento da degradação de resíduos oleosos de refinaria adicionando nitrogênio na forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , também verificaram a diminuição da relação C/N e o aumento na competitividade por este nutriente entre a população microbiana e a vegetação. BROWN (1983) também verificou maior taxa de degradação de lodos oleosos de refinarias petroquímicas com a incorporação no solo de uma mistura de nitrogênio, fósforo e potássio na taxa de 1,2% do conteúdo de carbono orgânico no solo.

Muitas vezes o próprio fertilizante pode ser um fator limitante na degradação de resíduos oleosos, devido a sua pronta disponibilidade aos microrganismos. Uma alternativa para evitar este efeito é a utilização de fertilizante na forma oleofílica, como por exemplo, a uréia parafinizada (BEWLEY, 1992).

A biodegradação do óleo pode ser aumentada pela suplementação de N,  $\text{PO}_4$ ,  $\text{O}_2$  e outros nutrientes (BROWN *et al.*, 1991; ROSEMBERG, 1993; HARRIS *et al.*, 1999).

CONCAWE (1980) e DINEEN *et al.* (1992) citam o estímulo da população microbiana através da adição de nutrientes que são limitantes na degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

DOWNEY (1990) citado em API (1995) encontrou resultados favoráveis na biorremediação *in situ* quando na adição de fertilizantes. DOWNEY *et al.* (1988) citado em API (1995) afirmam que hidrocarbonetos aromáticos podem ser removidos do solo em menos de duas semanas com um fornecimento adequado de nutrientes.

ATLAS e BARTHA (1973), BROWN *et al.* (1991) e LINDSTROM *et al.* (1991) também notaram aumentos significativos na biodegradação de hidrocarbonetos com a adição de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo,

mas sob a forma de fertilizantes oleofílicos.

### 3.4.2.3 A Temperatura

A temperatura é um importante fator nas reações bioquímicas promovidas pela população microbiana. Geralmente a atividade microbiana decresce com a diminuição da temperatura (DIBBLE e BARTHA, 1979; SKLADANY e METTING, 1993).

A oxidação de compostos oleosos geralmente ocorre no intervalo de 0 até 55°C. Em locais onde encontram-se microrganismos termófilos, a velocidade de reação a temperaturas elevadas é bastante rápida. Na temperatura de 0 °C ou abaixo desta, a degradação desses compostos é extremamente lenta (ALEXANDER, 1980).

WARD e BROCK (1976), encontraram temperaturas ótimas entre 20° C a 25° C para a degradação de óleo. Dentro destes valores os autores encontraram condições de trabalho ótimas, necessárias para a ocorrência dos processos de biorremediação.

### 3.4.2.4 A umidade

A falta de oxigênio no solo é causada principalmente pelo excesso de água no solo (KLADANY e METTING, 1993). Entretanto, assim como a presença de água no solo é fundamental para a comunidade microbiana, a presença de oxigênio é vital para os microorganismos aeróbico.

ROSEMBERG (1993) cita que a saturação ótima de água no solo para evitar a anaerobiose esta entre 20 e 60 %. Na condição de inundação, a população microbiana aeróbia se reduz, incentivando o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios ou resistentes aos baixos níveis de oxigênio. A quantidade ótima de umidade para a população microbiana está em torno de 50 a 60% da capacidade de retenção de umidade do solo (ALEXANDER, 1980).

CASARINI *et al.* (1991) verificaram que valores entre 50 e 70 % de umidade no solo são ótimos para que ocorra a biodegradação. Já DIBBLE e BARTHA (1979a) encontraram uma degradação de hidrocarbonetos aromáticos mais efetiva na faixa de umidade entre 30 e 90 %.

CHO e KIN (1997) demonstraram que o melhor tratamento para o aumento da degradação é o ajuste da umidade e aeração. Notaram ainda a decomposição de mais de 99% de fenantreno adicionado em 60 dias.

#### **3.4.2.5 O pH**

No processo de biorremediação, é necessário que o pH seja compatível com os microrganismos. Bactérias desenvolvem-se com um pH ótimo entre 5 e 9, enquanto que os fungos que degradam compostos complexos, tem o pH ótimo de 5 ou menos (SKALADANY e METTING, 1993).

ALEXANDER (1980) afirma que muitas espécies de fungos desenvolvem-se em grandes intervalos de pH, desde o extremo de 9 até 3 a 4. Mas pelo fato das bactérias e actinomicetes dominarem em solo de pH próximo ao neutro, os fungos geralmente dominam as áreas com baixo pH.

Já HUESEMANN (1994) relata um pH ótimo em torno de 7 para a otimização da biorremediação.

#### **3.4.2.6 Os metais pesados**

Muitas vezes a indisponibilidade do metal ao microrganismo, pode dar condições para o desenvolvimento da população microbiana e da vegetação, como verificado num vazamento de gás natural ocorrido em 1929, onde a quantidade de Mn disponível passou de 0 para 1,6 mEq mas com contínuas arações do solo, este conteúdo foi indisponibilizado aos microrganismos e à vegetação (SCHOLLENBERGER, 1930).

#### **3.4.2.7 A aeração**

Tratando-se de microrganismos aeróbios, a aeração é indispensável e é o fator mais limitante no processo de biodegradação. O aumento na degradação dos compostos oleosos através da aeração do solo é amplamente comprovado na literatura (SCHOLLENBERGER, 1930; DIBBLE e BARTHA, 1979; ATLAS; BARTHA, 1981; GRUIZ; KRISTON, 1995).

### 3.4.3 A Respiração do Solo

A respiração do solo, ou respirometria, é um parâmetro de fácil determinação, apresentando correlação com a atividade microbiana foi amplamente utilizado para trabalhos relacionados com a biomassa microbiana e biorremediação, inclusive para derivados petroquímicos.(BROWN *et al.*, 1991; MIELNICZUK, 1991). A respiração do solo tem sido usada como indicador da atividade biológica em um perfil de solo, este parâmetro nos dá uma melhor estimativa da relativa atividade microbiana do que a contagem de populações (SOPPER, 1993).

A respiração do solo é a metodologia mais citada em literatura para avaliar a atividade microbiana. Sua determinação se dá através da titulação ácido-base, onde uma solução alcalina captura o CO<sub>2</sub> produzido pela respiração microbiana no solo, sendo posteriormente titulada por um ácido. (STOTZKY, 1965; MILLER, 1974; AGBIM *et al.*; 1977; CASARINI *et al.*; 1988; MARSHALL e DEVINNI, 1988; PAUL e CLARK, 1989; SHARABY e BARTHA, 1993).

WATTS *et al.* (1982), trabalhando com a aplicação de resíduos no solo e medindo a atividade microbiana através da evolução do CO<sub>2</sub>, encontraram índices de respiração até dez vezes maiores em sítios que receberam aplicação de resíduos oleosos em comparação com aqueles que não receberam aplicação. GRUIZ e KRISTON (1995) encontraram valores de respiração até dez vezes superiores em solos contaminados com óleo.

RIIS *et al.* (1995) observaram maiores índices de respiração ao trabalharem com solos contaminados com óleos leves e pesados. Observaram ainda que na curva de respiração acumulada, os acréscimos no consumo de O<sub>2</sub> foram decrescentes de acordo com o tempo de incubação, indicando redução nas frações mais facilmente decompostas.

McGILL *et al.* (1981) relatam sobre o incremento da atividade respiratória e do número de bactérias adaptadas à degradação de hidrocarbonetos, quando óleo era adicionado ao solo. No mesmo experimento, os autores notaram um subsequente declínio na respiração após alguns dias de incubação. Este fato foi atribuído ou à completa decomposição de frações mais lábeis ou à disponibilidade limitada de nutrientes como o nitrogênio e o fósforo. WALKER e COLWELL (1976)

citam que a temperatura de incubação e a presença de óleo influenciam no número de microrganismos que degradam petróleo.

#### **3.4.4 TPH e Cromatogramas**

O parâmetro TPH (hidrocarbonetos totais de petróleo) pode ser utilizado como indicador de biodegradação de hidrocarbonetos. Trata-se de uma tecnologia aceita e utilizada por muitos órgãos ambientais como padrão de limpeza de áreas contaminadas por petróleo e derivados. O TPH é uma importante ferramenta para a quantificação e caracterização dos hidrocarbonetos derramados. Através da impressão digital (*fingerprint*) e análise dos constituintes obtidos em cromatogramas é possível estabelecer padrões de descontaminação em áreas atingidas por hidrocarbonetos. Porém, DOUGLAS *et al.* (1991) citam que as medidas de TPH podem ser susceptíveis a interferências por não distinguirem os hidrocarbonetos de petróleo daqueles compostos que ocorrem naturalmente no solo, tais como, graxas de plantas, lipídios e clorofilas.

#### **3.4.5 O Nitrato de Potássio (KNO<sub>3</sub>)**

Se os microrganismos nativos não forem suficientes para degradar os contaminantes, ajuda externa pode ser introduzida no local. Nutrientes suplementares deverão ser adicionados para aumentar o processo de biorremediação, independente de se usar microrganismos locais ou trazidos de fora. Sob condições aeróbicas, os contaminantes são totalmente mineralizados sob a forma de dióxido de carbono, água, biomassa e sais, tornando assim a biorremediação compatível com o ambiente (CUTRIGHT e LEE, 1994).

A denitrificação é uma boa opção para a biorremediação de solos. O nitrato pode ser usado como oxidante para a mineralização de hidrocarbonetos. (HESS *et al.*, 1996). Bactérias denitrificantes estão presentes no solo possuindo extensa capacidade metabólica. O nitrato (NO<sub>3</sub>) é um anion altamente solúvel em água e se dispersa rapidamente em solos úmidos, servindo como acceptor de elétrons para a biodegradação. Durante a biodegradação do contaminante, o nitrato é reduzido através de uma série de etapas para nitrito, óxido nitroso e então gás denitrogênio, com a concomitante oxidação do substrato carbonado (CAUWENBERGUE e ROOTE, 1998; ALEXANDER, 1999).

A adição de nitrato na ausência de denitrificantes nos processos de biorremediação “*in situ*” pode resultar na contaminação de águas de superfície e sub-superfície. A concentração de nitrato e nitrito na água de sub-superfície é regulada pela Resolução CONAMA 20, devido à toxicidade destes aos humanos. Como não existe registro bibliográfico, a respeito de uma recomendação de dose máxima, ou limite de toxidez para as doses de nitrato utilizadas nos processos de biorremediação “*in situ*”, é necessário no caso de sua utilização, que se realize um estudo aprofundado das mesmas, visando a não contaminação do meio ambiente.

A habilidade de microrganismos em degradar hidrocarbonetos sob condições estritamente anaeróbicas é bastante limitada. Compostos alifáticos são degradados apenas em poucos casos, como ocorre com *Pseudomonas aeruginosa* (BREGNARD *et al.*, 1997; COATES *et al.*, 1997), Já os aromáticos são degradados apenas por algumas espécies, e com potencial inferior à degradação aeróbica.

Segundo ALEXANDER (1999), Muitos compostos requerem condições aeróbicas para a biodegradação, já outros requerem condições anaeróbicas. Muitos compostos podem ser degradados sob ambas as condições, embora alguns sejam resistentes à degradação anaeróbica, como por exemplo o antraceno, o naftaleno, benzeno e alcanos em geral.

VERMACE *et al.*, (1996), investigaram a utilização de nitrato para a estimulação de um consórcio de microrganismos endógenos na degradação de BTX. O estudo constata que a adição deste nutriente efetivamente eleva a concentração de microrganismos, fato que facilita a biorremediação dos poluentes. VENKATRAMAN *et al.*, (1998), realizaram estudos sobre biorremediação *in situ*, promovendo o processo por adição de fosfato, nitrato e sais de amônia. Os resultados indicaram uma redução da ordem de 85% no teor de BTXs, após um período de 50 semanas.

GERSBERG *et al.* (1989), trabalharam com a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos valendo-se da denitrificação. Utilizaram o nitrato (500 mg/l) como acceptor de elétron e obtiveram num período de 54 dias a degradação de 80%, 95% e 47% respectivamente para benzeno, tolueno e xileno. Detectaram limitações quanto à existência de nitrogênio e fósforo como nutrientes.

### 3.4.6 O Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Em muitos casos o peróxido de hidrogênio é utilizado em processo de biorremediação *in situ*, sendo injetado no solo ou água do subsolo com a função de elevar os níveis de oxigênio, seja para aumentar a atividade microbiana, seja para promover a degradação dos hidrocarbonetos através de sua reação com o Fe<sup>+2</sup> (BÜYÜKSÖNMEZ *et al.*, 1998). Esta reação que ocorre com o Fé<sup>+2</sup> é chamada de reação de *Fenton* e é maximizada em pH's ácidos sendo que o pH ótimo está entre 3 a 4,5 baseando-se na química do ferro (LEETHEM, 2000).

Os autores HULING *et al.* (1991) realizaram estudos de laboratório com o peróxido de hidrogênio e obtiveram a degradação de até 54% dos hidrocarbonetos que encontravam-se no solo após 140 dias de tratamento.

WATTS *et al.* (2002) trabalharam com a mineralização de PAH's utilizando peróxido de hidrogênio através de oxidação química, os autores citam ainda que o peróxido de hidrogênio pode ser catalisado por minerais que ocorrem naturalmente nos solos.

O peróxido de hidrogênio é decomposto devido às reações de catalise que ocorrem no solo, que contem uma concentração natural de compostos orgânicos, ferro, níquel e cobre, que catalisam esta reação (MURPHY *et al.*, 1989; LAWES citado por COOKSON, 1995)

SCHUMB citado por ZAPPI *et al.* (2000) reportou a decomposição do peróxido tanto em pH's baixos (<3) como em pH's altos (>7) Conteúdos elevados de matéria orgânica no solo podem interferir nos processos de biorremediação com o peróxido.

A injeção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em superfície de sedimentos contaminados tem sido usada com sucesso para sítios visando a estimulação da biodegradabilidade "in situ" de hidrocarbonetos, (HADLEY *et al.*, 1997).

BARENSCHEE *et al.* (1991) compararam a efetividade do peróxido de hidrogênio e nitrato como aceptores de elétron para a biorremediação *in situ* de hidrocarbonetos de petróleo em um sítio com contaminação de 3,8 mg/l de óleo diesel. A extração do solo com solvente ao fim do experimento indicou que 68,8% dos hidrocarbonetos tinham sido biodegradados na coluna de peróxido comparado com 7,8% na coluna de nitrato. Usando um balanço de massa aproximado, a razão do acceptor de elétron utilizado com o hidrocarboneto degradado (massa/massa) era 5,7 para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 4,7 para NO<sub>3</sub>.

O peróxido de hidrogênio pode ser usado em concentrações que variam de 100 a 500 mg/L de acordo com o tipo de solo, utilizando-se de doses maiores para solos arenosos. Concentrações acima de 1200 a 2000 mg/L são consideradas tóxicas (Cookson, 1995). A toxicidade pode ser minimizada aplicando-se doses reduzidas de peróxido, possivelmente 50 mg/L, e então aplicar de modo gradativo até atingir doses mais elevadas em torno de 1000 mg/L (ALEXANDER, 1999).

### **3.5 Fitorremediação**

As plantas também exercem importante papel nos processos de biorremediação, a presença de raízes, juntamente com a manipulação do solo e a aplicação de substratos orgânicos e nutrientes inorgânicos, acelera os processos de degradação. As plantas conferem um aumento na absorção e transformação de compostos orgânicos, podendo ainda acumular metais e radionucleotídeos. A hiperacumulação de metais pesados, a alteração das moléculas orgânicas (pesticidas) e das populações microbianas rizosféricas tornam as plantas importantes componentes nos processos de biorremediação (METTING, 1993).

A fitorremediação pode ser definida como uma seleção e utilização de espécies de plantas para seqüestrar, assimilar, transformar e também decompor certos contaminantes, trata-se de um processo natural que oferece a possibilidade de uma ação eficaz na remediação de solos, sedimentos e sistemas de aquíferos contaminados (MORENO, 1998).

O uso de plantas associadas à microbiologia vem sendo considerado como um avanço no processo de biorremediação, minimizando os prejuízos ambientais causados por contaminantes. A capacidade de biorremediação das plantas, é indiscutível, porém suas potencialidades são menores do que as oferecidas pelos microrganismos. Nos animais, nas plantas e nos microrganismos, o metabolismo e o destino dos xenobiontes guardam diferenças importantes, (LANGENBACH, 1994).

Segundo SHIMABUKURO *et al.* (1982) citado por LANGENBACH (1994), nas plantas observa-se freqüentemente, a formação de conjugados solúveis e insolúveis, que ficam imobilizados em determinados tecidos por longo tempo ou se destacam da planta por senescência.

O efeito simbiótico da interação Planta-microrganismo para controle potencial da poluição do meio ambiente tem sido demonstrado de forma crescente nesta última década. Pesquisas têm relatado que poluentes como metais pesados e compostos químicos de origem orgânica podem ser absorvidos, detoxificados e mineralizados nos tecidos vegetais e na rizosfera de espécies de plantas aquáticas, herbáceas, arbustivas e arbóreas (WALTON e ANDERSON, 1990; ANDERSON e WALTON, 1993; NAIR *et al.*, 1993; BURKEN, 1996; MORENO, 1998).

A concentração de nutrientes nas plantas depende da interação de um certo número de fatores, incluindo o solo, espécies de plantas, estágio de maturidade, rendimento, manejo de planta e clima (McDOWEL *et al.*, 1993).

O principal fator, no entanto, é o potencial de absorção, este é específico e geneticamente fixado para os diferentes nutrientes (MENGEL e KIRKBY, 1987).

Existem basicamente três mecanismos principais envolvidos na fitorremediação de poluentes orgânicos: 1) absorção direta de contaminantes e subsequente transformação e acumulação de metabólitos não fitotóxicos nos tecidos das plantas; 2) estimulação da atividade microbiana e de transformações bioquímicas na rizosfera através da liberação de exudados e enzimas e 3) intensificação da mineralização na interface solo-raiz provocada pela associação simbiótica de fungos micorrízicos e colônias de bactérias nas raízes (ANDERSON e WALTON, 1995; SCHOOR *et al.*, NYER e GATLIFF, 1996).

Além da biomassa vegetal representar 99% da biomassa viva no planeta e um valor 100 vezes superior a biomassa de microrganismos, as plantas estão envolvidas em numerosos processos que têm uma relação muito íntima com destino dos resíduos químicos despejados no meio ambiente (NELESSEN e FLETCHER, 1993).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização da Área Impactada

O solo encontrado na região do Município de Mafra, Santa Catarina, é do tipo (P074) - PODZÓLICO BRUNO-ACINZENTADO Álico Ta A moderado, textura argilosa, de moderadamente a bem drenado EMBRAPA (2005).

A cobertura florestal é Ombrófila Mista, o relevo suave a ondulado e o clima subtropical (EMBRAPA 2005).

### 4.2 O Local do Acidente

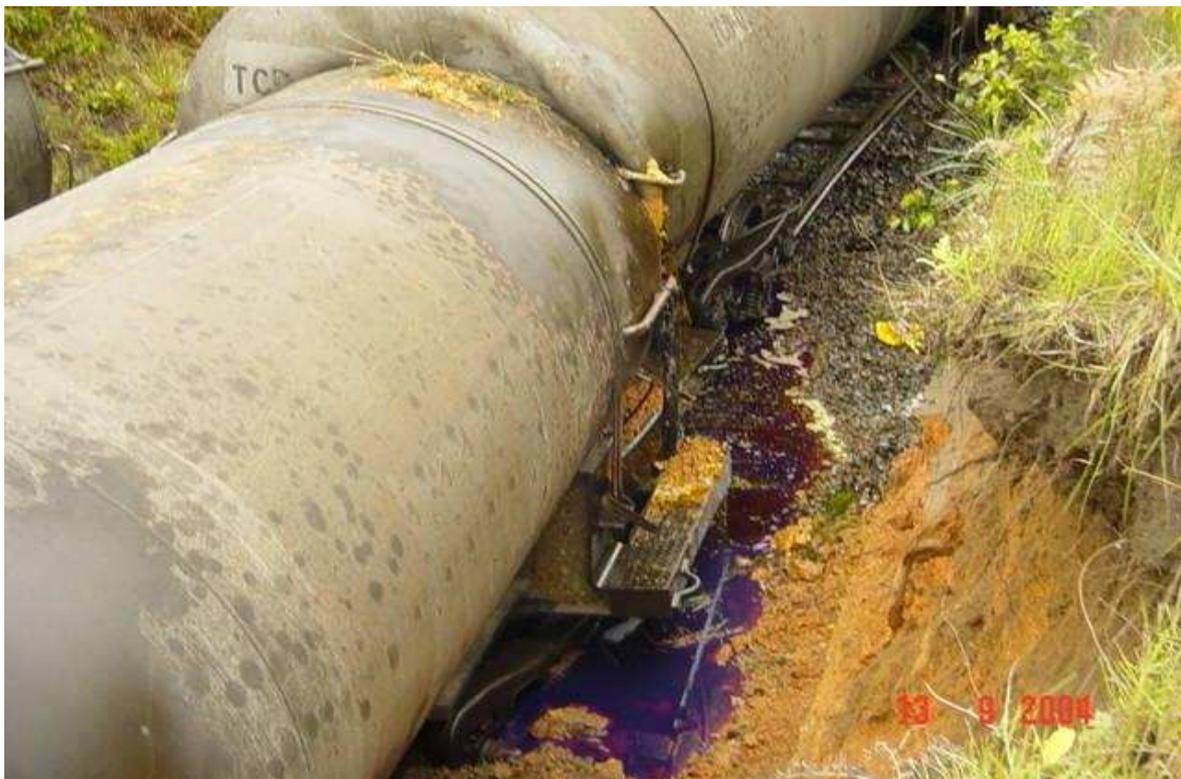
O local do acidente encontra-se a aproximadamente 10 Km a sudeste de Mafra, no acidente vagões do trem descarrilharam e bateram rasgando os tanques de armazenamento do óleo diesel (Figuras 01, 02 e 03). As Figuras 04 e 05 mostram o local do acidente e o caminho percorrido pelo óleo até o trecho de floresta, sendo que este, encontra-se logo ao lado da ferrovia (Figura 06) O solo encontrava-se encharcado devido às chuvas ocorrentes no período (Figura 07).

**Figura 01:** "Vagões Tanque Descarrilhados E Amontoados"



Fonte: ALL (2004)

**Figura 02:** "Vagões Tanque Rasgados Culminando no Vazamento de óleo Diesel"



Fonte: ALL (2004)

**Figura 03:** "Vagões Tanque Descarrilhados"



Fonte: ALL (2004)

**Figura 04:** “Local do Acidente e o Caminho Percorrido pelo Óleo até o Trecho de Floresta”.



Fonte: Adaptada de Defesa Civil (2004)

**Figura 05:** “Local do acidente no Dia da Amostragem do Solo e o Caminho Percorrido pelo Óleo até o Trecho de Floresta”.



Fonte: O autor (2005)

**Figura 06:** “Trecho de Floresta Contaminado Pelo Acidente ao Lado da ferrovia”



Fonte: O autor (2005)

**Figura 07:** “Área Impactada Alagada Pelas Chuvas no Período da Amostragem”.



Fonte: O autor (2005)

O solo a ser utilizado nos experimentos foi amostrado no local do acidente em Mafra – Santa Catarina, no dia 31 de Janeiro de 2005, portanto quatro meses e meio após o acidente ferroviário ocorrido.

### **4.3 - A Amostragem do Solo**

A amostragem do solo foi realizada com uma pá cortadeira esterilizada com álcool 98% e posteriormente lavadas com água deionizada. Para a amostragem dos solos foi aberto um buraco em uma profundidade de 0 á 40 cm, e largura de 50 por 50 cm, da mesma forma utilizada para a abertura de um perfil, ou seja, formando um buraco na forma de uma caixa. Todo o solo que preenchia este espaço foi coletado e acondicionado em caixas plásticas de 40 L

Parte do solo a ser trabalhado foi amostrada em áreas contaminadas (**Figura 08**) e parte em área adjacente não contaminada, para utilização como solo testemunho (**Figura 09**), totalizando aproximadamente 30 Kg de cada um dos dois tipos de solo.

Os pontos amostrados foram marcados com um GPS Garmin 2 Plus (**Figura 10**).

Após a amostragem as bandejas de 40 L foram embaladas em plásticos e trazidas para Curitiba para serem deixadas para secar ao ar dentro da estufa.

No decorrer deste trabalho, a amostra relativa ao solo contaminado será denominada de (SCF) Solo Contaminado Floresta, enquanto que àquela relativa ao solo testemunho será denominada de (SVF), Solo Virgem Floresta.

**Figura 08:** " Amostragem de Solo Contaminado (SCF)"



Fonte: O autor (2005)

**Figura 09:** " Amostragem de Solo Testemunho (SVF)"



Fonte: O autor (2005)

**Figura 10:** “Marcação das Coordenadas com GPS”



Fonte: O autor (2005)

#### **4.4- O Local do Experimento**

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação da Antroposfera. A casa de vegetação foi construída em anexo ao laboratório onde foram realizadas as incubações para determinação da atividade respiratória potencial, preparo das soluções e do solo. A casa de vegetação é uma sala de alvenaria com teto de vidro *fumée*. Para o monitoramento da temperatura foi instalado na estufa um termômetro analógico INCOTERM para o registro diário das temperaturas máximas e mínimas.

#### 4.5- Preparo das Amostras

Depois de secar, o solo foi peneirado em peneiras peneira Granutest de malha de 2mm, tanto para obter uma homogeneidade no tamanho das partículas, como para a retirada de galhos e raízes. Por tratar-se de um solo extremamente friável havia uma tendência de desagregação dos pequenos grânulos peneirados.

Depois de seco e peneirado foi determinada a capacidade de campo dos solos contaminado e virgem.

As amostras de SVF e SCF foram separadas em duas partes. A primeira, que não recebeu os tratamentos propostos e é relativa ao tempo “0”, e a segunda parte que recebeu os tratamentos propostos e foi monitorada gerando os tempos 1,2,3,4,5 e 6.

As amostras de SVF e SCF relativas ao “T0” foram umedecidas à 75% de sua capacidade de campo. 1 Kg de solo de cada amostra (seca) foi colocado em sacos plásticos para o umedecimento. Foram utilizados:

1 – SVF = 312,75 g de água para umedecer 1 Kg de solo virgem a 75 % da sua capacidade de campo.

2 – SCF = 287,25 g de água para umedecer 1 Kg de solo contaminado a 75 % da sua capacidade de campo.

Depois de umedecidas, as amostras de SVF e SCF foram utilizadas para incubação e determinações analíticas relativas ao tempo “0”

A segunda parte do solo, ainda seca, foi rebatida para 8 sacos plásticos com volume de 20 L, totalizando quatro sacos com 5 kg de “SVF” e quatro sacos com 5 kg de “SCF”. Feito isso três de cada quatro sacos plásticos de “SVF” e “SCF” receberam o inóculo. Estes são referentes às amostras SVF +I, SVF+I+N, SVF+I+P, SCF+I, SCF+I+N e SCF+I+P.

O inóculo utilizado no experimento é o proveniente do *landfarming* da PETROBRÁS situada em Cubatão/SP. O inóculo foi utilizado na proporção de 1,5% de inóculo (**ANEXO 1**) por massa de solo (CARVALHO, 2002), de forma que as quatro embalagens de 5 Kg de SVF e 5 Kg de SCF receberam 75g de inóculo cada uma.

Após a inoculação o solo das embalagens foi homogeneizado e pronto para ser rebatido para as bandejas.

Foram utilizadas no experimento, bandejas plásticas de 17 centímetros de comprimento por 13 centímetros de largura e 5 centímetros de profundidade, com furos para a drenagem. Para contenção da água de drenagem foram utilizados pratos de contenção, de forma que toda a água excedente que passasse pela drenagem, ficava contida nos pratos de contenção para ser absorvida pelo solo posteriormente. Esta providência foi tomada para neutralizar a perda de hidrocarbonetos e dos tratamentos através do sistema de drenagem em conjunto com a água.

Os 5 kg de solo de cada um dos oito sacos plásticos (4 com SVF e 4 com SCF) foram rebatidos para 10 bandejas (repetições 1 a 10) com 500 g de solo cada, feito isso, foram analisadas as diferenças entre as quantidades de água a serem aplicadas por bandeja, de acordo com a capacidade de campo do solo contaminado e virgem (**ANEXO 1**).

Após o levantamento das diferenças entre as quantidades de água necessárias para umedecer as amostras de solo contaminado e virgem, de acordo com as suas capacidades de campo, que foi de 12,75g de água a mais no solo testemunho (SVF), optou-se em utilizar a quantidade de água relativa ao (SVF). Com isso visou-se o estabelecimento de uma única quantidade de água e solução de nitrato e peróxido a serem aplicados no experimento. Tratando-se do mesmo tipo de solo, a pequena diferença entre as quantidades de água que foram absorvidas pelos solos no teste da capacidade de campo é resultado da impermeabilidade do solo contaminado, devido à presença de óleo.

Após a definição da quantidade de água a ser aplicada, que foi de 1563,75g de água para cada 5Kg ou 156,37g de água por repetição (bandeja), foram umedecidas as bandejas relativas aos tratamentos: SVF, SVF+I, SCF e SCF+I. As quantidades de a serem aplicadas por bandeja foram pesadas individualmente em balança de precisão de 0,01g modelo Bel Mark 1300 e posteriormente aplicadas com um pisquete lentamente de forma a umedecer todo o solo da bandeja. Em alguns casos, a diferença de água não absorvida nas amostras de solo contaminado foi para o prato de contenção de drenagem, sendo absorvida posteriormente e lentamente, em função do contato com o solo do fundo da bandeja.

As amostras: SVF+I+N, SVF+I+P, SCF+I+N e SCF+I+P foram umedecidas com as próprias soluções respectivas, soluções estas de 100 ppm's para o nitrato de potássio e 200 ppm's para o peróxido de hidrogênio de acordo com o cálculo para a montagem das soluções( **ANEXO 1**). Neste caso foram diluídos 0,89 mL de peróxido em 1563,75 mL de água e 0,074 mL de nitrato em 1563,75 mL de água, feito isso, as soluções foram pesadas e divididas em 10 partes para a aplicação nas repetições (bandejas). Os diferentes tratamentos com as respectivas doses de água e peróxido, nitrato e inóculo são mostradas na **tabela 01**:

**Tabela 01:** "Tratamentos com as Respectivas Doses de Água, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub> e Inóculo no Preparo Inicial para 5 Kg de solo (T1)"

TRATAMENTOS	INÓCULO (g)	ÁGUA (L)	NITRATO (mL)	PERÓXIDO (mL)
SVF	-	1,563	-	-
SVF+I	75	1,563	-	-
SVF+I+N	75	1,563	0,074	-
SVF+I+P	75	1,563	-	0,939
SCF	-	1,563	-	-
SCF+I	75	1,563	-	-
SCF+I+N	75	1,563	0,074	-
SCF+I+P	75	1,563	-	0,939

Ao final deste processo, temos quatro diferentes tratamentos para "SVF" E quatro para "SCF", totalizando oito novas diferentes amostras. Para manter constante a umidade, as bandejas foram irrigadas diariamente com água de torneira, de acordo com o ressecamento apresentado por cada uma. A aplicação de nitrato e peróxido nas bandejas relativas foi realizada semanalmente (toda a quinta feira), onde as amostras relativas aos tratamentos de peróxido e nitrato foram irrigadas com as próprias soluções, neste caso as mesmas doses predefinidas de nitrato e peróxido foram diluídas em 500 mL de água, para serem aplicados 50 mL por repetição (bandejas). Para a irrigação foram utilizados pissetes com o bico queimado e esmagado (para que a água saísse em gotas e não em jatos pressurizados), aplicando a água ou a solução lentamente, evitando assim a compactação do solo nas bandejas. A irrigação foi realizada sempre após

as 17 horas. Em média, as bandejas receberam aproximadamente 50 mL de água de torneira por dia. Nos dias mais quentes com sol descoberto, foram necessárias duas aplicações de água diárias, devido ao calor gerado na estufa.

Todo mês uma repetição foi desmanchada visando o levantamento de parâmetros laboratoriais. As repetições 09 e 10 de cada uma das oito amostras foram desmontadas antes do plantio de *Trifolium repens*, visando às determinações analíticas do tempo 01 e 02 respectivamente.

## **4.6 Sementes**

As sementes de *Trifolium repens* foram adquiridas no Comércio Paranaense de Sementes Ltda – COMPASEM, com potencial de germinação superior a 90%.

### **4.6.1 Preparo das Sementes**

Para promover a quebra de dormência das sementes, estas passaram por um tratamento onde foram embebidas em uma solução de 40% (400mL/L) de água sanitária por 30 minutos, depois as sementes com a solução foram coadas em uma peneira de 0,5 mm e lavadas por diversas vezes para então serem colocadas em um recipiente de 1 L de água deionizada com aerador (compressor a ar com pedra porosa na extremidade) para movimentar e aerar a água com as sementes. Depois de três horas dentro deste recipiente, as sementes foram coadas novamente para então serem utilizadas no teste de germinação e plantadas nas bandejas.

A taxa de germinação foi aferida de acordo com VIEIRA e CARVALHO (1994), no “Teste de Vigor em Sementes” onde 300 sementes foram utilizadas em três testes de germinação em paralelo, onde cada 100 sementes foram embaladas em papel toalha e umedecidas, a contagem da germinação foi realizada após 14 dias, A média de germinação para os três teste foi de 97% de sementes germinadas.

#### 4.6.2 A Semeadura

A semeadura foi realizada com o auxílio de uma pinça, com a utilização de uma lupa. Foram semeadas 12 sementes por bandeja em 12 pontos pré-estabelecidos, formando três linhas de quatro pontos ou quatro pontos de três linhas por bandeja, conforme ilustração abaixo. Temos então 96 sementes para cada uma das oito diferentes amostras (12 por repetição), totalizando 768 sementes em todo experimento.

Os dias relativos ao desmanche das repetições são os mesmos referentes a cada tempo, nestes mesmos dias foram realizadas as incubações e preparo do solo para as determinações analíticas.

No caso das repetições desmanchadas para os tempos 03 e 04, o critério para o desmanche das bandejas foi o número de plantas sobreviventes. Para tal, foi realizado o sorteio entre as repetições que apresentavam o menor número de plantas sobreviventes, visando assim minimizar as chances de não haver plantas sobreviventes nas amostras de solo contaminado quando nos tempos finais (T 5 e T 6). Garantido isto, quando no tempo cinco, as bandejas puderam ser desmanchadas por sorteio geral.

No tempo seis todas as bandejas restantes foram desmanchadas, e o solo de cada repetição relativa a um determinado tratamento foi homogeneizado visando às determinações analíticas. A seqüência de desmanche das repetições de todos os tempos pode ser observada no **ANEXO 02**.

Quando no desmanche das repetições relativas ao T6 (repetições restantes ou finais) foi necessário uma nova denominação para as mesmas (**Tabela 02**). Isso para viabilizar o enquadramento dos resultados em planilha para a posterior montagem dos gráficos.

**Tabela 02:** “Nova Denominação Para as Repetições Desmanchadas no T6”

TRATAMENTOS	REPETIÇÕES FINAIS				
	1	2	3	4	5
SCF+I+N	Rep 3	Rep 5	Rep 6	Rep 7	-
SCF+I+P	Rep 2	Rep 3	Rep 5	Rep 7	-
SVF+I+N	Rep 2	Rep 5	Rep 6	Rep 7	-
SVF+I+P	Rep 2	Rep 3	Rep 5	Rep 6	-
SCF	Rep 4	Rep 5	Rep 6	Rep 7	Rep 8
SCF+I	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 6	Rep 7
SCF+I+N	Rep 1	Rep 3	Rep 4	Rep 6	-
SCF+I+P	Rep 2	Rep 3	Rep 6	Rep 7	Rep 8

#### 4.6.3 Desmonte das Bandejas para Retirada das Plantas

Sempre que uma repetição era desmanchada, as plantas eram retiradas para registro fotográfico e posterior análise do peso seco.

A retirada das plantas do solo das bandejas foi realizada com todo cuidado para que não houvesse perda de material vegetal neste processo. Particularmente não houve dificuldade para a retirada das plantas nas repetições relativas às amostras de solo contaminado, devido à atrofia geral apresentada pelo sistema radicular. Porém nas repetições relativas às amostras de solo virgem, o desmanche foi realizado de outra forma, para tal as bandejas plantadas foram viradas de ponta cabeça em cima de um saco plástico, depositando neste o solo com as plantas. Então com todo cuidado o solo do fundo das bandejas foi sendo desprendido e separado para homogeneização. Depois de um certo ponto era impossível a retirada de mais solo sem afetar (arrebentar) as raízes, então o restante da massa de solo mais as plantas foi mergulhada em um recipiente com água para a retirada do solo das raízes, para então ser realizado o desembaraço das mesmas.

#### **4.6.4 O Preparo da Plantas Para o Registro Fotográfico**

Após lavar e separar individualmente cada planta, estas foram colocadas individualmente em um vasilha de vidro baixa com um pouco de água para conclusão do desembaraço e separação das raízes. O processo de retirada das plantas da vasilha se deu da mesma forma como se retira decalques para aeromodelismo. A vasilha era inclinada e as plantas eram retiradas e puxadas para a parte seca (mais alta) da vasilha com o auxílio de papel toalha evitando assim o colabamento e embaraçamento das raízes. Desta forma as plantas de cada repetição, grudadas no papel toalha, foram depositadas em uma cartolina de feltro. Finalmente as plantas foram fotografadas com uma régua como escala lateral e identificação relativa.

#### **4.6.5 O Preparo da Plantas Para o Peso Seco**

Depois de fotografadas, as plantas de cada repetição tiveram sua parte aérea e radicular separadas e acondicionadas em embalagens de 10 cm por 20 cm, para então serem levadas à estufa, na qual permaneceram por duas semanas à temperatura de 80 Graus °C. Após este período as partes aéreas e radicular das plantas foram pesadas em uma balança digital de precisão de 0,0001g modelo "Mettler at 201 Fact"

#### **4.6.6 Parâmetros Avaliados**

##### **4.6.6.1 - Fitoxidade do solo**

A Fitoxidade foi avaliada de acordo com a germinação, sobrevivência e diferenças no peso seco das partes aéreas e sistema radicular das plantas de acordo com a metodologia utilizada por NASCIMENTO (2000).

##### **4.6.6.2 - Fertilidade do solo**

De acordo co PAVAN *et al* (1992) a fertilidade é determinada em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol/dm<sup>3</sup>, a solução extratora para o  $\text{Al}^{+3}$  é KCl a 1 N para  $\text{H}+\text{Al}^{+3}$

utiliza-se como tampão acetato de cálcio a 1 N à pH 7, para  $\text{Ca}^{+2} + \text{Mg}^{+2}$  usa-se KCl a 1 N e determinação por titulação inversa. Para Fósforo e o potássio utiliza-se extrator Mehlich I (descrito em trabalho mimeografado segundo THOMAS e PEASLEE, (1973). Para a determinação do teor de carbono foi utilizado o método de WALKLEY e BLACK (1934)).

#### **4.6.6.3– Granulometria**

A granulometria do solo foi determinada de acordo com EMBRAPA, (1997). O método está descrito no Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos-EMBRAPA. Rio de Janeiro, 2ª. ed.

#### **4.6.6.4 – Respirimetria**

O método utilizado para determinação da respirometria (respiração do solo) consiste da microdestilação do  $\text{CO}_2$  com NaOH 0,5 N.

O  $\text{CO}_2$  atmosférico (branco) é capturado em frascos utilizados na incubação, inserindo-se dentro dos mesmos, tubos com hidróxido de sódio 0,5 N ausente de solo nos frascos.

Pesou-se uma massa conhecida da mistura (solo + tratamento) em vidro âmbar *Merck* de 1L. Foi introduzido no interior de vidro um tubo de ensaio com 5mL de solução de NaOH 0,5 N. Após 7 dias foi feita a titulação do NaOH residual com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,025 N, conforme Metodologia de Respiração do Solo - JENKINSON e POWLSON (1974) adaptado por CARVALHO (1983); CARVALHO *et al.* (1994 a e b), ALMEIDA e CARVALHO (1994 a e b) e PETROBRAS (1997 b). Este solo foi reincubado, ou seja, reintroduziu-se o tubo de ensaio com a solução por mais três vezes a cada 7 dias, totalizando 28 dias de respiração desta mistura. Os resultados são apresentados em mg de  $\text{CO}_2/100$  g de solo x 7 dias.

#### **4.6.6.5 - pH.**

O pH, ou, a determinação do potencial de hidrogênio através da dissociação dos íons em solução de acordo com o método de ensaio ME-6360-024 (1996) PETROBRAS / REPAR.

O solo após estar seco ao ar é triturado e peneirado entre as peneiras de 2mm (9 mesh) e 1mm (16 mesh). Pesa-se 20g deste solo em balança de precisão em copos plásticos, em duplicata. É adicionado 50mL de água deionizada em um dos copos e 50mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01Mol/L no outro. Agita-se a mistura e deixa-se em repouso por 1 hora. Enquanto isso o Ph-metro deve ser ligado em ficar em repouso por no mínimo 30min para atingir equilíbrio.

O equipamento de leitura de pH, o pH-metro, é tarado com as soluções de pH 4.0 e pH 7.0. Começa-se a leitura, que demora cerca de 5min para cada amostra. A leitura do resultado é direta.

#### **4.6.6.6 TPH (Total de hidrocarbonetos de petróleo).**

A determinação do TPH foi realizada de acordo com a metodologia – TPH Method 3550B- Ultrasonic Extration. Feita a extração deste com diclorometano, através do ultra-som. Pesa-se 1g do solo úmido e com sulfato de sódio anidro, onde a amostra é desidratada. A extração é feita então com 50mL de diclorometano em aparelho de ultra-som por cinco minutos em temperatura ambiente. O extrato é reduzido a 1mL e a leitura é feita em cromatógrafo gasoso. O resultado é apresentado em  $\mu\text{g}$  de TPH/g de solo seco.

#### **4.6.6.7- Metais Pesados no solo**

A determinação dos metais pesados no solo foi realizada no SENAI – Centro Integrado de Tecnologia e Educação Profissional da Cidade Industrial de Curitiba. O preparo da amostra para a análise foi realizado através das normas DIN 38414 – S7 e DIN EM 13346. As metodologias utilizadas encontram-se na **Tabela 03.**

**Tabela 03:** “ Metodologias Utilizadas Para a Análise de Metais Pesados no Solo”

Cd	As	Pb	Cu	Cr	Hg	Mo	Ni	Se	Zn
EAA/CH	EAA/CH	EAA/CH	EAA/CH	EAA/CH	EAA / GVF	EAA/CH	EAA/CH	EAA/CH	EAA/CH

EAA = Espectrofotometria de Absorção Atômica; CH = Chama; GVF = Gerador de Vapor Frio

#### 4.7. Análises Estatísticas Dos Resultados

A análise estatística dos resultados (**ANEXO 3**) foi avaliada de acordo com GOMES (1987), em seu livro Estatística Moderna na Pesquisa Agropecuária, através de comparações entre o cociente da divisão do quadrado médio de tratamentos pelo quadrado médio do resíduo e o fator crítico com o *alfa* de 0,05. Se o número deste quociente for maior que aquele encontrado no fator crítico, as diferenças entre os resultados podem ser consideradas estatisticamente representativas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Coordenadas dos Pontos Amostrados

As coordenadas dos pontos amostrados relativas ao solo testemunho (SVF) e ao solo contaminado (SCF) são respectivamente, S 26°10'32.3" / W 049°43'35.4" (SVF) e S 26°10'31.8" / W 049°43'36.2" (SCF).

### 5.2 Análise Química e Física do Solo

#### 5.2.1 Fertilidade

Os resultados de fertilidade (**Tabela 04**) do solo contaminado e do solo controle (virgem) relativos ao experimento foram interpretados de acordo com OLEYNIK (1989) no Manual de Análises de Solo.

Os resultados de pH dos tempos 1,2,3,4,5 e 6 são mostrados na **Tabela 05**:

**Tabela 04:** “Resultados de fertilidade das Amostras Iniciais”

AMOSTRAS	pH	pH	Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	H+Al	K <sup>+</sup>	T	p	C	m	V
	(CaCl <sub>2</sub> )	SMP							(mg/dm <sup>3</sup> )	(g/dm <sup>3</sup> )	%	%
SVF	3,90	4,70	2,30	1,30	1,10	13,10	0,15	15,65	6,00	29,9	47	16
SCF	3,80	4,70	3,50	1,00	0,80	13,10	0,22	15,12	6,50	35,3	63	13

**Tabela 05:** “Resultados de pH nas Amostras Relativas aos Tempos 1,2,3,4,5 e 6

AMOSTRAS	T 1		T 1		T 3		T 4		T 5		T6	
	pH	pH										
	H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub>										
SVF	5,22	5,20	5,21	4,43	5,21	5,07	5,21	5,18	4,20	4,17	5,90	5,67
SVF+I	5,08	4,99	5,07	4,89	5,21	5,07	4,15	4,05	4,13	4,01	5,88	5,70
SVF+I+N	4,96	4,89	4,87	4,26	4,88	4,53	4,13	4,10	3,97	4,09	5,88	5,72
SVF+I+P	5,16	4,67	5,06	4,59	4,95	4,52	4,09	4,02	3,99	3,99	5,84	5,69
SCF	5,07	5,02	4,62	3,82	5,06	4,33	4,12	4,02	4,08	4,00	5,80	5,63
SCF+I	4,86	4,80	4,61	3,89	4,98	4,58	4,06	4,01	3,97	3,92	5,84	5,68
SCF+I+N	5,00	4,97	4,70	4,17	5,23	5,03	4,11	3,83	3,86	3,99	5,81	5,66
SCF+I+P	4,99	4,83	4,59	3,85	5,06	4,57	4,00	3,82	3,89	4,05	5,86	5,68

Através dos resultados obtidos na análise de fertilidade, relativa às amostras SVF e SCF, observa-se que:

O pH das amostras iniciais se apresentou ácido, assim como em todos os tratamentos propostos ao SVF e SCF, nos tempos T1, T2, T3, T4, T5 e T6. O pH permaneceu ácido. Não houve diferença significativa entre os valores de pH encontrados nas diferentes amostras e tratamentos.

O teor de alumínio encontrado nas amostras foi alto, conferindo um alto índice álico. A saturação de bases (V%) foi baixíssima, o teor de carbono muito alto, característico de um solo florestal, porém o acréscimo de carbono encontrado no SCF em relação ao SVF pode estar relacionado com a contaminação por óleo diesel.

A soma de bases encontrada nas amostras foi baixa, reflexo do baixo teor de Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup> encontrado nas mesmas.

De acordo com OLEYNIK (1989), o solo relativo ao experimento não possui as propriedades adequadas à agricultura, sendo que, sua característica álica, que reflete em um pH ácido, representa sua maior limitação quanto à sua utilização para agricultura.

Os resultados de pH relativos aos tempos 1,2,3,4,5 e 6 mantiveram-se baixos,

A análise granulométrica é mostrada na **Tabela 06**:

**TABELA 06:** “Laudo de Análise Granulométrica das Amostras Iniciais”

AMOSTRAS	AREIA FINA	AREIA GROSSA	SILTE	ARGILA
g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg
SVF	51,6	378,9	214,6	350,0
SCF	51,8	358,1	315,2	275,0

De acordo com os resultados granulométricos encontrados nas amostras iniciais, é possível afirmar que o solo utilizado no experimento em questão possui textura franco-argilosa (OLEYNIK, 1989).

Os resultados de metais quantificados e relativos ao T1 (quatro tratamentos para cada amostra inicial) estão na **Tabela 07**. Na **Tabela 08** encontram-se os limites estabelecidos pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, São Paulo, com relação à concentração de metais em solos agrícolas, isso porque a Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina – FATMA utiliza os parâmetros da CETESB.

**Tabela 07:** “Composição e Concentração de Metais nas Amostras Relativas ao T1”

AMOSTRAS	Cd	As	Pb	Cu	Cr	Hg	Mo	Ni	Se	Zn
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
SVF	<49,49	<9,90	8,91	21,78	<4,95	<0,10	<9,90	<9,90	<49,49	21,80
SVF+I	<49,90	<9,98	11,97	23,85	<4,99	<0,10	<9,98	<9,98	<49,90	27,45
SVF+I+N	<49,95	<9,99	18,98	28,27	4,99	0,16	<9,99	<9,99	<49,95	44,51
SVF+I+P	<49,98	<10,00	18,99	23,79	<5,00	0,11	<10,00	<10,00	<49,98	<32,20
SCF	<49,86	<9,97	15,96	13,76	7,38	<0,10	<9,97	<9,97	<49,86	20,70
SCF+I	<49,95	<9,99	19,98	14,98	8,09	<0,10	<9,99	<9,99	<49,95	<25,17
SCF+I+N	<49,77	<9,95	21,90	16,22	9,75	0,11	<9,95	<9,95	<49,77	30,99
SCF+I+P	<49,96	<9,99	19,98	14,79	8,79	<0,10	<9,99	<9,99	<49,96	26,71

**Tabela 08:** “Valores Orientadores para Teor de Metais em Solos Agrícolas, Conforme o Relatório de Estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – CETESB/2001,”

VALORES ORIENTADORES CETESB	Cd mg/kg	As mg/kg	Pb mg/kg	Cu mg/kg	Cr mg/kg	Hg mg/kg	Mo mg/kg	Ni Mg/kg	Se mg/kg	Zn Mg/kg
VALOR DE REFERÊNCIA (S)	<0,5	3,50	17	35	40	0,05	<25	13	0,25	60
VALOR DE ALERTA (T)	3	15	100	60	75	0,5	30	30	5	300
VALOR DE INTERVENÇÃO (I)	10	25	200	100	300	2,5	50	50	-	500

De acordo com os resultados encontrados na tabela, pode-se observar que nenhum dos 10 metais, (exceto o cádmio e o selênio), apresentou resultados superiores ao limite de intervenção (I). De forma geral, os resultados encontrados nos quatro diferentes tratamentos de SVF foram muito parecidos com àqueles encontrados nos tratamentos propostos ao solo controle.

Não foi possível a quantificação do cádmio e do selênio porque o limite de detecção no método analítico foi superior ao limite de intervenção (I).

As concentrações de arsênio tiveram seu limite de detecção abaixo do valor de alerta(T) em todas as amostras e tratamentos.

As concentrações de cobre encontradas em todas as amostras ficaram um pouco abaixo dos valores de referencia(S), sendo que o cobre apresentou valores superiores nos quatro tratamentos do SVF.

As concentrações de cromo encontradas nos quatro tratamentos de SCF representaram em media 1/4 do valor de referência (S), embora este valor tenha sido o dobro do encontrado nos quatro tratamentos do SVF.

As concentrações de mercúrio encontradas em todos os oito tratamentos se encontraram entre o valor de referência(S) e o valor de alerta(T).

As concentrações de molibdênio encontradas em todos os oito tratamentos ficaram entre o valor de referência(S) e alerta(T), representando em media 1/3 do valor de alerta(T).

As concentrações de níquel encontradas em todos os oito tratamentos ficaram um pouco abaixo do valor de referência (S).

As concentrações do zinco também ficaram abaixo do limite de referência(s) em todos os oito tratamentos.

Os valores de metais pesados encontrados no SCF referente ao T1 não foram diferentes daqueles encontrados no SVF, sendo que este solo testemunho (SVF) apresentou valores de cobre um pouco superiores àqueles encontrados no SCF.

### 5.3 Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH)

Os resultados de TPH, monitorados bimestralmente são mostrados na tabela abaixo.

**Tabela 09:** “Resultados de TPH nos Tempos T0 ao T6”

	T0	T1	T3	T6
AMOSTRAS	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
SVF	169	411	57	520
SVF+I	-	256	1368	7238
SVF+I+N	-	508	933	1345
SVF+I+P	-	322	1059	524
SCF	18465	1987	9743	6955
SCF+I	-	14697	11134	9397
SCF+I+N	-	13980	12829	9104
SCF+I+P	-	10671	11476	10219

Nota: Valor incoerente em vermelho.

Os valores de TPH encontrados mostraram uma queda representativa entre o T0 e o T1 nas amostras de SCF. De forma geral, os valores caíram pela metade entre o T0 e o T6. A maior queda nos valores entre os quatro diferentes tratamentos

relativos ao SCF foi aquela encontrada no solo sem tratamentos, ou seja, na amostra SCF. Ocorreu erro de leitura na amostra de solo padrão (SVF+I), que apresentou o valor incoerente de 7238 ppm`s. Provavelmente houve erro no calculo da diluição. Os cromatogramas referentes à análise de TPH estão no **(ANEXO 4)**.

Os quase seis meses de intervalo entre o acidente (derrame de óleo) e a amostragem de solo, resultam em tempo suficiente para a aclimação dos microrganismos nativos (METTING, 1993; HERBES e SCHWALL, 1978) que também é conhecida como de fase *lag* . Este processo de aclimação é conseqüente da adaptação resultante de consecutivas mutações, onde os microrganismos adquirem a capacidade de degradar os hidrocarbonetos (HERBES e SCHWALL, 1978).

A baixa efetividade dos microrganismos inoculados, em comparação com os indígenas no experimento, está relacionada com as diferenças ambientais entre Cubatão SP e Mafra SC, e mais especificamente, entre as condições químicas e físicas do solo onde o inóculo é produzido e aquelas onde o mesmo foi inoculado, conforme já observado por (GOLDSTEIN *et al.* 1985; AL - HADHRAMI *et al.* 1995).

É provável que os microrganismos inoculados (de Cubatão) não tenham sobrevivido às baixas temperaturas características do inverno de Curitiba (DIBBLE e BARTHA, 1979; SKLADANY e METTING, 1993). Isto porque, estes são produzidos em uma região tropical. Cubatão encontra-se ao nível do mar e possui um regime de temperaturas altas se comparadas às de Curitiba PR ou de Mafra SC. Porém, as diferenças entre os ciclos anuais de temperatura entre Curitiba e Mafra são bastante parecidas (INFOCLIMA, 2006).

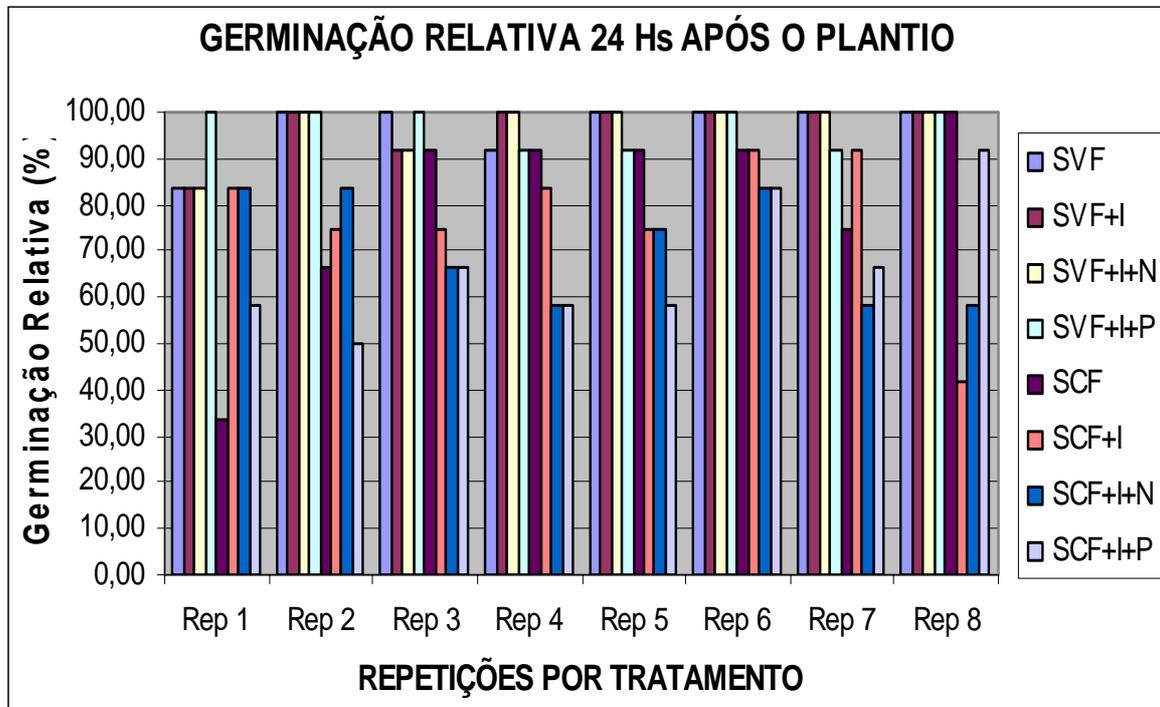
Parte da queda nos valores de TPH nas amostras pode ainda estar relacionada com a influência da evaporação e fotodecomposição (CASARINI *et al.*, 1988).

## **5.4 Fitoxidade**

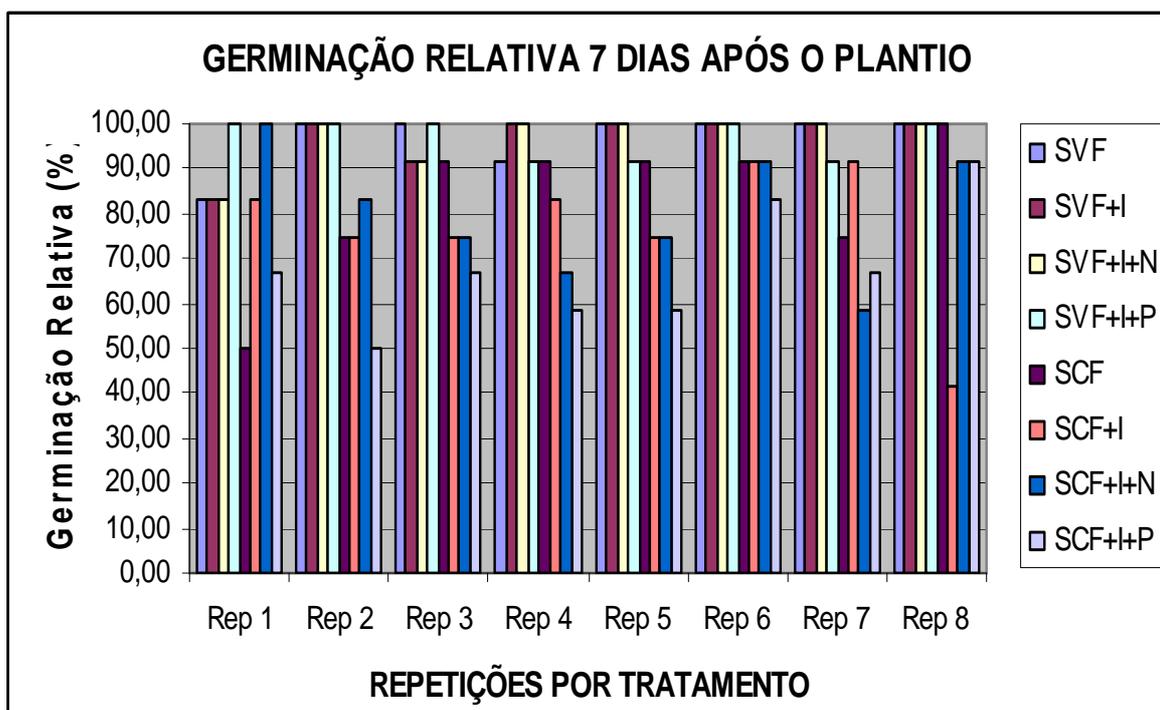
### **5.4.1 Germinação**

Os resultados referentes à germinação relativa 24 Hs, 7 dias e 16 dias após o plantio são mostrados nas **Figura 11, 12 e 13**

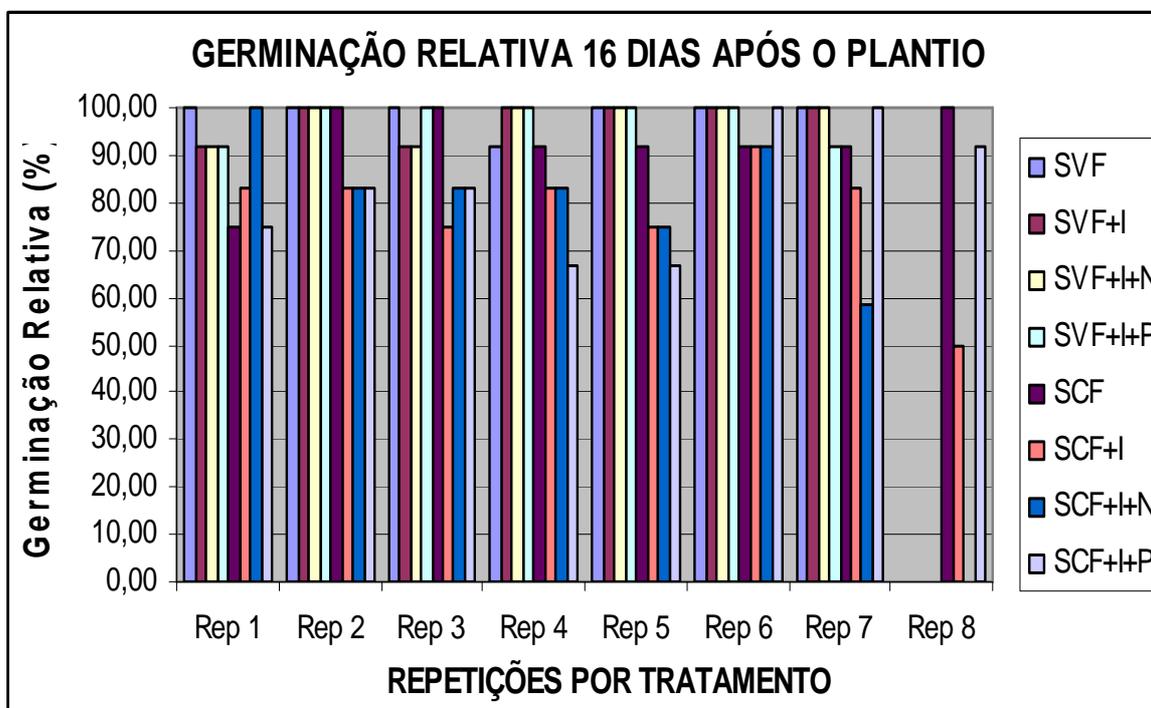
**Figura 11:** “Germinação Relativa em Todas as Repetições e Tratamentos 24 Hs Após o Plantio”



**Figura 12:** “Germinação Relativa em Todas as Repetições e Tratamentos 7 Dias Após o Plantio”



**Figura 13:** “Germinação Relativa em Todas as Repetições e Tratamentos 16 Dias Após o Plantio”



A germinação das sementes semeadas nas repetições (bandejas) relativas aos tratamentos do SCF foi lenta e gradativa, sendo que foram observadas germinações em até 16 dias após a semeadura. Após este período, as plântulas começaram a apresentar mortalidade.

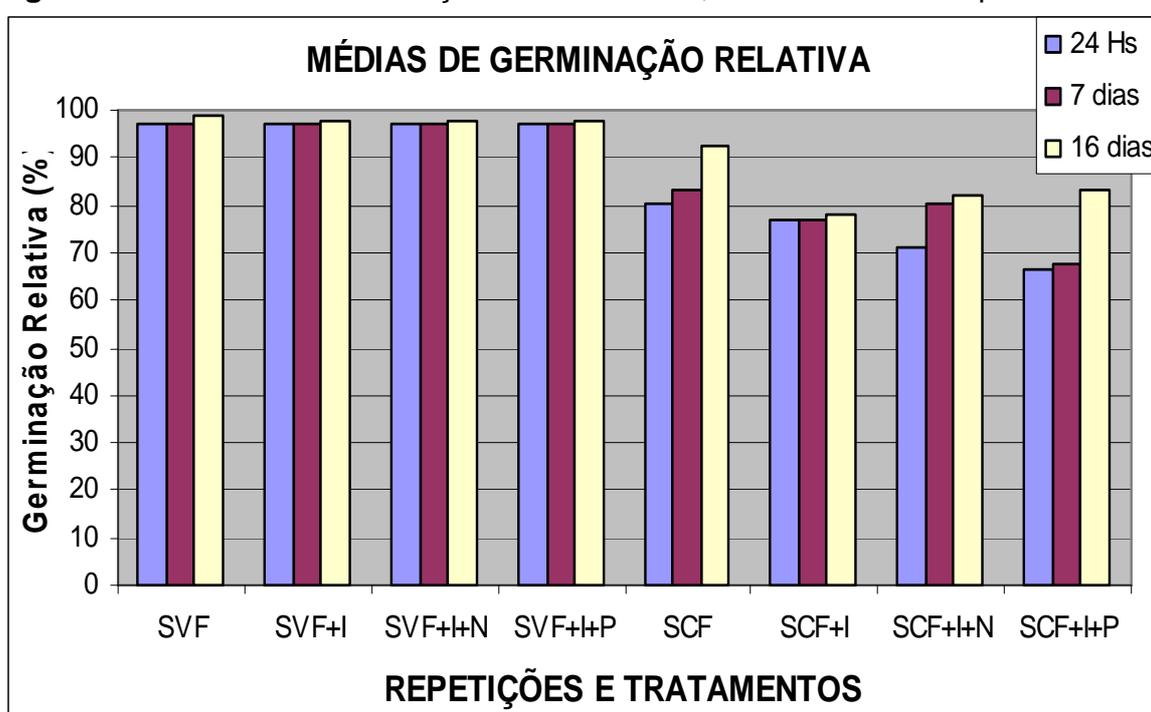
Os resultados de Germinação Relativa mostram que a maioria das repetições referentes aos tratamentos do solo controle (SVF), obteve alto índice de germinação 24 Hs após o plantio, sendo que as repetições 2,6 e 8 apresentaram 100% de germinação. O mesmo não ocorreu nos quatro tratamentos relativos ao SCF que apresentaram baixa germinação se comparados àqueles encontrados no SVF.

Os resultados referentes à Germinação Relativa 7 e 16 dias após o plantio, mostram a evolução de plantas germinadas nas diferentes repetições e tratamentos. Ocorreu no período entre 7 e 16 dias após o plantio, o alagamento das repetições 08 dos quatro tratamentos de SVF e SCF+I+N. Isso devido a uma forte chuva que gerou goteiras sob a calha que estava posicionada logo acima destas repetições. Como consequência houve mortalidade completa das plantas que se encontravam nos tratamentos desta repetição. (estas repetições não mais serão consideradas).

As germinações relativas aos diferentes tratamentos propostos ao solo controle (SVF) 16 dias após o plantio ficaram acima de 90%. Já as germinações relativas referentes aos diferentes tratamentos propostos ao SCF, em sua grande maioria, ficaram acima de 60% , com exceção da repetição 08 de SCF+I.

As médias das germinações relativas 24 Hs, 7 dias e 16 dias após o plantio são mostrados nas **Figura 14**:

**Figura 14:** “Médias de Germinação Relativa 24 Hs, 7 Dias e 16 Dias Após o Plantio”

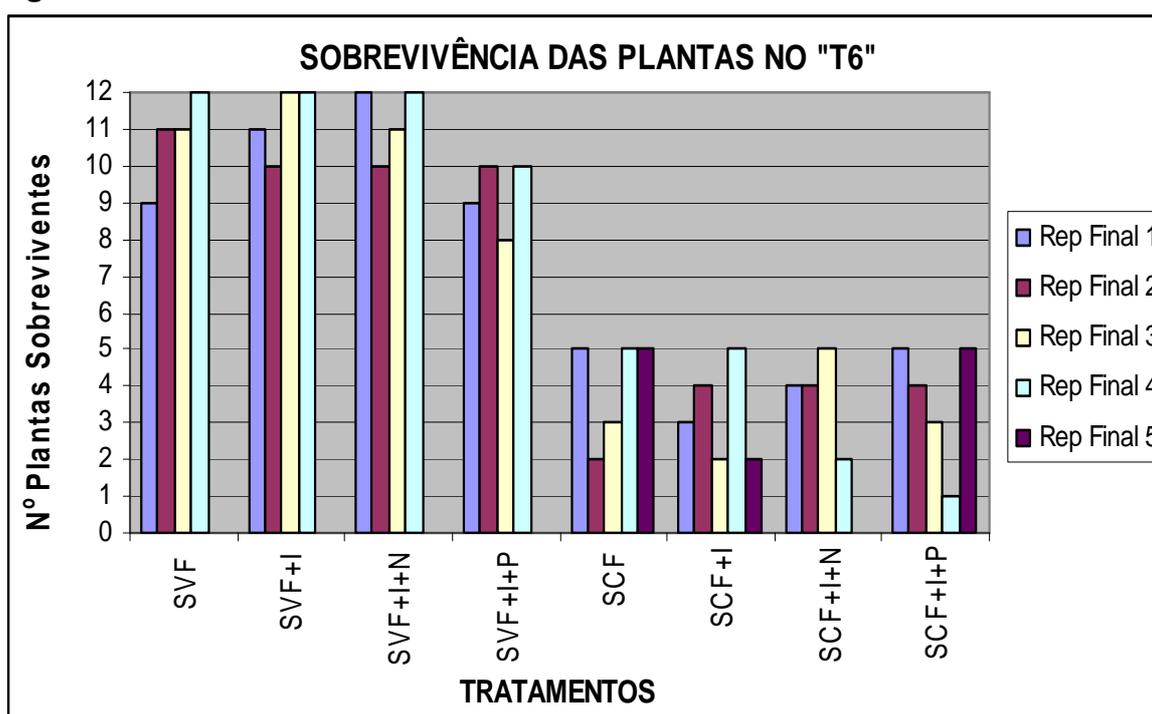


As medias de germinação relativa das repetições dos tratamentos propostos ao solo controle ficaram próximas de 100%. As médias das repetições referentes ao SCF+I, SCF+I+N e SCF+I+P ficaram próximas a 80% , sendo que aos 16 dias após o plantio, o tratamento que apresentou a maior germinação relativa foi o SCF apresentando mais de 90% de germinação.

### 5.4.2 Sobrevivência

A sobrevivência das plantas no tempo final (T6) para as diferentes repetições dos diferentes tratamentos referentes ao SVF e SCF é mostrada na **Figura 15**:

**Figura 15:** “Sobrevivência das Plantas no T6”

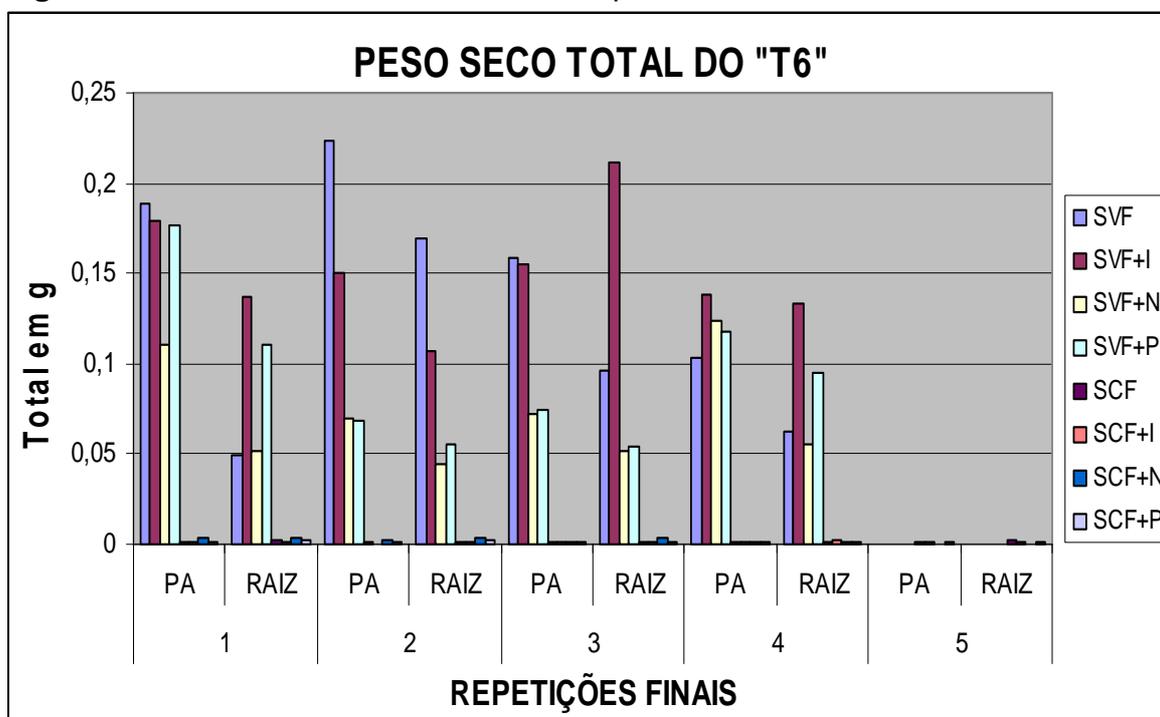


Nas repetições finais o solo controle nos seus diferentes tratamentos apresentou o mínimo de 8 plantas sobreviventes, neste caso no tratamento SVF+I+P. As repetições finais referentes aos diferentes tratamentos do SCF, apresentaram o número máximo de 5 plantas sobreviventes.

### 5.4.3 Peso Seco

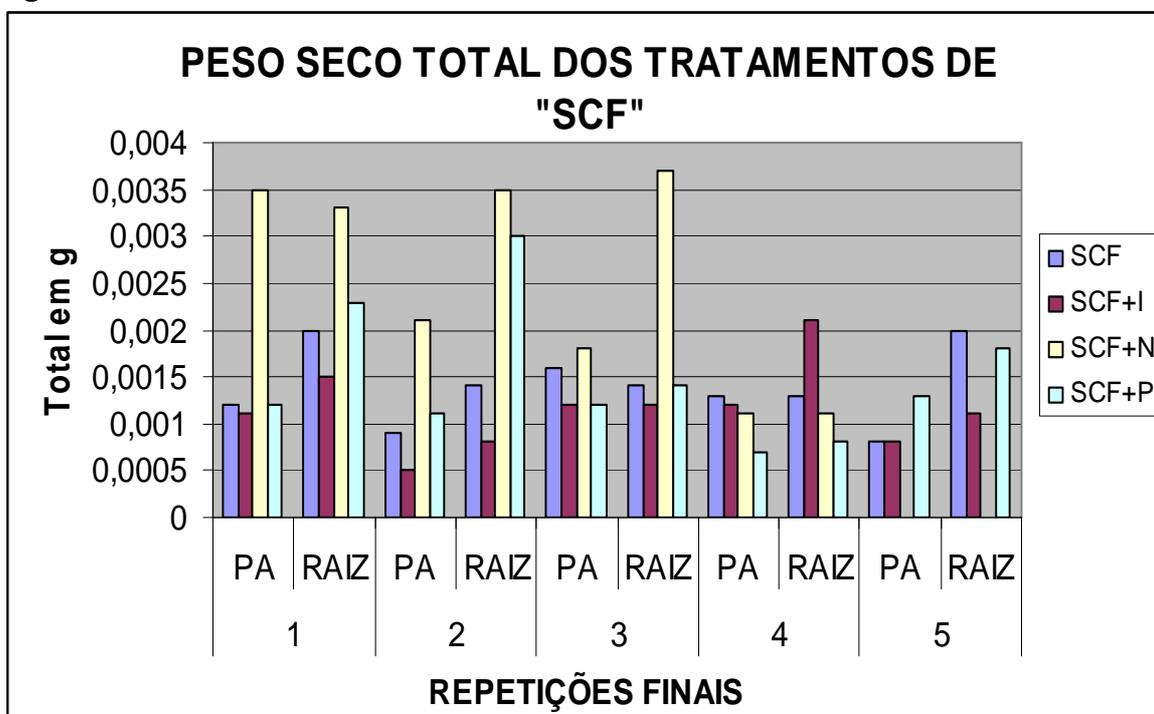
O peso seco total ao final do experimento “T6” é referente à massa seca total (todas as plantas juntas) encontrada em cada uma das repetições finais (bandejas restantes). Os resultados são apresentados na **Figura 16**:

**Figura 16:** “Peso Seco Total ao Final do Experimento “T6”



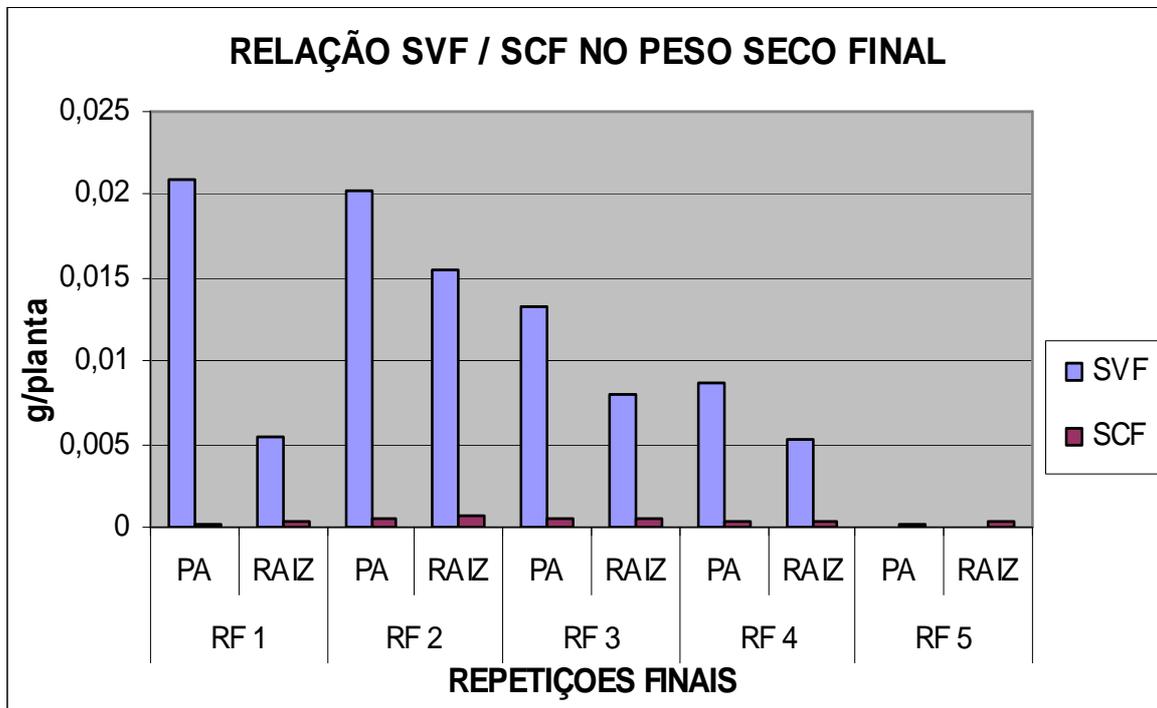
O peso seco total encontrado nas repetições finais dos diferentes tratamentos do SCF apresentou valores baixíssimos se comparados com aqueles encontrados nos tratamentos do solo controle (SVF). Para melhor visualização das diferenças entre o peso seco total nas repetições finais dos diferentes tratamentos do SCF, os resultados estão apresentados na **Figura 17**:

**Figura 17:** “Peso Seco Total dos Tratamentos Relativos ao SCF”

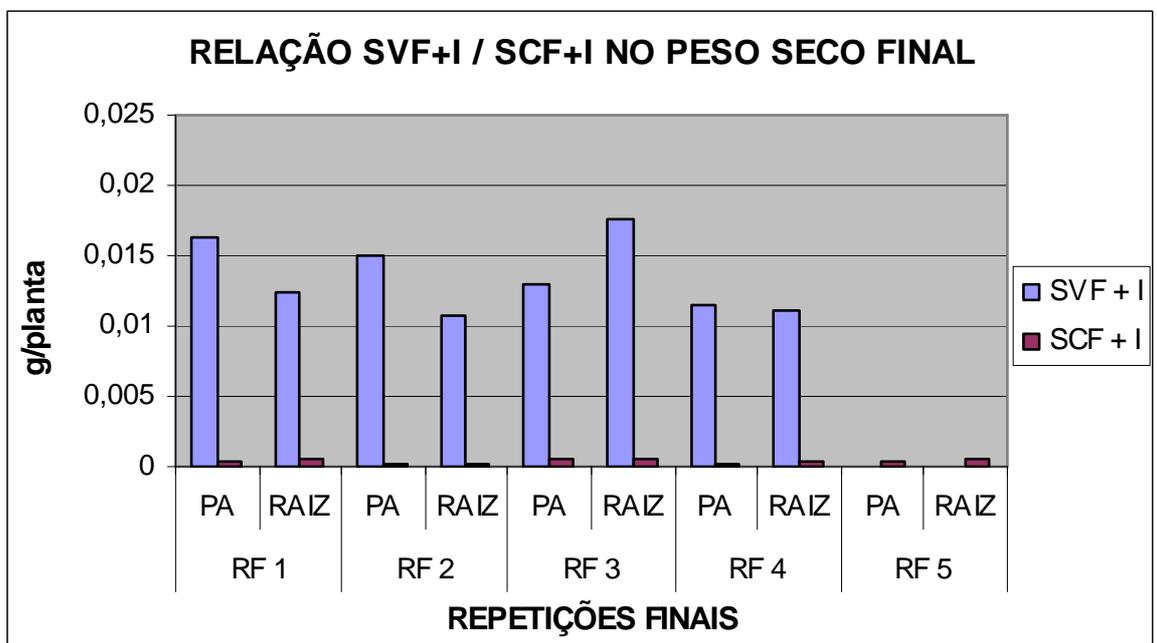


O peso seco por planta sobrevivente, ou simplesmente “peso seco”, é o resultado da divisão entre o peso seco total de uma repetição pelo número de plantas sobreviventes nesta mesma repetição. Os resultados referentes a este parâmetro estão representados de forma comparativa, onde os mesmos tratamentos relativos às amostras de SVF e SCF estão apresentados em um mesmo gráfico. A relação entre o peso seco do SVF e SCF, SVF+I e SCF+I, SVF+I+N e SCF+I+N, e SVF+I+P e SCF+I+P estão consecutivamente representados nas **Figuras 18, 19, 20 e 21**.

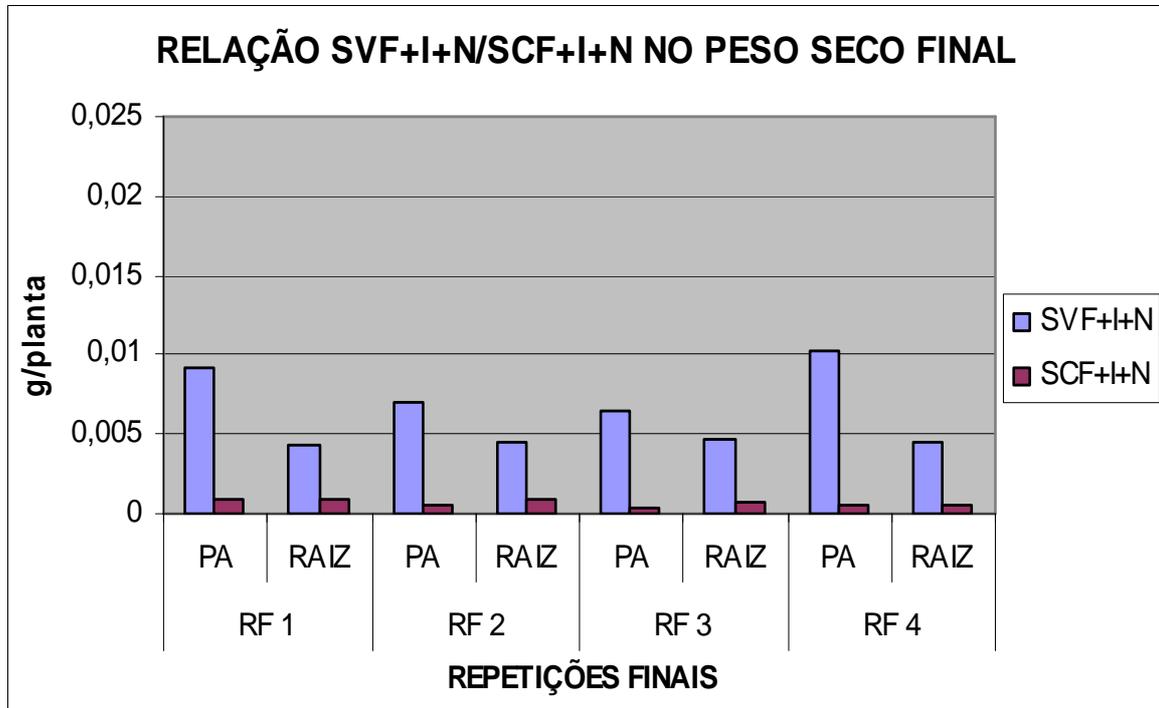
**Figura 18:** “Peso Seco Final dos Tratamentos SVF e SCF”



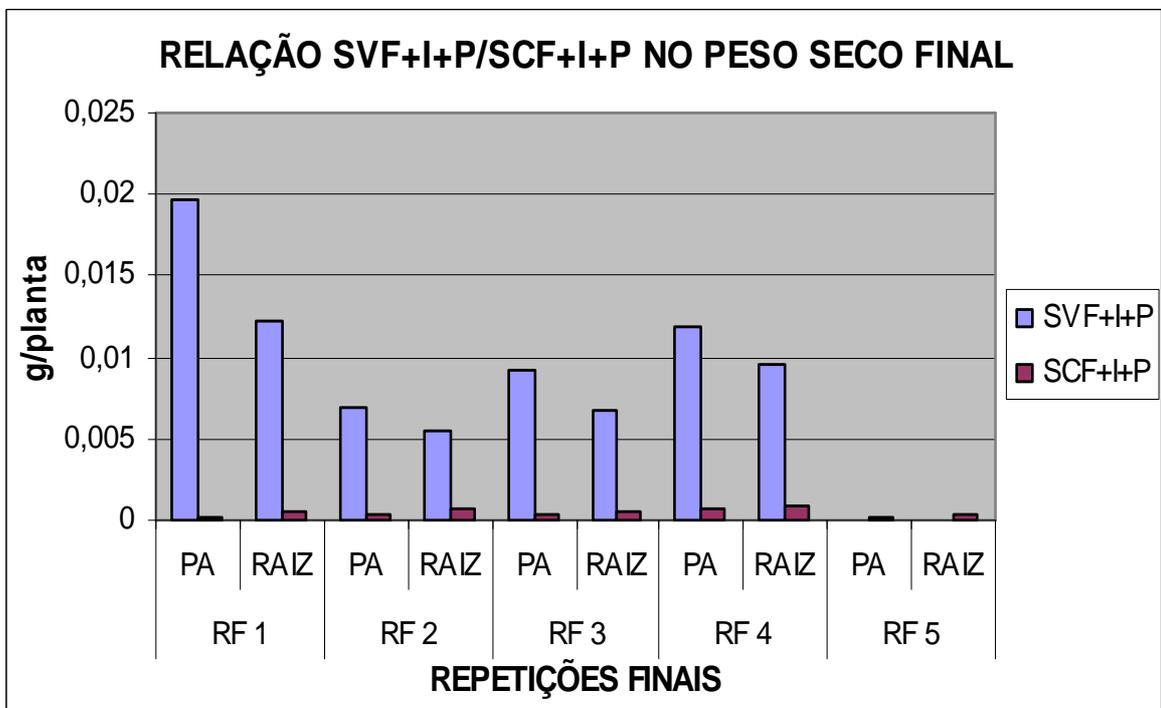
**Figura 19:** “Peso Seco Final dos Tratamentos SVF+I e SCF+I”



**Figura 20:** “Peso Seco Final dos Tratamentos SVF+I+N e SCF+I+N”



**Figura 21:** “Peso Seco Final dos Tratamentos SVF+I+P e SCF+I+P”

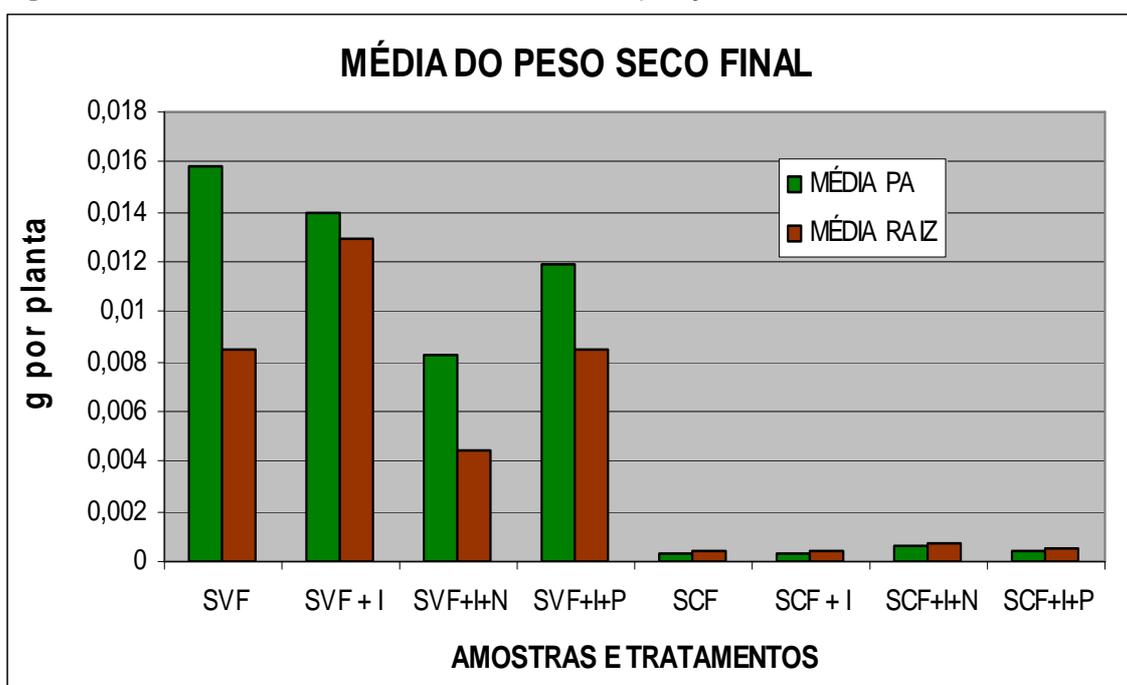


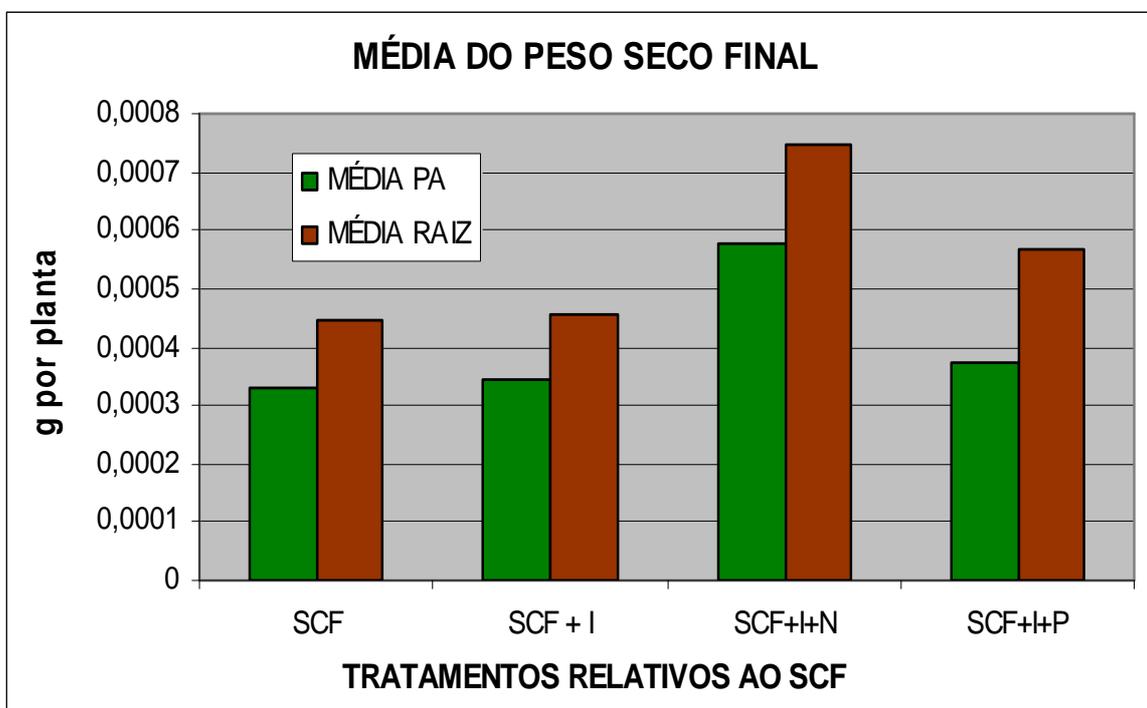
Os resultados de peso seco mostram que as plantas referentes aos tratamentos do SCF obtiveram um desenvolvimento muito inferior àquelas relativas ao solo controle “SVF”. Observa-se também que nas repetições relativas ao SVF+I+N foram encontrados os resultados de peso seco mais baixos quando em comparação com os outros tratamentos propostos ao solo controle. Por outro lado, as repetições relativas ao SCF+I+N apresentaram os maiores resultados de peso seco, quando em comparação com os outros tratamentos propostos ao solo contaminado.

Observa-se também que em todas as repetições finais propostas aos tratamentos do SVF, o peso seco da parte aérea foi superior ao peso seco do sistema radicular, enquanto que nas repetições relativas aos tratamentos do SCF ocorreu exatamente o contrário, onde o peso seco do sistema radicular foi superior ao peso seco da parte aérea.

As médias do peso seco ao final do experimento (T6) relativas às repetições finais são mostradas nas **Figuras 22 e 23**, e a proporção entre a parte aérea e o sistema radicular na **Figura 24**:

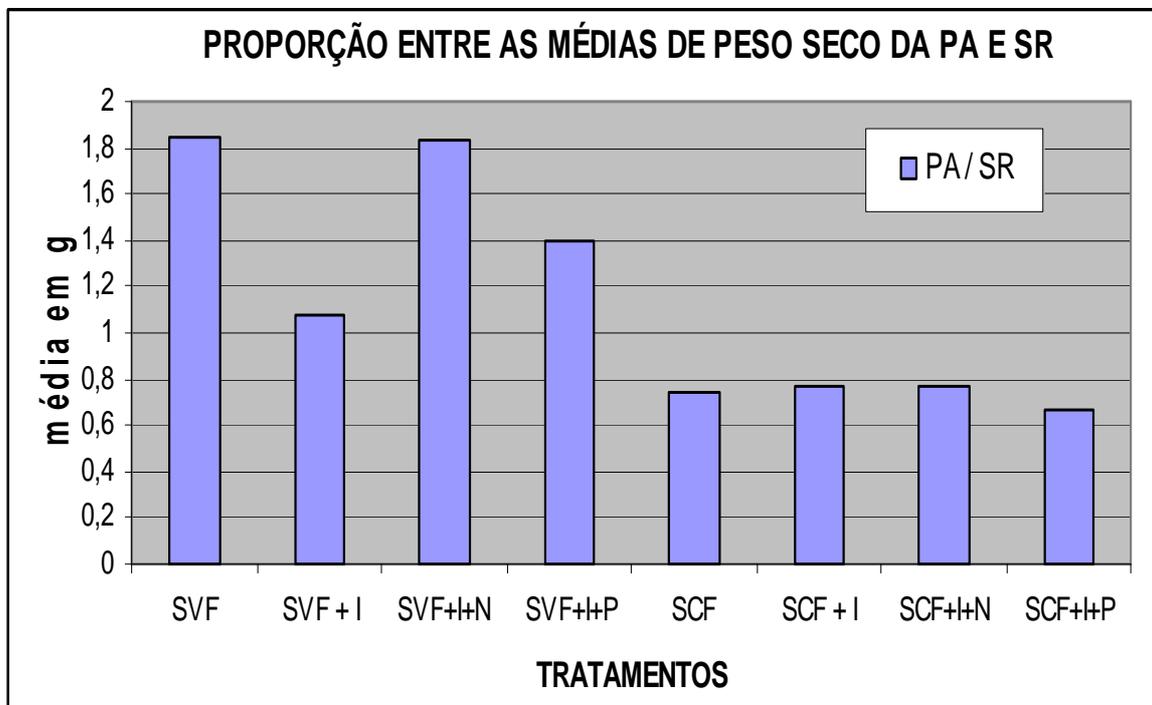
**Figura 22:** “Média do Peso Seco Final das Repetições Finais “



**Figura 23:** “Média do Peso Seco Final nos Tratamentos do SCF “

Nas médias do peso seco final ficam evidentes as diferenças nos resultados de peso seco entre sistema radicular e parte aérea nos tratamentos de SVF e SCF. Nos tratamentos propostos ao SVF, aquele com o solo apenas inoculado, mostrou resultados mais próximos entre parte aérea e sistema radicular. Também é possível observar que no peso seco final dos tratamentos propostos ao SVF o peso seco da parte aérea foi superior àquele encontrado no do sistema radicular, enquanto que nas repetições relativas ao SCF ocorreu exatamente o contrário, o peso seco do sistema radicular foi superior ao encontrado na parte aérea.

**Figura 24:** “Proporção Entre a Parte Aérea e o Sistema Radicular nos Tratamentos do SVF e SCF”

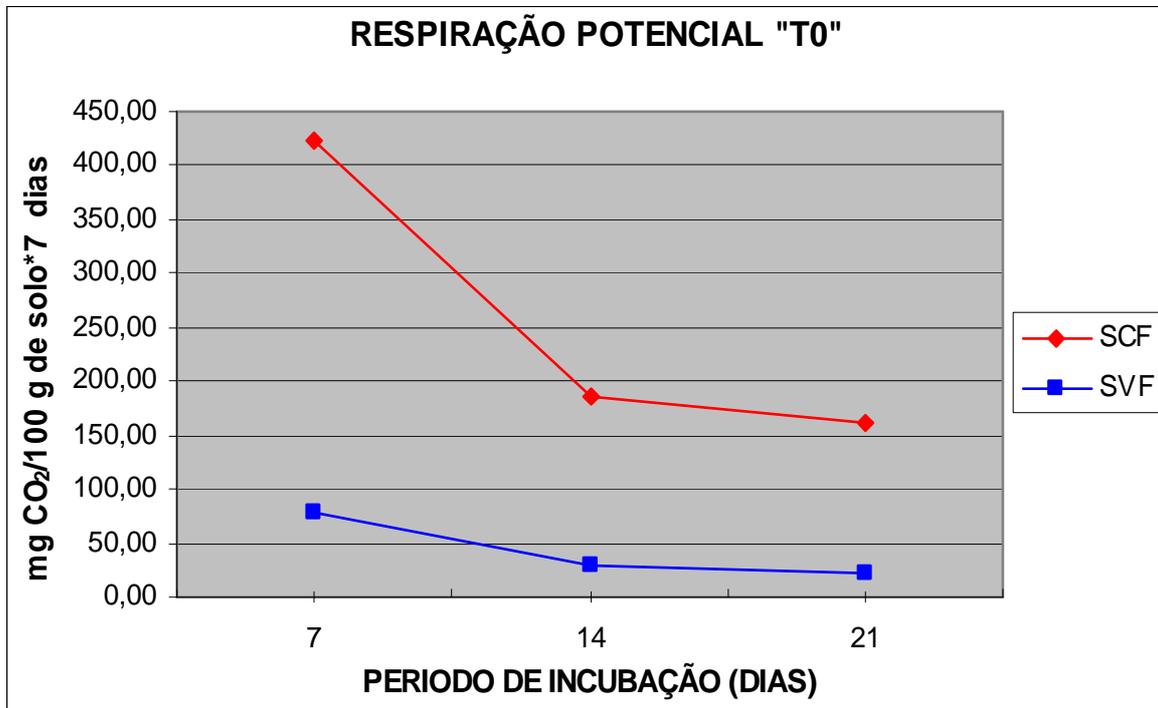


Não houve resultados proporcionais (PA/SR) entre o peso seco dos diferentes tratamentos propostos ao solo controle (SVF) Enquanto que nos tratamentos propostos ao SCF os resultados de peso seco foram proporcionais.

### 5.5 Respiração Potencial Microbiana

A respiração potencial nos tempos T0, T1, T2, T3, T4, T5, e T6 é mostrada nas **Figuras: 26, 28, 30, 32, 34, 36 e 38**, consecutivamente. O monitoramento das temperaturas no período de incubação de cada tempo é mostrado nas **Figuras: 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39** consecutivamente.

**Figura 25:** “Respiração Potencial do T0”



**Figura 26:** “Temperaturas no Período de Incubação do T0”

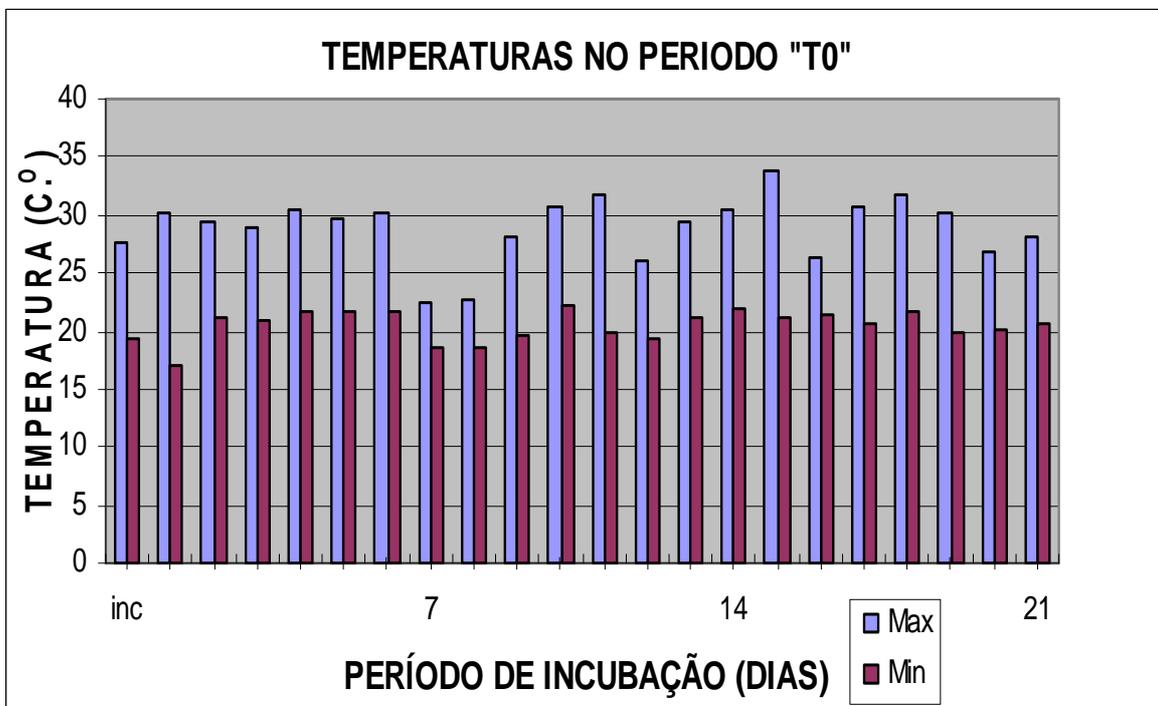


Figura 27: "Respiração Potencial do T1"

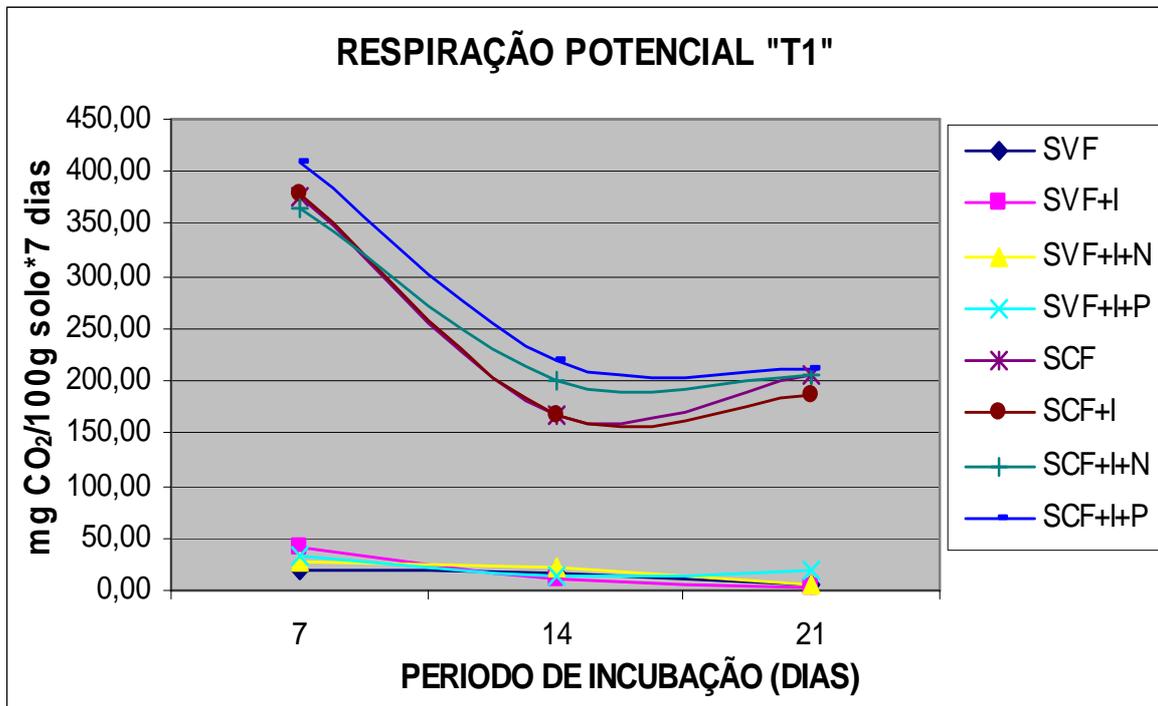


Figura 28: "Temperaturas no Período de Incubação do T1"

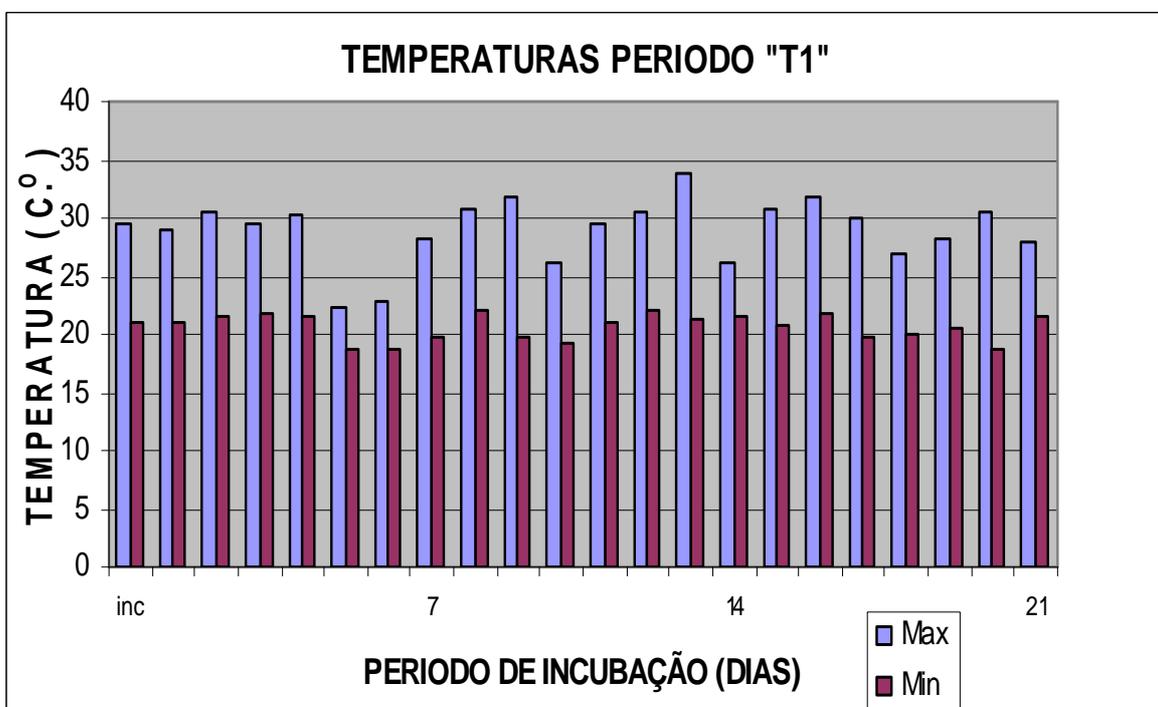


Figura 29: "Respiração Potencial do "T2"

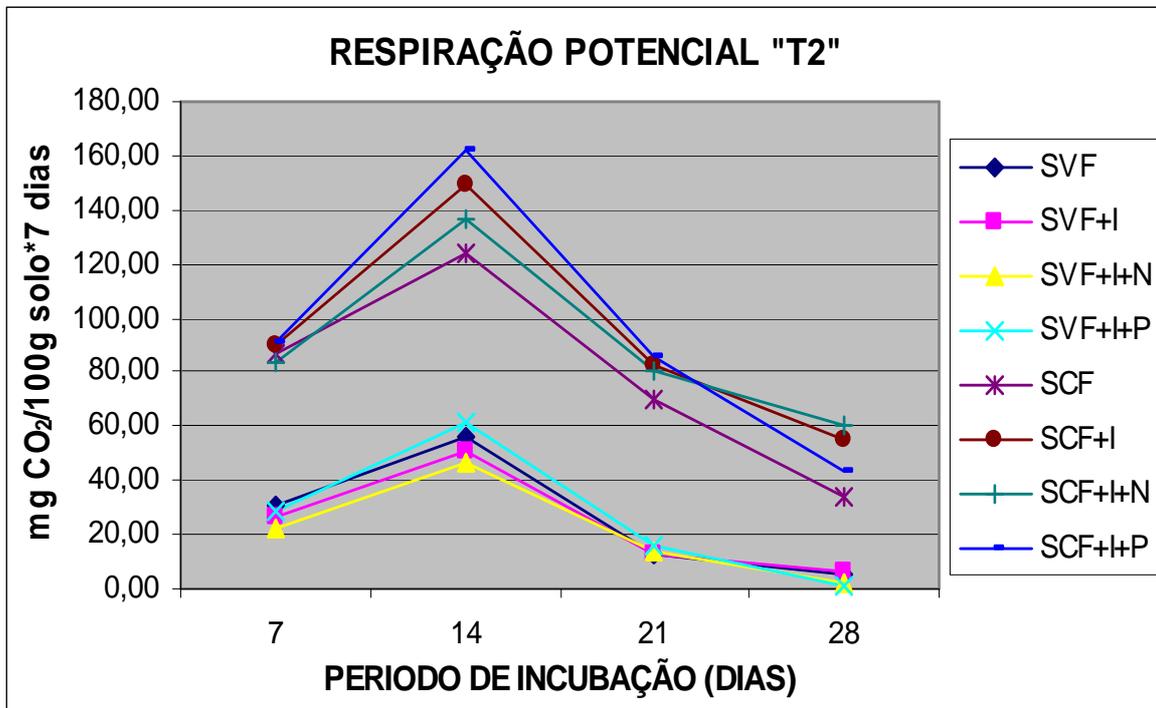
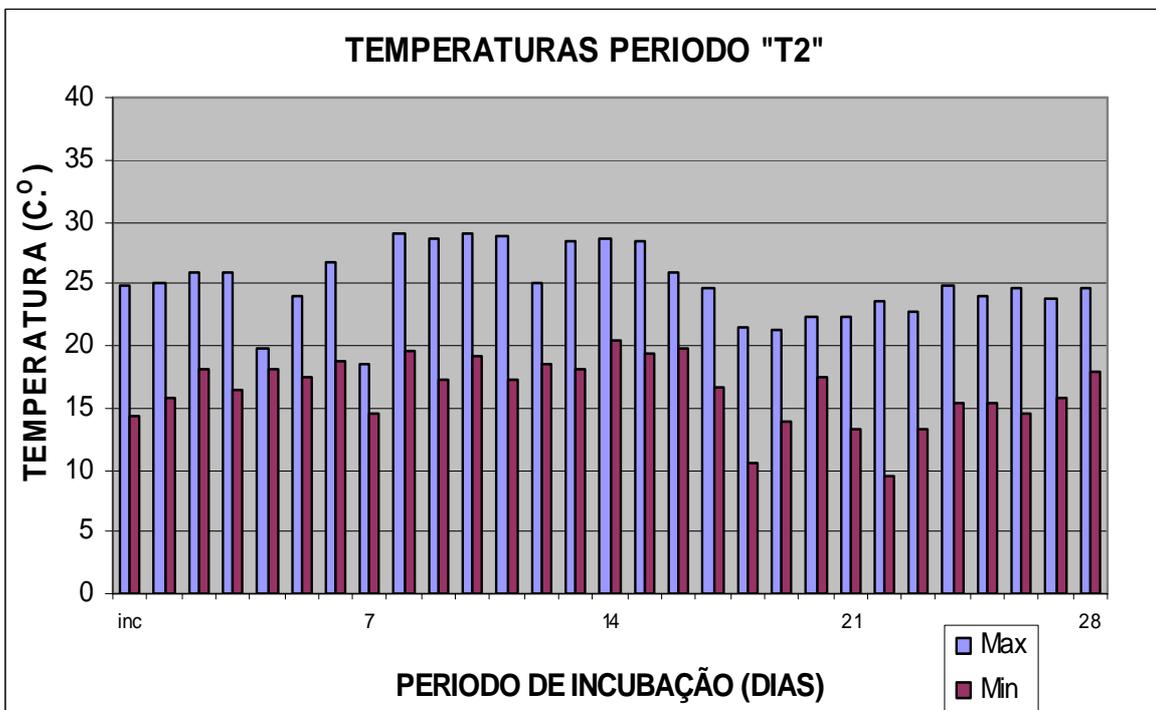
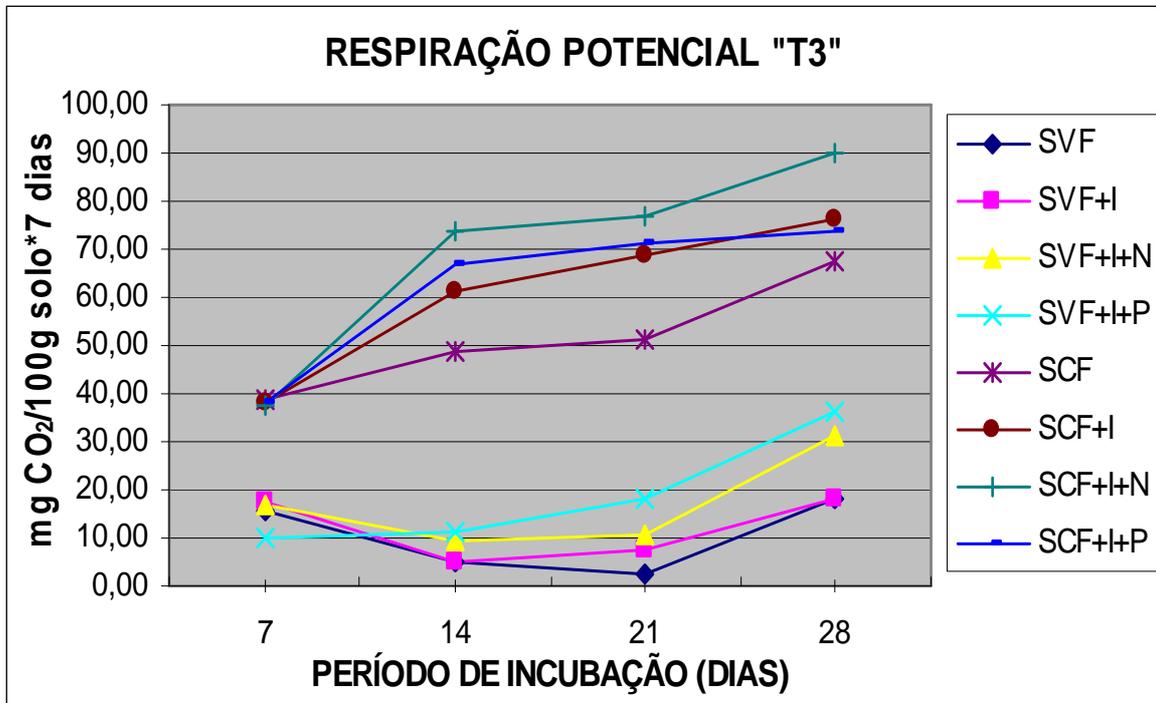


Figura 30: "Temperaturas no Período de Incubação do" T2"



**Figura 31:** “Respiração Potencial do “T3”



**Figura 32:** “Temperaturas no Período de Incubação do “T3”

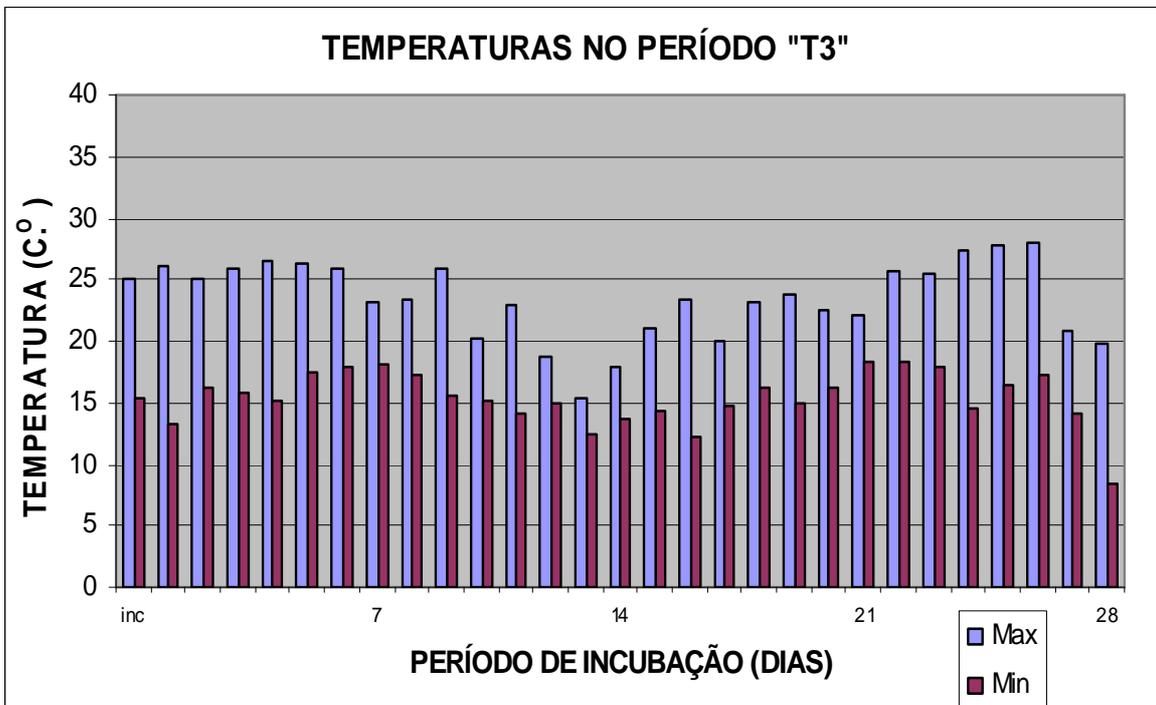


Figura 33: "Respiração Potencial do "T4"

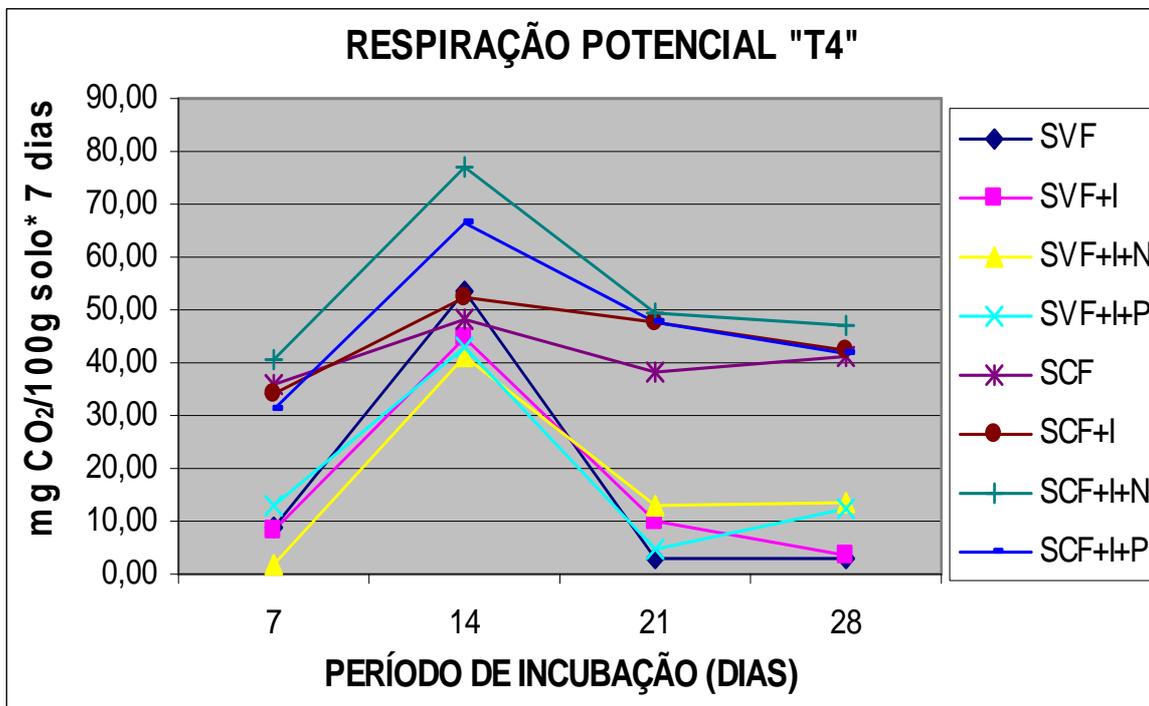


Figura 34: "Temperaturas no Período de Incubação do" T4"

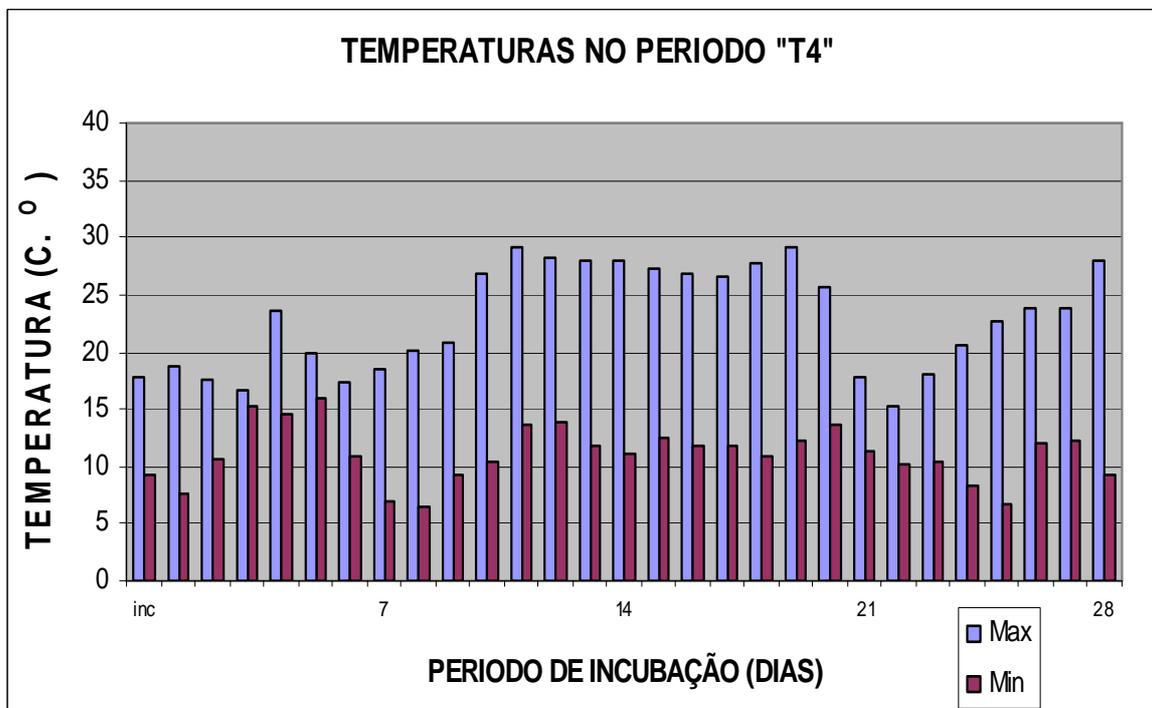


Figura 35: "Respiração Potencial do "T5"

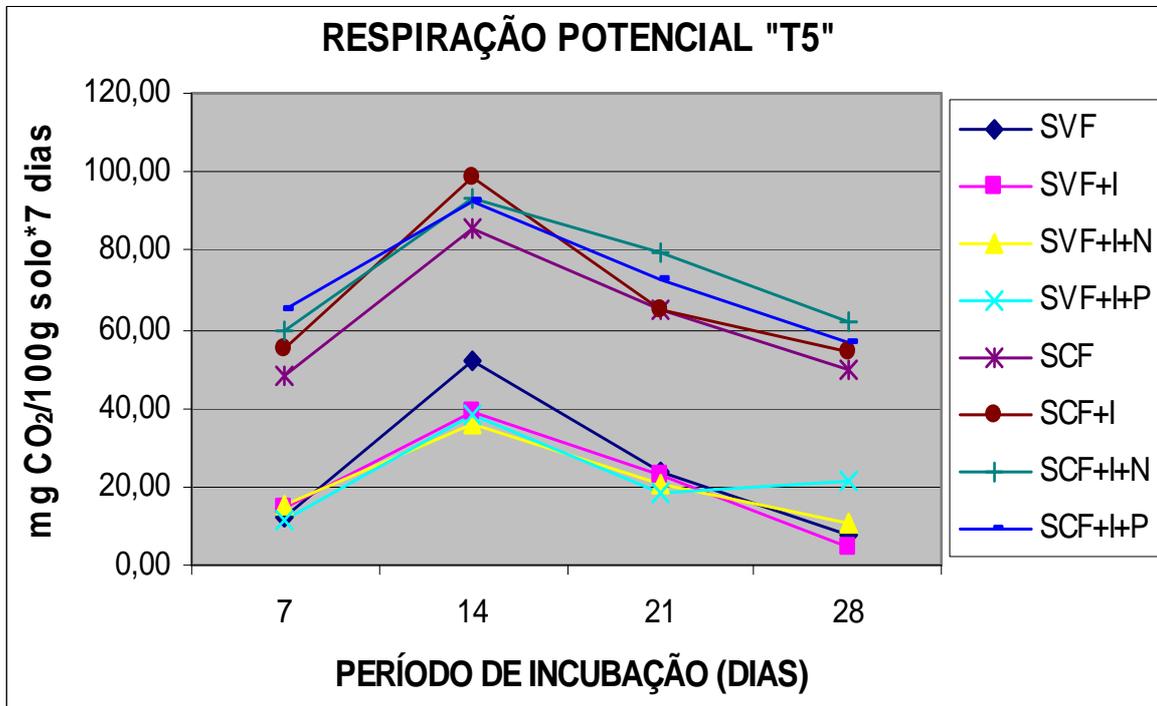


Figura 36: "Temperaturas no Período de Incubação do" T5"

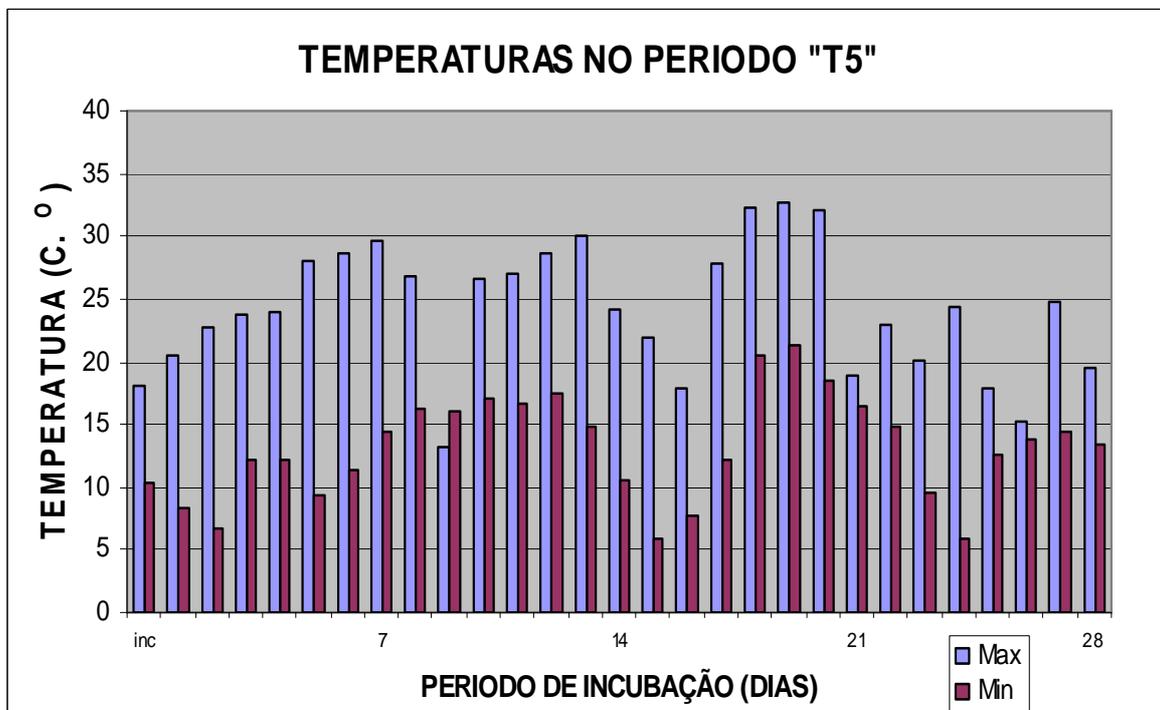


Figura 37: "Respiração Potencial do "T6"

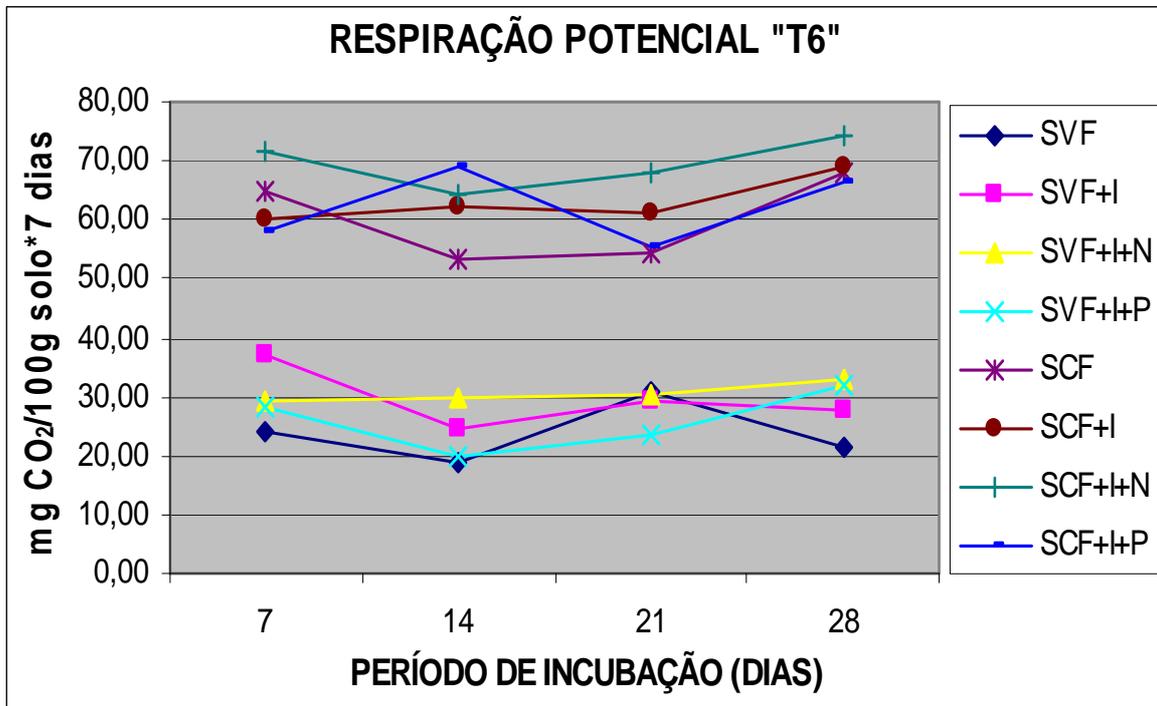
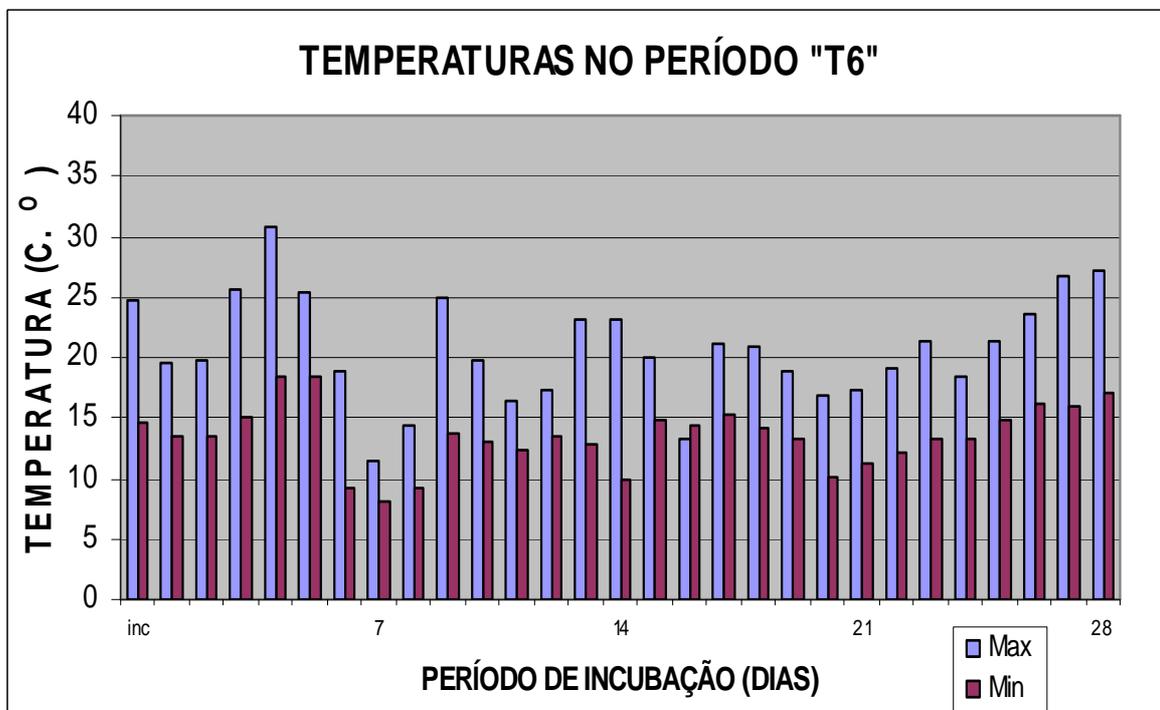


Figura 38: "Temperaturas no Período de Incubação do" T6"



De acordo com os resultados obtidos na respiração potencial, o SCF quando nos tempos “T0” e “T1” mostrou uma atividade respiratória bastante alta, principalmente na primeira semana. Esta condição foi encontrada por WATTS *et al.* (1982) e GRUIZ e KRISTON (1995), demonstrando que os microrganismos indígenas (nativos do solo em questão) adquiriram a capacidade de degradar o poluente em questão, já observado por FREDRICKSON *et al.* (1991), AL-HADHRAMI *et al.* (1995), (HERBES e SCHWALL, 1978). METTING (1993) também havia observado os processos de “Aclimatação” e “adaptação”.

Nos demais tempos, observa-se uma queda considerável nos níveis de respiração nos diferentes tratamentos do SCF quando em comparação com os dois primeiros tempos. A queda da temperatura relativa à chegada do inverno teve influência direta na atividade respiratória. Baixas temperaturas tendem a reduzir a atividade microbiana do solo e, conseqüentemente, os processos de biodegradação (DIBBLE e BARTHA, 1979; SKLADANY e METTING, 1993).

Observa-se que nos tempos “T2”, “T4” e “T5”, a segunda semana foi aquela que apresentou os maiores níveis de respiração.

A respiração microbiana relativa aos tratamentos propostos ao solo contaminado, ou seja, o solo inoculado e tratado com peróxido e nitrato, apresentou-se um pouco superior àquela relativa ao solo contaminado não tratado, esta diferença foi considerada como não representativa.

O solo controle (SVF) e seus diferentes tratamentos apresentaram uma atividade respiratória baixa quando em comparação com o solo contaminado (SCF), o que já foi observado por WATTS *et al.* (1982) e GRUIZ e KRISTON (1995).

As análises estatísticas encontram-se no **ANEXO 3**.

## 6 CONCLUSÕES

Através dos resultados apresentados e discutidos foi possível concluir:

1) A espécie *Trifolium repens* L. apresentou diferenças em todos os tempos do experimento, nos diferentes tratamentos e parâmetros avaliados, porém as diferenças representativas foram encontradas apenas entre os tratamentos do SCF (Solo Contaminado Floresta), quando em comparação com os tratamentos do SVF (Solo Virgem Floresta, Solo Testemunho, ou Solo Controle). A espécie apresentou germinação, sobrevivência e principalmente peso seco superior no solo controle e seus tratamentos respectivos.

2) Na fitotoxicidade, A espécie *Trifolium repens* L. mostrou-se adequada como bioindicadora de solos contaminados com óleo diesel, sobrevivendo no solo contaminado por até quatro meses, fornecendo dados sobre a variação em seu desenvolvimento em relação ao SVF e tratamentos respectivos. As maiores variações encontradas ao longo dos quatro meses, em que a espécie foi monitorada, foram aquelas encontradas no último mês, quando a espécie apresentou sobrevivência e principalmente peso seco bastante inferior no (SCF) e seus tratamentos.

3) A Respiração Potencial avaliada entre os tratamentos do solo contaminado (SCF), assim como entre os tratamentos do solo controle (SVF) não apresentou diferenças representativas. Porém, na relação entre os tratamentos do SCF e SVF ocorreram as maiores diferenças nos parâmetros avaliados. O solo contaminado obteve respiração bastante superior ao solo controle em todos os tratamentos avaliados. Embora as diferenças na Respiração Potencial Microbiana, entre os tratamentos propostos, não tenham sido significativas, o solo contaminado que recebeu tratamentos apresentou sua respiração um pouco superior ao solo contaminado que não recebeu tratamentos. Os tratamentos relativos ao nitrato de potássio e peróxido de hidrogênio foram os que apresentaram maiores índices respiratórios, em todos os tempos avaliados.

4) Os resultados encontrados na fitoxidade e TPH mostram que o solo contaminado sem tratamentos (SCF) mostrou os melhores resultados em seu estado de biorremediação, quando em comparação com os outros tratamentos. Já, com relação à Respiração Potencial Microbiana, o SCF apresentou índices um pouco inferiores aos outros tratamentos propostos.

5) O inóculo da RPBC não obteve efeito representativo no experimento. Provavelmente por ter sido produzido em uma região tropical, com clima e características pedológicas diferentes daquelas da região sul.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBIM, N. N.; SABEY, B. R. ; MARKSTROM, D. C. **Land application of sewage sludge: V. Carbon dioxide production as influenced by sewage sludge and Word waste mixtures.** Journal Environmental Quality. Vol. 6. 1977. p. 446-451.

AL- AWADHI, N., AL- DAHER, R., ELNAWAWY, A.; BALBA, T. **Bioremediation of oil-contaminated soil in Kwait. Landfarming to remediate oil-contaminated soil.** Jornal of Soil Contamination. Vol. 6, 5 (3). 1996. P. 243-260.

ALDRETT, S., BONNER, J.S., MILLS, M.A., AUTENRIETH, R. L.,STEPHENS, F.L.. **Microbial degradation of crude oil in marine enviroments tested in a flash experiment.** Wat. Res. Vol. 31(11), 1997, p. 2840-2848.

ALEXANDER, M. **Introducción a la microbiología del suelo.** 2. Ed. Planta Alta, México: libros y editoriales, 1980.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation.** Academic Press, 2.ed. 1999. 453p.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology.** 2 ed. New York, John Wiley & Sons, 1977, 467 p.

AL- HADHRAMI, M. N., LAPPIN-SCOTT, H. M., FISHER, P. J. **Bacterial survival and n-alkane degradation within Omani Crude Oil and a Mouse, Marine Pollution Bulletin.** Vol. 30 (6). 1995. P. 403-408.

ANDERSON, T. A. AND WALTON, B. T. **Fate of C<sup>14</sup> trichloroethylene in Root zone of plants from a former solvent disposal site,** Enviroment, Toxicol. Chem. 14 (12): 1995.p. 2041-2047.

ANTONOVICS, J.; BRADSHAW, A. D.; TURNER, R.S. **Heavy metal tolerance in plants.** Adv. In Ecol. Res., London, v.7, 1971.p. 1-85,

API. **Publication n. 4627, Health and Env. Sciencs Dep.** 1995. 139 p.

ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de Importância Agrícola.** Brasília: EMBRAPA. 1994. 236p.

ARNON, D.I.; STOUT, P.R. **Molybdenum as na essential element for green plants.** London: Nature, v. 172, 1939. p. 599-602.

**ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.** Resíduos Sólidos – Classificação: NBR 10.004. Rio de Janeiro: ABNT, 1987b.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R **Stimulated Biodegradation of slicks using oleophilic fertilizers.** Environmental Science and Technology. Vol. 7. 1973. p. 538-541.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology, Fundamentals and applications.** Addison-Wesley, Reading, Mass. 1981.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology, Fundamentals and applications.** Addison-Wesley, Reading, Mass. 1981.

BARENSCHEE, E.R., BOCHEM, P., HELMLING, O. E WEPPEN, P. **Effectiveness and kinetics of hydrogen peroxide and nitrate-enhanced biodegradation of hydrocarbons.** In: Hinchee, R.E. and Olfenbuttel, R.F. (eds.), **In situ bioreclamation applications and investigations for hydrocarbon and contaminated site remediation.** Butterworth-Heinmann, Boston, MA, 1991. p.103-124.

BARKER, J. F., PATRICK, G. C., MAJOR, D. **Natural Attenuation of Aromatic Hydrocarbons in a Shallow Sand Aquifer.** Ground Water Monitoring Review, v.7, n.1, 1987, p.64-71.

BARTHA, R. *et al.* **Land Treatment: Biodegradative.** UNESCO-PNDU-CETESB, São Paulo, nov. 1986.

BAUER, J. E. e CAPONE, D. G. **Degradation and mineralization of the polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 50 (1). 1985. p. 81-90.

BAUMEISTER, W.; ERNEST, W. **Mineralstoffe und Pflanzenwachstum.** 3. Aufl. New York : G. Fischer, 1978. 416 p.

BEWLEY, R. J.F.; **Bioremediation of contaminated ground. Contaminated land treatment technologies.** Papers presented at na international conference. Barking, uk; Elsevier Science Publishers. London, 1992, p. 270-284.

BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N. & GUSTAVSSON, P. **Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons.** Cancer Causes & Control, 8: 1997. p. 444-472,

BOLLAG, J.M., MERTZ, T., OTJEN, L.. **Role of microorganisms in soil biorremediation.** In: **Bioremediation Through Rhizosphere Technology.** American Chemical Society. 1994, p. 2-10.

BREGNARD, T. P. A., HOHENER, P., HANER, A., ZEYER, J. **Bioavailability and biodegradation of weathered diesel fuel in aquifer material under denitrifying conditions.** Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 17(7). 1997. p.1222-1229.

BROETZMAN, G., CHACÓN, M. J., HADLEY, P. W., KABACK, D. S., KENNETT, R. W., ROSENTHAL, N. J. **New Approches Towards Promoting The Application Of Innovative Bioremediation Technologies.** 1997. P. 323-328. In: In situ and On-Site biorremediation: V. 4. Fourth international in situ and On-Site biorremediation symposium. Battele Press, Columbus, Ohio.

BROWN, E. J., RESNICK, S. M., REBSTOCK, C., LUONG, H. V., LINDSTROM, J. 1991. **UAF Radiorespirometric protocol for assessing hydrocarbon mineralization potential in environmental samples.** Biodegradation. Vol. 2. 1991. p. 121-127.

BROWN, K.W; DONNELLY, K.C. **Influence of soil environment on biodegradation of a refinery and petrochemical sludge.** Environmental Pollution. Texas, USA. v. 6, n. 2, p. 119-132, 1983. CAB: OS Soils-and-Fertilizers, 1984, ref. 047-00833. Resumo.

BURKEN, J. G. **Uptake and Fate of Organic Contaminants by Hibrid Poplar Trees,** PhD. Dissertation, Iowa City, IA, USA.1996.

BUSHNELL, L. B., HAAS, H. F. **The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms.** Journal of Bacteriology. 41: 1941. p. 653-673.

BÜYÜKSÖNMEZ, F., HESS, T. F., CRAWFORD, R. L., WATTS, R. J. **Toxic effects of modified fenton reagents on Xanthobacter flavus FB 71.** Applied and Environmental Microbiology. Vol 64 (10). 1998. p. 3759-3764.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. **Estabelecimento de plantas herbáceas em solo contaminado com metais pesados: efeito de misturas de espécies e inoculação com fungos micorrízicos.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 36, n. 12, dez. 2001. p. 1443-1452,

CARVALHO, F. J. P. C.; ALMEIDA, M. H. Petrobras<sup>®</sup> **High Efficiency Landfarming Sistem:** "New for Biodegradable Toxic Industrial Wastes" in Biodeterioratio an Biodegradation, DECHEMA Monographs, v.133, Hamburg, Sep, 1996. p.535-542,

CARVALHO, F.J.P.C., SOUSA, S.L. CASTRO, R.A., RESENDE, E.E.B., RITTES, J.R.F., DYMINSKY, D.S **Determinação da Respiração da camada reativa do solo do landfarming da Repar-Refinaria Presidente Getulio Vargas – Petrobrás, através da evolução do CO<sub>2</sub> : otimização do sistema de incubação.** Anais da 46ª SBPC. . 1994b. p. 707.

CASARINI, D. C. P., MACEDO P. M. DE, CUNHA, R. C. DE A., MAUGER, J. C. O. **The development of assessment techniques to evaluate the biodegradation of oily sludge in *landfarming* system.** *Water Science Technology*. Vol. 20 (10). 1988. p. 231-236.

CASARINI, D. C. P., CUNHA, R. C. A., SATO, M. I. Z., SANCHES, P. S. **Evaluation of toxicity test procedure to define loading rates in a land treatment system.** *Water Science Tecnology*. Vol. 24(12). 1991. p. 183-188.

CAUWENBERG, L.V., ROOTE, D.S. **In situ bioremediation.** *Ground-Water Remediation Technologies*. Analysis Center. 1998.20 p.

**CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental)** Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo- Série Relatórios Ambientais. São Paulo. 2001.

**CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental)** Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/impactos/efeitos.asp>> Acesso em: 17 out. 2004c.

CHAPELLE, F. H. **Assessing the Efficiency of Intrinsic Bioremediation.** *EPA/540/R-94/515*. Washington, D.C.U.S. Environmental Protection Agency, 1994.

CHIANG, C. Y. , SALANITRO, J. P., CHAI, E. Y., COLTHART, J. D., KLEIN, C.L. **Aerobic Biodegradation of Benzene, Toluene, and Xylene in a Sandy Aquifer: Data Analysis and Computer Modeling.** *Ground Water*, V. 27, n.6, 1989. p.823-834.

CHO, J. C., KIM, S. J. Biodegradation of phenanthrene in soil microcosms. p. 239-244. In: Alleman, B. C. e Leeson, A. (ed.) *In Situ and On-Site Bioremeation*: Vol. 2. Papers from the fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. New Orleans, April 28-may 1997.1.647 p.

COATES, J.D., WOODWARD,J., ALLEN, J., PHILP, P., LOVLEY, D.R. **Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-**

**CONAMA** (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Resolução nº. 22, de 23 de janeiro 1986.

**contaminated marine harbor sediments.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 63 (9). 1997. p. 3589-3593.

CONCAWE. **Sludge Farming: a Technique for the Disposal of Oily Refinery Wastes.** Concaawe Report 3: 1980. 95p.

COOKSON, J.T. **Bioremediation engineering: desing and application.** McGraw-Hill, Inc. ,1995, 525 p.

CUNNINGHAM, Scott D.; ANDERSON, Todd A.; SCHWAB, A et al. **Phytoremediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants.** *Advances in Agronomy*, Newark, USA, v. 56, 1996, p. 55-113.

CUTRINGHT, T. J. e S. LEE. **In Situ Soil Remediation: Bacteria or Fungi?** Dept. of Chem. Eng., University of Akron. Akron - Ohio - USA. s/v. 1994, p. 413-419.

DAVIS, J. W., KLIER, N. J. **Natural Biological Attenuation Of Benzene in Groundwater Beneath a Manufacture Facility.** *Ground Water* V.32, n.2, p. 215-226, 1994.

DEKOCK, P. C. **Heavy Metal Toxicity And Iron Chorosis.** *Ann. Bot.*, London, v.20, n. 77, Jan. 1956. p.133-141.

DEL' ARCO, J. P. e FRANÇA, F. P. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 44. 1999. p. 87-92.

DIBBLE, J.T.; BARTHA, R. **Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge.** *Applied and Environmental Microbiology*. New Brunswick, New Jersey, v. 37, n. 4, p. 729-739, 1979. CD: Soil-Biology; Materials-Science. Resumo.

DINEEN, D, SLATER, J.P., HICKS, P., HOLLAND, J., CLENDENING, L.D. **In situ biological remediation of petroleum hydrocarbons in unsaturated soils.** p 453 – 463. **In: Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils (Calabrese, E.J., KostECKI, P.T. – ed.)**. Boca Raton: Lewis Publishers. 1992, 658p.

DOBSON, A. L., WILSON, H. A. 1964. **Respiration studies on soil treated with some hydrocarbons.** *Proceedings soil Science America*. Vol. 28. 1964. p. 536-539.

DOUGLAS, G. S., MCCARTHY, K. J., DAHLEN, D. T. SEAVEY, J. A., STEINHAUER, W. G., PRINCE, R. C. ELMENDORF, D. L. 1991. **The use of hydrocarbon analyses for environmental assessment and remediation.** In Contaminated Soils: Diesel Fuel Contamination. (Calabrese, E. J., Kostecki, P.T. –ed.) 1991. Boca Raton: Lewis Publishers.

ECKENFELDER Jr, W. W.; NORRIS, R. D. **Applicability of Biological Processes for Treatment of Soils.** In: TEDDER; POHLAND, Emerging Technologies in Hazardous Waste Management III. 1993, cap. 8, p. 138-158.

EMBRAPA, Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos-EMBRAPA. Rio de Janeiro, 2 ed. 1997.

EMBRAPA, (Base de solos do Brasil). Disponível em <<http://www.cnps.embrapa.br/solosbr/bsb/index.cfm>> Acesso em 23 Dez. 2005.

ENGLERT, C. J., KENZIE, E. J., DRAGUN, J. **Bioremediation of petroleum products in soil.** p. 111-129. In: Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils (Calabrese, E. J., Kostecki, P. T. – ed.) Boca Raton: Lewis Publishers. 1993. 658 p.

EPSTEIN, E. Os componentes inorgânicos das plantas. **In: Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas.** Rio de Janeiro : Ed. USP, 1975. P. 43-69.

EPA(Environmental Protection Agency). Disponível em< <http://www.epa.gov/>>. Acesso em 16 jun de 2005

FERNANDES, F. M. **Bioremediation – State of the Art. In Third Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium.** Florianópolis, 27-30, Abril, 1998.

FISHER, P. J. *et alli* **Bacterial Survival and n- Alkane Degradation Within Omani Crude Oil and a Mousse.** Department of Biological Sciences, University of Exeter. s/v. 1995. p. 403-407.

FREDRICKSON, J. K., BROCKMAN, F. J., WORKMAN, D. J., LI, S. W., STEVENS, T. O. **Isolation and characterization of a subsurface bacterium capable of growth on toluene, naphthalene, and other aromatic compounds. Applied and Environmental Microbiology.** Vol. 57 (3). 1991. p. 796-803

GERSBERG, R.M., DAWSEY, W.J., RIDGWAY, H.F. **Biodegradation of dissolved aromatic hydrocarbons in gasoline contaminated groundwaters using denitrification.** In: Petroleum Contaminated Soils. Vol. 2: Remediation Techniques, Environmental Fate, Risk Assessment, Analytical Methodologies. Lewis Publishers, Chelsea, MI. 1989, p. 211-217.

GLIMMERVEEN, I. **Should trees now be more actively used in the rehabilitation of heavy metal contaminated sites? Vegetation management in forestry, amenity and conservation areas: managing for multiple objectives.** York, UK. n. 44, p. 357-361, March, 1996. CD: Protection-Forestry; Pollution-and-Degradation. Resumo.

GOLDSTEIN, R. M. , MALLORY, L. M. , ALEXANDER, M. **Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 50 (4). 1985. p. 977-9983.

GROVE, G.W. **Use landfarming for oily waste disposal.** Hydrocarbon Processing. 5: p.138 - 140.

GRUIZ, K., KRISTON, E. **1995. In situ bioremediation of hydrocarbon in soil.** Journal of Soil Contamination. 4(2): 1978. p.163 - 173.

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

HADLEY, P. W., ROGERS, L. C., HILL, S. R. **Interstate Acceptance Of In Situ Biomediation Technologies.** 1997. p. 347-51. In: In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 4. Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. Battelle Press, Columbus, Ohio.

HAIMANN, R. A. **Fungal Technologies for the Treatment of Hazordous Waste.** Environmental Progress, Santa Ana - Califórnia, v. 14, n. 3, , Aug, 1995. p. 201-203

HARRIS, B. C., BONNER, J. S., AUTENRIETH, R. L. **Nutrient dynamics in marsh sediments contaminated by and oil spill following a flood .** Environmental Technology. Vol. 20. 1999. p. 795-810.

HARRIS, J. O. **Petroleum Wastes in the Soil in Land Application of Waste Materials.** Published by the Soil Conservation Society of America, Ankeny, Iowa. 1976.313p.

HERBES, S. E., SCHWALL, L. R. **Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristane and petroleum contaminated sediments.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 35. 1978. p. 306-316.

HERBES, S. E. **Rates of microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediments in the vicinity of a coal-cooking wastewater discharge.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 41(1). 1981. p. 20-28.

HILDEBRAND, C. **Manual de análise química dos solos e plantas.** Curitiba, UFPR, 1976.

HUESEMANN, M.H. **Guidelines for land treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils.** Journal of Soil Contamination. Richland, v. 3, n. 3, 1994. p. 299-318.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Complete List of Agents, Mixtures and Exposures Evaluated and Their Classification.** 3 May 2002 Disponível em:<<http://www.iarc.fr/>>.

INFOCLIMA. Disponível em:<[http://www.cptec.inpe.br/infoclima/2001/dez\\_2001.shtml](http://www.cptec.inpe.br/infoclima/2001/dez_2001.shtml)> Acesso em: 04 Fev. 2006.

IVSHINA, I. B., KUYUKINA, M. S. , PHILIP, J. C., CHRISTOFI, N. **Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species.** World Journal of Microbiology & Biotechnology. Vol. 14. 1998. p. 711-717.

JENKINSON, D. S. & POLWSON, D.S. **The effects of biocidal treatments on metabolism in soil V. A method for measuring soil biomass.** Soil Biology and Biochemistry 8:209, 1974.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS. H. **Trace elements in soils and plants.** 3 ed. Boca Raton : CRC, 1985. 315 p.

KÄMPFER, P., STEIOF, M., BACKER, P. M., DOTT, W. **Characterization of chaemoheterotrophic bacteria associated with the in situ bioremediation of a west-oil contaminated site.** Microbial Ecology. Vol. 26. 1993. p. 161-188.

KRENCZYNSKI, M. C. **Avaliação da Capacidade de Degradação de Diferentes Substratos Oleosos para Microrganismos da Camada Reativa do *Landfarming*.** Monografia Apresentada ao Curso de Biologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 1996.

KRENCZYNSKI, M. C. **Avaliação da Biorremediação do Solo Contaminado com Resíduos Oleosos Através do Fracionamento da Matéria Orgânica do Solo.** Dissertação (tese de mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

LANGENBACH, T. et al. **Microrganismos de Importância Agrícola.** EMBRAPA, s/v. 1994. p. 217-228. Rio de Janeiro.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal.** Ed. Rima, São Carlos, 2000. p.455-458,

LARRABE, L; MACKEPRANG, O. **Como se Controla um Derrame de Crudo.** p. 71-86, Junho, 1993.

LINDSTRON, J. E., PRINCE, R. C., CLARK, J. C., GROSSNAN, M. J., YEAGER, T. R., BRADDOCK, J. F., BROWN, E. J. **Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 57 (9). 1991. p. 2514- 2522.

LOPES, W. A. & ANDRADE, J. B. **Fonte, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera.** Química Nova, 19: 1996. p 497-516.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil.** 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Plantarum 2000. p. 438,

LYNCH, J. M. **The terrestrial environment In microorganisms in action: Concepts and Applications in Microbial Ecology.** , J. M. Lynch and J.E. Hobbie eds. Blackwell Scientific, Oxford, 1988, p.103-131.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola.** São Paulo : Ed. Agronômica Ceres, 1976.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral das plantas.** São Paulo : Ed. Agronômica Ceres, 1980. 215 p.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental : metais pesados, mitos, mistificações e fatos.** São Paulo: ProduQuímica, 1994.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants.** Sandiego, CA. Academic press inc. 5. ed. 1993 a.

MA, G.; LOVE, N. G.; **Water Science Technology.** 2001, 43, 275p.

MANZOCHI, C. I. S. **Gerenciamento ambiental em postos de serviços automotivos**. Dissertação (tese de mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

MARCHALL, T. R., DEVINNY, J. S. **The microbial ecosystem in petroleum waste Land treatment**. Water Science and Technology. Vol. 20 (11/12). 1988. p. 285-291.

McDOWELL, L. R.; CONRAD, J. H.; HEMBRY, F. G. **Mineral for grazing ruminants in tropical regions**. 2 ed. Gainesville : University of Florida, Animal Science Department, 1993. 77 p.

McGILL, W.B., ROWELL, M.J., WESTLAKE, D.W.S. **Biochemistry, Ecology and Microbiology of Petroleum Components in Soil**. In: Soil Biochemistry Ed. E.A . Paul and J.N. Ladd, Marcel Dekker, New York, vol. 5. 1981, 229p.

MEETING, J. B. **Soil microbial e Ecology Applications in Agricultural an Environmental Nangment**. Environmental Sciencies Department Battele Pacific Notwest Laboratóries, Richland, Washington, Cap.01 e 17,1993. p.132-138.

METTING, F. B. **Soil Microbial Ecology**. Enviromental Sciences Departement Bettelle Pacific Northwest Laboratories. Richland, Washington, 1993.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 4 th. Ed. Bern: International Potash Institute, 1987.p 684-687.

MIELNICZUK, C. **A população microbiana a degradação de resíduo petroquímico no solo**. Tese de mestrado UFRGS. 1991.135p.

MIHELICIC, J. R., e LUTHY, R. G. **Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems**. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54 (5). 1988a. p. 1182-1187.

MIHELICIC, J. R., e LUTHY, R. G. **Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrifying conditions in soil-water systems**. Applied end Environmental Microbiology. Vol. 54 (5) 1988b. p. 1188-1196.

MILLER, R. H. **Factors affecting the decomposition of anaerobically digested sewage sludge in soil**. Journal Environmental quality. Vol 3. 1974. p. 376-380.

MORENO, F.N. **Avaliação experimental do potencial do chorão (*Salix babylonica*-Linnaeus) na fitorremediação de aquíferos contaminados por nitratos, etanol e benzeno.** Dissertação de Mestrado. Florianópolis, SC, 1998.

NAIR, D. R., BURKEN, J. G., LICHT, L. A. AND SCHOOR, J. L. **Mineralization and uptake of triazine pesticide in soil-plant systems**, *J. of Envirom. Eng.*, 119(5): 1993. p.986-993

NASCIMENTO, D. **Metodologia Para Utilização da *Avena strigosa* L., como Bioindicadora de Estado de Biorremediação de Solo Contaminado por Resíduos de Petróleo.** Dissertação (tese de mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

NOVAK, J. T., YEH, C., GULLIC, D., EICHENBERGER, J., BENOIT, R. E., **The influence of microbial ecology on subsurface degradation of petroleum contaminants.** Bulletin. Vol. 177. 1992. 44 p.

OLSEN, S. R. **Interacciones de los micronutrientes.** In: MOTVEEDT, J. J.; GIORDANO, P. M.; LINDSAY, W.L. Micronutrientes en agricultura. México : AGT, 1983. p. 267-290.

PATNAIK P. **Handbook of Environmental Analysis: Chemical Pollutants in Air, Water, soil, and Solid Wastes.** 1996. 604p.

PAUL, E. A., CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry.** Academic Press, Inc. – San Diego- Califórnia. 1989.275p.

PAVAN, M. A., BLOCH, M. F., ZEMPULSKI, H. C., MYAZAWA, M., ZOCOLER, D. C. **Manual de Fertilidade de Solo e Controle de Qualidade.** Londrina IAPAR – Circular n.76, 1997.

PEREIRA NETTO, A. D.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S. & BAREK, J. **Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): Uma revisão metodológica.** Química Nova, 23: 2000. p. 765-773,

PEREIRA, J. C. **Os microorganismos e os metais pesados do solo.** Seropédica: Embrapa **Agrobiologia**, ago. 2001. 14p. (Embrapa **Agrobiologia**. Documentos, 132)

PETROBRÁS. **Relatório Anual de Atividades**, Rio de Janeiro, 1995.

PORTO, M. L. **Vegetação metalófito e o desenvolvimento do setor mineral.** In: **Simpósio do Trópico Úmido, 1., 1986. Belém. Anais. Belém.**

RAYMOND, R.L; LIBERATI,M.A.; ZANIKOS,I; FISCHER,T.A. **National Petroleum Association** Publicação NAM-9047, 1990.

RAHOMA S. M. **A Fração Pesada de Petróleo e Gás Natural: Propriedades e Implicações**. Dissertação (tese de mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas,1989.

REPAR ME-6360-019 - **Determinação do Índice de Toxicidade de Resíduos Oleosos**. 1997,12 p. Araucária.

REPAR ME-6360-025 - **Determinação de Metais, em Solos e em Resíduos Oleosos**. 1997. 15 p., Araucária,

REPAR ME – 6360 – 027 – **Determinação da atividade respiratória potencial**.

REPAR P-6360-006 - **obtenção de amostras deformadas de solo**. 12p., Araucária, 1996.

REPAR P-6360-030 **vegetalização das áreas de biorremediação e de solos contaminados com compostos oleosos** 2000.18p.,Araucária.

REPAR - TPH Method 3550B – **Ultrasonic Extraction**.

RIDGWAY, H. F., SAFARIK, J., PHIPPS, D., CARL, P., CLARK, D. **Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer**. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 56 (11) 1990. p. 3536-3575.

RIIS, V., MIETHE, D., BABEL, W. **Degradation of refinery products and oils from polluted sites by the autochthonous microorganisms of contaminated and pristine soils**. Microbiological Research. Vol. 150 (3). 1995. p.323-330.

ROSENBERG, E. **Exploiting microbial growth on hydrocarbons – new markets. Trends in Biotechnology**. Vol. 11. 1993, p. 419-424.

Secretaria do Estado do Desenvolvimento Urbano e do Meio Ambiente.**Coletânea de Legislação Ambiental**, Curitiba, SEMA, 1990.

SCHOLLENBERGER, C.J.; **Effect of leaking natural gas upon the soil**. Soil Science. Madison, WI, v. 29, 1930, p. 261-266.

SHARABI, N. E. D. e BARTHA, **Testing of some assumptions about biodegradation in soil as measured by carbon dioxide evolution**. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 59 (4). 1993, p. 1201-1205.

SIMON, M. A., BONNER, J. S., MACDONALD, T. J., AUTENRIETH, R. L. **Bioaugmentation for the enhanced bioremediation of petroleum in a wetland.** Polycyclic Aromatic Compounds. Vol. 14 & 15. 1999, p. 231-239.

SKLADANY, G.J., METTING JR., F.B. **Bioremediation of contaminated soil.** p. 483 – 513. In: Metting Jr, F.B. (ed.) Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management. Marcel Dekker, Inc. New York. 1993. 646 p.

SOUSA, L. L. **Revegetação de Área de Biorremediação Contaminada por Resíduos de Petróleo** Dissertação (tese de mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

SOPPER, W. E. **Municipal Sludge use in land reclamation.** Boca Raton: CRC Press. 1993. 163 p.

SONG, H.G., WANG, X., BARTHA, R. **Bioremediation potential of terrestrial fuel spills.** Applied and Environmental Microbiology. 1990. 56(3): 652 – 656

STOTZKY, G. **Microbial respiration.** 1965. p. 1550-1572. In: C. A. Black (ed. ) Methods of Soil Analysis. Part 2. American Society Agronomy, Madison, WI.

SWINDOLL, C. M., AELION, C. M. e PFAENDER, F. K. **Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities.** Applied And Environmental Microbiology. Vol. 54 (1) 1988.. p. 212-217.

THOMAS, G.W., PEASLEE, D.E. **Testing soil for phosphorous.** In: WALSH, L.M. & BEATON, J.D., **Soil testing and plant analysis.** American Society Agronomy, Madison, Wiscosin. p. 115-132

THOMAS, J.M., WARD, C.H. **In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface.** Environmental Science Technology. 23(7): 1988. p760 - 766. 1989.

TIBURTIUS LOPES E. R., ZAMORA P. P. **Contaminação De Águas Por BTX e Processos Utilizados Na Remediação De Sítios contaminados.** Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

TIEDJE, J. M. **Denitrification.** In A. L. Page (Ed.), Methods of Soil Analysis, part 2 1982. (pp. 1011 – 1026). Madison, WI: ASA-SSSA.

TURNER, R. G. **Heavy metal tolerance in plants**. In: RORISON, I. H. Ecological aspects of the mineral nutrition of plants. Oxford : Blackwell Scientific, 1969. p. 399-410.

VENKATRAMAN, S. N.; BOLAND, T. M.; BOSSERT, I. D.; KASSON, D. S.; J. **Soil Contaminated**. 7, 143. 1998.

VERMACE, M. E.; CHRISTENSEN, R. F. PARKIN, G. F.; ALVAREZ, P. J. J.; **Water Resources**., 30, 3139, 1996.

VIEIRA, R.D, CARVALHO, N.M. **Teste de Vigor em Sementes**. São Paulo: FUNEP,1994. 164 p.

VO DINH, T.; FETZER, J. & CAMPIGLIA, A. D. **Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment**. Talanta, 47: p943-969.

WALKER, J. D. e COLWELL, R. R., 1976 a. **Measuring the potential activity of hydrocarbon-degrading bacteria**. Applied microbiology. Vol. 31 (2). 1998. p. 189-197.

WALTON, B. T. AND ANDERSON, T. A. **Microbial degradation of trichloroethylene in the rizhosphere: potential application to biological remediation of waste sites**, Applied and Environ. Technol., 56(4): Apr, 1990 p.1012-1016

WALKLEY, A., BLACK, T.A. 1934 **An Examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method**. Soil Science. 37: p. 29-38

WARD, D. M. e BROCK, T. D. **Environmental factors influencing the rate of hydrocarbon oxidation in temperade lakes**. Applid and Environmental Microbiology. Vol. 31 (5). 1976.p.764-772.

WATTS, J. R., COREY, J. C.e McLEOD, K. W. **Land application studies of industrial waste oils**. Environmental Pollution. Vol28. 1982. p.165-175.

WHO (World Health Organization). **Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. IPCS (International Programme on Chemical Safety). Geneva: 1988.

WIEDEMEIR, T. H., SWANSON, M. A., WILSON, J. T., KAMPBELL, D. H.; MILLER, R.N., HANSEN, J. E. **Aproximation Of Biodegradation Rate Constants For Monoaromatic Hydrocarbons (BTEX) In Ground**. Monit. Rem., V. Summer, 1996, p. 186-194.

WIKIPEDIA (a enciclopédia livre) Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Diesel> > Acesso em: 51 Jan. 2006.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

### 1. Determinação da Dose de Inóculo

5.000 g de solo \_\_\_\_ 100%

X \_\_\_\_ 1,5%, X = 75 g de inoculo por cada 5 Kg de solo

### 2. Determinação da Capacidade de Campo

1 – Solo Controle (SVF)

Foi pesado um papel filtro de café úmido.

- Peso do papel úmido: 4,77g

Em seguida foi utilizado um outro filtro seco idêntico ao que foi pesado anteriormente e este foi colocado em um funil de vidro onde recebeu os 50 g de solo seco. O conjunto foi umedecido, até que cessasse o escorrimento de água. Os resultados foram:

- Peso do solo + papel úmido = 75,62g

- Peso do solo úmido =  $75,62 - 4,77 = 70,85$  g

- Peso da água –  $70,85 - 50 = 20,85$ g

Capacidade de campo:

20,85g \_\_\_\_\_ 50g

X \_\_\_\_\_ 100 g, CC = 41,7%

2 – Solo contaminado (SCF)

Determinação da capacidade de campo

Foi pesado um papel filtro de café úmido.

- Peso do papel úmido: 4,77g

Em seguida foi utilizado um outro filtro seco idêntico ao que foi pesado anteriormente e este foi colocado em um funil de vidro onde recebeu os 50 g de solo seco. O conjunto foi umedecido, até que cessasse o escoamento de água. Os resultados foram:

- Peso do solo + papel úmido: 73,92g
- Peso do solo úmido:  $73,92\text{g} - 4,77\text{g} = 69,15\text{g}$
- Peso da água:  $69,15\text{g} - 50\text{g} = 19,15$

Capacidade de campo:

$$19,15\text{g} \text{ _____ } 50\text{g}$$

$$X \text{ _____ } 100\text{ g, CC} = 38,3\%$$

1 – SVF:

$$20,85\text{g (água) _____ } 50\text{g de solo (para 100\% da CC)}$$

$$X \text{ _____ } 1000\text{g de solo (para 100\% da CC)}$$

$$X = 417\text{g de água (para 100\% da CC)}$$

$$417\text{g _____ } \text{para 100\% da CC}$$

$$X \text{ _____ } \text{para 75\% da CC}$$

$X = 312,75\text{ g de água para umedecer } 1\text{ Kg de solo virgem a } 75\% \text{ da sua capacidade de campo}$

2 – SCF:

$$19,15\text{g (água) _____ } 50\text{g de solo (para 100\% da CC)}$$

$$X \text{ _____ } 1000\text{g de solo (para 100\% da CC)}$$

$$X = 383\text{ g de água (para 100\% da CC)}$$

$$383\text{g _____ } \text{para 100\% da CC}$$

$$X \text{ _____ } \text{para 75\% da CC}$$

$X = 287,25$  g de água para umedecer 1 Kg de solo contaminado a 75 % da sua capacidade de campo

### 3. Preparo do Solo Relativo ao “T0”

As amostras de SVF e SCF relativas ao “T0” foram de umedecidas 75% de sua capacidade de campo. 1 Kg de solo de cada amostra(seca) foi colocado em sacos plásticos, o preparo se deu da seguinte forma:

1 – SVF:

20,85g (água) \_\_\_\_\_ 50g de solo (para 100% da CC)

X \_\_\_\_\_ 1000g de solo (para 100% da CC)

X = 417g de água (para 100% da CC)

417g \_\_\_\_\_ para 100% da CC

X \_\_\_\_\_ para 75% da CC

X = 312,75 g de água para umedecer 1 Kg de solo virgem a 75 % da sua capacidade de campo

2 – SCF:

19,15g (água) \_\_\_\_\_ 50g de solo (para 100% da CC)

X \_\_\_\_\_ 1000g de solo (para 100% da CC)

X = 383 g de água (para 100% da CC)

383g \_\_\_\_\_ para 100% da CC

X \_\_\_\_\_ para 75% da CC

X = 287,25 g de água para umedecer 1 Kg de solo contaminado a 75 % da sua capacidade de campo.

### 4. Doses de Água Levantadas Para 5 kg de solo de acordo com a capacidade de campo

SVF:

20,85g \_\_\_\_\_ 50g de solo (para 100% da CC)

X \_\_\_\_\_ 5000g de solo (para 100% da CC)

x = 2085g de água para umedecer 5 Kg de solo a 100% de sua capacidade de campo. Portanto para umedecer o solo a 75% temos:

2085 g \_\_\_\_\_ 100% da CC

X \_\_\_\_\_ 75% da CC, X = **1563,75g** de água para umedecer 5 Kg de solo virgem a 75% de sua capacidade de campo.

1563,75g de água divididos por 10 bandejas de 500g = **156,375g** de água por bandeja. Então cada uma das dez bandejas de SVF e SVF + I receberia lentamente com um pissete a quantidade de **156,37** g de água por bandeja.

SCF:

19,15g \_\_\_\_\_ 50g de solo (para 100% da CC)

X \_\_\_\_\_ 5000g de solo (para 100% da CC)

x = 1915g de água para umedecer o solo a 100% de sua capacidade de campo. Portanto para umedecer o solo a 75% temos:

1915g \_\_\_\_\_ 100% da CC

X \_\_\_\_\_ 75% da CC, X = **1436,25g** de água para umedecer 5 Kg de solo contaminado a 75% de sua capacidade de campo.

1436,25g de água divididos por 10 bandejas de 500g = 143,625 g de água por bandeja. Então cada uma das dez bandejas de SCF e SCF + I receberia lentamente com um pissete a quantidade de **143,62** g de água por bandeja. Resultados:

SVF = 156,37 g de água por bandeja

SCF = 143,62 g de água por bandeja

Diferença = SVF-SCF= 12,75g de água por bandeja

## 5. Cálculo da concentração de $\text{KNO}_3$ (nitrato de potássio)

A concentração da solução é de 100mg/L.

1L de solução de nitrato equivalem a 2,1kg (densidade 2,1g/mL).

$$X = 0,1 \text{ g} * 1000\text{mL} / 2100\text{g} \quad X = 0,0476 \text{ mL de nitrato para 1L de solução}$$

Para 1563,75 mL de água será necessário 0,0744345 mL de nitrato

## 6. Cálculo da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(peróxido de hidrogênio)

A concentração da solução é de 200mg/L.

1L de solução de peróxido equivalem a 0,35kg (densidade 1,1g/mL e concentração de 35% máxima na solução).

$$X = 0,2 \text{ g} * 1000\text{mL} / 350\text{g} \quad X = 0,5714 \text{ mL de peróxido para 1L de solução}$$

Para 1563,75 mL de água será necessário 0,893526

## ANEXO 2

## 7. Germinações

REPETIÇÕES								
1º germ 13/5/2005	1	2	3	4	5	6	7	8
SVF	10	12	12	11	12	12	12	12
SVF+I	10	12	11	12	12	12	12	12
SVF+I+N	10	12	11	12	12	12	12	12
SVF+I+P	12	12	12	11	11	12	11	12
SCF	4	8	11	11	11	11	9	12
SCF+I	10	9	9	10	9	11	11	5
SCF+I+N	10	10	8	7	9	10	7	7
SCF+I+P	7	6	8	7	7	10	8	11

REPETIÇÕES								
2º germ 20/5/2005	1	2	3	4	5	6	7	8
SVF	10	12	12	11	12	12	12	12
SVF+I	10	12	11	12	12	12	12	12
SVF+I+N	10	12	11	12	12	12	12	12
SVF+I+P	12	12	12	11	11	12	11	12
SCF	6	9	11	11	11	11	9	12
SCF+I	10	9	9	10	9	11	11	5
SCF+I+N	12	10	9	8	9	11	7	11
SCF+I+P	8	6	8	7	7	10	8	11

REPETIÇÕES								
3º germ 28/5/2005	1	2	3	4	5	6	7	8
SVF	12	12	12	11	12	12	12	
SVF+I	11	12	11	12	12	12	12	
SVF+I+N	11	12	11	12	12	12	12	
SVF+I+P	11	12	12	12	12	12	11	
SCF	9	12	12	11	11	11	11	12
SCF+I	10	10	9	10	9	11	10	6
SCF+I+N	12	10	10	10	9	11	7	
SCF+I+P	9	10	10	8	8	12	12	11

## ANEXO 3

### 8. Seqüência de Desmanche das Repetições Com o Número de Plantas Sobreviventes e Datas Relativas

		REPETIÇÕES							
T3	08/06/05	1	2	3	4	5	6	7	8
	SVF	12	11	12	11	12	12	12	
	SVF+I	10	12	11	12	12	12	12	
	SVF+I+N	11	12	11	12	12	12	12	
	SVF+I+P	11	12	12	11	11	12	9	
	SCF	6	12	11	11	11	9	11	9
	SCF+I	10	9	9	10	9	11	10	5
	SCF+I+N	11	10	10	10	9	11	6	
	SCF+I+P	3	10	8	7	7	12	12	11

		REPETIÇÕES							
T4	18/07/05	1	2	3	4	5	6	7	8
	SVF	11	X	11	8	12	12	12	
	SVF+I	X	11	11	11	11	11	12	
	SVF+I+N	10	12	X	12	12	11	12	
	SVF+I+P	11	11	11	11	11	12	X	
	SCF	X	8	11	9	10	9	11	9
	SCF+I	10	9	9	9	9	11	10	X
	SCF+I+N	11	10	10	9	9	11	X	
	SCF+I+P	X	9	7	7	7	12	11	10

		REPETIÇÕES							
T5	10/08/05	1	2	3	4	5	6	7	8
	SVF	11	X	10	X	11	12	12	
	SVF+I	X	11	10	X	12	11	12	
	SVF+I+N	X	12	X	12	11	11	12	
	SVF+I+P	X	10	10	11	10	11	X	
	SCF	X	X	7	7	3	6	9	9
	SCF+I	4	7	3	7	X	8	5	X
	SCF+I+N	7	9	7	7	X	6	X	
	SCF+I+P	X	5	6	7	X	5	2	7

		REPETIÇÕES							
T6	06/09/05	1	2	3	4	5	6	7	8
	SVF	X	X	9	X	11	11	12	5
	SVF+I	X	11	10	X	12	X	12	
	SVF+I+N	X	12	X	X	10	11	12	
	SVF+I+P	X	9	10	X	8	10	X	
	SCF	X	X	X	5	2	3	5	5
	SCF+I	3	4	2	X	X	5	2	5
	SCF+I+N	4	X	4	5	X	2	X	
	SCF+I+P	X	5	4	X	X	3	1	5

#### LEGENDA

 REPETIÇÕES DESMANCHADAS NO TEMPO REFERENTE

 REPETIÇÕES PERDIDAS POR ALAGAMENTO

 REPETIÇÕES DESMANCHADAS A MAIS DE UM TEMPO



Anova: fator duplo sem repetição

pH dos tempos 1 ao 6

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	12	60,67	5,055833	0,284845
Linha 2	12	58,23	4,8525	0,403439
Linha 3	12	56,28	4,69	0,400818
Linha 4	12	56,57	4,714167	0,415372
Linha 5	12	55,57	4,630833	0,452481
Linha 6	12	55,2	4,6	0,450873
Linha 7	12	56,36	4,696667	0,481988
Linha 8	12	55,19	4,599167	0,500827
Coluna 1	8	40,34	5,0425	0,013164
Coluna 2	8	39,37	4,92125	0,025955
Coluna 3	8	38,73	4,84125	0,060355
Coluna 4	8	33,9	4,2375	0,148193
Coluna 5	8	40,58	5,0725	0,01765
Coluna 6	8	37,7	4,7125	0,087279
Coluna 7	8	33,87	4,23375	0,157798
Coluna 8	8	33,03	4,12875	0,190641
Coluna 9	8	32,09	4,01125	0,013698
Coluna 10	8	32,22	4,0275	0,005736
Coluna 11	8	46,81	5,85125	0,001241
Coluna 12	8	45,43	5,67875	0,000727

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	2,015841	7	0,287977	7,29123	1,07E-06	2,130989
Colunas	34,25584	11	3,114167	78,84688	2,99E-37	1,915303
Erro	3,041222	77	0,039496			
Total	39,3129	95				

Os resultados de pH mostraram diferenças estatisticamente representativas apenas as colunas, no caso esta não é referente aos tempos mais sim aos dois diferentes métodos de análise.

## 9.2 Médias de germinação de todas as repetições

Trat.	Médias das repetições		
	48 Hs	7 dias	16 dias
SVF	96,875	96,875	98,80952
SVF+I	96,875	96,875	97,61905
SVF+I+N	96,875	96,875	97,61905
SVF+I+P	96,875	96,875	97,61905
SCF	80,20833	83,33333	92,70833
SCF+I	77,08333	77,08333	78,125
SCF+I+N	70,83333	80,20833	82,14286
SCF+I+P	66,66667	67,70833	83,33333

Anova: fator duplo sem repetição

Médias de germinação de todas as repetições

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	3	292,5595	97,51984	1,247461
Linha 2	3	291,369	97,12302	0,184536
Linha 3	3	291,369	97,12302	0,184536
Linha 4	3	291,369	97,12302	0,184536
Linha 5	3	256,25	85,41667	42,31771
Linha 6	3	232,2917	77,43056	0,36169
Linha 7	3	233,1845	77,72817	36,58972
Linha 8	3	217,7083	72,56944	87,16725
Coluna 1	8	682,2917	85,28646	169,4065
Coluna 2	8	695,8333	86,97917	131,4484
Coluna 3	8	727,9762	90,99702	71,19068

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	2405,495	7	343,6421	24,1972	8,61E-07	2,764196
Colunas	137,6507	2	68,82533	4,846264	0,025155	3,73889
Erro	198,8242	14	14,20173			
Total	2741,97	23				

Os resultados de media de germinação apresentaram diferenças estatísticas representativas apenas entre os tratamentos e não entre os diferentes dias após a semeadura.

### 9.3 Peso seco total

	PA	RAIZ								
SVF	0,1885	0,0488	0,2233	0,1698	0,1586	0,0958	0,1039	0,063		
SVF+I	0,1796	0,1369	0,1508	0,1075	0,1547	0,2118	0,1381	0,1329		
SVF+N	0,1107	0,0521	0,0695	0,0445	0,0721	0,0511	0,1232	0,0547		
SVF+P	0,1765	0,1103	0,0686	0,0547	0,0744	0,0539	0,1182	0,0952		
SCF	0,0012	0,002	0,0009	0,0014	0,0016	0,0014	0,0013	0,0013	0,0008	0,002
SCF+I	0,0011	0,0015	0,0005	0,0008	0,0012	0,0012	0,0012	0,0021	0,0008	0,0011
SCF+N	0,0035	0,0033	0,0021	0,0035	0,0018	0,0037	0,0011	0,0011		
SCF+P	0,0012	0,0023	0,0011	0,003	0,0012	0,0014	0,0007	0,0008	0,0013	0,0018

Nota: Dados desconsiderados

Anova: fator duplo sem repetição

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	8	1,0517	0,131463	0,003921
Linha 2	8	1,2123	0,151538	0,001016
Linha 3	8	0,5779	0,072238	0,000859
Linha 4	8	0,7518	0,093975	0,001692
Linha 5	8	0,0111	0,001388	1,01E-07
Linha 6	8	0,0096	0,0012	2,23E-07
Linha 7	8	0,0201	0,002513	1,24E-06
Linha 8	8	0,0117	0,001463	6,23E-07
Coluna 1	8	0,6623	0,082788	0,008054
Coluna 2	8	0,3572	0,04465	0,002868
Coluna 3	8	0,5168	0,0646	0,006966
Coluna 4	8	0,3852	0,04815	0,003834
Coluna 5	8	0,4656	0,0582	0,004676
Coluna 6	8	0,4203	0,052538	0,005356
Coluna 7	8	0,4877	0,060963	0,004184
Coluna 8	8	0,3511	0,043888	0,002612

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	0,226728	7	0,03239	36,80214	2,15E-17	2,20323
Colunas	0,009301	7	0,001329	1,509673	0,186175	2,20323
Erro	0,043125	49	0,00088			
Total	0,279154	63				

Os resultados de peso seco total apresentaram diferenças estatisticamente significativas apenas entre os tratamentos e não entre as repetições finais e entre a parte aérea e radicular das plantas relativas.

### 9.4 Peso seco por planta

PA	RAIZ	PA	RAIZ	PA	RAIZ	PA	RAIZ	PA	RAIZ
0,020944	0,005422	0,0203	0,015436	0,013217	0,007983	0,008658	0,00525	-	-
0,016327	0,012445	0,01508	0,01075	0,012892	0,01765	0,011508	0,011075	-	-
0,009225	0,004342	0,00695	0,00445	0,006555	0,004645	0,010267	0,004558	-	-
0,019611	0,012256	0,00686	0,00547	0,0093	0,006738	0,01182	0,00952	-	-
0,00024	0,0004	0,00045	0,0007	0,000533	0,000467	0,00026	0,00026	0,00016	0,0004
0,000367	0,0005	0,000125	0,0002	0,0006	0,0006	0,00024	0,00042	0,0004	0,00055
0,000875	0,000825	0,000525	0,000875	0,00036	0,00074	0,00055	0,00055	-	-
0,00024	0,00046	0,000275	0,00075	0,0004	0,000467	0,0007	0,0008	0,00026	0,00036

Anova: fator duplo sem repetição

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	8	0,097211	0,012151	3,97E-05
Linha 2	8	0,107728	0,013466	6,66E-06
Linha 3	8	0,050992	0,006374	5,39E-06
Linha 4	8	0,081574	0,010197	2,03E-05
Linha 5	8	0,00331	0,000414	2,54E-08
Linha 6	8	0,003052	0,000381	3,29E-08
Linha 7	8	0,0053	0,000663	3,69E-08
Linha 8	8	0,004092	0,000511	4,61E-08
Coluna 1	8	0,067829	0,008479	8,58E-05
Coluna 2	8	0,03665	0,004581	2,67E-05
Coluna 3	8	0,050565	0,006321	5,94E-05
Coluna 4	8	0,038631	0,004829	3,13E-05
Coluna 5	8	0,043856	0,005482	3,3E-05
Coluna 6	8	0,03929	0,004911	3,58E-05
Coluna 7	8	0,044003	0,0055	3,02E-05
Coluna 8	8	0,032433	0,004054	1,88E-05

#### ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	0,001847	7	0,000264	32,36418	2,8E-16	2,20323
Colunas	0,000106	7	1,52E-05	1,860873	0,096674	2,20323
Erro	0,000399	49	8,15E-06			
Total	0,002353	63				

Os resultados de peso seco nas repetições finais apresentaram diferenças estatisticamente significativas apenas entre os tratamentos, e não entre as repetições finais e entre a parte aérea e radicular das plantas relativas.

## 9.5 TPH

Trat.	TO	T1	T3	T6
	28/mar	30/mar	8/jun	6/set
	□g/g	□g/g	□g/g	□g/g
SVF	169	411	57	520
SVF+I	169	256	1368	7238
SVF+I+N	169	508	933	1345
SVF+I+P	169	322	1059	524
SCF	18465	1987	9743	6955
SCF+I	18465	14697	11134	9397
SCF+I+N	18465	13980	12829	9104
SCF+I+P	18465	10671	11476	10219

Em vermelho resultados repetidos pra gerar o ponto de partida.

Anova: fator duplo sem repetição

TPH

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	4	1157	289,25	45489,58
Linha 2	4	9031	2257,75	11321475
Linha 3	4	2955	738,75	261044,3
Linha 4	4	2074	518,5	150977,7
Linha 5	4	37150	9287,5	47723948
Linha 6	4	53693	13423,25	16164346
Linha 7	4	54378	13594,5	14873654
Linha 8	4	50831	12707,75	15001788
Coluna 1	8	74536	9317	95641033
Coluna 2	8	42832	5354	42933471
Coluna 3	8	48599	6074,875	31972516
Coluna 4	8	45302	5662,75	17456451

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	1,08E+09	7	1,54E+08	13,73494	1,46E-06	2,487582
Colunas	80710242	3	26903414	2,394781	0,097047	3,072472
Erro	2,36E+08	21	11234187			
Total	1,4E+09	31				

Os resultados de TPH entre os diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, porem entre tratamentos apresentaram diferenças

### 9.6 Relação da respiração dos mesmos tratamentos em tempos diferentes

		7	14	21	28
T0	SCF	422,35	186,63	160,74	
T1	SCF	376,88	168,00	206,54	
T2	SCF	87,25	124,23	69,39	34,38
T3	SCF	38,98	48,92	51,02	67,23
T4	SCF	36,09	48,25	38,48	40,95
T5	SCF	47,83	85,87	64,77	49,30
T6	SCF	64,85	53,56	54,48	67,99

Anova: fator duplo sem repetição  
7,14,21 DIAS

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	3	769,7166	256,5722	20779,55
Linha 2	3	751,4176	250,4725	12355,45
Linha 3	3	280,8636	93,62121	782,4755
Linha 4	3	138,9173	46,30578	41,40946
Linha 5	3	122,8113	40,93709	41,49239
Linha 6	3	198,4682	66,15606	363,3281
Linha 7	3	172,8813	57,62709	39,31058
Coluna 1	7	1074,215	153,4593	28749,45
Coluna 2	7	715,4615	102,2088	3387,665
Coluna 3	7	645,3995	92,19992	4174,624

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	164183,3	6	27363,88	6,11629	0,003906	2,996117
Colunas	15118,83	2	7559,417	1,689658	0,225666	3,88529
Erro	53687,2	12	4473,934			
Total	232989,3	20				

Os resultados de SCF apresentaram uma pequena diferença estatística entre os tempos, mas não entre as semanas.

Anova: fator duplo sem repetição

7,14, 21 e 28 DIAS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	4	315,2484	78,81211	1398,888
Linha 2	4	206,1476	51,5369	137,0646
Linha 3	4	163,7651	40,94128	27,66166
Linha 4	4	247,7692	61,9423	313,242
Linha 5	4	240,8696	60,2174	53,04594
Coluna 1	5	274,9836	54,99672	450,6513
Coluna 2	5	360,8299	72,16597	1089,37
Coluna 3	5	278,1283	55,62565	147,3931
Coluna 4	5	259,8582	51,97164	231,7952

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	3135,975	4	783,9937	2,071835	0,147802	3,25916
Colunas	1248,843	3	416,281	1,100093	0,386938	3,4903
Erro	4540,865	12	378,4054			
Total	8925,683	19				

Os resultados de SCF entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas

		7	14	21	28
T1	SCF+I	377,81	167,22	185,81	
T2	SCF+I	90,10	149,31	82,50	54,95
T3	SCF+I	38,25	61,22	68,76	76,05
T4	SCF+I	33,91	52,60	47,51	42,21
T5	SCF+I	55,31	98,69	64,88	54,14
T6	SCF+I	60,04	62,27	61,03	68,97

Anova: fator duplo sem repetição

7,14, 21 DIAS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	730,8523	243,6174	13592,99
Linha 2	3	321,9067	107,3022	1337,785
Linha 3	3	168,237	56,07899	252,6265
Linha 4	3	134,0142	44,67142	93,29613
Linha 5	3	218,8865	72,96215	519,3857
Linha 6	3	183,3438	61,11459	1,246981
Coluna 1	6	655,4273	109,2379	17708,21
Coluna 2	6	591,3094	98,55157	2422,784
Coluna 3	6	510,5037	85,08396	2563,651

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	83636,57	5	16727,31	5,606291	0,010182	3,325837
Colunas	1757,971	2	878,9857	0,294599	0,751077	4,102816
Erro	29836,68	10	2983,668			
Total	115231,2	17				

Os resultados de SCF+I apresentaram uma pequena diferença estatística entre os tempos, mas não entre as semanas.

Anova: fator duplo sem repetição  
7,14, 21, 28 DIAS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	4	376,8521	94,21303	1577,167
Linha 2	4	244,2893	61,07233	268,1512
Linha 3	4	176,2231	44,05579	63,71341
Linha 4	4	273,0299	68,25749	434,7926
Linha 5	4	252,3121	63,07802	16,25159
Coluna 1	5	277,6131	55,52262	495,3014
Coluna 2	5	424,0862	84,81723	1613,741
Coluna 3	5	324,6889	64,93778	160,5496
Coluna 4	5	296,3184	59,26369	177,942

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	5261,392	4	1315,348	3,485332	0,041391	3,25916
Colunas	2551,484	3	850,4946	2,253591	0,134508	3,4903
Erro	4528,744	12	377,3953			
Total	12341,62	19				

Os resultados de SCF+I entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

		7	14	21	28
T1	SCF+I+N	363,98	200,78	205,39	
T2	SCF+I+N	83,54	136,79	80,81	60,19
T3	SCF+I+N	37,33	73,55	76,85	90,27
T4	SCF+I+N	40,66	76,90	49,34	46,82
T5	SCF+I+N	59,64	93,53	79,46	62,26
T6	SCF+I+N	71,69	64,49	67,94	74,43

Anova: fator duplo sem repetição

7,14, 21

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	770,153	256,7177	8633,463
Linha 2	3	301,1291	100,3764	996,1175
Linha 3	3	187,7262	62,57538	480,9018
Linha 4	3	166,9024	55,63413	357,9184
Linha 5	3	232,6288	77,54292	289,7991
Linha 6	3	204,1122	68,03741	12,97995
Coluna 1	6	656,8329	109,4721	15858,96
Coluna 2	6	646,0324	107,6721	2738,732
Coluna 3	6	559,7863	93,29772	3151,828

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	88148,21	5	17629,64	8,558323	0,002212	3,325837
Colunas	942,9485	2	471,4742	0,228878	0,79948	4,102816
Erro	20599,41	10	2059,941			
Total	109690,6	17				

Os resultados de SCF+I+N apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos, mas não entre as semanas.

Anova: fator duplo sem repetição

7,14, 21, 28

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	4	361,3229	90,33072	1067,739
Linha 2	4	277,9992	69,49979	512,391
Linha 3	4	213,7215	53,43038	258,0383
Linha 4	4	294,8855	73,72137	251,6162
Linha 5	4	278,5406	69,63516	18,86453
Coluna 1	5	292,8576	58,57152	392,1515
Coluna 2	5	445,2491	89,04982	822,5036
Coluna 3	5	354,3919	70,87839	170,0872
Coluna 4	5	333,9711	66,79422	268,1734

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	2773,457	4	693,3642	2,167776	0,134605	3,25916
Colunas	2487,74	3	829,2468	2,592608	0,101072	3,4903
Erro	3838,206	12	319,8505			
Total	9099,403	19				

Os resultados de SCF+I+N entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

		7	14	21	28
T1	SCF+I+P	409,41	219,19	211,50	
T2	SCF+I+P	90,64	162,01	85,78	43,13
T3	SCF+I+P	38,18	66,60	71,12	73,58
T4	SCF+I+P	30,96	66,51	47,83	41,78
T5	SCF+I+P	65,29	92,64	72,94	56,75
T6	SCF+I+P	57,80	68,82	55,37	66,55

Anova: fator duplo sem repetição

7,14,21 DIAS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	840,0972	280,0324	12568,42
Linha 2	3	338,4269	112,809	1821,137
Linha 3	3	175,9019	58,63395	319,0346
Linha 4	3	145,2979	48,43264	316,301
Linha 5	3	230,87	76,95668	199,0737
Linha 6	3	181,9968	60,66559	51,37413
Coluna 1	6	692,2733	115,3789	21195,39
Coluna 2	6	675,773	112,6288	4071,573
Coluna 3	6	544,5444	90,75739	3680,021

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	116368,5	5	23273,71	8,204676	0,002597	3,325837
Colunas	2184,281	2	1092,141	0,385012	0,690107	4,102816
Erro	28366,39	10	2836,639			
Total	146919,2	17				

Os resultados de SCF+I+P entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Anova: fator duplo sem repetição

7,14,21,28 DIAS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	4	381,553	95,38825	2428,017
Linha 2	4	249,4809	62,37022	268,5284
Linha 3	4	187,0747	46,76867	221,9426
Linha 4	4	287,6244	71,9061	234,7493
Linha 5	4	248,5479	62,13698	42,90937
Coluna 1	5	282,865	56,573	558,2394
Coluna 2	5	456,5801	91,31602	1682,698
Coluna 3	5	333,0484	66,60968	226,6879
Coluna 4	5	281,7873	56,35747	197,0794

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	5127,216	4	1281,804	2,780685	0,075923	3,25916
Colunas	4056,837	3	1352,279	2,933571	0,076688	3,4903
Erro	5531,603	12	460,9669			
Total	14715,66	19				

Os resultados de SCF+I+P entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

		7	14	21	28
T0	SVF	78,93	28,32	22,76	
T1	SVF	20,36	15,92	5,51	
T2	SVF	30,67	56,27	12,45	5,67
T3	SVF	15,31	5,29	2,34	18,30
T4	SVF	8,68	53,32	2,84	2,80
T5	SVF	11,97	51,75	23,87	7,33
T6	SVF	24,06	18,88	30,93	21,44

Anova: fator duplo sem repetição  
7,14,21 DIAS

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	3	130,0122	43,33739	957,8475
Linha 2	3	41,78861	13,92954	58,12807
Linha 3	3	99,38382	33,12794	484,6934
Linha 4	3	22,94665	7,648882	46,21776
Linha 5	3	64,83442	21,61147	762,4192
Linha 6	3	87,59529	29,19843	416,9602
Linha 7	3	73,87364	24,62455	36,53804
Coluna 1	7	189,98	27,14	576,8225
Coluna 2	7	229,7507	32,82153	431,0711
Coluna 3	7	100,7039	14,38628	132,4945

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	2564,576	6	427,4294	1,19903	0,370162	2,996117
Colunas	1247,856	2	623,9282	1,750251	0,215285	3,88529
Erro	4277,752	12	356,4793			
Total	8090,185	20				

Os resultados de SVF entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Anova: fator duplo sem repetição

7,14,21,28 DIAS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	4	105,049	26,26225	511,6795
Linha 2	4	41,24375	10,31094	59,15802
Linha 3	4	67,63544	16,90886	596,7377
Linha 4	4	94,9204	23,7301	397,5841
Linha 5	4	95,31764	23,82941	26,88766
Coluna 1	5	90,69051	18,1381	81,89003
Coluna 2	5	185,5103	37,10206	547,2382
Coluna 3	5	72,43302	14,4866	161,4708
Coluna 4	5	55,53243	11,10649	67,8641

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	684,0397	4	171,0099	0,746276	0,578907	3,25916
Colunas	2026,328	3	675,4426	2,947586	0,075841	3,4903
Erro	2749,813	12	229,1511			
Total	5460,181	19				

Os resultados de SVF entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

		7	14	21	28
T1	SVF+I	42,41	10,47	4,04	
T2	SVF+I	26,98	50,71	12,20	5,86
T3	SVF+I	17,59	4,97	7,71	18,36
T4	SVF+I	8,08	44,87	10,25	3,68
T5	SVF+I	14,21	38,62	22,70	4,64
T6	SVF+I	36,94	24,61	29,46	27,85

Anova: fator duplo sem repetição

7,14,21 DIAS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	56,91389	18,9713	422,3174
Linha 2	3	89,89622	29,96541	377,3113
Linha 3	3	30,26639	10,0888	44,06749
Linha 4	3	63,1956	21,0652	426,3335
Linha 5	3	75,5351	25,17837	153,5807
Linha 6	3	90,99612	30,33204	38,58942
Coluna 1	6	146,2069	24,36781	180,9485
Coluna 2	6	174,2504	29,04173	351,2108
Coluna 3	6	86,34612	14,39102	93,95155

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	878,2047	5	175,6409	0,779812	0,586306	3,325837
Colunas	672,0501	2	336,025	1,491887	0,271016	4,102816
Erro	2252,35	10	225,235			
Total	3802,604	17				

Os resultados de SVF+I entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Anova: fator duplo sem repetição  
7,14,21,28 DIAS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	4	95,75182	23,93795	396,8615
Linha 2	4	48,62171	12,15543	46,46216
Linha 3	4	66,87757	16,71939	359,7666
Linha 4	4	80,17082	20,0427	207,8873
Linha 5	4	118,8501	29,71253	27,26148
Coluna 1	5	103,7985	20,75969	128,5468
Coluna 2	5	163,7814	32,75627	335,5297
Coluna 3	5	82,30962	16,46192	85,27461
Coluna 4	5	60,38258	12,07652	113,2214

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	723,293	4	180,8232	1,126042	0,389684	3,25916
Colunas	1187,72	3	395,9067	2,465433	0,112359	3,4903
Erro	1926,997	12	160,5831			
Total	3838,01	19				

Os resultados de SVF+I entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

		7	14	21	28
T1	SVF+I+N	27,80	21,23	5,38	
T2	SVF+I+N	21,77	46,24	13,87	1,91
T3	SVF+I+N	16,61	9,61	10,76	30,94
T4	SVF+I+N	1,98	40,89	12,65	13,45
T5	SVF+I+N	14,92	36,17	20,41	10,52
T6	SVF+I+N	29,14	29,97	30,08	33,20

Anova: fator duplo sem repetição

7,14,21 dias

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	54,40628	18,13543	132,8969
Linha 2	3	81,88011	27,29337	284,8411
Linha 3	3	36,98316	12,32772	14,09437
Linha 4	3	55,51802	18,50601	404,0481
Linha 5	3	71,49978	23,83326	121,7432
Linha 6	3	89,18647	29,72882	0,267204
Coluna 1	6	112,211	18,70184	99,83774
Coluna 2	6	184,1062	30,68437	182,0574
Coluna 3	6	93,15659	15,5261	74,4989

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	633,0676	5	126,6135	1,102039	0,417105	3,325837
Colunas	766,8788	2	383,4394	3,33744	0,077569	4,102816
Erro	1148,903	10	114,8903			
Total	2548,849	17				

Os resultados de SVF+I+P entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Anova: fator duplo sem repetição  
7,14,21,28 DIAS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	4	83,7906	20,94765	350,9667
Linha 2	4	67,92275	16,98069	95,9967
Linha 3	4	68,9655	17,24138	275,7626
Linha 4	4	82,01713	20,50428	125,4905
Linha 5	4	122,383	30,59576	3,184473
Coluna 1	5	84,4123	16,88246	99,97114
Coluna 2	5	162,8739	32,57477	200,7696
Coluna 3	5	87,78139	17,55628	62,2114
Coluna 4	5	90,0115	18,0023	183,4892

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	489,1472	4	122,2868	0,864921	0,512395	3,25916
Colunas	857,5846	3	285,8615	2,021868	0,164616	3,4903
Erro	1696,618	12	141,3849			
Total	3043,35	19				

Os resultados de SVF+I+N entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

		7	14	21	28
T1	SVF+I+P	32,72	12,84	19,89	
T2	SVF+I+P	29,00	61,56	16,16	0,65
T3	SVF+I+P	9,84	11,17	18,07	36,04
T4	SVF+I+P	12,89	43,04	4,48	12,50
T5	SVF+I+P	11,55	38,28	18,13	21,20
T6	SVF+I+P	28,02	19,78	23,60	31,82

Anova: fator duplo sem repetição  
7,14,21 DIAS do T2 em diante.

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	65,45129	21,8171	101,658
Linha 2	3	106,7246	35,57488	547,8504
Linha 3	3	39,08166	13,02722	19,54336
Linha 4	3	60,40674	20,13558	410,9663
Linha 5	3	67,96698	22,65566	193,977
Linha 6	3	71,39955	23,79985	17,00495
Coluna 1	6	124,0271	20,67119	105,9577
Coluna 2	6	186,6669	31,11115	396,2292
Coluna 3	6	100,3368	16,7228	42,23988

#### ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	803,3492	5	160,6698	0,837352	0,55232	3,325837
Colunas	663,2151	2	331,6075	1,728216	0,226647	4,102816
Erro	1918,785	10	191,8785			
Total	3385,349	17				

Os resultados de SVF+I+P entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Anova: fator duplo sem repetição  
7,14,21,28 DIAS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	4	107,3765	26,84414	670,1368
Linha 2	4	75,11904	18,77976	145,3958
Linha 3	4	72,90291	18,22573	288,5677
Linha 4	4	89,16565	22,29141	129,8487
Linha 5	4	103,2212	25,80531	27,42414
Coluna 1	5	91,30303	18,26061	88,86523
Coluna 2	5	173,8298	34,76595	395,105
Coluna 3	5	80,44677	16,08935	49,79049
Coluna 4	5	102,2058	20,44117	207,0174

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	247,5536	4	61,88841	0,273484	0,889458	3,25916
Colunas	1068,561	3	356,1869	1,573983	0,246984	3,4903
Erro	2715,559	12	226,2966			
Total	4031,673	19				

Os resultados de SVF+I+P entre as mesmas semanas e nos diferentes tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas

### 9.7 Relação da respiração entre tratamentos

T0	7	14	21
SCF	422,35	186,63	160,74
SVF	78,93	28,32	22,76

Anova: fator duplo sem repetição

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	769,7166	256,5722	20779,55
Linha 2	3	130,0122	43,33739	957,8475
Coluna 1	2	501,2811	250,6405	58968,88
Coluna 2	2	214,948	107,474	12531,39
Coluna 3	2	183,4998	91,74988	9518,072

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	68203,64	1	68203,64	10,64459	0,082487	18,51276
Colunas	30660,1	2	15330,05	2,392573	0,294762	19,00003
Erro	12814,7	2	6407,35			
Total	111678,4	5				

Os resultados entre tratamentos e semanas do T0 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas

T1	7	14	21
SVF	20,36	15,92	5,51
SVF+I	42,41	10,47	4,04
SVF+I+N	27,80	21,23	5,38
SVF+I+P	32,72	12,84	19,89
SCF	376,88	168,00	206,54
SCF+I	377,81	167,22	185,81
SCF+I+N	363,98	200,78	205,39
SCF+I+P	409,41	219,19	211,50

Anova: fator duplo sem repetição

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	3	41,78861	13,92954	58,12807
Linha 2	3	56,91389	18,9713	422,3174
Linha 3	3	54,40628	18,13543	132,8969
Linha 4	3	65,45129	21,8171	101,658
Linha 5	3	751,4176	250,4725	12355,45
Linha 6	3	730,8523	243,6174	13592,99
Linha 7	3	770,153	256,7177	8633,463
Linha 8	3	840,0972	280,0324	12568,42
Coluna 1	8	1651,369	206,4211	35436,41
Coluna 2	8	815,662	101,9578	8909,036
Coluna 3	8	844,0492	105,5062	10788,6

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	346498,4	7	49499,78	17,57094	6,23E-06	2,764196
Colunas	56290,69	2	28145,35	9,990757	0,002015	3,73889
Erro	39439,94	14	2817,139			
Total	442229,1	23				

Os resultados entre tratamentos e semanas do T1 apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Embora as diferenças entre semanas apresentaram menores diferenças.

T2	7	14	21	28
SVF	30,67	56,27	12,45	5,67
SVF+I	26,98	50,71	12,20	5,86
SVF+I+N	21,77	46,24	13,87	1,91
SVF+I+P	29,00	61,56	16,16	0,65
SCF	87,25	124,23	69,39	34,38
SCF+I	90,10	149,31	82,50	54,95
SCF+I+N	83,54	136,79	80,81	60,19
SCF+I+P	90,64	162,01	85,78	43,13

Anova: fator duplo sem repetição

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	4	105,049	26,26225	511,6795
Linha 2	4	95,75182	23,93795	396,8615
Linha 3	4	83,7906	20,94765	350,9667
Linha 4	4	107,3765	26,84414	670,1368
Linha 5	4	315,2484	78,81211	1398,888
Linha 6	4	376,8521	94,21303	1577,167
Linha 7	4	361,3229	90,33072	1067,739
Linha 8	4	381,553	95,38825	2428,017
Coluna 1	8	459,9409	57,49262	1066,269
Coluna 2	8	787,1159	98,38949	2414,975
Coluna 3	8	373,1543	46,64429	1265,809
Coluna 4	8	206,7333	25,84166	630,3696

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	34768,64	7	4966,949	36,30162	2,44E-10	2,487582
Colunas	22331,05	3	7443,685	54,40317	4,48E-10	3,072472
Erro	2873,314	21	136,8245			
Total	59973,01	31				

Os resultados entre tratamentos e semanas do T2 apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

T3	7	14	21	28
SVF	15,31	5,29	2,34	18,30
SVF+I	17,59	4,97	7,71	18,36
SVF+I+N	16,61	9,61	10,76	30,94
SVF+I+P	9,84	11,17	18,07	36,04
SCF	38,98	48,92	51,02	67,23
SCF+I	38,25	61,22	68,76	76,05
SCF+I+N	37,33	73,55	76,85	90,27
SCF+I+P	38,18	66,60	71,12	73,58

Anova: fator duplo sem repetição

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	4	41,24375	10,31094	59,15802
Linha 2	4	48,62171	12,15543	46,46216
Linha 3	4	67,92275	16,98069	95,9967
Linha 4	4	75,11904	18,77976	145,3958
Linha 5	4	206,1476	51,5369	137,0646
Linha 6	4	244,2893	61,07233	268,1512
Linha 7	4	277,9992	69,49979	512,391
Linha 8	4	249,4809	62,37022	268,5284
Coluna 1	8	212,0792	26,5099	161,0048
Coluna 2	8	281,3312	35,1664	909,0907
Coluna 3	8	306,6498	38,33123	1007,037
Coluna 4	8	410,764	51,3455	814,8173

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	18189,48	7	2598,497	26,56471	4,55E-09	2,487582
Colunas	2545,273	3	848,4244	8,673532	0,000614	3,072472
Erro	2054,17	21	97,81764			
Total	22788,92	31				

Os resultados entre tratamentos e semanas do T3 apresentaram diferenças estatisticamente significativas, embora as diferenças entre semanas apresentaram menores diferenças.

T4	7	14	21	28
SVF	8,68	53,32	2,84	2,80
SVF+I	8,08	44,87	10,25	3,68
SVF+I+N	1,98	40,89	12,65	13,45
SVF+I+P	12,89	43,04	4,48	12,50
SCF	36,09	48,25	38,48	40,95
SCF+I	33,91	52,60	47,51	42,21
SCF+I+N	40,66	76,90	49,34	46,82
SCF+I+P	30,96	66,51	47,83	41,78

Anova: fator duplo sem repetição

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	4	67,63544	16,90886	596,7377
Linha 2	4	66,87757	16,71939	359,7666
Linha 3	4	68,9655	17,24138	275,7626
Linha 4	4	72,90291	18,22573	288,5677
Linha 5	4	163,7651	40,94128	27,66166
Linha 6	4	176,2231	44,05579	63,71341
Linha 7	4	213,7215	53,43038	258,0383
Linha 8	4	187,0747	46,76867	221,9426
Coluna 1	8	173,2476	21,65594	231,8493
Coluna 2	8	426,3596	53,29495	155,4067
Coluna 3	8	213,3735	26,67169	437,4269
Coluna 4	8	204,1852	25,52316	363,2964

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	7084,342	7	1012,049	17,25765	2,14E-07	2,487582
Colunas	5045,058	3	1681,686	28,67643	1,28E-07	3,072472
Erro	1231,513	21	58,6435			
Total	13360,91	31				

Os resultados entre tratamentos e semanas do T4 apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

T5	7	14	21	28
SVF	11,97	51,75	23,87	7,33
SVF+I	14,21	38,62	22,70	4,64
SVF+I+N	14,92	36,17	20,41	10,52
SVF+I+P	11,55	38,28	18,13	21,20
SCF	47,83	85,87	64,77	49,30
SCF+I	55,31	98,69	64,88	54,14
SCF+I+N	59,64	93,53	79,46	62,26
SCF+I+P	65,29	92,64	72,94	56,75

Anova: fator duplo sem repetição

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	4	94,9204	23,7301	397,5841
Linha 2	4	80,17082	20,0427	207,8873
Linha 3	4	82,01713	20,50428	125,4905
Linha 4	4	89,16565	22,29141	129,8487
Linha 5	4	247,7692	61,9423	313,242
Linha 6	4	273,0299	68,25749	434,7926
Linha 7	4	294,8855	73,72137	251,6162
Linha 8	4	287,6244	71,9061	234,7493
Coluna 1	8	280,7236	35,09045	573,9605
Coluna 2	8	535,5624	66,9453	790,6129
Coluna 3	8	367,1646	45,89558	716,8228
Coluna 4	8	266,1324	33,26655	605,8431

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	18268,34	7	2609,763	101,0541	9,93E-15	2,487582
Colunas	5743,299	3	1914,433	74,12981	2,44E-11	3,072472
Erro	542,3336	21	25,82541			
Total	24553,97	31				

Os resultados entre tratamentos e semanas do T5 apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

T6	7	14	21	28
SVF	24,06	18,88	30,93	21,44
SVF+I	36,94	24,61	29,46	27,85
SVF+I+N	29,14	29,97	30,08	33,20
SVF+I+P	28,02	19,78	23,60	31,82
SCF	64,85	53,56	54,48	67,99
SCF+I	60,04	62,27	61,03	68,97
SCF+I+N	71,69	64,49	67,94	74,43
SCF+I+P	57,80	68,82	55,37	66,55

Anova: fator duplo sem repetição

T6 Semanas e tratamentos

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	4	95,31764	23,82941	26,88766
Linha 2	4	118,8501	29,71253	27,26148
Linha 3	4	122,383	30,59576	3,184473
Linha 4	4	103,2212	25,80531	27,42414
Linha 5	4	240,8696	60,2174	53,04594
Linha 6	4	252,3121	63,07802	16,25159
Linha 7	4	278,5406	69,63516	18,86453
Linha 8	4	248,5479	62,13698	42,90937
Coluna 1	8	372,5323	46,56653	360,0185
Coluna 2	8	342,3715	42,79643	462,8456
Coluna 3	8	352,8861	44,11076	299,2041
Coluna 4	8	392,2525	49,03156	495,037

ANOVA

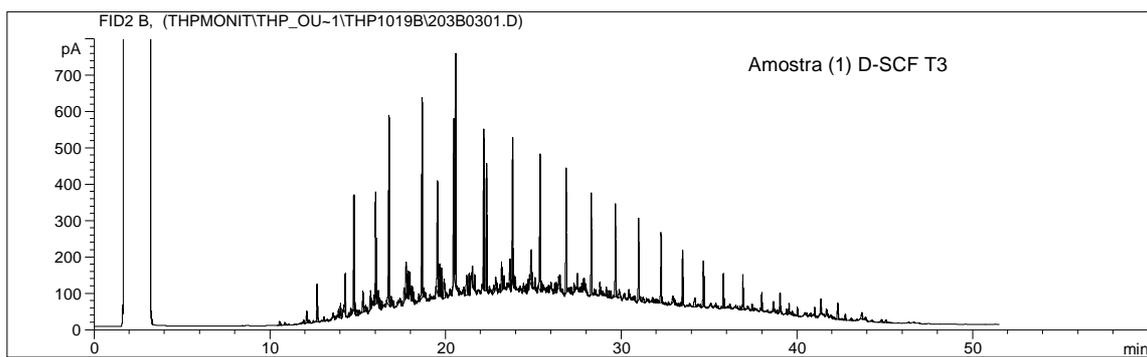
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	10854,53	7	1550,647	69,99778	3,99E-13	2,487582
Colunas	182,2788	3	60,75959	2,74275	0,068764	3,072472
Erro	465,2088	21	22,1528			
Total	11502,01	31				

Os resultados entre tratamentos do T6 apresentaram diferenças estatisticamente significativas, porem entre as diferentes semanas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

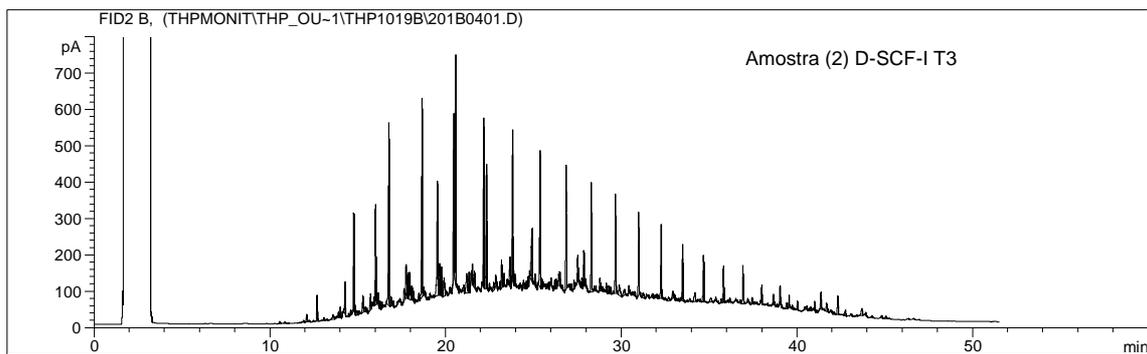
## ANEXO 5

### 1. CROMATOGRAMAS<sup>1</sup>

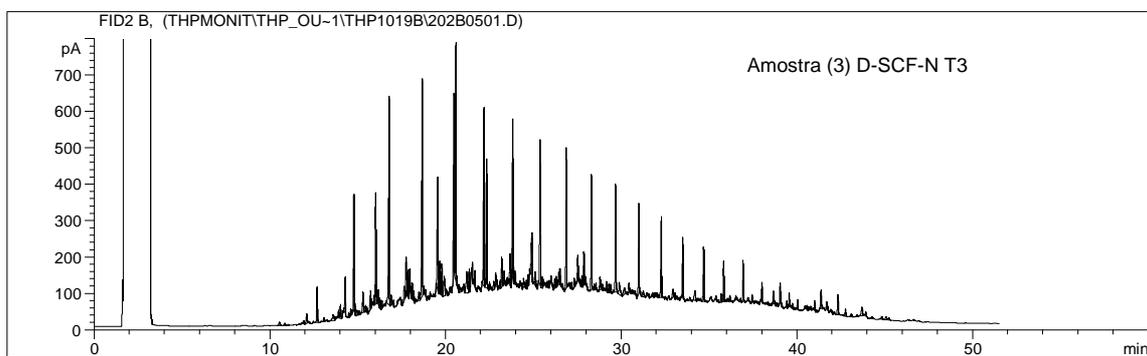
#### 1.1 Cromatogramas Relativos ao Tempo “T3”



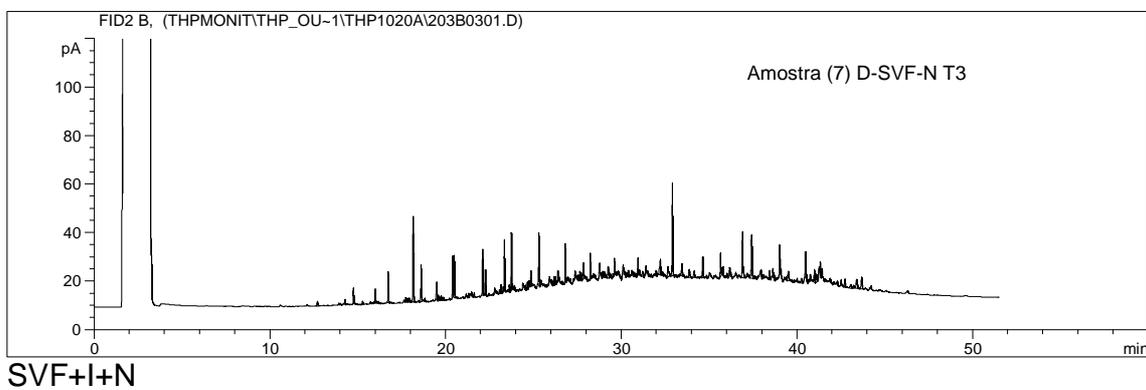
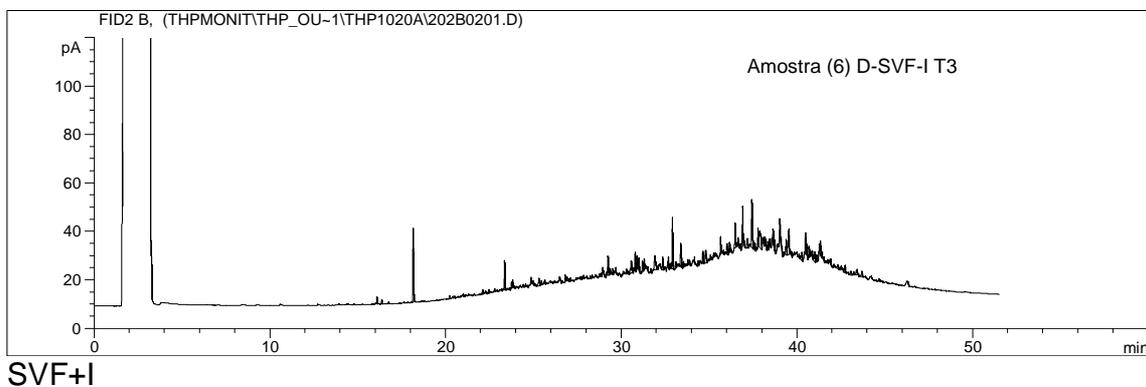
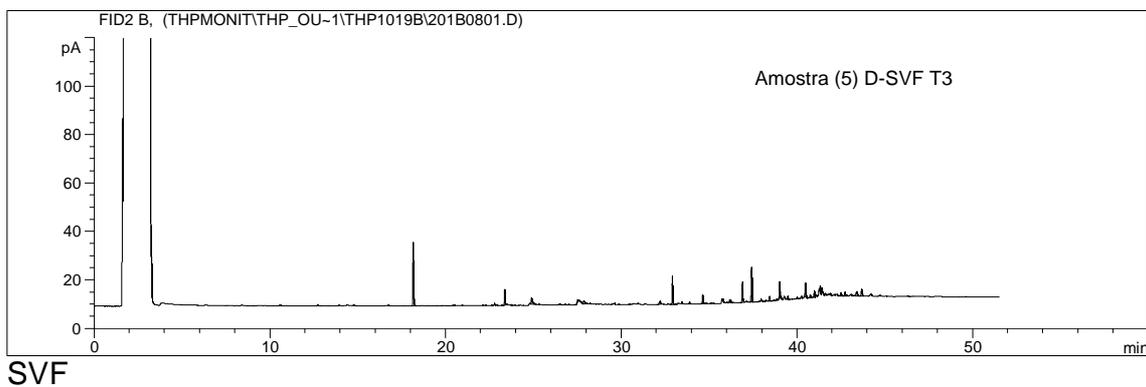
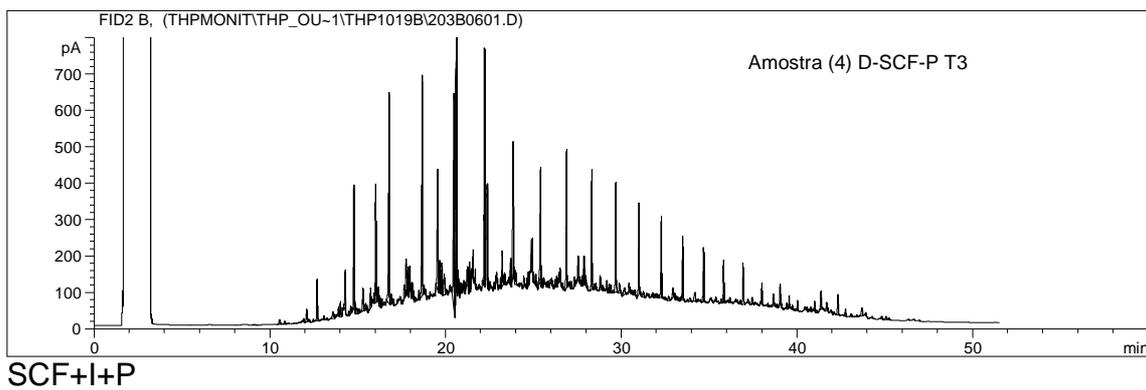
SCF

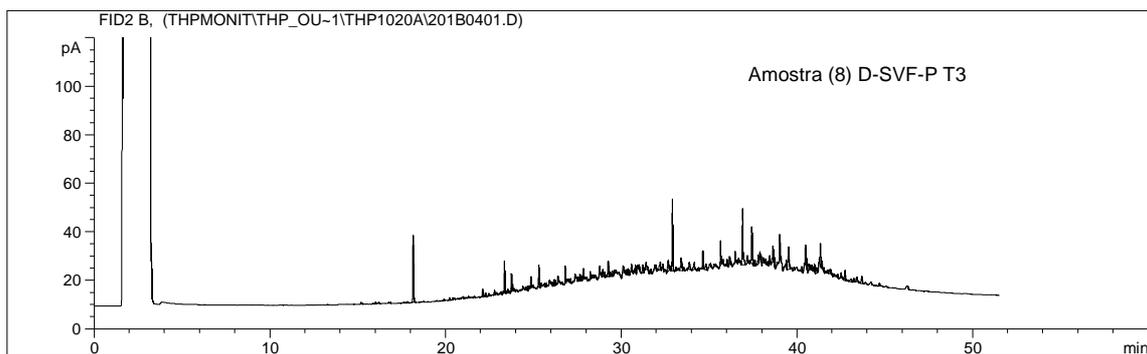


SCF+I



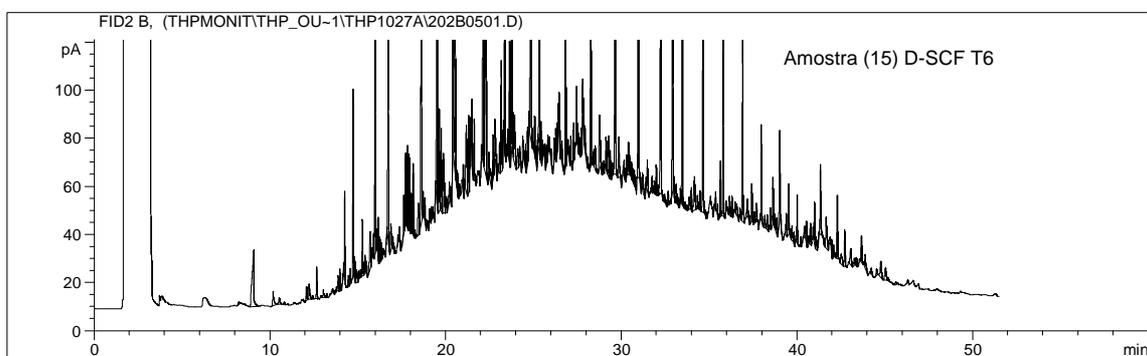
SCF+I+N



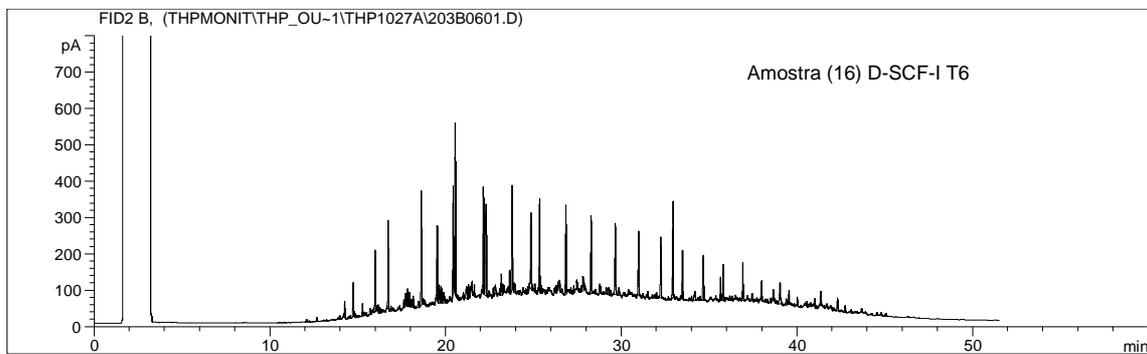


SVF+I+P

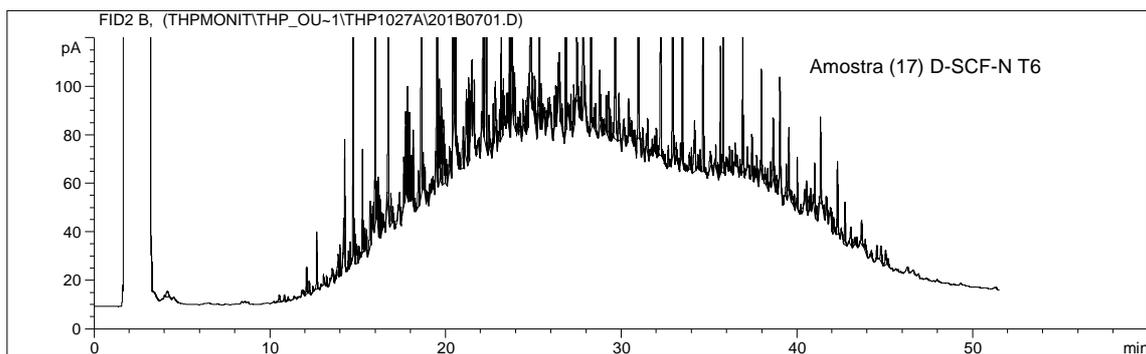
### 1.2 Cromatogramas Relativos ao Tempo "T6"



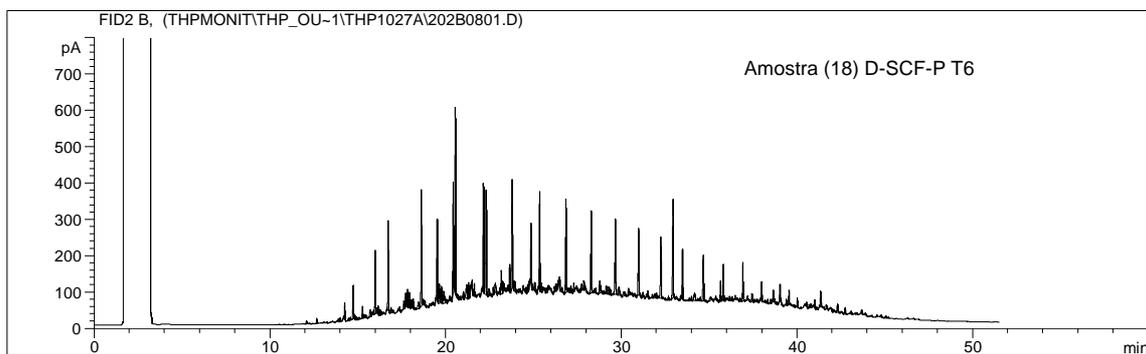
SCF



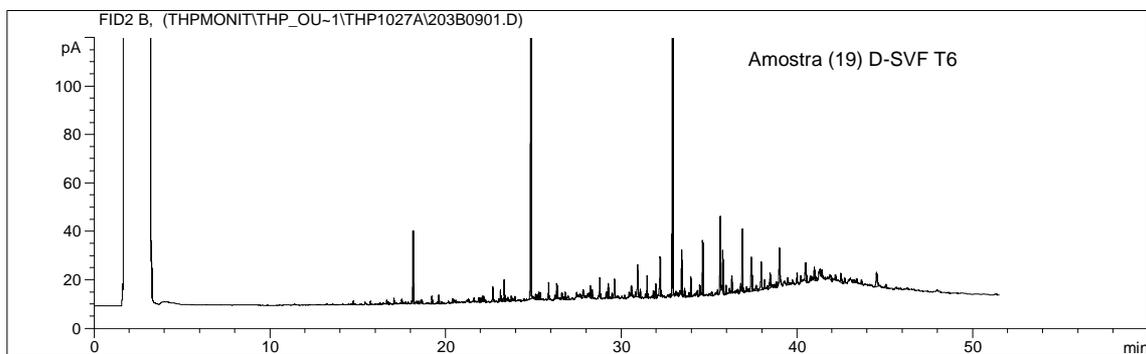
SCF+I



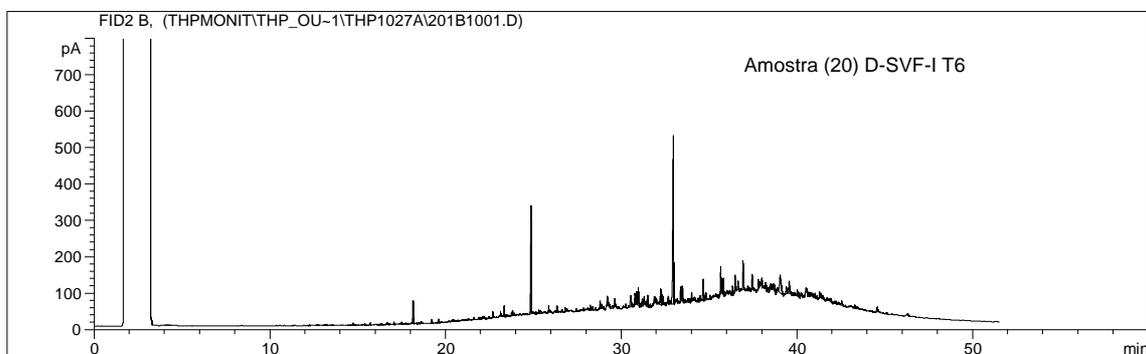
SCF+I+N



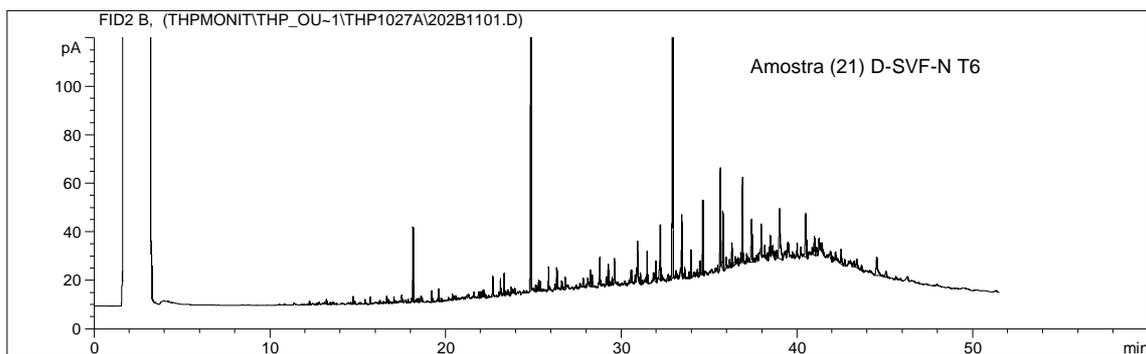
SCF+I+P



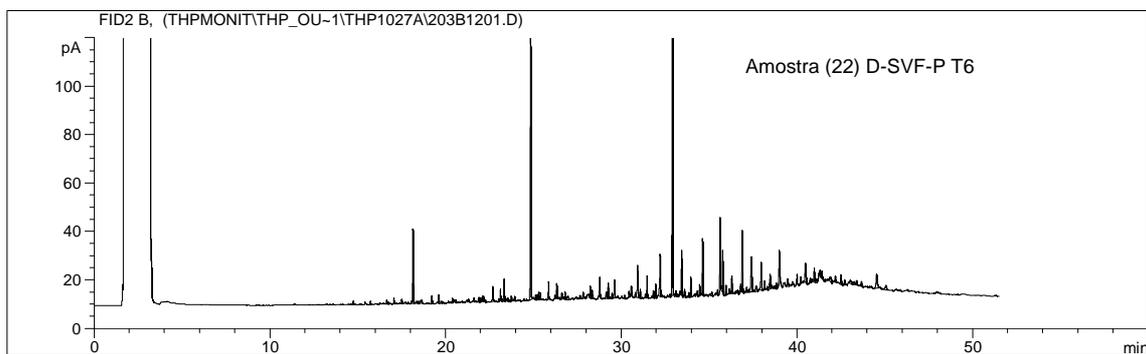
SVF



SVF+I



SVF+I+N



SVF+I+P

## ANEXO 6

Tempo 03 Solo Virgem (testemunho) Floresta Repetição 2, com 11 Plantas Sobreviventes



Tempo 03 Solo Contaminado Floresta Repetição 01, com 06 Plantas Sobreviventes



Tempo 03 Solo Virgem (testemunho) Floresta + Inóculo, Repetição 01 com 10 Plantas Sobreviventes



Tempo 03 Solo Contaminado Floresta + Inóculo Repetição 08 com 05 Plantas Sobreviventes.



Tempo 03 Solo Virgem Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 03 com 11 Plantas Sobreviventes



Tempo 03 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 07 com 06 Plantas Sobreviventes



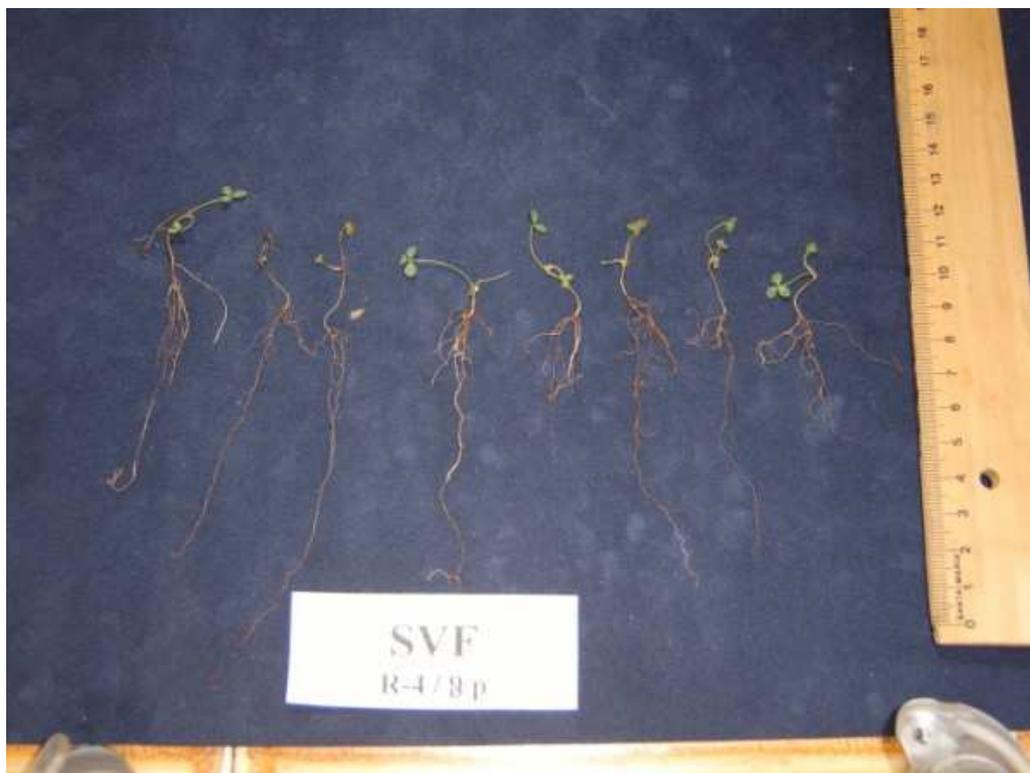
Tempo 03 Solo Virgem Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 07 com 09 Plantas Sobreviventes



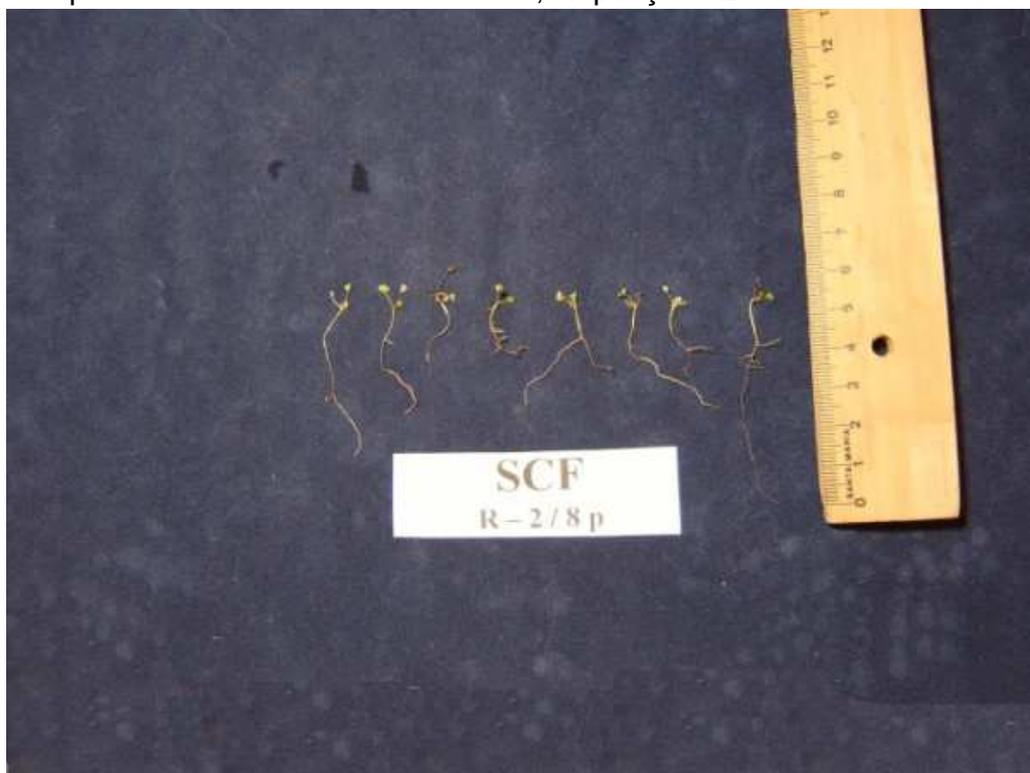
Tempo 03 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 01 com 03 Plantas Sobreviventes.



Tempo 04 Solo Virgem Floresta, Repetição 04 com 08 Plantas Sobreviventes



Tempo 04 Solo Contaminado Floresta, Repetição 02 com 08 Plantas Sobreviventes



Tempo 04 Solo Virgem Floresta + Inóculo, Repetição 04 com 11 Plantas Sobreviventes



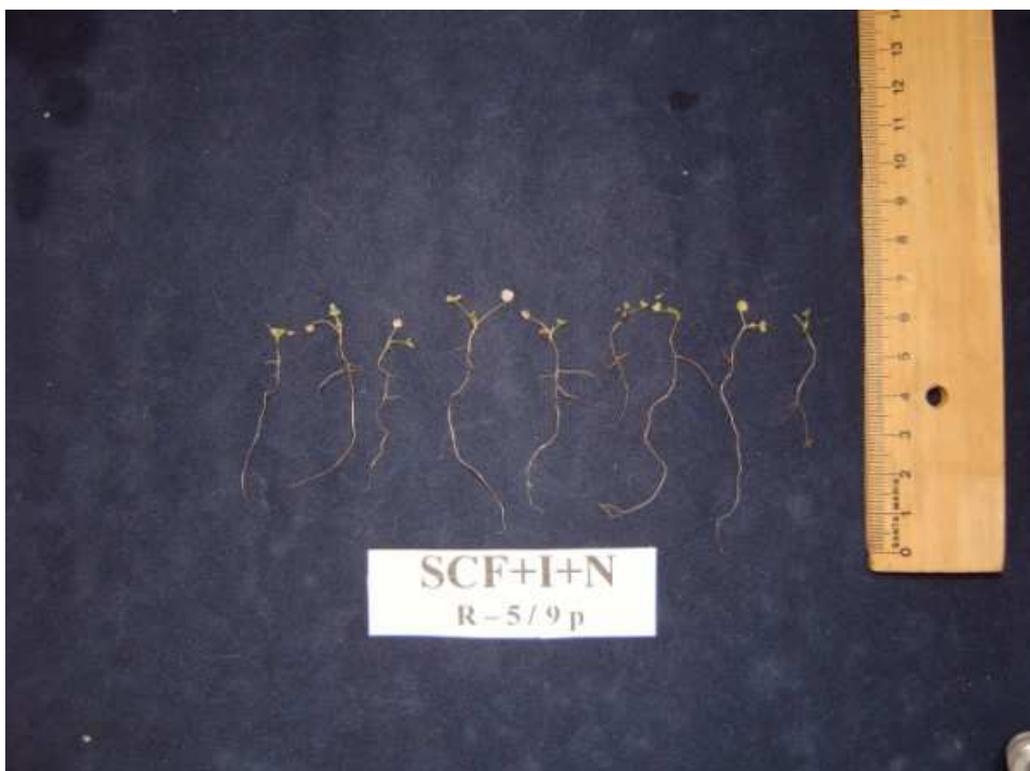
Solo Contaminado Floresta + Inóculo, Repetição 05 com 09 Plantas Sobreviventes



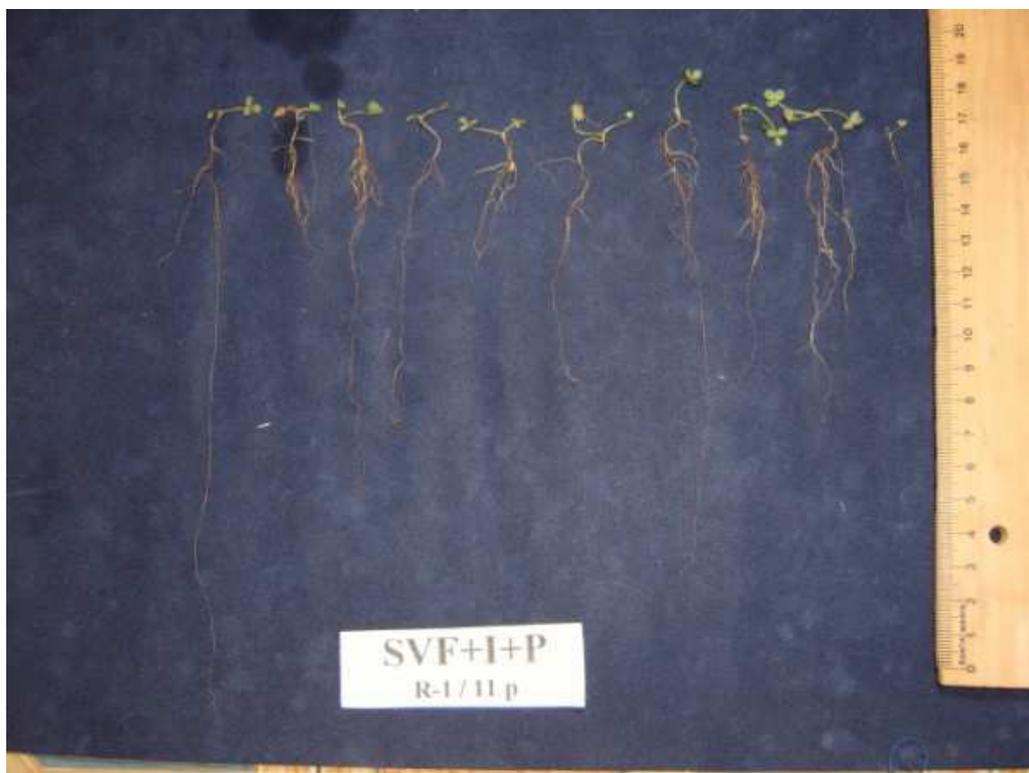
Solo Virgem Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 01 com 10 Plantas Sobreviventes



Tempo 04 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 05 com 09 Plantas Sobreviventes.



Tempo 04 Solo Virgem Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 01 com 11 Plantas Sobreviventes



Tempo 04 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 05, com 07 Plantas Sobreviventes



Tempo 05 /solo Virgem Floresta + Inóculo, Repetição 6 com 11 Plantas Sobreviventes



Tempo 05 Solo Contaminado Floresta + Inóculo, Repetição 4 com 07 Plantas Sobreviventes



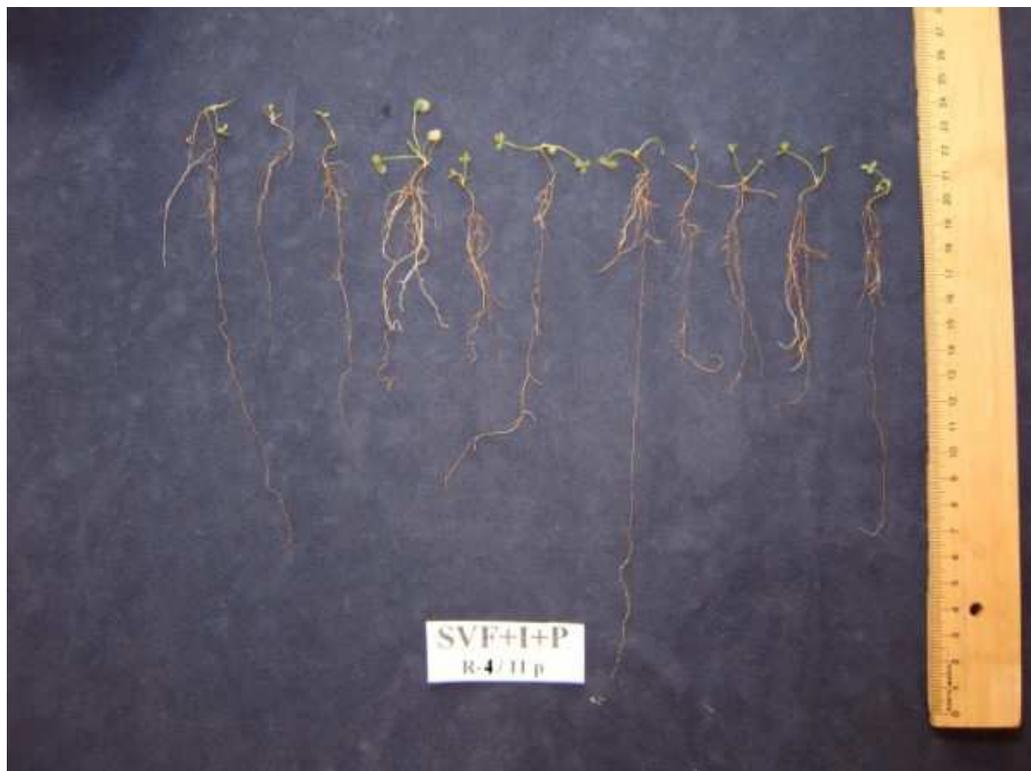
Solo Viegem Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 4 com 12 Plantas Sobreviventes



Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Nitrato, /Repetição 2 com )9 Plantas Sobreviventes



Tempo 05 Solo Virgem Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 4 com 11 Plantas Sobreviventes



Tempo 05 Solo Contaminado Floreta + Inóculo + Peróxido, Repetição 4 com 07 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta Repetição 03 com 09 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta Repetição 05 com 11 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta Repetição 06 com 11 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta Repetição 07 com 12 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta + Inóculo Repetição 02 com 11 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta + Inóculo Repetição 03 com 10 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta + Inóculo Repetição 05 com 12 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta + Inóculo Repetição 07 com 12 Plantas Sobreviventes



Solo Virgem Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 02 com 11 Plantas Sobreviventes



Solo Virgem Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 05 com 10 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 06 com 11 Plantas Sobreviventes



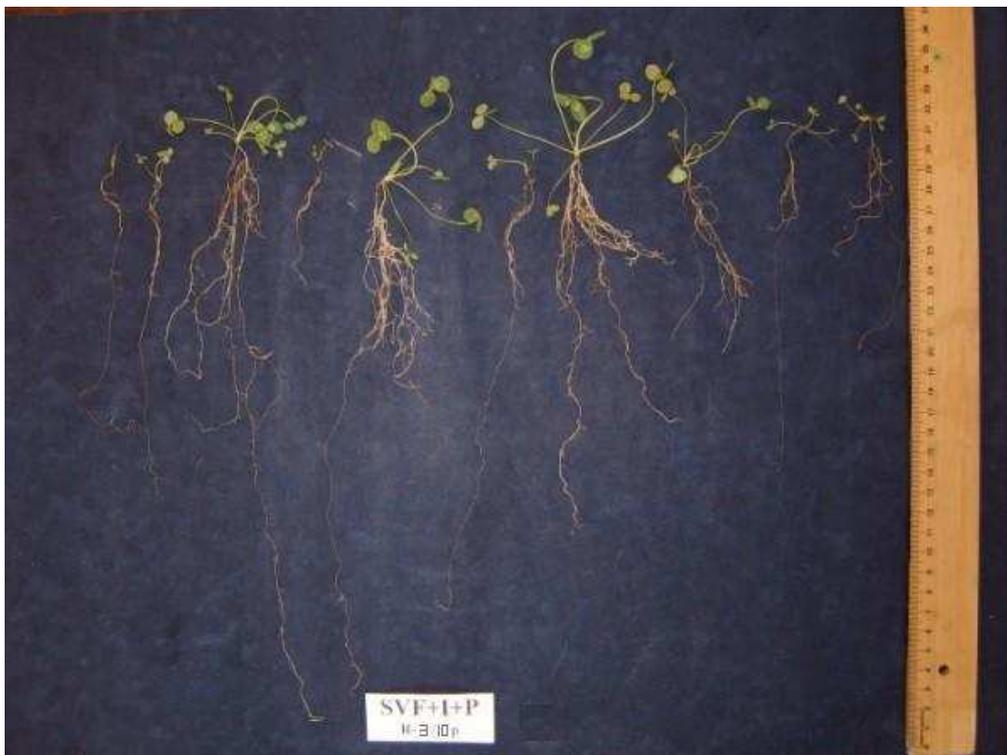
Tempo 06 Solo Virgem Floresta + Inóculo + Nitrato Repetição 07 com 12 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 02 com 09 Plantas Sobreviventes



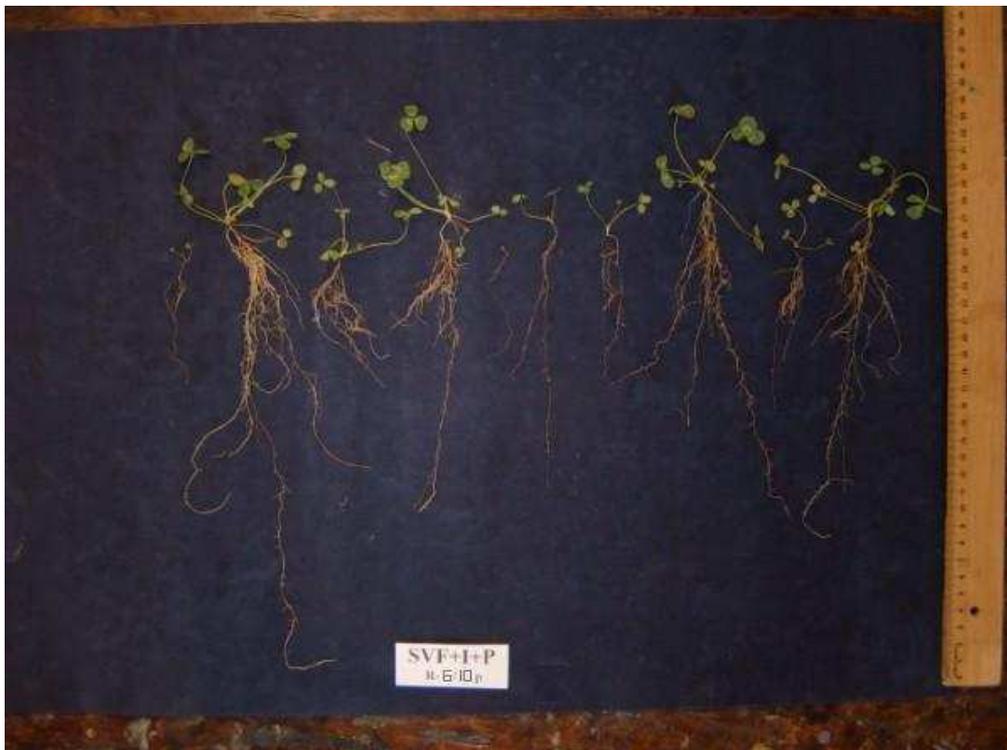
Tempo 06 Solo Virgem Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 03, com 10 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 05 com 08 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Virgem Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 06 com 10 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Contaminado Floresta Repetição 04, com 05 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Contaminado Floresta, Repetição 05 com 02 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Contaminado Floresta, Repetição 06 com 03 Plantas Sobreviventes



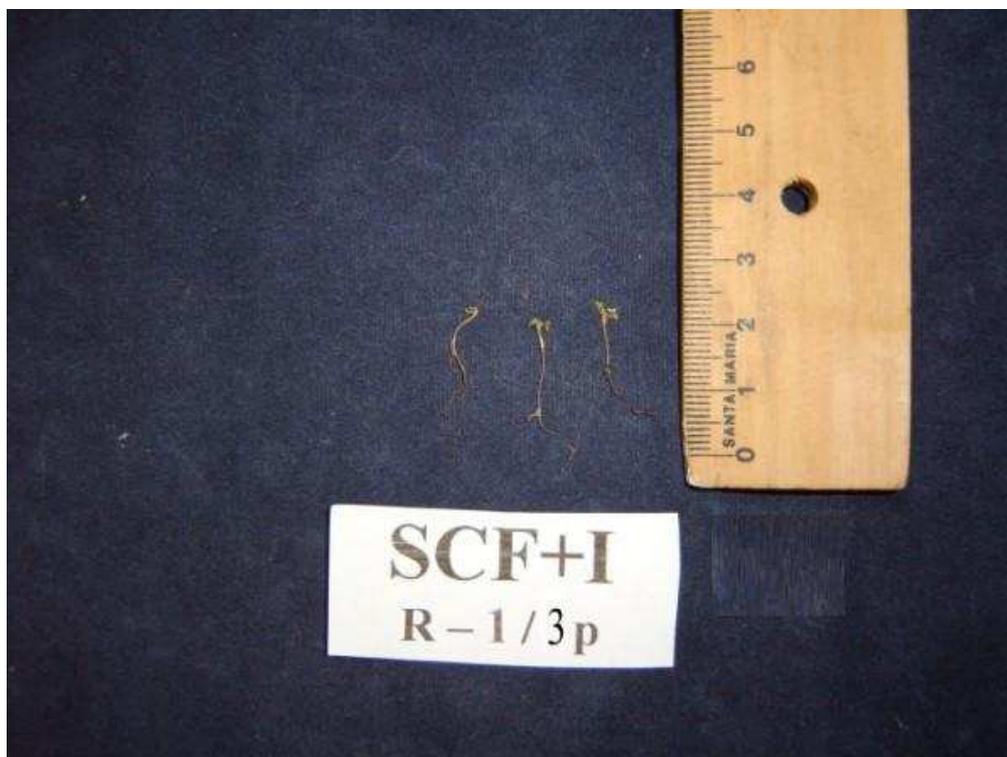
Tempo 06 Solo Contaminado Floresta, Repetição 07 com 05 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Contaminado Floresta, Tempo 08 com 05 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Contaminado Floresta + Inóculo, Repetição 01, com 03 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Contaminado Floresta + Inóculo, Repetição 02 com 04 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Contaminado Floresta + Inóculo, Repetição 03 com 02 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Contaminado Floresta + Inóculo, Repetição 06 com 05 Plantas Sobreviventes



Tempo 06 Solo Contaminado Floresta + Inóculo, Repetição 07 com 02 Plantas Sobreviventes



T6 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 01 com 04 Plantas Sobreviventes



T6 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 03 com 04 Plantas Sobreviventes



T6 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 04 com 05 Plantas Sobreviventes



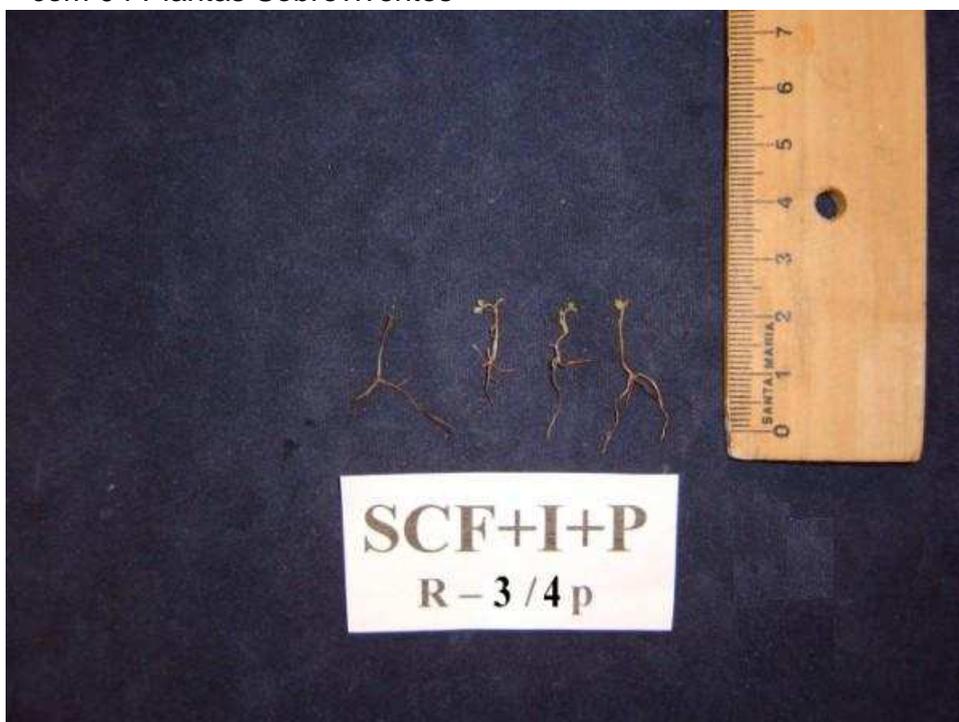
T6 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Nitrato, Repetição 06 com 02 Plantas Sobreviventes



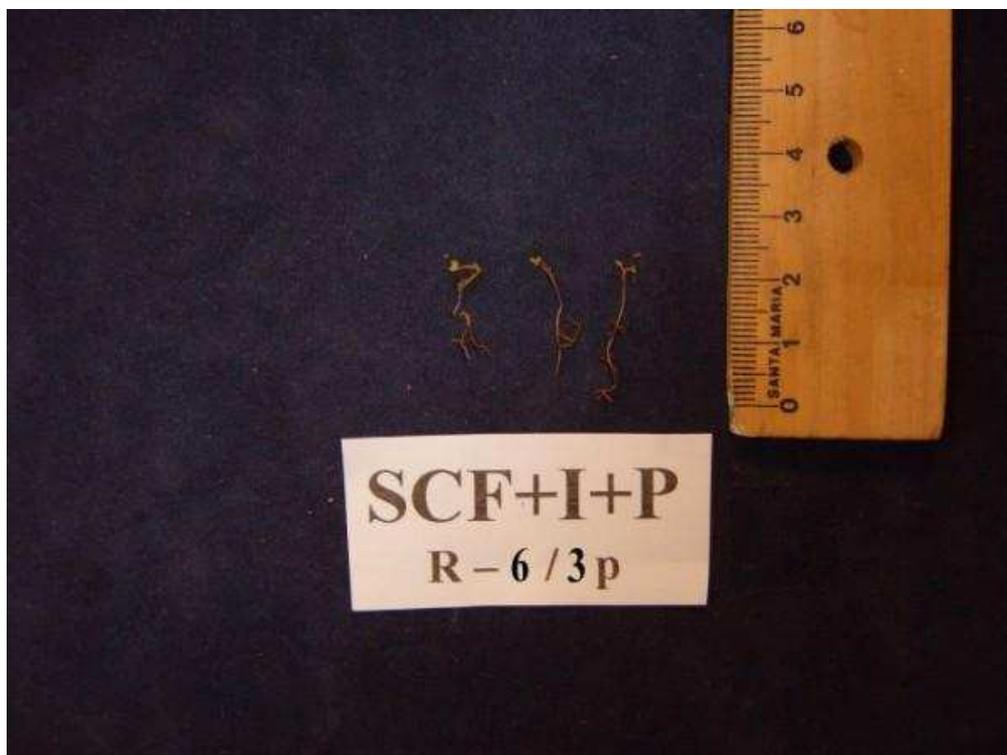
T6 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 02  
com 05 Plantas Sobreviventes



T6 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 03  
com 04 Plantas Sobreviventes



T6 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 06 com 03 Plantas Sobreviventes



T6 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 07 com 01 Plantas Sobreviventes



T6 Solo Contaminado Floresta + Inóculo + Peróxido, Repetição 08 com  
05 Plantas Sobreviventes

