



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOINTERAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Estudos de fitorremediação de solos contaminados com diesel  
utilizando *Rhizophora mangle* L. e rizobactérias promotoras do  
crescimento de plantas**

**Carla Jaqueline Silva Sampaio**

Orientador: Prof. Dr. Thiago  
Campanharo Bahiense

Co- orientador: Prof. Dr. Milton  
Ricardo de Abreu Roque

Fevereiro – 2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOINTERAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Estudos de fitorremediação de solos contaminados com diesel  
utilizando *Rhizophora mangle* L. e rizobactérias promotoras do  
crescimento de plantas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago  
Campanharo Bahiense

Co- orientador: Prof. Dr. Milton  
Ricardo de Abreu Roque

Fevereiro – 2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de  
Saúde, SIBI - UFBA.

S192 Sampaio, Carla Jaqueline Silva

Estudos de fitorremediação de solos contaminados com diesel utilizando *Rhizophora mangle* L. e rizobactérias promotoras do crescimento de plantas/ Carla Jaqueline Silva Sampaio. – Salvador, 2015.

72 f.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Campanharo Bahiense

Co-Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2015.

1. Biotecnologia. 2. Manguezal. 3. Biorremediação. 4. Óleo diesel I. Bahiense, Thiago Campanharo. II. Roque, Milton Ricardo de Abreu. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 574.6

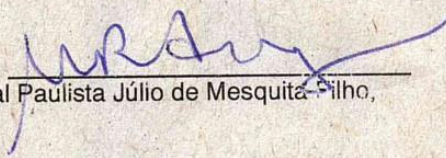
**CARLA JAQUELINE SILVA SAMPAIO**

**Estudos de fitorremediação de solos contaminados com diesel utilizando *Rhizophora mangle* e rizobactérias promotoras do crescimento de plantas**

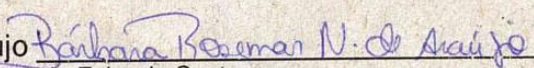
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2015.

**BANCA EXAMINADORA:**

Milton Ricardo de Abreu Roque – Co-Orientador   
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita-Filho,  
UNESP, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Martins Dias de Cerqueira   
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia:

Bárbara Rosemar Nascimento de Araújo   
Doutora em Botânica pela Universidade Estadual de Feira de Santana,  
UEFS, Brasil.  
União Metropolitana para o Desenvolvimento da Educação e Cultura.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Deus por ter permitido que esse trabalho tenha se desenvolvido e por me fortalecer nos momentos difíceis.

À minha mãe Maria de Lourdes que lutou muito para que eu chegasse até aqui, muitas vezes abdicando de si mesma para me ajudar a realizar os meus sonhos.

Mãe, muito obrigada!! Essa vitória é nossa! Amo você!

Ao meu irmão Carlos Allan pelo apoio e compreensão.

Ao Antônio Gabriel pela compreensão.

Ao meu orientador Prof. Thiago Bahiense por ter confiado no meu trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Milton Ricardo de Abreu Roque por ter aberto as portas do BIOPROSPECTOR para que eu pudesse desenvolver meu trabalho.

Muito obrigada pela confiança!

À amiga Aldinéia Oliveira Damião por me ajudar em todos os momentos. Sempre me orientando quando tive dificuldades, apoiando-me nos momentos difíceis e vibrando junto comigo nos momentos felizes. Muito obrigada, Aldi!! Prometo te dar umas férias agora.

À amiga Jamille Pereira que me ajudou no desenvolvimento desse trabalho. Dividindo comigo as angústias e as alegrias do dia-a-dia do mestrado e da vida pessoal. Muito obrigada, JEMILLE!!!!

Ao Edmundo, à Neila e à Fulvia pelo apoio logístico e pela amizade de sempre. Sinto-me honrada por conviver com pessoas como vocês.

Aos colegas do BIOPROSPECTOR que me apoiaram na construção da casa de vegetação e na fase de experimentos e análises. Não tenho palavras suficientes para agradecer. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

Às Prof<sup>a</sup> Maria Aparecida e Kelly Leite do IBIO pela ajuda na casa de vegetação e na fase de experimentos. Obrigada!

Ao Laboratório de Isótopos Estáveis – LFNA/UFBA, em especial ao José Roberto, pela análise dos hidrocarbonetos e pela amizade.

Ao Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos – LBBB/UFBA, em especial à Cristiane, por me ajudar na secagem e pesagem das plantas, e por me apresentar à plataforma de Microscopia da FIOCRUZ.

Ao Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento - LABIOMAR/UFBA por ter cedido o espaço para o processamento da água do mar.

À FIOCRUZ pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura junto à plataforma.

À PETROBRAS pelo financiamento do projeto.

À CAPES pela bolsa concedida.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho!

Muito obrigada!!!

“A poluição no Brasil é consequência da enorme falha educacional em que vive o país. A educação é a arma mais eficaz contra a poluição do meio ambiente, por isso eduque para preservar a vida.”

Autora

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>4</b>
3.1. Manguezal.....	4
3.1.1. Flora dos Manguezais.....	4
3.1.2. Fauna dos Manguezais.....	6
3.1.3. Derramamento de petróleo e derivados nos manguezais.....	7
3.2. Óleo diesel.....	7
3.3. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs).....	8
3.4. <i>n</i> -Alcanos.....	9
3.5. Degradação bacteriana de <i>n</i> -Alcanos e HPAs.....	10
3.6. Biorremediação.....	13
3.6.1. Atenuação natural.....	13
3.6.2. Bioestimulação.....	13
3.6.3. Bioventilação.....	14
3.6.4. Bioaugmentação.....	14
3.6.5. <i>Landfarming</i> .....	14
3.6.6. Fitorremediação.....	15
3.7. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs).....	17
3.8. Biossurfactantes.....	17
3.8.1. Biossurfactantes produzidos pelo gênero <i>Bacillus</i> .....	18
3.8.2. Biossurfactantes produzidos pelo gênero <i>Pseudomonas</i> .....	19
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
4.1. Coleta do sedimento e dos propágulos de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	21



4.2. Esquema de montagem do sedimento.....	21
4.3. Autoclavagem do sedimento anterior a montagem do experimento..	22
4.4. Contaminação do sedimento com óleo diesel.....	22
4.5. Preparo do inóculo bacteriano.....	22
4.5.1. Pré-inóculo.....	22
4.5.2. Inóculo do sedimento.....	22
4.5.3. Inoculação dos propágulos e plantio.....	23
4.6. Avaliação da germinação dos propágulos e do peso das plantas.....	23
4.7. Análise histológica das plantas.....	24
4.8. Isolamento das bactérias da raiz.....	24
4.9. Isolamento das bactérias do propágulo.....	24
4.10. Isolamento das bactérias do sedimento.....	25
4.11. Análise das raízes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..	25
4.12. Análise de hidrocarbonetos do sedimento.....	25
4.13. Análise de hidrocarbonetos das plantas.....	27
4.14. Análise estatística.....	27
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>28</b>
5.1. Análise de <i>n</i> -Alcanos e HPAs do sedimento.....	28
5.2. Análise de <i>n</i> -Alcanos e HPA na planta.....	33
5.3. Germinação dos propágulos e peso seco das plantas de <i>Rhizophora</i> <i>mangle</i> L.....	36
5.4. Análise histológica das plantas.....	40
5.5. Isolamento das bactérias do sedimento, propágulo e raiz.....	41
5.6. Microscopia Eletrônica de Varredura das raízes.....	44
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....</b>	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BTEX: Benzeno, Tolueno, Etil-benzeno e Xileno

BTS: Baía de Todos os Santos

CCMICS: Coleção de Cultura de Micro-organismos do Instituto de Ciências da Saúde

CG: Cromatografia Gasosa

DO: Densidade Óptica

EM: Espectrômetro de Massa

HPA: Hidrocarboneto Policíclico Aromático

HTP: Hidrocarboneto Total de Petróleo

Kg: Quilograma

Km<sup>2</sup>: Quilômetros quadrados

LB: Luria-Bertani

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

mL: Mililitro

µg.g<sup>-1</sup>: Micrograma por grama

µg.mL<sup>-1</sup>: Micrograma por mililitro

µm: Micrômetro

P.A.: Para-Análise

pH: Potencial Hidrogeniônico

ppm: Partes por milhão

RPCP: Rizobactéria Promotora do Crescimento de Planta

rpm: Rotação por minuto

TSA: Tryptone Soya Agar

USEPA: United States Environmental Protection Agency

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Vista geral de ramo com fruto iniciando a germinação para formação do propágulo de <i>Rhizophora mangle</i> L. do manguezal do rio Paraguaçu, Bahia. Fonte: Autoria própria.....	6
<b>Figura 2</b> - Vias aeróbicas de degradação de <i>n</i> -alcanos.....	11
<b>Figura 3</b> - Vias de biodegradação aeróbica de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	12
<b>Figura 4</b> - Modelo esquemático dos tipos de mecanismos de fitorremediação utilizados pelas plantas.....	15
<b>Figura 5</b> - Experimento de biorremediação montado na casa de vegetação do Instituto de Biologia da UFBA.....	23
<b>Figura 6</b> - Propágulo cortado longitudinalmente para avaliação da presença de bactérias.....	24
<b>Figura 7</b> - Percentual de <i>n</i> -alcano presente nas amostras de sedimento do Controle 1 (A) e no Diesel (B).....	28
<b>Figura 8</b> - Comparação entre o percentual de <i>n</i> -alcanos presente na amostra de Diesel com o percentual absorvido pelo sedimento.....	29
<b>Figura 9</b> - Comparação entre o percentual de <i>n</i> -alcanos presente nas amostras de sedimento dos Controles e Tratamentos após 120 dias de experimento.....	29
<b>Figura 10</b> - Comparação entre o percentual de HPA presente nas amostras de sedimento do Controle 1 e no Diesel.....	31
<b>Figura 11</b> - Comparação entre o percentual de HPAs presente na amostra de Diesel com o percentual absorvido pelo sedimento.....	32
<b>Figura 12</b> - Comparação entre o percentual de HPA presente nas amostras de sedimento dos Controles e Tratamentos após 120 dias de experimento.....	33
<b>Figura 13</b> - Comparação entre o percentual de <i>n</i> -alcanos presentes nas plantas do Controle 1 e dos Tratamentos 1 e 2 após 120 dias de experimento.....	34
<b>Figura 14</b> - Comparação entre o percentual de HPAs presentes nas plantas do Controle 1 e dos Tratamentos 1 e 2 após 120 dias de experimento.....	35
<b>Figura 15</b> - Desenvolvimento de plantas do Controle 1 após 120 dias de experimento.....	36

<b>Figura 16</b> - Comparação do nível de desenvolvimento de plantas do Controle 1 (esquerda) e plantas do Tratamento 2 (direita) (A) após 120 dias de experimento. Planta do Tratamento 2 com folhas (B).....	37
<b>Figura 17</b> - Desenvolvimento de plantas do Tratamento 3 (A) após 120 dias de experimento. Sistema radicular ramificado da planta do Tratamento 3 (B). Seta indicando raízes laterais.....	38
<b>Figura 18</b> - Comparação entre os pesos seco e fresco das plantas após 120 dias de experimento.....	39
<b>Figura 19</b> - Secção transversal da região mediana dos propágulos de <i>Rhizophora mangle</i> L. evidenciando espaços intercelulares na região cortical do Controle 1 (A), do Tratamento 2 (B) e do Tratamento 3 (C). Seta indicando grânulos de amido. Tamanho da foto 200µm.....	40
<b>Figura 20</b> - Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura evidenciando a colonização da epiderme de raízes do Tratamento 2. A seta indica a presença de bacilo esporulando.....	45
<b>Figura 21</b> - Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura da formação de biofilme na epiderme da raiz do Tratamento 2.....	45
<b>Figura 22</b> - Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura de tecidos internos da raiz do Tratamento 2 evidenciando a colonização por bactérias.....	46
<b>Figura 23</b> - Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura da epiderme da raiz do Controle 1 evidenciando a ausência de colonização por bactérias.....	46
<b>Figura 24</b> - Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura evidenciando a obstrução da região do córtex e cilindro central da raiz do Tratamento 2 (A). Córtex e cilindro central do Controle 1 sem obstrução (B). Detalhe do xilema do Controle 1 desobstruído (C).....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Mecanismos de fitorremediação.....	16
<b>Tabela 2</b> - Relação dos principais biossurfactantes produzidos pelas várias espécies do gênero <i>Bacillus</i> .....	19
<b>Tabela 3</b> - Taxa de germinação dos propágulos de <i>Rhizophora mangle</i> L. após 120 dias de experimento.....	36
<b>Tabela 4</b> - Isolados bacterianos obtidos a partir dos sedimentos dos controles e tratamentos após 120 dias de experimento.....	41
<b>Tabela 5</b> - Isolados bacterianos obtidos a partir das raízes de plantas do Tratamento 2 após 120 dias de experimento.....	43
<b>Tabela 6</b> - Isolados bacterianos obtidos a partir do propágulo do Controle 1 após 120 dias de experimento.....	43
<b>Tabela 7</b> - Isolados bacterianos obtidos a partir do propágulo do Tratamento 2 após 120 dias de experimento.....	44

SAMPAIO, Carla Jaqueline Silva. Estudos de fitorremediação de solos contaminados com diesel utilizando *Rhizophora mangle* L. e rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. 74f. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

## RESUMO

Manguezais são ecossistemas costeiros, considerados berçários naturais para muitas espécies de animais. São ambientes que possuem uma acentuada influência das marés. Por se localizarem em regiões costeiras e próximos a indústrias petrolíferas, são alvos constantes de contaminação por petróleo e derivados e se faz necessário estudos sobre técnicas que minimizem os impactos ambientais ocasionados pela presença desses contaminantes. Este trabalho objetivou avaliar técnicas de biorremediação para recuperação ex situ de sedimento de manguezal, através da simulação de contaminação por óleo diesel. Utilizou-se a *Rhizophora mangle* L. e as linhagens bacterianas CCMICS105 *Pseudomonas fluorescens* e CCMICS108 *Bacillus* sp., produtoras de compostos bioativos e promotoras do crescimento de plantas. Os resultados evidenciam que houve redução nos percentuais de n-Alcanos e HPAs de cadeia leves presentes no sedimento, sobretudo nos tratamentos 1 e 2 em que houve a inoculação das bactérias. As bactérias isoladas dos propágulos do Controle 1 e do Tratamento 2 são endofíticas, exceto o isolado 10 que acredita-se ser a mesma bactéria presente no sedimento e na raiz. Todos os isolados do sedimento foram encontrados nas raízes do Tratamento 2, sendo que o isolado 2, que possui características semelhantes à bactéria CCMICS108, esteve em maior densidade. Os dados de MEV e do isolamento indicam que houve colonização das raízes no Tratamento 2 por bactérias semelhantes morfológicamente às linhagens CCMICS105 e CCMICS108. O que contribuiu para o aumento no número de propágulos germinados, para a redução, de modo geral, do espaço intercelular do córtex e da ramificação do sistema central, o que não foi constatado no Tratamento 3. Apesar de não haver diferença significativa nos pesos fresco e seco das plantas nos controles e tratamentos, o Tratamento 2 foi o que apresentou maior biomassa. A *Rhizophora mangle* L., neste trabalho, não foi eficaz na biodegradação de hidrocarbonetos, possivelmente devido a elevada concentração do óleo diesel ( $55\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) utilizada.

**Palavras chaves:** Manguezal, biorremediação, *Rhizophora mangle* L., *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp., óleo diesel.

SAMPAIO, Carla Jaqueline Silva. Soil phytoremediation studies contaminated with diesel using *Rhizophora mangle* L. and promoting rhizobacteria plant growth. 74f. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

### ABSTRACT

Mangroves are coastal ecosystems, provide nursery habitat for many wildlife species. Are environments that have a marked influence of the tides. Since they are located in coastal areas and near oil industries, mangroves may be a target of contamination by oil and oil products and must be necessary studies of techniques that can minimize environmental impacts caused by the presence of these contaminants. This study aimed to evaluate *ex situ* bioremediation utilizing techniques simulating contamination by diesel in mangrove sediment. We used the red mangrove *Rhizophora mangle* L. and bacterial strains *Pseudomonas fluorescens* (CCMICS105) and *Bacillus sp.* (CCMICS108), bioactive compounds producing and plant growth promoting bacterias. The results show that there was a decrease in n-alkanes percentage and light chain of PAHs in the sediment, especially in treatments 1 and 2 in which there was inoculation of bacteria. The bacteria isolated from the seedlings from Control 1 and Treatment 2 are endophytic, except isolated 10 that we believe belongs from the sediment and roots. All sediment isolates were found in the roots from Treatment 2, and the isolated 2 shows similar characteristics to CCMICS108 and was higher in density (biomass). The SEM data and from the isolation point to root colonization in Treatment 2 by morphologically similar bacterias CCMICS105 and CCMICS108. Contributing to the increase in the number of seedlings germinated, to reduce, in general, the intercellular space of the cortex and the branch of the central system, which was not observed in Treatment 3. Although there is no significant difference in fresh and dry weights of plants in the control and treatments, the Treatment 2 showed the highest biomass. The *Rhizophora mangle* L., in this work was not effective to hydrocarbon biodegradating, possibly due to high concentration of diesel used ( $55\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Keywords: Mangrove, bioremediation, *Rhizophora mangle* L., *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus sp.*, diesel oil.

## 1. INTRODUÇÃO

Manguezais são ecossistemas costeiros, situados entre os ambientes terrestres e marinhos que são encontrados em regiões tropicais e subtropicais. Devido a sua localização, sofrem a ação das marés e apresentam espécies vegetais adaptadas às características desse ambiente. Apresentam condições propícias para o crescimento e desenvolvimento de espécies de animais que vivem nesse ambiente, além das espécies que migram para essas regiões em alguma fase do seu ciclo de vida.

Os manguezais são alvos de contaminação constante por petróleo ou derivados. Estas contaminações ocorrem, sobretudo, nas ações de exploração, refino, transporte e armazenamento realizadas por indústrias petrolíferas. A contaminação dos manguezais por petróleo pode desencadear desequilíbrios ecológicos, visto que os manguezais são considerados berçários naturais para muitas espécies de animais. Além de ocasionar danos econômicos para muitas populações que sobrevivem de atividades como maricultura e pesca.

Os danos causados pelo petróleo ou derivados no ambiente de manguezal se agravam devido a persistência do óleo por longos períodos em sedimentos lamosos e ricos em matéria orgânica, característico de manguezais. Os hidrocarbonetos do petróleo adsorvem a matéria orgânica, devido a sua hidrofobicidade e alto peso molecular, o que aumenta a sua recalcitrância no ambiente.

Deste modo, é necessário o estabelecimento de técnicas para reduzir o impacto ambiental causado pelo petróleo e seus derivados neste ecossistema. Dentre as técnicas empregadas com esta finalidade, destacam-se a biorremediação e a fitorremediação, devido, sobretudo, ao baixo custo e por utilizar recursos naturais.

A biorremediação trata-se de uma técnica que utiliza organismos vivos ou seus derivados (ex: enzimas, lipídios etc) para remediação de uma área impactada, acelerando a biodegradação natural de contaminantes como hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos são utilizados pelos organismos como fonte de carbono em seus processos metabólicos.

Os micro-organismos podem degradar ou reduzir a toxicidade do poluente por meio da produção de biossurfactantes (moléculas que apresentam atividade



tensoativa), resultando na biodisponibilização do contaminante para a ação microbiana. Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* estão entre os principais capazes de degradar hidrocarbonetos, além de serem promotores do crescimento de plantas.

A fitorremediação também é utilizada na descontaminação de ambientes. Esta técnica utiliza plantas e a microbiota presente na rizosfera na descontaminação de solos, reestabelecendo as condições física, química e biológica do solo. Sendo, portanto, uma técnica promissora quando aliada a adição de micro-organismos produtores de compostos bioativos, a exemplo dos biossurfactantes.

Sendo assim, estudos biotecnológicos que envolvam o emprego de bactérias e plantas na remediação de manguezais impactados por atividades antrópicas se fazem cada vez mais necessários diante da importância ecológica e econômica deste ecossistema.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAL

Avaliar as técnicas de biorremediação para recuperação *ex situ* de sedimento de manguezal através da simulação de contaminação por óleo diesel.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a germinação e desenvolvimento de propágulos de *Rhizophora mangle* L. inoculados com *Bacillus sp.* e *Pseudomonas fluorescens* em sedimento de manguezal contaminado por óleo diesel através do sistema radicular e dos pesos seco e fresco.

- Avaliar através de cortes histológicos dos propágulos de *Rhizophora mangle* L. possíveis alterações celulares ocasionadas pelo óleo diesel.

- Avaliar através de Microscopia Eletrônica de Varredura a colonização bacteriana das raízes de *Rhizophora mangle* L., assim como possíveis alterações ocasionadas pelo óleo diesel.

- Monitorar de formas qualitativa e quantitativa a presença dos hidrocarbonetos das plantas e dos sedimentos utilizados para realizar os experimentos em casa de vegetação.

-Avaliar a colonização de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus sp.* nos sedimentos utilizados nos tratamentos.

- Avaliar a eficácia da biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel com a inoculação de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus sp.* e com a utilização da *Rhizophora mangle* L..

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1. O manguezal**

O manguezal é um ecossistema característico de regiões tropicais, situado entre os ambientes terrestre e marinho que está sujeito ao regime das marés (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). As inundações periódicas das marés conferem fatores ambientais como salinidade e disponibilidade de nutrientes altamente variáveis, proporcionando a este ecossistema características específicas e próprias para ser atribuída a um bioma com biodiversidade peculiar e de alto grau de complexidade (DIAS, 2008).

Os manguezais ocorrem em regiões costeiras abrigadas como estuários, baías e lagunas. Apresentam condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies de animais, sendo considerados importantes transformadores de nutrientes em matéria orgânica e geradores de bens e serviços para comunidades adjacentes, além de oferecerem proteção contra a erosão costeira (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; ALONGI, 2002).

No Brasil, os manguezais representam uma área de cerca de 25.000 Km<sup>2</sup>, e ocorrem em quase todo o litoral brasileiro desde o Oiapoque ao extremo setentrional, até Laguna em Santa Catarina (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). Na Baía de Todos os Santos – BTS, este ecossistema abrange uma área de 152 km<sup>2</sup>, representando a maior e mais importante baía navegável da costa tropical brasileira (LEÃO & DOMINGUES, 2000), predominando nas proximidades do Rio Jaguaripe, Baía de Iguape e município de São Francisco do Conde. Portanto, a área de cobertura de manguezais da BTS está entre as maiores das grandes baías brasileiras (SANTOS *et al.*, 2003).

##### **3.1.1. Flora dos Manguezais**

A flora dos manguezais é caracterizada por vegetação lenhosa típica, adaptada às condições limitantes de salinidade, substrato inconsolidado, pouco oxigenado e frequente submersão pelas marés (SOARES, 1997). Os fatores geradores de estresse ambiental se apresentam num gradiente, com o estresse aumentando com a distância da linha d'água e com os efeitos relacionados à inundação pelas marés (aumento da salinidade, variações granulométricas do substrato, intensidade de ondas e correntes), resultando em condições que

podem prejudicar o desenvolvimento das plântulas (FRY *et al.*, 2000). As espécies de manguezal apresentam adaptações estruturais e fisiológicas para sobreviver nesse ambiente (LAURENTINO & SOUZA, 2013), tais como: reprodução vivípara, folhas coriáceas e glândulas de sal (TOMLINSON, 1986; GARCIA, 2005).

As espécies ocupam locais diferentes, apresentando características distintas com relação à frequência de inundação pelas águas estuarinas, textura do sedimento, salinidade intersticial, processos geomorfológicos, entre outros (COSTA, 2009).

As árvores que compõem a vegetação inundada pertencem aos gêneros *Rhizophora*, *Avicennia* e *Laguncularia*. Quatro espécies ocorrem na costa baiana: *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho), *Avicennia germinans* (L.) Stearn (mangue preto) e *Avicennia schaueriana* Stapf e Leechman ex Moldenke (mangue-siriúba), e *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. f. (mangue-branco) (RAMOS, 2002). E, como associados, são encontrados os gêneros *Spartina*, *Talipariti* e *Acrostichum* (SILVA *et al.*, 2005).

### **Gênero *Rhizophora***

O mangue vermelho é endêmico da vegetação de manguezal, pertencente à família Rhizophoraceae, possui caráter arbóreo com folhas simples e é em geral encontrado nas franjas dos bosques. A característica peculiar do gênero é o sistema de sustentação com caules (rizóforos) que partem do tronco. Tais estruturas são adaptações caulinares ricas em lenticelas, que aumentam a aeração e atuam diretamente na fixação da planta no substrato lodoso (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1994; LAMBERTI, 1966).

O gênero apresenta melhor desenvolvimento em solos siltosos rasos, inundado por água salobra, que esteja em locais com abundância de água natural e elevados índices de pluviosidade. Os sedimentos característicos desse tipo de mangue apresentam valores de pH elevados, relação C/N alta, e elevados teores de enxofre oxidável, nitrogênio, fósforo e carbono (JIMENEZ, 1985).

Os frutos germinam ainda presos à árvore-mãe (Figura 1) e originam os propágulos em forma de lança, cuja viabilidade pode chegar a 12 meses (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1994).

Segundo FRUEHAUF (2005) e MOREIRA *et al.* (2010), a espécie *Rhizophora mangle* L. é promissora para aplicação em fitorremediação de sedimentos de manguezal, devido às características de absorção da planta, da forte interação com a comunidade microbiana, sendo pouco sensível à presença de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTPs) presentes no sedimento.



**Figura 1:** Vista geral de ramo com fruto iniciando a germinação para formação do propágulo de *Rhizophora mangle* L. do manguezal do rio Paraguaçu, Bahia.

Fonte: Autoria própria

### 3.1.2. Fauna dos Manguezais

A fauna associada aos manguezais é muito variada, desde formas microscópicas até grandes peixes, aves, répteis e mamíferos (FRUEHAUF, 2005). Sua estrutura possibilita a manutenção de diversos habitats propícios à proteção contra predadores, reprodução, desova e crescimento de diversas espécies marinhas ou de água doce (DELABIE *et al.*, 2006).

Dentre as espécies de animais associadas aos manguezais, destacam-se as várias espécies de crustáceos, formando enormes populações nos fundos lodosos. Nos troncos submersos, vários animais filtradores, tais como bivalves, alimentam-se de partículas suspensas na água. A maioria dos crustáceos são ativos na maré baixa, enquanto os moluscos alimentam-se durante a maré alta. Uma grande variedade de peixes acessa os manguezais na maré alta, muitos dos quais que constituem o estoque pesqueiro das águas costeiras dependem das fontes alimentares do manguezal, pelo menos na fase jovem. Espécies de aves e de invertebrados marinhos nidificam nas árvores do manguezal e

alimentam-se especialmente na maré baixa, quando os fundos lodosos estão expostos (RODRIGUES, 2008).

### **3.1.3. Derramamento de petróleo e derivados nos manguezais**

Por se localizarem em regiões costeiras, os manguezais são sujeitos à poluição crônica e a derrames acidentais de óleo (NOERNBERG & LANA, 2002), devido às práticas antrópicas como processamento industrial do petróleo e combustão incompleta de combustíveis fósseis (CHANG *et al.*, 2008).

Fato que é considerado um sério problema, pois ecossistemas de manguezal são sensíveis a distúrbios antrópicos como a contaminação por petróleo, que pode provocar danos a toda a biota, exercendo impacto por longo prazo (KREPSKY *et al.*, 2007; CURY, 2002). Áreas mais protegidas da ação das correntes e das ondas são mais seriamente afetadas do que as áreas externas, de franja (SILVA, 2008).

Quando o petróleo e seus derivados atingem o manguezal, o impacto físico e os efeitos toxicológicos podem ser agudos (por exemplo a desfolha e a morte da fauna) e/ou crônicos (a exemplo da redução da reprodução das plantas, a sobrevivência das sementes e da população de caranguejos) (NOAA, 2002).

A degradação do óleo residual que contamina os manguezais ocorre lentamente uma vez que estes sedimentos são anaeróbicos logo abaixo dos primeiros centímetros de profundidade (BURNS *et al.*, 2000). Além disso, manguezais são ambientes complexos e heterogêneos que são influenciados pela diversidade e abundância de plantas, variação da maré e nichos nos sedimentos, fatores que influenciam na variação no nível dos poluentes (PEIXOTO *et al.*, 2011).

## **3.2. Óleo diesel**

O óleo diesel é um produto da destilação fracionada do petróleo que apresenta em sua composição principalmente hidrocarbonetos alifáticos de cadeia simples, não ramificados, que contêm de 9 a 28 átomos de carbono, além de outros compostos que destilam na mesma faixa de temperatura, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados alquílicos (ANP, 2012). O óleo diesel pode também conter vários aditivos na sua composição final, tais como: inibidores de corrosão, surfactantes e aditivos para melhorar a

estabilidade e a ignição. Contudo, a composição de um óleo diesel específico dependerá da fonte do petróleo, do método de produção e dos processos de destilação (PETROBRAS, 2003).

Dos hidrocarbonetos totais de petróleo que compõem o óleo diesel, incluem-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), *n*-alcanos e os monoaromáticos (BTEX), como benzeno, tolueno, etilbenzeno, *o*-xileno, *m*-xileno, *p*-xileno (MAZUCCO, 2004).

O óleo diesel é utilizado em motores de combustão interna e ignição por compressão (motores do ciclo diesel) empregados nas mais diversas aplicações, tais como: automóveis, furgões, ônibus, caminhões, pequenas embarcações marítimas, máquinas de grande porte, locomotivas, navios e aplicações estacionárias (geradores elétricos, por exemplo). O atual modelo energético brasileiro é apoiado entre outros pontos, no transporte de cargas em motores diesel, por via rodoviária, em detrimento do transporte ferroviário, fluvial ou cabotagem. Isso faz com que o óleo diesel seja o derivado propulsor do refino no Brasil. (PETROBRAS, 2014).

### **3.3. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)**

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são contaminantes ambientais ubíquos, de origem petrogênica, pirogênica ou biogênica (WIDDEL & RABUS, 2001; FOGHT, 2008; SEO *et al.*, 2009). Os HPAs de origem petrogênica são comprovadamente ou potencialmente tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos, entrando no ambiente principalmente por deposição atmosférica, escoamento urbano, efluentes municipais, águas residuais de indústrias e derramamentos de óleo (SEO *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009).

Os HPAs compreendem moléculas com 2 a 6 anéis aromáticos. Com base no peso molecular, os HPAs podem ser divididos em dois grupos: aqueles com baixos pesos moleculares, que possuem dois ou três anéis aromáticos, e os de altos pesos moleculares, compostos por quatro a sete anéis aromáticos (CELINO & QUEIROZ, 2006). Dentre os HPAs, somente 16 são considerados relevantes em função das informações químico-físicas, toxicológicas, industriais e ambientais existentes. São eles: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo(a) antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b) fluoranteno, benzo(k) fluoranteno,

benzo(g,h,i) pirelino, criseno, dibenzo(a,h) antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-c,d) pireno, naftaleno e pireno (POTIN *et al.*, 2004).

Essas substâncias são pouco solúveis em água e, em geral, sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis (MAZUCCO, 2004), além de apresentarem forte tendência de sorção às partículas orgânicas e minerais do solo e dos sedimentos, o que reduz sua biodisponibilidade aos micro-organismos degradadores e resulta na contaminação ambiental (JACQUES *et al.*, 2007).

### **3.4. *n*-Alcanos**

Os alcanos são hidrocarbonetos alifáticos, conhecidos como parafinas, que apresentam ligações simples (CARRASCOSA, 2011). De acordo com SINGH *et al.* (2012), podem ser classificados como linear (*n*-alcanos), cíclico (ciclo-alcanos) ou ramificado (iso-alcanos) e apresentam três estados físicos: gasoso (C1-C4), líquido (C5-C16) e sólido (>C17).

São originados, sobretudo, a partir de plantas terrestres, algas e bactérias (JENG, 2006; MEAD & GONI, 2006; GAO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008; TROVÃO & CARREIRA, 2009). Nos casos em que há predominância de *n*-alcanos com número de carbonos ímpares, existe indicativo de aportes biogênicos. Enquanto que na contaminação de ambientes por petróleo cru, não existe predominância de cadeias de carbono ímpares ou pares (DEL ROSSO, 2005; WANG *et al.*, 2006; MIZUKAWA, 2012). Sendo assim, os *n*-alcanos são utilizados para caracterizar a origem da matéria orgânica e o nível de contaminação ambiental. Segundo HU *et al.* (2014), os *n*-alcanos são biomarcadores lipídicos mais amplamente distribuídos nos corpos geológicos.

Na composição de hidrocarbonetos de plantas vasculares predominam maiores concentrações dos *n*-alcanos *n*-C27, *n*-C29 e *n*-C31 (YUNKER *et al.*, 2005; FAHL & NÖTHIG, 2007; YAMAMOTO *et al.*, 2008; YUNKER *et al.*, 2011). Para fitoplâncton há predominância das cadeias (C14-C24), sendo C15, C17 e C19 os mais abundantes (SAKATA *et al.*, 1997; MEYERS, 1997; GELPI *et al.*, 1970; XING *et al.*, 2011).

### **3.5. Degradação de *n*-Alcanos e HPAs por bactérias**

Devido a sua composição química, os alcanos podem ser degradados por micro-organismos como bactérias, fungos filamentos e leveduras, que os



utilizam como fonte de carbono (van BEILEN *et al.*, 2003; WENTZEL *et al.*, 2007). De acordo com NIE *et al.* (2014), a degradação bacteriana de *n*-alcanos é importante para a biorremediação de ambientes contaminados por petróleo. Ainda segundo o autor, as enzimas chave na degradação aeróbica de *n*-alcanos por bactérias são as alcanos hidroxilases (AHs). Esse complexo enzimático consiste em três componentes: alcanos hidroxilase, rubredoxina e rubredoxina redutase (van BEILEN *et al.*, 1994), que são codificados pelos genes *alkB*, *alkG* e *alkT*, respectivamente (CAPPELLETTI *et al.*, 2011).

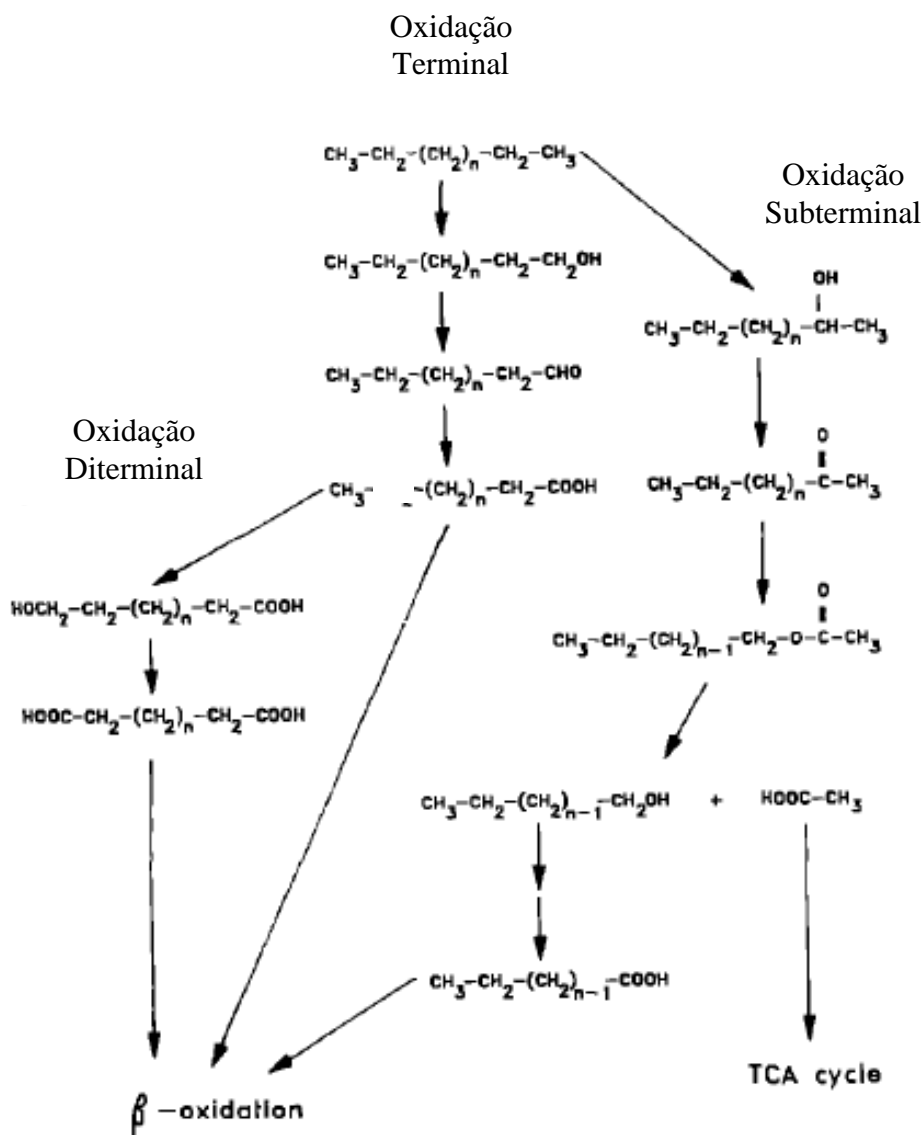
Gêneros de bactérias têm sido reportados como degradadores de compostos alifáticos, tais como: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Alcanivorax* e *Bacillus* (SINGH *et al.*, 2012). WANG *et al.* (2010) identificou o gene *alkB* em bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Alcanivorax* cultivadas em água do mar suplementada com óleo bruto e diesel. Em seu trabalho, DIOGO *et al.* (2010) também identificou o gene *alkB* em *Pseudomonas* e *Rhodococcus* isoladas da rizosfera de *Cyperus rotundus* L. pertencentes a uma área previamente contaminada com petróleo.

A biodegradação aeróbica de *n*-alcanos inicia-se com a adição de um grupo hidroxila à cadeia alifática por uma monooxigenase (LOPES, 2010) (Figura 2). As principais vias de oxidação são:

-Oxidação Terminal: esta via inicia com a oxidação do grupo metil terminal, gerando um álcool primário. A oxidação do álcool primário gera um aldeído, que em seguida é transformado em ácido graxo. O ácido graxo sofre  $\beta$ -oxidação para gerar acetil-CoA (ROJO, 2009).

-Oxidação Subterminal: a oxidação do metileno gera um álcool secundário, o qual é convertido na cetona correspondente. A cetona é oxidada por uma monooxigenase gerando um éster, que é hidrolisado produzindo um álcool e um ácido graxo. O ácido graxo é então degradado via  $\beta$ -oxidação (ROJO, 2009).

-Oxidação Diterminal: ocorre oxidação de ambos os grupos metil terminal formando ácido carboxílico, que é degradado via  $\beta$ -oxidação (BENTO & GAYLARDE, 2001).



**Figura 2:** Vias aeróbicas de degradação de *n*-alcanos.

Fonte: Adaptado de WATKINSON & MORGAN, 1990.

Segundo CRUZ & MARSAIOLI (2012), os *n*-alcanos de cadeias longas (C10-C24) são mais rapidamente degradados a partir da porção terminal. Enquanto os *n*-alcanos de cadeias menores que C10 são tóxicos para a maioria dos micro-organismos, portanto, sua oxidação é iniciada pela porção subterminal da cadeia.

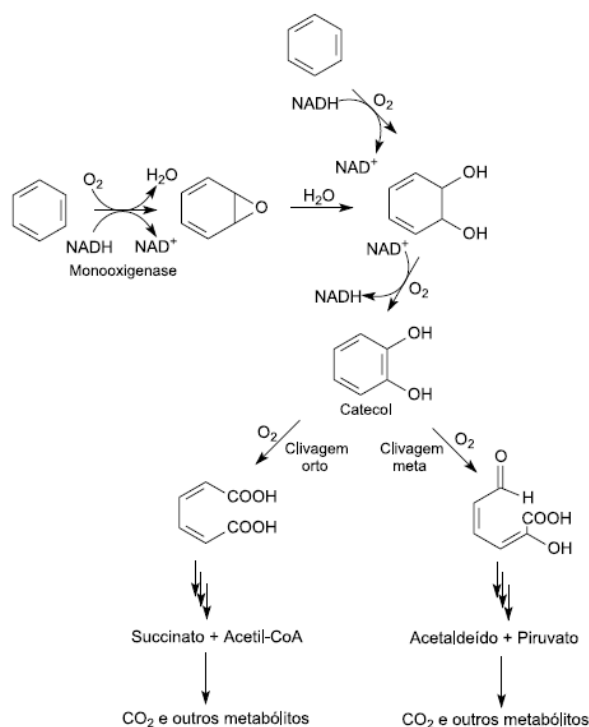
A biodegradação anaeróbica de *n*-alcanos ocorre através de duas principais estratégias: uma envolve a ativação do alcano numa posição subterminal através da adição de uma molécula de fumarato, sendo o produto degradado por  $\beta$ -oxidação. No segundo mecanismo, a molécula de fumarato é

adicionada aos carbonos terminais da molécula de alcano (KNIEMEYER *et al.*, 2007; ROJO, 2009).

O destino dos HPAs na natureza é influenciado por uma série de fatores que determinam a taxa de degradação e a extensão do metabolismo, como: propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos (peso molecular, solubilidade em água, volatilidade, presença de grupos funcionais, concentração), pH do meio, temperatura, concentração de oxigênio; salinidade; tipo de sedimento; e nutrientes (MESQUITA, 2004).

Portanto, os HPAs são contaminantes do ambiente com potencial para serem biodegradados, no entanto, a eficiência deste processo pode ser reduzida se as condições químicas e físicas não forem favoráveis a sobrevivência e a atividade dos micro-organismos degradadores (JACQUES *et al.*, 2007).

A biodegradação aeróbica de HPAs é iniciada pela oxidação do hidrocarboneto formando dióis, devido a ação de oxigenases (monoxigenases e dioxigenases). Em seguida ocorre a clivagem do anel e formação do protocatecol e catecol que é degradado formando intermediários como acetaldeído, piruvato e succinato (Figura 3) (ATLAS, 1981; ATLAS, 1995; WENTZEL *et al.*, 2007; CRUZ & MARSALOLI, 2012).



**Figura 3:** Vias de biodegradação aeróbica de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Fonte: CRUZ & MARSALOLI, 2010

As vias de biodegradação anaeróbica de HPAs são as mesmas propostas para degradação de *n*-alcanos e ocorrem através da adição de fumarato ou carboxilação (SPORMANN & WIDDEL, 2000).

### **3.6. Biorremediação**

Biorremediação é a utilização de organismos vivos ou seus derivativos (ex.: enzimas) para degradar compostos poluentes (van DILLEWIJN *et al.*, 2009), apresentam baixo consumo de energia e causam poucas mudanças nas características físicas, químicas e biológicas do ambiente (TONINI *et al.*, 2010). É um bioprocessos que emprega micro-organismos, principalmente, para remediar contaminantes por meio de mecanismos de biodegradação naturais (biorremediação intrínseca ou atenuação natural) ou pelo aumento da biodegradação natural (TELHADO, 2009).

Além disso, a biorremediação pode tratar grandes quantidades de produtos químicos tóxicos que são liberados no ambiente, deliberadamente como na aplicação de agrotóxicos, ou acidentalmente como no caso de derramamentos de óleo (EZEZIKA & SINGER, 2010).

Dentre as estratégias de biorremediação mais estudadas incluem a atenuação natural, bioestimulação, bioventilação, bioaumentação e *landfarming* (SKIPPER, 1999).

#### **3.6.1. Atenuação natural**

Processo de biorremediação que ocorre naturalmente pela ação dos micro-organismos autóctones (FERREIRA, 2010). Trata-se de uma coleção de processos biológicos, químicos e físicos que ocorrem naturalmente, resultando na contenção, transformação ou destruição de produtos químicos indesejáveis no ambiente (MORENO *et al.*, 2004).

#### **3.6.2. Bioestimulação**

Alguns micro-organismos estão presentes nos locais contaminados, porém para remediação efetiva, estes micro-organismos precisam ter o crescimento estimulado. Bioestimulação é o processo de adição de nutrientes, aceptores de elétrons e oxigênio para estimular as bactérias existentes no solo.

Este processo melhora a condição do macro e micro-ambiente para a realização da biorremediação. Dessa forma, micro-organismos nativos presentes no solo são responsáveis pela degradação do poluente (THAPA *et al.*, 2012).

### **3.6.3. Bioventilação**

A bioventilação é uma tecnologia *in situ* que caracteriza-se pela adição de oxigênio ao solo contaminado o que favorece o crescimento, desenvolvimento e metabolização de microrganismos autóctones e alóctones. Na maioria dos casos, o oxigênio é suprido pela injeção direta de ar no solo contaminado, onde ocorre também a biodegradação dos compostos orgânicos voláteis, que se movem lentamente através do solo biologicamente ativado (AZEVEDO, 2006).

### **3.6.4. Bioaumentação**

O bioaumento ocorre pela adição de micro-organismos específicos em regiões impactadas, adaptados em laboratório às condições ambientais. Ao usar essa técnica, faz-se a avaliação dos microrganismos presentes no ambiente, identificando-se os degradadores de óleo. Em seguida, através de biorreatores estimula-se em laboratório, o crescimento microbiano das espécies de interesse e, posteriormente, injeta-se o “*pool*” de microrganismos no local contaminado com o objetivo de aumentar a população microbiana, responsável pela degradação do óleo (MOREIRA, 2011; ROSA, 2003). As espécies de bactéria dos gêneros *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* e *Bacillus* já são amplamente difundidas pela capacidade de degradar hidrocarbonetos presentes em combustíveis derivados do petróleo (SOLANO-SERENA *et al.*, 2000; GHAZALI *et al.*, 2004; SILVA & ALVAREZ, 2004; DOU *et al.*, 2007).

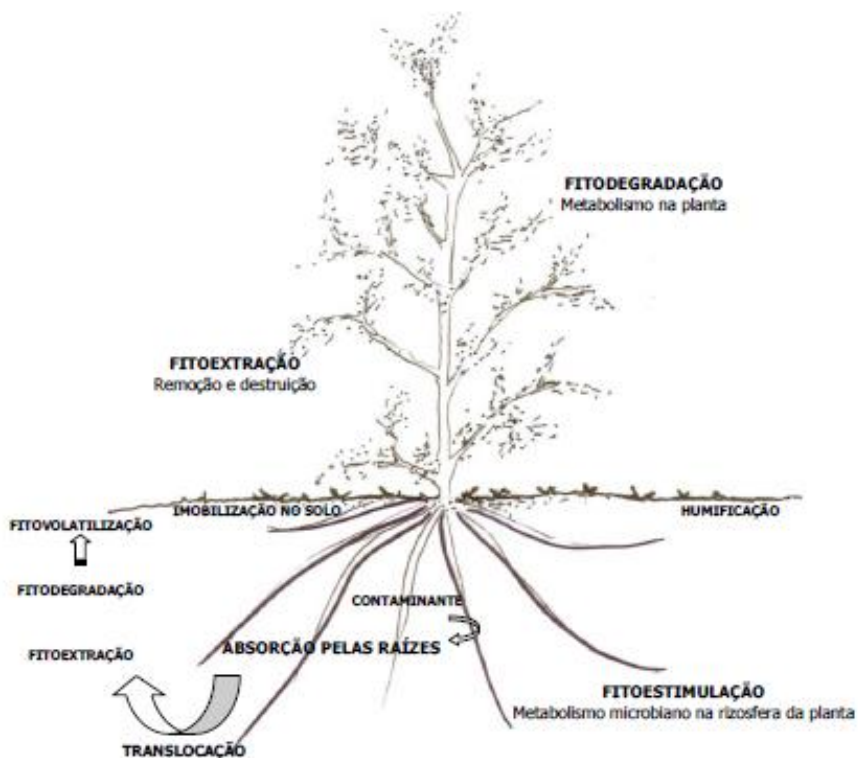
### **3.6.5. Landfarming**

Técnica referente ao tratamento de resíduos dispostos em área impermeabilizada denominada célula, a qual sofre a adição de nutrientes, a correção de pH e umidade, além da aração do solo para favorecer a biodegradação dos resíduos orgânicos por micro-organismos nativos (MONTEIRO *et al.*, 2008).

### 3.6.6. Fitorremediação

A fitorremediação tem como base áreas como a botânica, fisiologia vegetal, bioquímica do solo e a química dos contaminantes, promovendo a reabilitação da estrutura e da ecologia do solo, aumentando a quantidade de carbono orgânico, a porosidade e a infiltração da água e reduzindo a erosão. É uma tecnologia que visa o tratamento dos solos contaminados, com custo relativamente baixo em relação a outras tecnologias, baixo impacto ambiental e aceitação pela comunidade científica e as indústrias (MERKL *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2011).

Didaticamente a fitorremediação pode ser dividida em oito processos denominados de Fitoextração, Fitoacumulação, Fitodegradação, Fitovolatilização, Fitoestimulação, descritos na Figura 4, e Rizodegradação, Rizovolatilização e Rizoestabilização, os quais ocorrem em função das características morfofisiológicas de cada espécie vegetal (Tabela 1) (PROCÓPIO *et al.*, 2009).



**Figura 4:** Modelo esquemático dos tipos de mecanismos de fitorremediação utilizados pelas plantas.

Fonte: ANDRADE *et al.*, 2007.

**Tabela 1.** Mecanismos fitorremediação

<i>MECANISMO</i>	<i>DESCRIÇÃO DO PROCESSO</i>
Fitoextração	Absorção do contaminante presente no ambiente pela espécie vegetal
Fitoacumulação	Armazenamento do contaminante nas raízes ou em outros órgãos, sem modificação nas moléculas do xenobiótico (aprisionamento). Ocorre após a fitoextração
Fitodegradação	Bioconversão do contaminante em formas menos tóxicas ou não-tóxicas nas raízes ou em outros órgãos dos vegetais; em alguns casos a transformação ocorre de forma intensa, resultando na mineralização do xenobiótico. Ocorre após a fitoextração, ou mesmo após a fitoacumulação
Fitovolatilização	Volatilização de um contaminante fitotransformado a uma forma volátil, a qual é liberada na atmosfera. Ocorre após a fitoextração, ou mesmo após a fitoacumulação
Fitoestimulação	Estimulação à concentração/ativação de comunidade microbiana apta a biodegradar o contaminante, resultado da produção e liberação de exsudatos radiculares pela espécie vegetal
Rizodegradação	Biodegradação do contaminante pela comunidade microbiana associada à rizosfera da espécie vegetal. Normalmente ocorre após a fitoestimulação
Rizovolatilização	Volatilização de um contaminante rizotransformado a uma forma volátil, a qual é liberada na atmosfera
Rizoestabilização	Imobilização, lignificação ou humificação do contaminante na rizosfera da espécie vegetal, ficando o contaminante inativo no solo, mesmo que preservando sua integridade molecular

Fonte: PROCÓPIO *et al.*, 2009

As plantas garantem as trocas gasosas e o desenvolvimento dos micro-organismos, inclusive os biorremediadores. O Brasil apresenta grande potencial de uso tanto para biorremediação quanto para fitorremediação na recuperação de áreas contaminadas, devido à grande biodiversidade e ao clima, que favorecem os processos biológicos no tratamento da poluição (MARQUES *et al.*, 2011).

A fitorremediação pode ser usada em aplicações “*in situ*” ou “*ex situ*”. A técnica é em geral considerada para uso “*in situ*” pelo estabelecimento da vegetação em áreas de solo ou água subterrânea contaminada. Porém, o solo

pode ser escavado e transportado para uma unidade de tratamento onde a fitorremediação possa ser aplicada (MONTEIRO, 2008).

No processo de fitorremediação é desejável que as espécies vegetais apresentem um crescimento rápido, elevada produção de biomassa, competitividade, vigor e tolerância à poluição. Deste modo, plantas com essas características podem ser utilizadas como agentes de despoluição (LAMEGO & VIDAL, 2007).

### **3.7. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas – RPCP's**

Exsudatos liberados pelas plantas através das raízes, incluindo íons (ex.: H<sup>+</sup>), ácidos inorgânicos, oxigênio, água, compostos de carbono de baixo peso molecular (aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, compostos fenólicos e metabólitos secundários) e de alto peso molecular (mucilagem, proteínas), modelam interações, como associações simbióticas com micorriza, rizóbio e rizobactérias promotores do crescimento vegetal (plant growth promoting rhizosphere-PGPR) (BAIS *et al.*, 2006; BADRI & VIVANCO, 2009). Rizobactérias que colonizam as raízes e promovem o crescimento vegetal têm sido associadas à biorremediação de solos (HUANG *et al.*, 2005; ZHUANG *et al.*, 2007).

As rizobactérias podem melhorar diretamente a extensão ou qualidade do crescimento da planta aumentando a ciclagem de nutrientes, tais como, a fixação biológica de nitrogênio (AHMAD *et al.*, 2008) e produção de hormônios, além de promover a supressão de patógenos (CUMMINGS, 2009). Segundo MARIANO *et al.* (2004), as bactérias *Pseudomonas spp.* e espécies de *Bacillus* estão entre as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas.

### **3.8. Biossurfactantes**

Os biossurfactantes ou surfactantes de origem microbiana são agentes tensoativos com capacidade de detergência, emulsificação, dispersão de fases, e entre suas aplicações podem ser utilizados em processos de descontaminação de ambientes poluídos (GASPARIN *et al.*, 2012). Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula (NITSCHKE & PASTORE, 2002), desta forma, similar aos surfactantes de origem sintética, possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial (líquido-gás) ou tensão interfacial



(entre líquidos imiscíveis). Resultam do metabolismo secundário dos micro-organismos, ocorrendo a sua produção no final da fase exponencial e durante a fase estacionária. (NAWAWI & JAMAL, 2010).

Algumas funções fisiológicas dos biossurfactantes têm sido relatadas, tais como: emulsificação e a solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de micro-organismos nestes substratos, transporte de hidrocarbonetos, regulação da aderência-liberação da célula a superfícies e atividade antibiótica, o que confere aos micro-organismos maiores chances de sobrevivência e competitividade (DESAI & BANAT, 1997; FIECHTER, 1992; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

O uso do biossurfactante foi sugerido como uma alternativa a produtos de origem sintética. As principais vantagens em relação aos detergentes sintéticos residem em sua baixa toxicidade e natureza altamente biodegradável (ARAÚJO *et al.*, 2013). Biossurfactantes têm sido testados na recuperação e tratamento de áreas contaminadas por hidrocarbonetos, sendo bastante efetivos na diminuição da tensão interfacial do óleo e da água e na viscosidade do óleo (COSTA, 2010).

As principais classes de biossurfactantes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI & DESAI, 1993). Vários tipos de biossurfactantes foram sintetizados a partir de bactérias que pertencem a uma variedade de gêneros, dentre elas encontra-se os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (BANAT *et al.*, 2010).

### **3.8.1. Biossurfactantes produzidos pelo gênero *Bacillus***

O gênero *Bacillus*, é compreendido por micro-organismos Gram-positivos, formadores de esporos, em forma de bastão, aeróbios ou anaeróbios facultativos, podendo ser encontrados no solo, na água, na poeira ou no ar. Bactérias deste gênero apresentam intensa atividade metabólica, degradando substratos orgânicos (FRANCO & LANDGRAF, 2002). Segundo BOGNOLO (1999), os lipopeptídeos produzidos pelo gênero *Bacillus* estão entre os biossurfactantes mais efetivos. Linhagens de *Bacillus* têm sido indicadas pela produção do biossurfactante denominado surfactina (Tabela 2), o qual consiste de um lipopeptídio cíclico consistindo de um ácido graxo de 14 a 15 carbonos

ligado a um peptídio com 7 resíduos de aminoácidos. A produção do biossurfactante pelo *Bacillus sp.* provavelmente ocorre devido a mecanismos de proteção da célula ao ataque de outros micro-organismos (COLLA & COSTA, 2003).

DECESARO *et al.* (2013) verificou o potencial de produção de biossurfactantes por bactérias do gênero *Bacillus* isoladas de ambiente contaminado por óleo diesel. Os resultados demonstram que as linhagens isoladas são capazes de reduzir a tensão superficial de um meio contendo óleo de soja, sendo, portanto, promissoras na produção de biossurfactantes. *Bacillus* também são potenciais degradadores de HPAs. Segundo PINHATI *et al.* (2014), bactérias do gênero *Bacillus* são eficientes na degradação de antraceno e fenantreno.

**Tabela 2.** Relação dos principais biossurfactantes produzidos pelas várias espécies do gênero *Bacillus*.

<b>Tipo de biossurfactante</b>	<b>Microrganismo</b>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Surfactina	<i>B. subtilis</i>
Subtilisina	<i>B. subtilis</i>
Cerexina	<i>B. cereus</i>
Gramicidina	<i>B. brevis</i>
Liquenisina	<i>B. licheniformis</i>
Fengicina	<i>B. subtilis</i>
Surfactina	<i>B. pumilus</i>
Surfactina	<i>B. coagulans</i>
Ramnolipídeo	<i>B. subtilis</i>
Surfactina	<i>B. atrophaeus</i>
Bamicina	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Lipopeptídeo	<i>B. circulans</i>
Glicolipídeo	<i>B. megaterium</i>

Fonte: BUGAY, 2009.

### 3.8.2. Biossurfactantes produzidos pelo gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* é composto por bacilos Gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, com dimensões entre 0,5 – 1,0 µm de largura e 1,5 – 5,0µm de comprimento, não formadores de esporos, integrante da família *Pseudomonadaceae* (PALLERONI, 1998). Cresce formando colônias irregulares e opacas, em uma faixa ampla de temperaturas. A maioria das linhagens produz

pigmentos hidrossolúveis tais como a pioverdina, o qual confere ao meio de cultura coloração esverdeada (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

GEORGIU *et al.* (1992) relata a produção de biossurfactante do tipo ramnolipídio e viscosina por *Pseudomonas sp.* e *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente. Já DESAI *et al.* (1997) relata a produção do biossurfactante polimérico carboidrato-proteína-lípido por *Pseudomonas fluorescens*.

Segundo BARATHI & VASUDEVAN (2001), *Pseudomonas fluorescens* poderia desempenhar um papel importante na remediação de solo contaminado com petróleo em ecossistemas aquáticos. BARATHI & VASUDEVAN (2001) demonstraram que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas fluorescens* emulsifica substratos contendo hidrocarbonetos aromáticos derivados de petróleo. O que corrobora com o aumento da biodegradação do tetradecano, pristano e hexadecano no solo obtidos por JAIN *et al.* (1992) com a adição de biossurfactante produzido por uma bactéria do gênero *Pseudomonas*. Segundo THAVASI *et al.* (2011), o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* pode ser aplicado na descontaminação de ambientes com derramamento de óleo cru, devido sua alta atividade de emulsificação em baixa concentração.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Amostragem

O sedimento foi coletado em uma região típica de manguezal do Rio Paraguaçu, coordenadas S 12°42 11'.1"/ W0 38°45 19'.4", altura da maré 0,1m, localizado no município de Maragogipe - Bahia. Coletou-se 144kg de sedimento com o auxílio de pás. O sedimento foi acondicionado e transportado em tambores plásticos para a casa de vegetação onde permaneceu secando, a temperatura ambiente, até o momento da montagem do experimento.

Os propágulos de *Rhizophora mangle* L. foram coletados no manguezal de Praia Grande, localizado na região de Ilha de Maré - Bahia. Foram coletados 54 propágulos de acordo com a uniformidade do tamanho, ausência de raízes e condições fitossanitárias adequadas (ex: presença de necrose, clorose, herbivoria etc), em seguida foram transportados em bandejas plásticas até a casa de vegetação, onde permaneceram até o plantio.

### 4.2. Esquema de montagem do experimento

Em casa de vegetação, os tratamentos foram distribuídos em blocos ao acaso, conforme descrito abaixo:

**Controle 1:** Sedimento sem autoclavar + 6 propágulos de *Rhizophora mangle* L.

**Controle 2:** Sedimento sem autoclavar + óleo diesel

**Controle 3:** Sedimento autoclavado + óleo diesel

**Tratamento 1:** Sedimento autoclavado + óleo diesel + *Bacillus* sp. + *Pseudomonas fluorescens*

**Tratamento 2:** Sedimento autoclavado + óleo diesel + *Bacillus* sp. + *Pseudomonas fluorescens* + 6 propágulos de *Rhizophora mangle* L.

**Tratamento 3:** Sedimento autoclavado + óleo diesel + 6 propágulos de *Rhizophora mangle* L.

Os módulos, com capacidade de 18L, foram adaptados com torneiras plásticas, identificados e forrados com papel alumínio, a fim de evitar o contato do sedimento com o plástico. Os módulos foram regados com água do mar autoclavada e sem autoclavar, conforme montagem do experimento.

### **4.3. Autoclavagem do sedimento anterior a montagem do experimento**

Após o período secando em casa de vegetação, parte do sedimento foi pesada e distribuída em 12 sacos plásticos para autoclave, contendo 8kg de sedimento em cada saco. Posteriormente, o sedimento foi autoclavado a 121°C por 30 minutos durante 3 dias consecutivos, em intervalos de 24h entre cada autoclavagem, adaptado de ARAÚJO & GUERREIRO (2010) e BENTO *et al.* (2003). A parte restante do sedimento foi mantida na casa de vegetação. Ao final, foi adicionado 8kg de sedimento em cada módulo, para a distribuição dos tratamentos e controles.

### **4.4. Contaminação do sedimento com óleo diesel**

O sedimento, já distribuído nos módulos, foi contaminado com óleo diesel S500, adquirido em posto de gasolina. Utilizou-se um volume de 310mL por módulo, uma concentração de 55µg.mL<sup>-1</sup>, adaptado de CHAGAS-SPINELLI (2007). A contaminação foi realizada 5 dias antes da inoculação das bactérias e do plantio dos propágulos, a fim de proporcionar uma eficiente absorção do óleo pelo sedimento. Foi coletada amostra do óleo diesel para realização da quantificação de HPAs e *n*-alcanos.

### **4.5. Preparo do inóculo bacteriano**

#### **4.5.1. Pré-inóculo**

As linhagens de bactérias utilizadas neste experimento foram isoladas da rizosfera de plantas do semiárido baiano e pertencem a Coleção de Cultura de Micro-organismos do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA.

O pré-inóculo das linhagens CCMICS105 *Pseudomonas fluorescens* e CCMICS 108 *Bacillus sp.* foi preparado em frascos do tipo erlenmeyers de 300mL, contendo 100mL do meio Caldo Nutriente, a 30°C, sob agitação orbital de 120rpm, por 24h.

#### **4.5.2. Inóculo do sedimento**

O inóculo foi preparado a partir de um volume pré-determinado do pré-inóculo. A biomassa bacteriana foi re-inoculada em frascos do tipo erlenmeyers de 300ml contendo 100ml do meio Caldo Nutriente, a 30°C, sob agitação de

120rpm, por 16h. Após o período de incubação, o inóculo atingiu a densidade óptica (DO) de  $10^9$  células/mL e posteriormente as amostras foram centrifugadas a 5000rpm, durante 5 minutos. O pellet contendo as células foi ressuspensão em 200mL de solução salina, a 0,9%(NaCl), e inoculado no sedimento.

#### 4.5.3. Inoculação dos propágulos e plantio

Os propágulos foram inicialmente mensurados e higienizados com hipoclorito de sódio a 2%, durante 5 minutos e lavados 3 vezes com água, para retirar o excesso do hipoclorito. Para o inóculo do propágulo, o pellet contendo as células foi ressuspensão em 1L de solução salina a 0,9%. Os propágulos foram imersos, separadamente, por 2 minutos, em solução salina contendo as linhagens CCMICS105 *Pseudomonas fluorescens* e CCMICS108 *Bacillus sp.*. Posteriormente, os propágulos foram identificados com lacres numerados e plantados nos módulos (Figura 5).



**Figura 5:** Experimento de biorremediação montado na casa de vegetação do Instituto de Biologia da UFBA.

#### 4.6. Avaliação da germinação dos propágulos e do peso das plantas

Avaliou-se a germinação das plantas ao final do experimento (120 dias) através da presença ou não de raiz. Em seguida, duas plantas por módulo, totalizando 18 plantas, foram separadas em parte aérea, propágulo e raiz, e mensuradas individualmente para obtenção da matéria fresca. As partes da planta foram posteriormente secas em estufa com circulação de ar forçada, a

80°C. Após a secagem, até peso constante, determinou-se o peso da matéria seca.

#### 4.7. Análise histológica das plantas

Os propágulos dos tratamentos e controle foram fixados em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 70%) por 48h e armazenados em etanol a 70% (JOHANSEN, 1940). Realizou-se cortes transversais, a mão livre, da região mediana dos propágulos. As seções foram clarificadas em hipoclorito de sódio a 2%, lavadas com água destilada e submetidas à coloração com fucsina. Em seguida, os cortes foram montados em lâmina e visualizados em microscópio óptico LEICA DM750 acoplado à câmera LEICA DFC 295.

#### 4.8. Isolamento das bactérias da raiz

Foram coletadas amostras de raízes de plantas do Tratamento 2 para avaliação de colonização por bactérias. Os fragmentos de raízes foram incubados em meio LB (Luria-Bertani) a 30°C, por 48h. Após este período procedeu-se a realização do plaqueamento em meio TSA e ágar *Pseudomonas* Piocianina e Fluoresceína. As colônias foram contadas e as bactérias foram avaliadas quanto a morfologia em microscópio óptico.

#### 4.9. Isolamento das bactérias do propágulo

O isolamento das bactérias do propágulo foi realizado a partir de cortes longitudinais das plantas do Controle 1 e do Tratamento 2 (Figura 6).



**Figura 6:** Propágulo cortado longitudinalmente para avaliação da presença de bactérias.

Os cortes foram higienizados com hipoclorito de sódio a 2%, álcool a 70% e lavados com água destilada estéril por 3 vezes. Posteriormente os cortes foram seccionados e incubados em ágar nutriente, a 30°C por 48h.

#### **4.10. Isolamento das bactérias do sedimento**

As bactérias do sedimento foram isoladas após 120 dias de experimento. Foi coletado 5g do sedimento e incubado em frasco erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de solução salina estéril a 0,9% (NaCl), a 28°C, sob agitação de 200rpm por 20 minutos. A partir do sobrenadante realizou-se diluição seriada até a concentração de  $10^{-5}$  e plaqueamento das 3 últimas diluições em meio TSA (*Tryptone Soya Agar*) e ágar *Pseudomonas* Piocianina e Fluoresceína. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas (BAYER, 2010).

#### **4.11. Análise das raízes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Amostras das raízes de plantas do Tratamento 2 e do Controle 1 foram coletadas para avaliação de colonização por bactérias em MEV. As raízes foram fixadas em solução Karnovsky 70%, com pH 7,4 (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, tampão cacodilato de sódio 0,1M e água destilada), durante 24h. Em seguida as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%. Após a fixação, as amostras foram submetidas a uma série de banhos em etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) para desidratação, secas em aparelho de ponto crítico modelo LEICA EM CPDO30. As amostras foram então montadas em *stubs* e metalizadas com fina camada de ouro no metalizador modelo DETON VACUM DESK IV STANDARD. As observações foram feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura de alta resolução modelo JEOL JSM 6390LV. O processamento e a observação das amostras foram realizados na Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/BA.

#### **4.12. Análise de hidrocarbonetos do sedimento**

Amostras do sedimento antes da contaminação com óleo diesel e ao final do experimento foram coletadas e analisadas quanto a presença de HPA e *n*-alcanos, no Laboratório de Isótopos Estáveis localizado no Laboratório de Física Nuclear Aplicada da UFBA. As amostras foram homogeneizadas, formando uma



amostra composta, armazenadas em recipientes de alumínio, e acondicionadas a 4°C até a realização das análises.

Os HPA's e *n*-alcanos foram determinados segundo o método USEPA 3550C. O sedimento foi previamente seco em estufa com circulação forçada de ar a 45°C durante 48h e em seguida uma alíquota de 2g de cada amostra foi submetida a extração em equipamento de ultrassom tipo 75T utilizando 10mL de diclorometano P.A. como solvente, sendo 3 banhos com duração de 30 minutos cada. No intervalo de cada banho de ultrassom, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 5 minutos e o extrato final foi submetido a evaporação com nitrogênio.

Após a extração, o extrato foi submetido à cromatografia de adsorção em coluna de vidro contendo sílica, sulfato de sódio anidro e cobre. A sílica foi ativada a 140°C/4h, o sulfato de sódio anidro foi ativado a 400°C/16h e o cobre foi ativado em HCl 0,1M, seguido por acetona e armazenado em *n*-hexano P.A.. O extrato foi eluído inicialmente em 40mL de *n*-hexano P.A. para obtenção da fase 1. Posteriormente, adicionou-se à coluna uma mistura de *n*-hexano P.A. e diclorometano P.A. (4:1 v/v) para obtenção da fase 2. O eluente foi submetido a Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-EM) modelo GCMS-QP2010 Plus.

Os *n*-alcanos e HPAs presentes nas frações foram identificados e quantificados no modo de monitoramento de íons específicos (SIM), com uma coluna DB5-HP e hélio como gás de arrasto. O fluxo do gás de arrasto foi mantido constante.

A injeção dos *n*-alcanos foi realizado no modo split com razão de 40, com o injetor à temperatura de 280 °C. No método de análise SIM, foram monitoradas as razões massa/carga 43, 57, 71 e 85 durante todo o tempo de análise. A injeção dos HPAs foi realizado no modo splitless, com o injetor à temperatura de 300 °C.

Os compostos foram identificados com base em padrões externos. O padrão usado nas análises dos *n*-alcanos foi Alkanes Calibration std, 40147-U da SUPELCO, contendo os compostos C8 a C40, além dos isoprenóides pristano e fitano. Para as análises dos HPAs foi utilizado o padrão TCL Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix, 48905-U SUPELCO, contendo os 16 HPAs prioritários. A quantificação foi realizada via padrão externo, com a construção

de curvas analíticas com sete pontos com concentrações distintas. Os resultados foram expressos em termos do volume final dos extratos e na massa seca de extração.

#### **4.13. Análise de hidrocarbonetos das plantas**

Avaliou-se a presença de HPA e *n*-alcanos de 3 plantas pertencentes ao Controle 1, Tratamento 2 e Tratamento 3. As amostras foram processadas no Laboratório de Isótopos Estáveis localizado no Laboratório de Física Nuclear Aplicada da UFBA.

As plantas foram previamente liofilizadas e maceradas. Em seguida, 1g de cada amostra foi submetida a extração em equipamento de ultrassom tipo 75T, seguindo o método 3550C, utilizando 10mL de diclorometano P.A. como solvente, sendo 3 banhos com duração de 30 minutos cada. No intervalo de cada banho de ultrassom, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 5 minutos e o extrato final foi submetido a evaporação com nitrogênio. Após a extração, o extrato foi submetido à coluna de sílica, sulfato de sódio anidro e cobre para obtenção do eluente limpo, com utilização de diclorometano P.A e *n*-hexano P.A. como solventes, seguindo as mesmas etapas utilizadas para o sedimento. O eluente foi submetido a Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-EM) modelo GCMS-QP2010, adaptado de CHEEMA *et al.* (2010). As condições de injeção foram as mesmas relatadas para o sedimento.

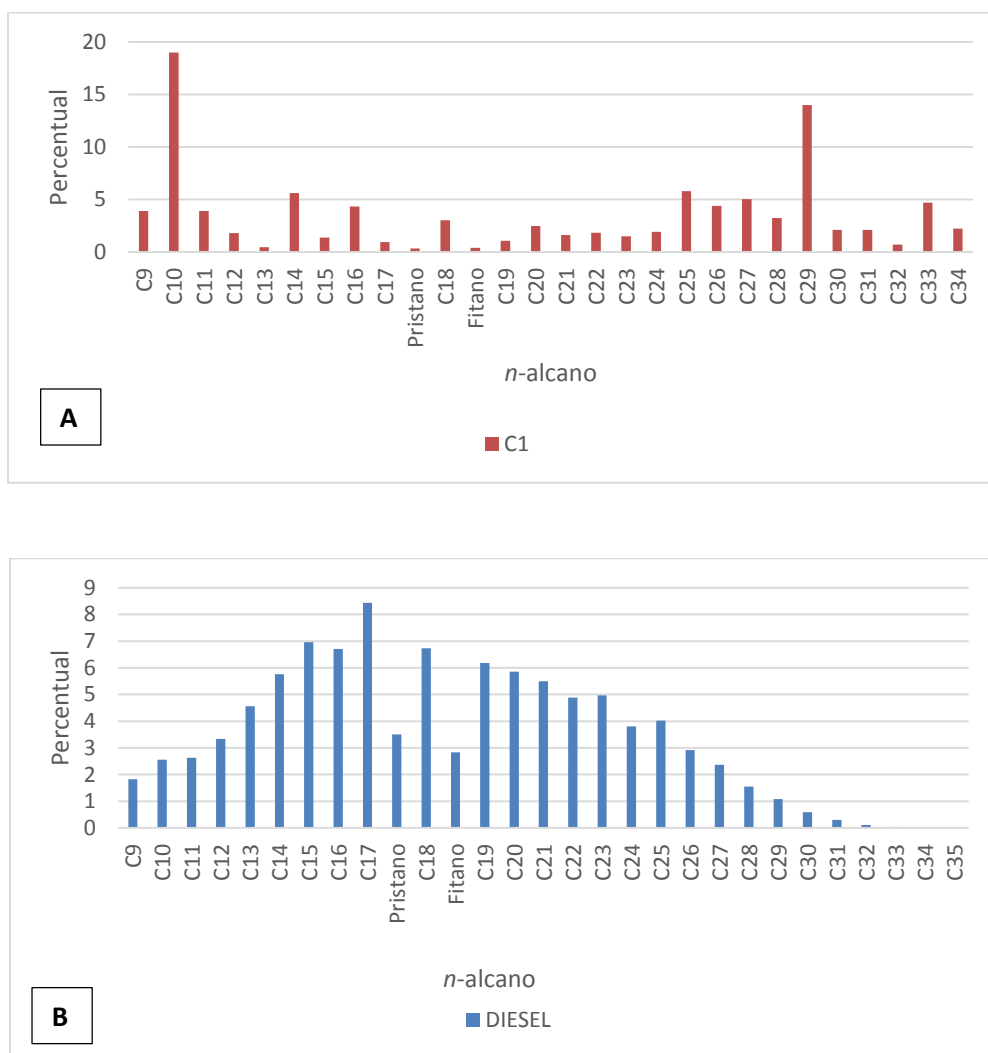
#### **4.14. Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o teste de contraste utilizado foi o Teste de Tukey (1 e 5% de probabilidade), utilizando o software Assistat versão 7.7 (2015).

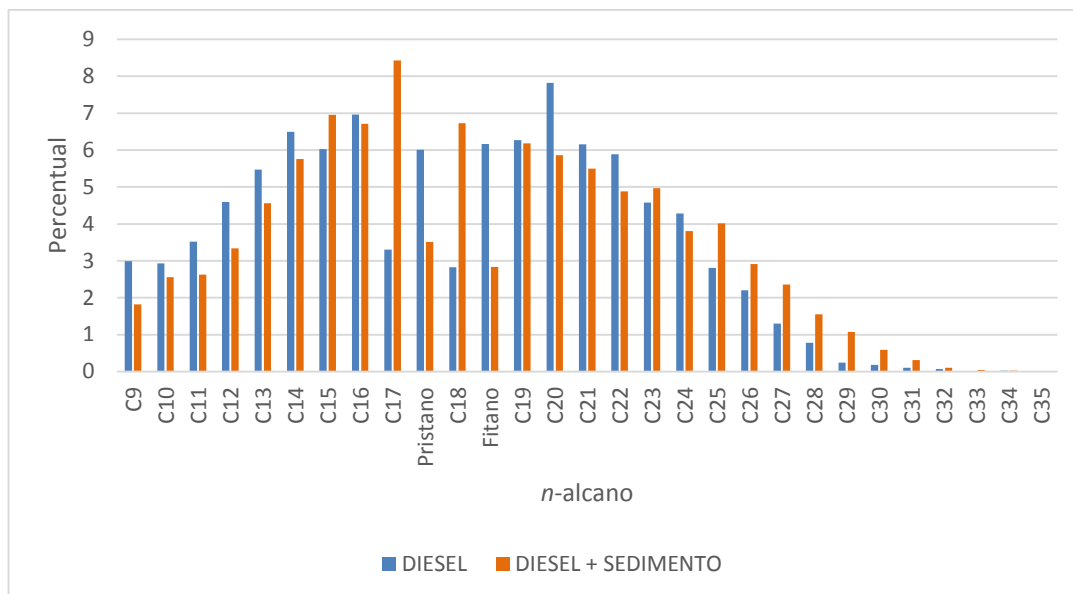
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Análise de *n*-alcanos e HPAs do sedimento

Foram identificados e quantificados os *n*-alcanos no intervalo de C9-C35. A partir das análises dos resultados foi possível observar que a contaminação de *n*-alcanos a ser considerada para título de degradação é a originada do óleo diesel ilustrado na Figura 7 (A), uma vez que o sedimento utilizado neste trabalho, representado pelo Controle 1, não apresentava contaminação por este composto, pois os valores das frações de alcanos foram baixos. Os picos observados na Figura 7 (B) correspondem a componentes naturais do sedimento, podendo ser atribuídos à matéria orgânica.

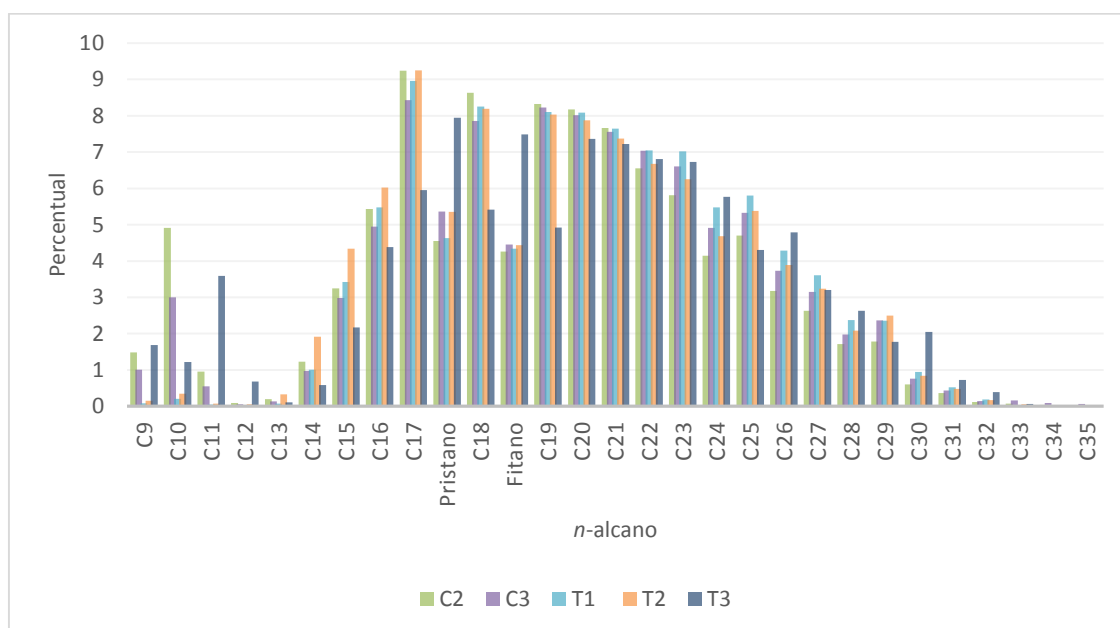


**Figura 7:** Percentual de *n*-alceno presente nas amostras de sedimento do Controle 1 (A) e no Diesel (B).



**Figura 8:** Comparação entre o percentual de *n*-alcanos presente na amostra de Diesel com o percentual absorvido pelo sedimento.

A extração de *n*-alcanos por ultrassom realizada neste trabalho obteve uma recuperação satisfatória das frações, conforme Figura 8.



**Figura 9:** Comparação entre o percentual de *n*-alcanos presente nas amostras de sedimento dos Controles e Tratamentos após 120 dias de experimento.

Como pode ser observado na Figura 9, houve redução de C9-C11 entre os tratamentos. Os Tratamentos 1 e 2, em que houve a inoculação das bactérias

CCMICS105 *Pseudomonas fluorescens* e CCMICS108 *Bacillus sp.*, apresentaram maior degradação dos compostos C9-C11 do que o Tratamento 3. Alguns alcanos, a exemplo do C15, C17 e C25, foram detectados em maiores percentuais nos Tratamentos 1 e 2 do que no Tratamento 3. Fato que pode ser atribuído à ação de substâncias produzidas por bactérias, a exemplo dos biossurfactantes, que promovem a desorção dos hidrocarbonetos do sedimento e os biodisponibilizam.

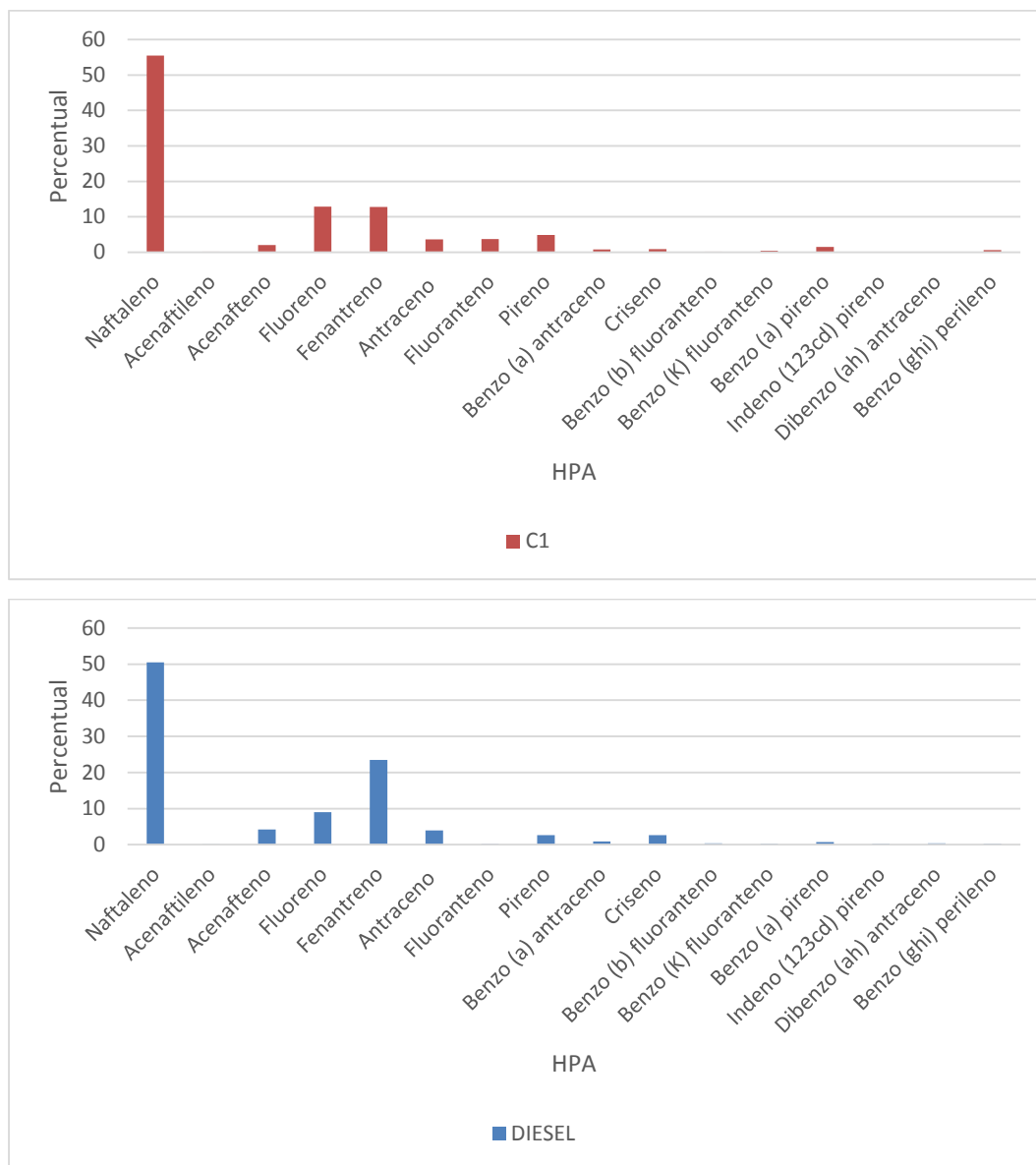
Os elevados percentuais das cadeias C9-C11 encontrados no Tratamento 3 é indicativo de que a *Rhizophora mangle* L. não apresentou efeito na degradação destes compostos. A fração C12-C14 apresentou redução em todos os tratamentos e controles, Figuras 8. Fato que pode ser atribuído à ação de bactérias provenientes de contaminação ou ação do intemperismo, uma vez que o experimento ocorreu em condições de campo.

As cadeias intermediárias e pesadas de *n*-alcanos (C14-C35) não apresentaram redução significativa entre os tratamentos e controles, quando comparados ao óleo diesel. Deste modo, a *Rhizophora mangle* L. e as linhagens CCMICS105 e CCMICS108 utilizadas neste trabalho não foram eficientes na biodegradação desta fração de alcanos.

De acordo com AZEVEDO *et al.* (2009), a biodegradação por microorganismos aeróbicos e/ou aneróbicos ocorre inicialmente pela perda de compostos mais leves, como *n*-alcanos de baixa massa molecular. ZHANG *et al.* (2014) utilizou *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas sp.* na degradação de compostos do óleo diesel. Os autores conseguiram reduzir totalmente os *n*-alcanos de cadeias leves. SINGH & LIN (2010), obtiveram uma aceleração da biodegradação do óleo diesel ao utilizar *Bacillus pumilus* e *Acinetobacter calcoaceticus* após 65 dias de experimento. A presença da bactéria *Bacillus pumillus* no solo contaminado resultou em significativa taxa de degradação do diesel. MARÍN *et al.* (2013) obteve 95% de degradação do C12 presente no óleo diesel utilizando consórcio de bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Sphingomonas*. Dados que corroboram com os resultados obtidos neste trabalho.

Para avaliar a presença de HPA no sedimento, foram identificados e quantificados os 16 HPAs prioritários, listados na Tabela 4. Os percentuais de

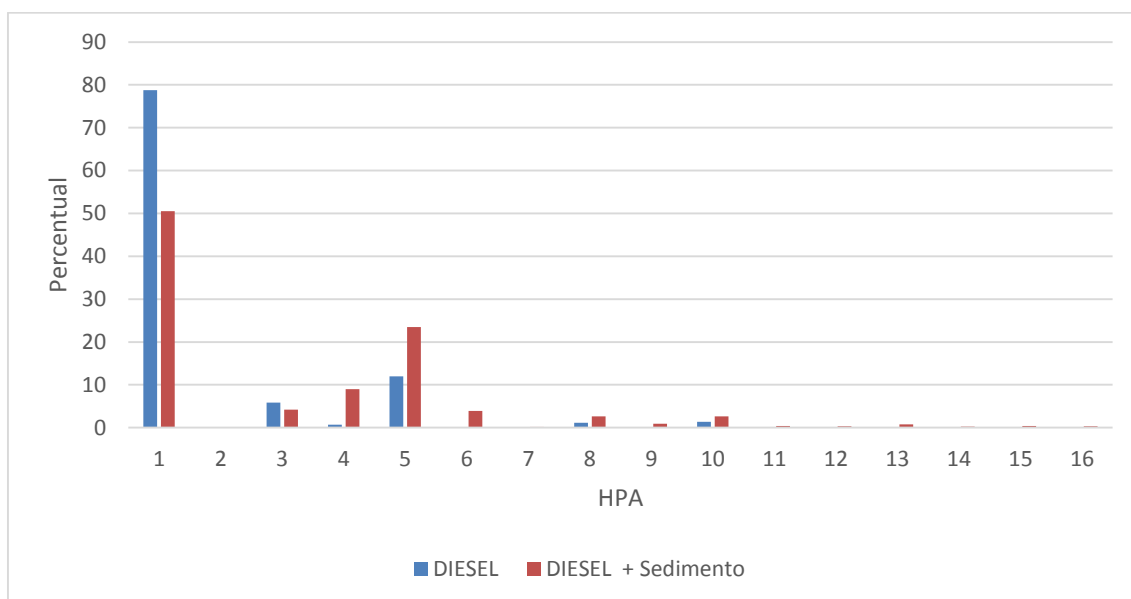
hidrocarbonetos aromáticos presentes no óleo diesel são elevados, quando comparadas com os valores encontrados no Controle 1 (Figura 11).



**Figura 10:** Comparação entre o percentual de HPA presente nas amostras de sedimento do Controle 1 e no Diesel.

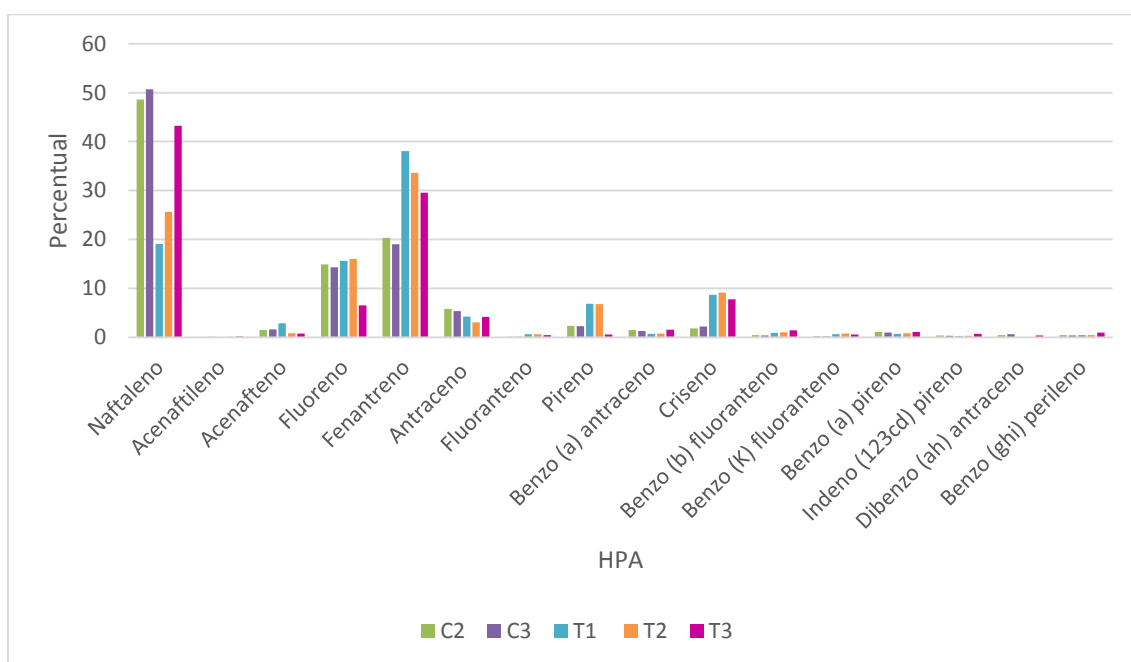
Dentre os HPAs presentes no óleo diesel, os que apresentaram maiores percentuais foram naftaleno, acenafteno, fluoreno e fenantreno. O naftaleno também obteve uma elevada contribuição no Controle 1, o que indica aporte antropogênico. Porém, os índices do óleo diesel foram os que apresentaram

maiores contribuições do que o Controle 1, sendo, portanto, os valores utilizados como base para análises de degradação neste trabalho.



**Figura 11:** Comparação entre o percentual de HPAs presente na amostra de Diesel com o percentual absorvido pelo sedimento.

A extração de HPAs por ultrassom realizada neste trabalho obteve uma recuperação satisfatória das frações, conforme Figura 11.



**Figura 12:** Comparação entre o percentual de HPA presente nas amostras de sedimento dos Controles e Tratamentos após 120 dias de experimento.

Os percentuais de HPA nos Controles 2 e 3 ao final do experimento são próximos entre si (Figura 12). Por ser um controle em que há microbiota natural, visto que o sedimento não foi autoclavado, pode-se inferir que não houve biodegradação pela microbiota autóctone do sedimento de manguezal, ao analisar os valores do Controle 2. Infere-se ainda que o tempo do experimento não foi suficiente para que houvesse a degradação dos HPAs ou que tais microorganismos não apresentam o aparato enzimático necessário para degradar esses compostos. Além de não haver perdas consideráveis por ação do intemperismo, quando observa-se os valores do Controle 3.

As maiores reduções nos níveis do naftaleno ocorreram no Tratamento 1 e no Tratamento 2, conforme observa-se na Figura 12.

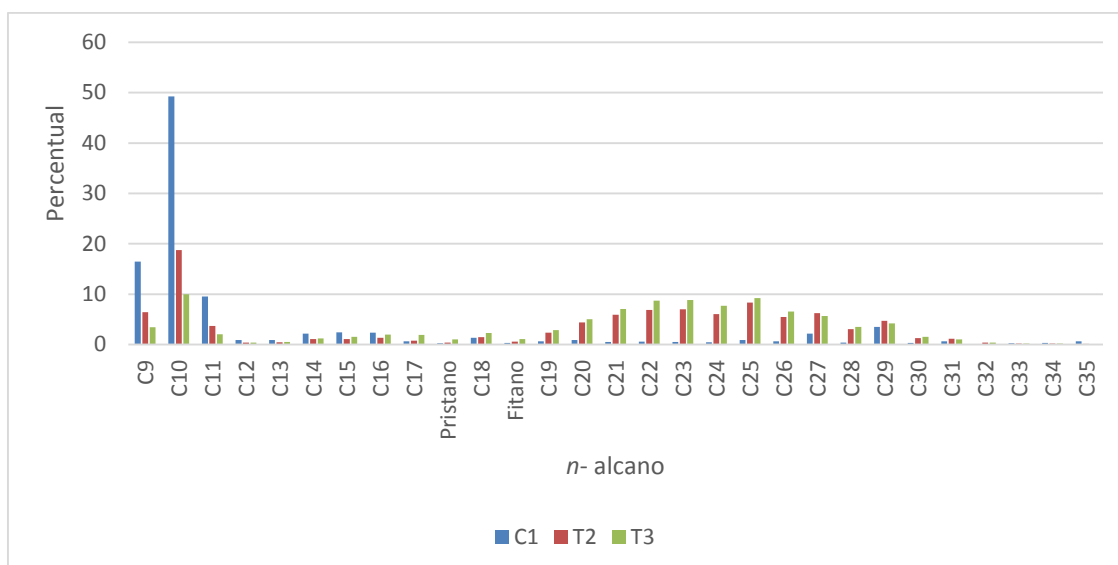
Os dados indicam que as bactérias CCMICS105 *Pseudomonas fluorescens* e CCMICS108 *Bacillus sp.* atuaram somente na degradação das frações de baixo peso molecular dos HPAs e que a *Rhizophora mangle* L. não foi eficaz na degradação desses compostos, provavelmente devido ao curto espaço de tempo do experimento, aliado a grande estabilidade e resistência dos HPAs à biodegradação.

Em experimentos realizados por PATHAK *et al.* (2009) foi possível observar degradação de 2000ppm do naftaleno em 24h utilizando *Pseudomonas sp.* PATEL *et al.* (2012) também demonstrou degradação de naftaleno utilizando linhagens de *Pseudomonas*. Estudos também têm demonstrado o potencial de degradação do naftaleno por bactérias do gênero *Bacillus*. LIN *et al.* (2010) alcançou a taxa de 99,1% de remoção do naftaleno com *Bacillus fusiformis*. Segundo o autor, a salinidade pode influenciar na biodegradação do composto. CERQUEIRA *et al.* 2011 removeu 51,8% da fração de aromáticos utilizando consórcio formado por bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, sendo o naftaleno a apresentar a maior taxa de degradação.

## **5.2. Análise de *n*-Alcanos e HPA na planta**

Foram avaliados os *n*-alcanos C9-C35 nas plantas, conforme Figura 13. Os percentuais das cadeias C9-C11 na planta do Controle 1 foram superiores às encontradas nos Tratamentos 2 e 3. É provável que os níveis encontrados desses compostos alifáticos na planta sejam devido a bioacumulação sofrida





**Figura 13:** Comparação entre o percentual de *n*-Alcanos presentes nas plantas do Controle 1 e dos Tratamentos 1 e 2 após 120 dias de experimento.

pelos propágulos na região em que foram coletados, pois trata-se de uma área que sofre influência da indústria petroquímica.

Aliado a adsorção desses compostos à superfície das folhas durante o experimento. De acordo com KRISTENSEN *et al.* (2008), a composição de *n*-alcanos em plantas de manguezais é susceptível às variações biogeográficas.

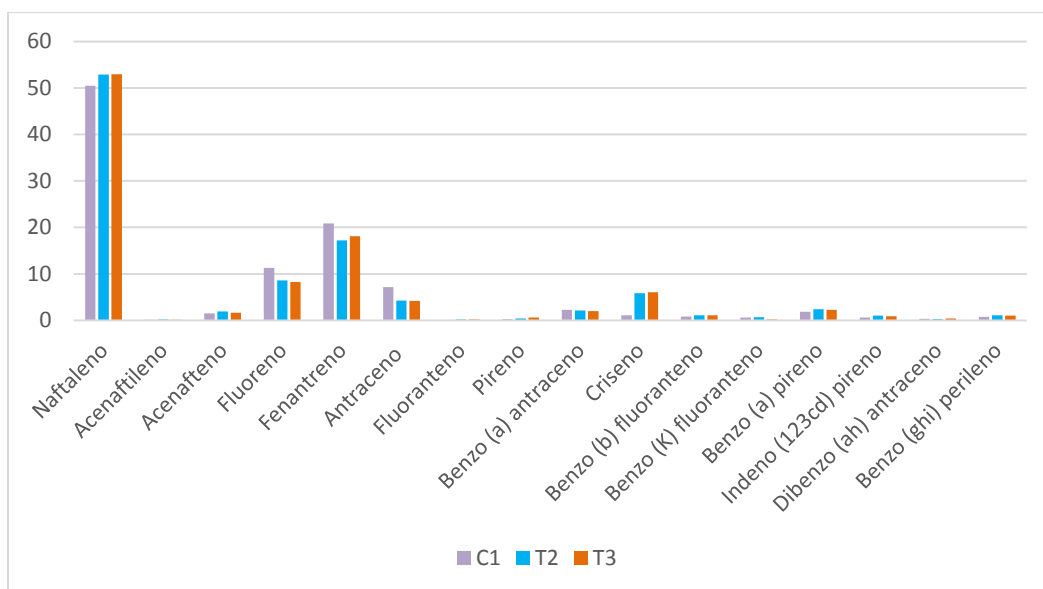
Dentre os tratamentos, houve maior retenção de alcanos na planta do Tratamento 3 do que no Tratamento 2. Podemos inferir que as linhagens CCMICS105 *Pseudomonas fluorescens* e CCMICS108 *Bacillus sp.* tenham colonizado a raiz e, conseqüentemente, protegido a planta através da degradação dos alcanos no sedimento evitando maior absorção do contaminante pelo vegetal, o que corrobora com os dados de *n*-alcanos do sedimento do Tratamento 2. Diferente da planta do Tratamento 3, onde houve maior absorção de alcanos.

Segundo ESPINOSA *et al.* (2005), a presença de micro-organismos que degradam hidrocarbonetos na rizosfera proporciona proteção externa para as plantas, reduzindo o potencial efeito tóxico produzido pelo contaminante.

Os percentuais de hidrocarbonetos aromáticos encontradas nas plantas do Controle 1 foram superiores às encontradas nas plantas dos tratamentos, exceto o Criseno que foi encontrado em menor percentual. Assim como relatado para *n*-alcanos, acredita-se que esses percentuais de HPA sejam oriundos do

processo de bioacumulação realizado pelos propágulos na região onde foram coletados.

Os valores de HPA encontrados nas plantas dos tratamentos não apresentaram diferença considerável, Figura 14.



**Figura 14:** Comparação entre o percentual de HPAs presentes nas plantas do Controle 1 e dos Tratamentos 1 e 2 após 120 dias de experimento.

Sendo assim, as linhagens inoculadas não impediram a absorção de HPA pelas plantas. As contribuições do naftaleno nas plantas dos tratamentos e do controle corroboram com os elevados índices desse composto nos respectivos sedimentos. Os dados obtidos corroboram com SOJINU *et al.* (2010) que avaliou as concentrações de HPA em plantas oriundas de ambiente onde há exploração de óleo. Os resultados mostram que as plantas absorveram os HPAs presentes no solo, sendo o naftaleno a obter concentrações mais elevadas, segundo os autores, devido a sua volatilidade e biodisponibilidade.

Segundo GLICK (2003), a fitorremediação de compostos orgânicos pode ocorrer por fitoestabilização, fitoestimulação ou fitotransformação, que é a absorção e degradação de compostos orgânicos pela planta. Apesar da planta do controle apresentar percentual elevado de HPAs, essas não morreram ao final do experimento. O que não pôde ser observado nas plantas dos tratamentos, apesar da redução nos níveis dos HPAs em seus tecidos.

### 5.3. Germinação dos propágulos e peso seco das plantas de *Rhizophora mangle* L.

A germinação dos propágulos foi avaliada através da presença ou não da raiz. Todos os propágulos do Controle 1 germinaram (Tabela 3), apresentando folhas e raízes bem desenvolvidas (Figura 15). O desenvolvimento das plantas do Controle 1 demonstra uma boa adaptabilidade da *Rhizophora mangle* L. às condições de um cultivo *ex situ*.

**Tabela 3:** Taxa de germinação dos propágulos de *Rhizophora mangle* L. após 120 dias de experimento.

Tratamento	Nº total de propágulos	Nº de propágulos que germinaram	Porcentagem de propágulos que germinaram
Controle 1	18	18	100%
Tratamento 2	18	10	55,5%
Tratamento 3	18	4	22,2%

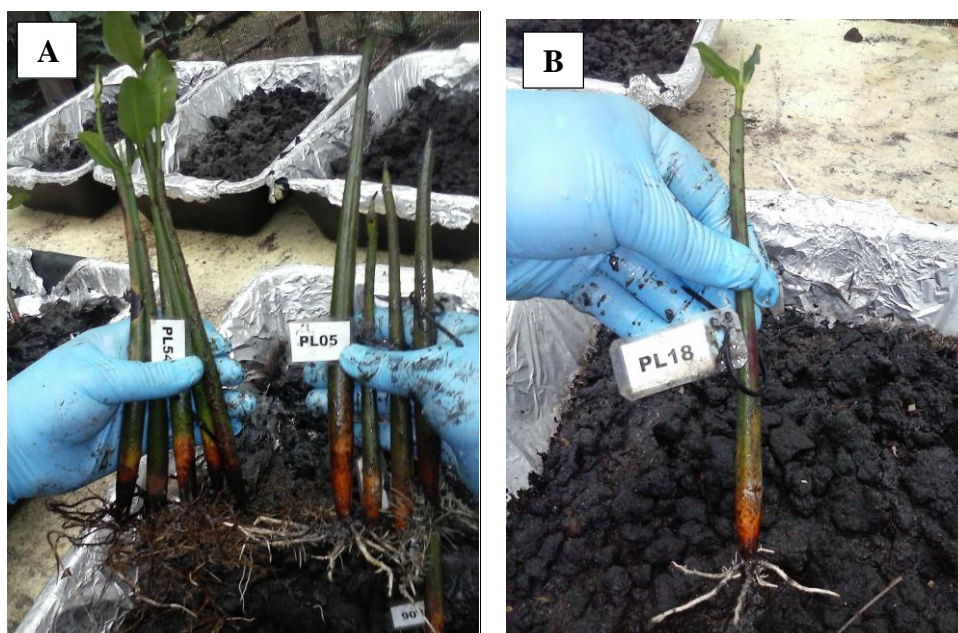
Apesar de não apresentar folhas e sistema radicular com maior de nível de complexidade, como observado no Controle 1, o Tratamento 2 apresentou 10 propágulos germinados, correspondendo a 55,5% do total de propágulos plantados (Figura 15).



**Figura 15:** Desenvolvimento de plantas do Controle 1 após 120 dias de experimento.

No Tratamento 3 apenas 22,2% dos propágulos germinaram. A diferença na taxa de germinação entre os tratamentos pode ser atribuída às linhagens CCMICS105 e CCMICS108 inoculadas no Tratamento 2.

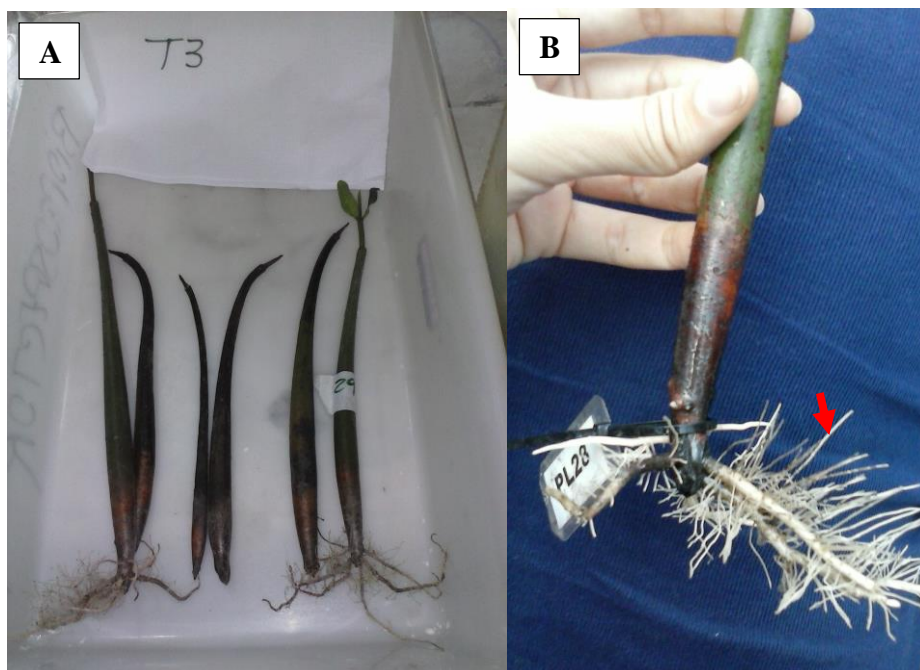
Por se tratarem de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, infere-se que as linhagens induziram a germinação dos propágulos, e que as bactérias colonizaram e, conseqüentemente, protegeram as raízes das plantas do Tratamento 2, evitando a exposição ao contaminante, reduzindo a absorção dos compostos do óleo diesel e aumentando a sobrevivência dos propágulos.



**Figura 16:** Comparação do nível de desenvolvimento de plantas do Controle 1 (esquerda) e plantas do Tratamento 2 (direita) (A) após 120 dias de experimento. Planta do Tratamento 2 com folhas (B).

No entanto, pode-se observar na Figura 15 e na Figura 16 que a germinação e o desenvolvimento dos propágulos foram retardados nos tratamentos, o que pode ser atribuído aos efeitos tóxicos do óleo diesel. Os efeitos do diesel foram mais proeminentes no Tratamento 3, que apresentou 77,8% de propágulos não germinados. CHINDAH *et al.* (2007) verificaram que mudas de *Rhizophora mangle* L. expostas a sedimento contaminado por óleo cru tiveram redução no crescimento do caule, no desenvolvimento das folhas, além de apresentarem clorose. Segundo os autores, as mudas do tratamento reduziram mais de 50% no crescimento quando comparadas com o controle. Os

autores atribuíram os efeitos tóxicos observados na planta aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos do óleo cru e ao baixo nível de nitrogênio dos sedimentos poluídos por petróleo.



**Figura 17:** Desenvolvimento de plantas do Tratamento 3 (A) após 120 dias de experimento. Sistema radicular ramificado da planta do Tratamento 3 (B). Seta indicando raízes laterais.

O sistema radicular das plantas do Tratamento 3 apresentou maior ramificação do que as plantas do Tratamento 2 (Figura 17), possivelmente em resposta ao estresse hídrico e ao baixo teor de oxigênio causados pelo óleo diesel no sedimento que impermeabilizou as raízes. Em estudos anteriores, OLIVEIRA *et al.* (2008) relata a presença de um sistema radicular mais denso e ramificado em *Schinus terebinthifolius* cultivadas em solo contaminado com petróleo. Os autores sugerem que esta característica morfológica pode estar relacionada a um déficit hídrico do solo contaminado. ADAM & DUNCAM (1999) também verificaram a formação de raízes laterais em plantas expostas ao óleo diesel.

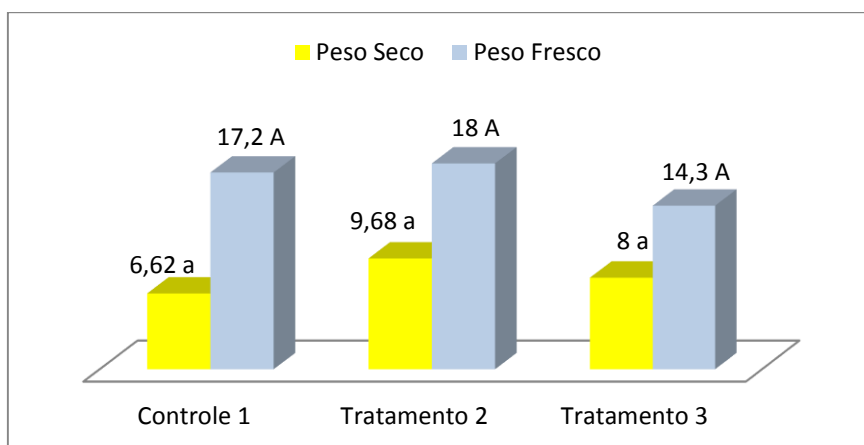
Segundo VISSER *et al.* (1997), as raízes tendem a ser mais ramificadas em situação de hipóxia, o que aumenta a eficiência no transporte de oxigênio e água. De acordo com FERNÁNDEZ *et al.* (2011), os compostos de

hidrocarbonetos podem causar toxicidade à planta, devido aos componentes voláteis presentes na mistura, que podem mover através da membrana das células produzindo efeitos tóxicos, bem como, a sua hidrofobicidade, que podem dificultar a infiltração de água e de arejamento necessário para o crescimento das plantas.

A ausência de elevada ramificação no sistema radicular das plantas do Tratamento 2 pode estar relacionada com a presença das rizobactérias CCMICS105 e CCMICS108 protegendo a raiz e, portanto, reduzindo o estresse hídrico e respiratório para as plantas.

Sendo assim, infere-se a partir dos dados que a morte das plantas dos tratamentos foi devido aos efeitos tóxicos ocasionados pela alta concentração do óleo diesel ( $55\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), acarretando na ineficácia do processo de fitorremediação neste trabalho.

Foram avaliados estatisticamente os pesos fresco e seco totais das plantas. Os resultados mostram que não houve diferença significativa na biomassa fresca e seca entre o controle e os tratamentos (Figura 18), apesar das plantas do controle apresentarem um maior desenvolvimento do que nos tratamentos.



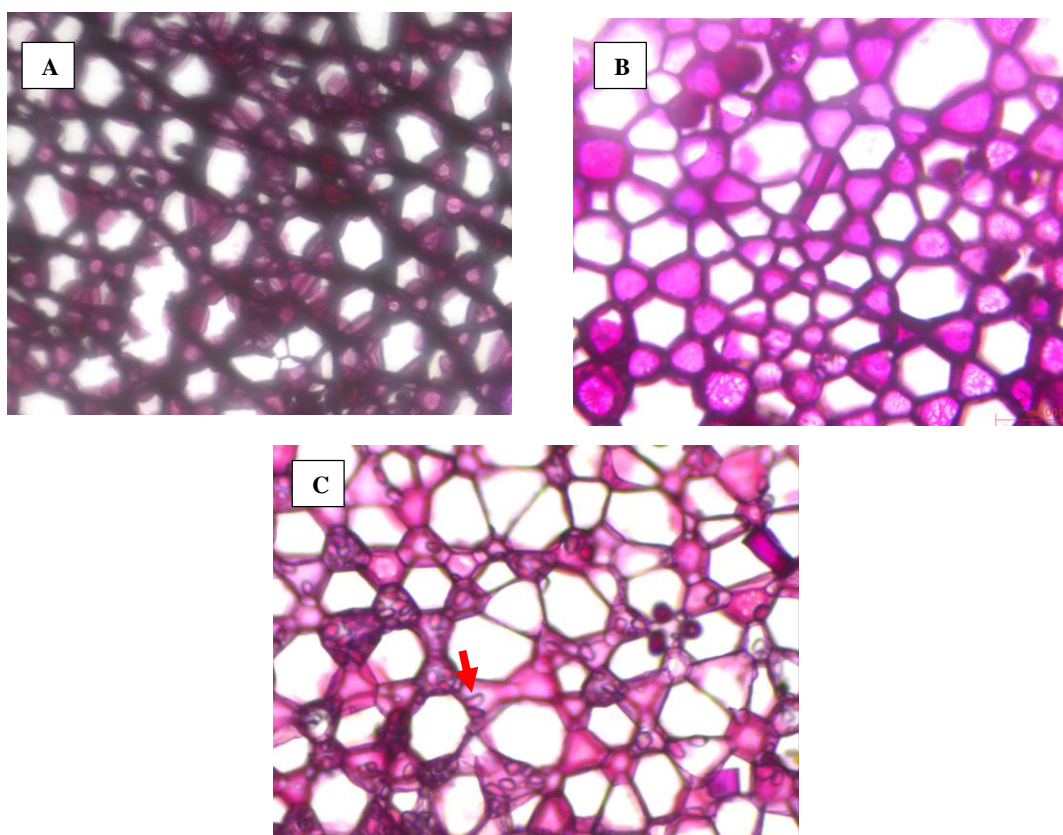
**Figura 18:** Comparação entre os pesos seco e fresco das plantas após 120 dias de experimento.

Infere-se a partir dos resultados que houve maior absorção de água pelas plantas do controle. O que já era esperado, visto que a disponibilidade de água no sedimento sem contaminação é mais elevada, devido a sua maior capacidade de retenção, quando comparado ao sedimento com óleo diesel.

Os valores dos pesos fresco e seco das plantas do Tratamento 2 foram os mais elevados, embora as diferenças não tenham sido significativas. Acredita-se que as rizobactérias CCMICS105 e CCMICS108 tenham contribuído para o aumento da produção de biomassa. Apesar de haver relatos na literatura da estimulação do crescimento de plantas por componentes do petróleo, como demonstram os resultados obtidos por PAULA *et al.* (2007). Os autores verificaram que o crescimento de *Pueraria phaseoloides* não foi afetado pelo antraceno e que *Brachiaria brizantha* teve pequeno aumento do crescimento ocasionado pelo composto.

#### 5.4. Análise histológica das plantas

Ao analisar os cortes histológicos da região mediana dos propágulos, de modo geral, pode-se observar a presença de espaços intercelulares, característicos de aerênquima, nas plantas que não foram expostas ao contaminante, Figura 19 (A).



**Figura 19:** Secção transversal da região mediana dos propágulos de *Rhizophora mangle* L. evidenciando espaços intercelulares na região cortical do Controle 1 (A), do

Tratamento 2 (B) e do Tratamento 3 (C). Seta indicando grânulos de amido. Tamanho da foto 200µm.

Apesar da necessidade de realização da mensuração suficiente para a análise estatística, nota-se que há um aumento dos espaços intercelulares na região do córtex das plantas dos tratamentos, Figura 19 (B) e (C), sobretudo nas plantas do Tratamento 3 onde houve uma maior deformação celular.

O aumento do aerênquima nos tratamentos pode ser uma adaptação da planta à condição de hipóxia causada pelo contato do óleo diesel com as raízes e com o sedimento. Pois o aerênquima funciona como uma alternativa de obtenção do oxigênio, permitindo que a planta sobreviva em ambientes deficientes ou desprovidos de oxigênio (DREW *et al.*, 2000). Em seu trabalho, BONA *et al.* (2011) relata o aumento de espaços intercelulares nas raízes e folhas de plantas como resposta ao baixo teor de oxigênio resultante da contaminação por óleo diesel.

Embora neste estudo não tenha sido avaliada a concentração de etileno, supõe-se que as alterações encontradas na estrutura do aerênquima no córtex dos tratamentos podem estar relacionadas à alteração nas concentrações deste hormônio. Uma vez que a formação das câmaras de ar, decorrente da resistência a ambientes adversos, também pode ser atribuída ao etileno (IRFAN *et al.*, 2010).

### 5.5. Isolamento das bactérias do sedimento, propágulo e raiz

As análises morfológicas das bactérias isoladas do sedimento indicam a presença de 5 colônias com aspectos distintos, conforme Tabela 4. Apesar de apresentarem colônias com diferentes aspectos, os isolados são morfolologicamente bacilos gram-positivo.

**Tabela 4:** Isolados bacterianos obtidos a partir dos sedimentos dos controles e tratamentos após 120 dias de experimento.

Bactérias	Morfologia	Aspecto da colônia
Isolado 1	Bacilo curto Gram- positivo	Branca e Cremosa
Isolado 2	Bacilo longo Gram- positivo	Transparente e Viscosa
Isolado 3	Bacilo longo Gram- positivo	Amarela e Cremosa
Isolado 4	Bacilo longo Gram- positivo	Vermelha e Cremosa



Todos os isolados foram encontrados nos controles e tratamentos, exceto no Controle 1 em que havia apenas os Isolados 1 e 3. Os demais isolados não foram encontrados no Controle 1, devido a competição por nutrientes entre as bactérias e as plantas. Uma vez que nesse controle todas as plantas apresentaram um bom desenvolvimento. O Isolado 2 apresentou maior densidade em detrimento das demais bactérias nos controles e tratamentos. Os dados morfológicos desse isolado são similares às características da cepa CCMICS108.

Dessa forma, acredita-se que o fato dessa bactéria estar presente em todos os tratamentos e em quase todos os controles seja devido a contaminação oriunda da espátula utilizada no momento da manipulação do sedimento. Infere-se ainda que os demais isolados sejam provenientes do próprio sedimento e que não foram eliminados no processo de autoclavagem, devido ao grande volume de sedimento que foi autoclavado.

Ao relacionar os dados de hidrocarbonetos do sedimento e das plantas com os isolados, pode-se inferir que as bactérias autóctones do sedimento inibiram o crescimento da cepa CCMICS105, que apresenta morfologia bacilo curto gram-negativo. A CCMICS105, portanto, manteve-se viável no sedimento como um todo até dado momento do experimento, onde atuou em consórcio com a CCMICS108 aumentando a eficácia da degradação dos hidrocarbonetos. Segundo TONINI *et al.* (2010), consórcios têm demonstrado maior eficiência do que culturas puras na degradação de poluentes do petróleo devido a complementariedade metabólica, que é essencial para a degradação de alguns hidrocarbonetos.

A produção dos diferentes biossurfactantes pelos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* também aumenta a eficácia da biodegradação, pois de acordo com ZHANG & MILLER (1994), a atração entre células microbianas e diferentes biossurfactantes pode levar a um aumento da hidrofobicidade das células, que apresentarão melhor contato com o substrato hidrofóbico e, conseqüentemente, uma maior biodegradação.

Com o objetivo de avaliar a colonização da CCMICS105 e da CCMICS108 nas raízes das plantas foi realizado o isolamento das bactérias (Tabela 5).

**Tabela 5:** Isolados bacterianos obtidos a partir das raízes de plantas do Tratamento 2 após 120 dias de experimento.

Bactérias	Morfologia	Aspecto da colônia
Isolado 1	Bacilo curto Gram- positivo	Branca e Cremosa
Isolado 2	Bacilo longo Gram- positivo	Transparente e Viscosa
Isolado 3	Bacilo longo Gram- positivo	Amarela e Cremosa
Isolado 4	Bacilo longo Gram- positivo	Vermelha e Cremosa
Isolado 5	Bacilo curto Gram- negativo	Branca e Cremosa
Isolado 6	Coco Gram- positivo	Branca e Cremosa

Todos os isolados presentes no sedimento também foram encontrados nas raízes. A presença dos isolados 5 e 6 apenas nas raízes indica que tais bactérias dependem da interação com a planta para a sua sobrevivência, sendo que o Isolado 5 apresenta características morfológicas similares a cepa CCMICS105. Portanto, acredita-se que a CCMICS105 não teve seu crescimento inibido nas raízes, devido a sua interação com a planta. DENNIS *et al.* (2010) relata que os exsudatos produzidos pelas raízes são a chave para a estruturação da comunidade microbiana que compõe a rizosfera.

Quatro isolados das raízes e todos os isolados do sedimento apresentaram morfologia característica do gênero *Bacillus*. O que corrobora com os dados de SOUZA *et al.* (2006) que isolou bactérias da rizosfera de *Rhizophora mangle* L. e *Laguncularia racemosa* após vazamento de óleo. Dos onze isolados obtidos mais promissores na degradação de óleo, dez pertenciam ao gênero *Bacillus*.

Foram encontrados dois isolados no propágulo da planta do Controle 1 (Tabela 6) e dois no propágulo do Tratamento 2 (Tabela 7). O Isolado 8 foi encontrado apenas no propágulo do Controle 1, o que indica que seja uma bactéria endofítica.

**Tabela 6:** Isolados bacterianos obtidos a partir do propágulo do Controle 1 após 120 dias de experimento.

Bactérias	Morfologia	Aspecto da colônia
Isolado 8	Bacilo longo Gram- positivo	Branca e Cremosa
Isolado 9	Bacilo curto Gram- negativo	Branca e Cremosa

O Isolado 9 e o Isolado 11 são bactérias que apresentam a mesma morfologia e que estão presentes no Controle 1 e no Tratamento 2. Dessa forma, acredita-se que sejam também bactérias endofíticas dos propágulos.

**Tabela 7:** Isolados bacterianos obtidos a partir do propágulo do Tratamento 2 após 120 dias de experimento.

Bactérias	Morfologia	Aspecto da colônia
Isolado 10	Bacilo curto Gram- positivo	Branca e Cremosa
Isolado 11	Bacilo curto Gram- negativo	Branca e Cremosa

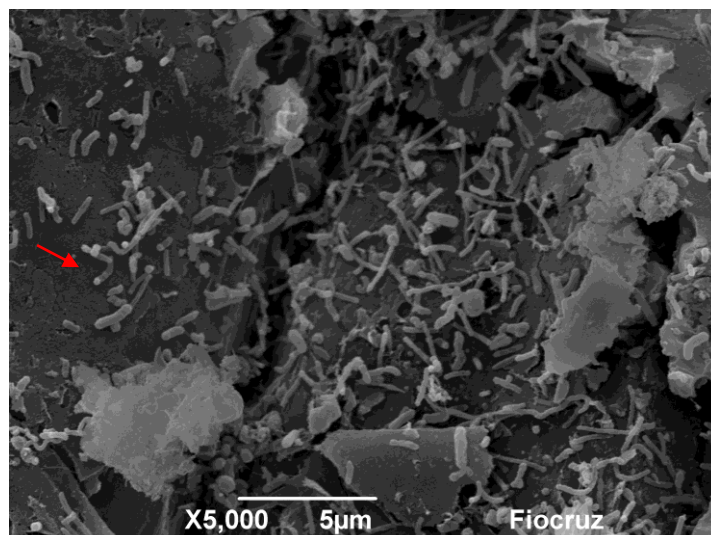
O Isolado 10 apresenta características semelhantes ao Isolado 1, que esteve presente no sedimento e na raiz, portanto infere-se que essa bactéria também possui a capacidade de colonizar os tecidos internos da planta. Por apresentarem características similares entre si, acredita-se que os Isolados 8 e 10, assim como o Isolado 1, sejam também pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Esses dados corroboram com CASTRO *et al.* (2014) que isolou bactérias endofíticas das espécies *Rhizophora mangle* L. e *Avicennia nitida*. Os resultados mostram que o gênero *Bacillus* foi o mais isolado. Bactérias do gênero *Bacillus* também foram isoladas por RAVIKUMAR *et al.* (2010). Os autores isolaram bactérias endofíticas de 11 plantas halófitas de manguezal, alguns dos isolados obtidos eram das espécies *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus pumilus*.

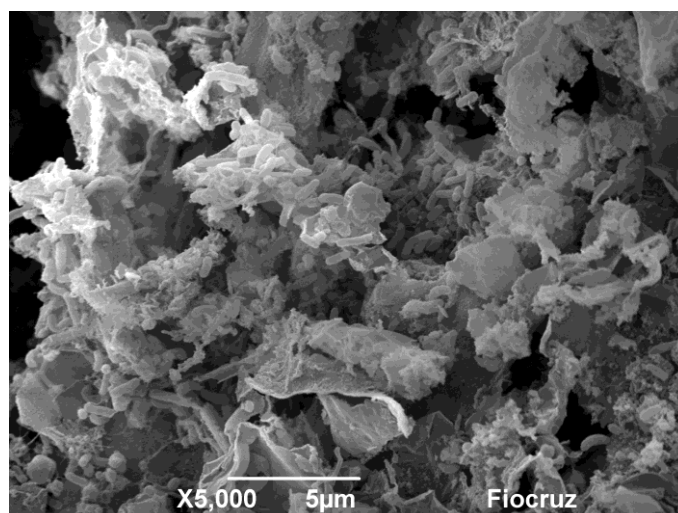
## 5.6. Microscopia Eletrônica de Varredura das raízes

As análises das raízes por MEV evidenciam que houve colonização bacteriana das raízes das plantas do Tratamento 2. As bactérias encontradas são morfologicamente cocos, bacilos curtos e longos (Figura 20), ratificando com os dados obtidos através do isolamento. Sendo que foram encontrados alguns bacilos esporulando, o que caracteriza uma forma de resistência ao ambiente adverso.

Houve formação de biofilme na epiderme das raízes do Tratamento 2, como evidenciado na Figura 21. Por se tratarem de isolados obtidos de rizosfera e serem promotoras do crescimento de plantas, acredita-se que as linhagens CCMICS105 e CCMICS108 possuam a capacidade de formar biofilmes ao colonizarem as raízes.



**Figura 20:** Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura evidenciando a colonização da epiderme de raízes do Tratamento 2. A seta indica a presença de bacilo esporulando.



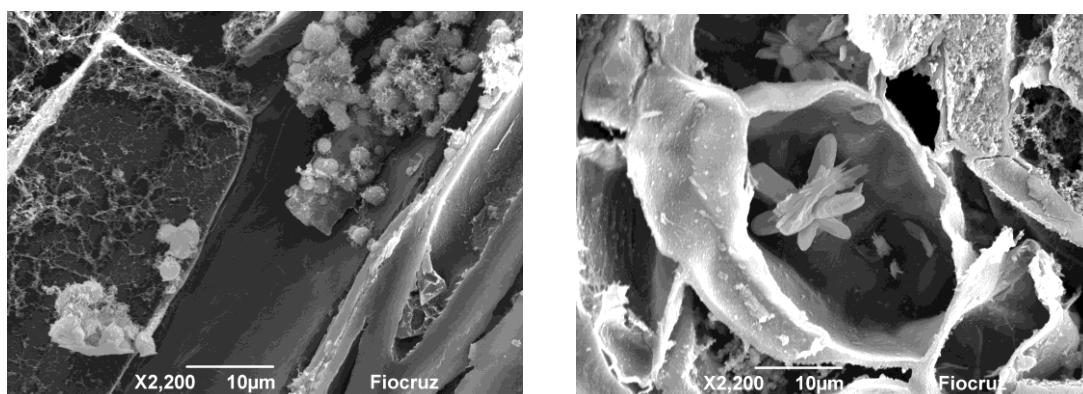
**Figura 21:** Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura da formação de biofilme na epiderme da raiz do Tratamento 2.

Acredita-se que a formação do biofilme por essas linhagens seria uma forma de resistência às condições adversas do ambiente causadas pela contaminação, o que pode ter ocasionado o aumento da degradação dos hidrocarbonetos neste tratamento. Uma vez que os micro-organismos produtores de biossurfactante formam biofilme denso na interface óleo-água consumindo o hidrocarboneto emulsionado MORTON & SURMAN (1994).

De acordo com DANHORN & FUQUA (2007), os biofilmes aumentam a resistência a certas pressões ambientais. SÁ *et al.* (2014) verificou a formação

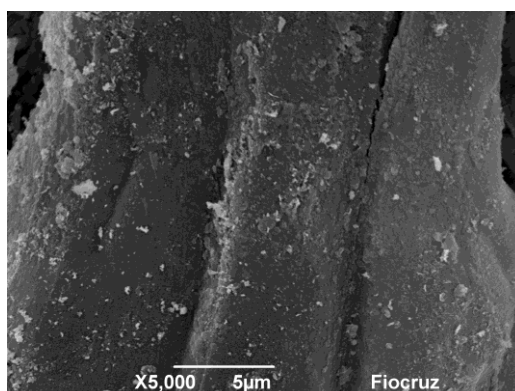
de biofilme por *Bacillus subtilis* isolados de *Rhizophora mangle* L. cultivados em diferentes salinidades. Segundo os autores, a formação do biofilme foi significativamente aumentada em resposta a elevadas salinidades. UDE *et al.* (2006) relata 76% de produção de biofilme por isolados de *Pseudomonas*.

Foram encontradas bactérias nos tecidos mais internos da raiz do Tratamento 2 (Figura 22), evidenciando que algumas bactérias também são endofíticas.



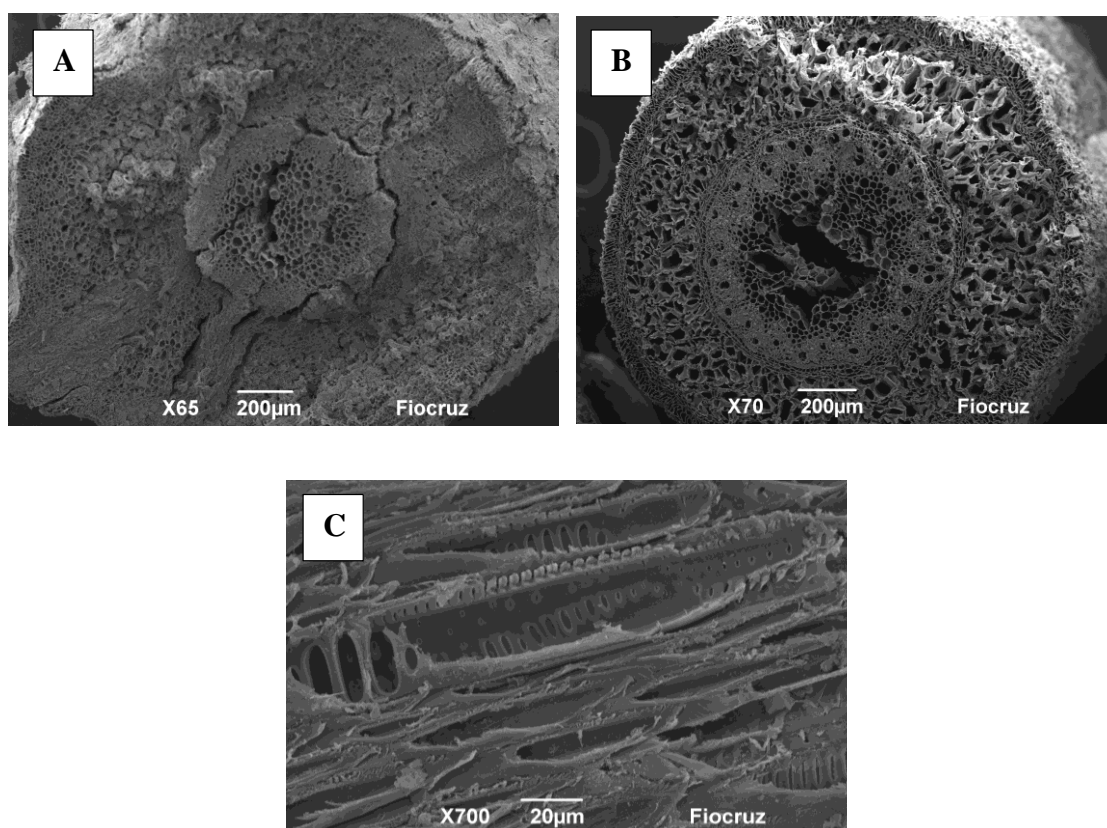
**Figura 22:** Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura de tecidos internos da raiz do Tratamento 2 evidenciando a colonização por bactérias.

As raízes do controle não apresentaram colonização por bactérias (Figura 23). Acredita-se que as bactérias presentes no sedimento do Controle 1 não possuem capacidade de colonizar as raízes.



**Figura 23:** Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura da epiderme da raiz do Controle 1 evidenciando a ausência de colonização por bactérias.

As análises de MEV revelaram obstrução no cilindro central e no córtex das raízes do Tratamento 2, o que não foi observado nas raízes do Controle 1 (Figura 24). A Figura 24 (A) mostra um maciço de células em que não é possível distinguir o periciclo das células do parênquima medular, além da obstrução dos vasos e do parênquima cortical. No entanto, na Figura 24 (B) observa-se que as células do córtex estão desobstruídas, assim como o cilindro central e seus elementos de vaso, Figura 24 (C), apresentando lúmen evidente do xilema próximo ao periciclo.



**Figura 24:** Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura evidenciando a obstrução da região do córtex e cilindro central da raiz do Tratamento 2 (A). Córtex e cilindro central do Controle 1 sem obstrução (B). Detalhe do xilema do Controle 1 desobstruído (C).

Supõe-se que o colapso das células do cilindro central e do córtex tenha sido ocasionado pela deposição de componentes do óleo diesel, corroborando com os dados de hidrocarbonetos, germinação e histologia dos propágulos. Estudos indicam a ocorrência de modificações anatômicas nas raízes de plantas submetidas ao contato com petróleo. FARIAS *et al.* (2009) observou aumento dos espaços intercelulares, além da compactação das células do córtex radicial

de plantas cultivadas em solo contaminado por petróleo. Apesar de haver registros na literatura do aumento de aerênquima nas raízes de plantas submetidas a tratamento com petróleo e/ou derivados, o mesmo não foi observado na Figura 24 (A).

## 6. CONCLUSÕES

- Houve redução nos percentuais de *n*-Alcanos C9-C11 no Tratamento 1 e no Tratamento 2, nos quais houve inoculação das linhagens CCMICS105 e CCMICS108. O percentual encontrado no Tratamento 3 para essas cadeias indica que a *Rhizophora mangle* L. não foi eficaz na fitorremediação desses compostos.
- C15, C17 e C25, foram detectados em maiores percentuais nos Tratamentos 1 e 2 do que no Tratamento 3, sugerindo que houve biodisponibilização das cadeias devido a produção de biossurfactantes por CCMICS105 e CCMICS108.
- *Rhizophora mangle* L. e as linhagens CCMICS105 e CCMICS108 não foram eficazes na degradação da fração intermediária e pesada (C14-C35).
- As maiores reduções nos níveis do naftaleno ocorreram no Tratamento 1 e no Tratamento 2, devido à ação das linhagens inoculadas.
- CCMICS105 e CCMICS108 atuaram somente na degradação das frações de baixo peso molecular dos HPAs.
- A *Rhizophora mangle* L. não foi eficaz na degradação desses compostos de baixo peso molecular.
- As plantas do Tratamento 2 absorveram menor percentual de *n*-alcanos do que as plantas do Tratamento 3, provavelmente devido a colonização das raízes por CCMICS105 e CCMICS108, protegendo a raiz e biodegradando os compostos.
- As linhagens CCMICS105 e CCMICS108 contribuíram na germinação e adaptação das plantas do Tratamento 2.
- Os dados de MEV corroboram com os dados encontrados a partir o isolamento das raízes do Tratamento 2.
- O colapso das células do cilindro central e do córtex do Tratamento 2 possivelmente ocasionado pela deposição do óleo diesel corrobora com os dados de hidrocarbonetos, germinação e histologia dos propágulos.



## 7. ESTUDOS FUTUROS

- Avaliar o desempenho das linhagens CCMICS105 e CCMICS108 na biodegradação de hidrocarbonetos em diferentes concentrações óleo diesel.
- Testar a germinação, desenvolvimento e biorremediação de *Rhizophora mangle* L. cultivada em diferentes concentrações do óleo diesel.
- Realizar cortes histológicos para avaliar se houve diferenças na disposição e no tamanho dos elementos que compõem a raiz e o caule.
- Verificar estatisticamente se há diferença no tamanho dos aerênquimas.

## 8. REFERÊNCIAS

ADAM, G. & DUNCAM, H.J. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. **Environmental Geochemistry and Health** **21**, p.353–357, 1999.

**AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP)**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: Julho de 2012.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple growth promoting activities. **Microbiol Res** **163**:173–181, 2008.

ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. Australian Institute **Marine Science**, **29**, 331–349, 2002.

ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, C. F. Fitorremediação, o uso de plantas na melhoria ambiental. São Paulo: **Oficina de Textos**. 176pp, 2007.

ARAÚJO, F.F.; GUERREIRO, R.T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010.

ARAÚJO, L.V.; FREIRE, D.M.G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 6, 848-858, 2013.

ATLAS, R. M. Microbial Degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiol. Rev.** **(45)**, p.180-209, 1981.

ATLAS, R.M. Petroleum biodegradation and oil spil remediation. **Mar Pollut Bull** **(31)**, p.178-182, 1995.

AZEVEDO, D.A.; SILVA, T.F.; SILVA, D.B. Avaliação geoquímica de biomarcadores ocluídos em estruturas asfálticas. **Quím. Nova**, vol.32, no.7, 1770-1776, 2009.

AZEVEDO, V. L. C. **Tecnologias para remediação de solos Contaminados por derivados de petróleo. Estudo de caso: as tecnologias da biopilha e dessorção térmica para remediação de solos Contaminados por óleo combustível**. 49f. Monografia (Especialização em gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo) – Universidade Federal da Bahia, Bahia, Salvador, Departamento de Engenharia Ambiental, 2006.

BADRI, D.V.; VIVANCO, J.M. Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell Environ.**, **32**:666-681, 2009.

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S. & VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Ann. Rev. Plant Biol.**, **57**:233-266, 2006.

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production applications and future potential. **Chem. Mater. Sci.** V.87, p.427–444, 2010.

BAYER, D.M. **Biorremediação de sedimento estuarino contaminado por óleo diesel com o uso de biossurfatante.** 92p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International**, Volume 26, Issues 5–6, pp. 413–416, 2001.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; JÚNIOR, W.T.F. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology** 34 (Suppl.1):p. 65-68, 2003.

BENTO, F.M.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil-studies in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation** 47, p.107-112, 2001.

BOGNOLO, G., Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1, p. 41-52, 1999.

BONA, C.; SILVA, M.Y.B.; REZENDE, I.M.; SANTOS, G.O.; SOUZA, L.A.; INCKOT, R.C. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). **Acta Bot. Bras.**, 2011.

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: estudos de produção e caracterização.** 82p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BURNS, K. A.; CODI, S.; DUKE, N.C., Gladstone, Australia field studies: Weathering and Degradation of hydrocarbons in oiled mangrove and salt marsh sediments with and without the application of an experimental bioremediation protocol. **Marine Pollution Bulletin** 41, 7: 392-402, 2000.

CARRASCOSA, L.S. **Hidrocarbonetos alifáticos em sedimentos de fundo do estuário do rio Potengi, Grande Natal (RN): Implicações ambientais.** 95p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.

CASTRO, R.A.; QUECINE, M.C.; LACAVALA, P.T.; BATISTA, B.D.; LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; FERREIRA, A.; MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **SpringerPlus** 3:382, 2014.

CAPPELLETTI, M.; FEDI, S.; FRASCARI, D.; OHTAKE, H.; TURNER, R.J.; ZANNONI, D. Analyses of both the *alkB* gene transcriptional start site and *alkB*

promoter-inducing properties of *Rhodococcus* sp. strain BCP1 grown on *n*-alkanes. **Appl. Environ. Microbiol.** **77**, p.1619-1627, 2011.

CELINO, J.J.; QUEIROZ, A.F.S. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. **REM: R. Esc. Minas**, Ouro Preto, 59(3): 265-270, 2006.

CERQUEIRA, V.S.; HOLLENBACH, E.B.; MABONI, F.; VAINSTEIN, M.H.; CAMARGO, F.A.O.; PERALBA, M.C.R.; BENTO, F.M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology** **102**, p.11003–11010, 2011.

CHAGAS-SPINELLI, A.C.O. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel**. 174p. Tese de Doutorado - Universidade Federal Pernambuco, Recife, 2007.

CHANG, B. V., CHANG, I. T.; YUAN, S. Y. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 80, 145–149, 2008.

CHEEMA, S.A.; KHAN, M.I.; SHEN, C.; TANG, X.; FAROOQ, M.; CHEN, L.; ZHANG, C.; CHEN, Y. Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation. **Journal of Hazardous Materials** **177**, 384–389, 2010.

CHINDAH, A.C.; BRAIDE, S.A.; AMAKIRI, J.; ONOKURHEFE, J. Effect of crude oil on the development of mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings from Niger Delta, Nigeria. **Revista UDO Agrícola** (1), p.181-194, 2007.

COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, 13: 85-103, 2003.

COSTA, B.C.P. **Avaliação ambiental de manguezais adjacentes aos campos petrolíferos de Macau e Serra (RN), como subsídio às medidas mitigadoras ao processo erosivo**. 159 p. Dissertação de Mestrado. Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

COSTA, S.G.V.A.O. **Estudo da Produção de Metabólitos por Pseudomonas aeruginosa: Ramnolipídios e Polihidroxicanoatos (PHAs)**. 136p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

CRUZ, G.F. & MARSAIOLI, A.J. Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios. **Química Nova** (35), p.1628-1634, 2012.

CUMMINGS, S.P. The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems. **Environ Biotechnol** 5(2):43–50, 2009.

CURY, J. C., **Atividade Microbiana e Diversidade Metabólica e Genética em solo de Mangue Contaminado com Petróleo**. 84p. Monografia. Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002.

DANHORN, T. & FUQUA, C. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** **61**, p.401–22, 2007.

DECESARO, A.; RIGON, M.R.; THOMÉ, A.; COLLA, L.M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 7, 947-954, 2013.

DELABIE, J.H.C.; PAIM, V.R.L.M.; NASCIMENTO, I.C.; CAMPIOLO, S.; MARIANO, C.S.F. As formigas como indicadores biológicos do impacto humano em manguezais da costa sudeste da Bahia. **Neotropical Entomology** (5),p.602-615., 2006.

DEL ROSSO, C. **Avaliação dos aportes de hidrocarbonetos à lagoa dos Patos (RS - Brasil)**. 118p. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

DENNIS, P.G.; MILLER, A.J.; HIRSCH, P.R. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? **FEMS Microbiol Ecol** **72**, p.313–327, 2010.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J., **Production of biosurfactants**. In: KOSARIC, N. (Ed.) Biosurfactants: production, properties, applications. New York: CRC Press, cap 1, p. 19-98, 1993.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**,V. 61, p.47-64, 1997.

DIAS, A.C.F. **Diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da Ilha do Cardoso Cananéia**. 59p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2008.

DIOGO, J.; KORENBLUM, E.; CASELLA, R.; VITAL, R.L.; SELDIN, L. Polyphasic analysis of the bacterial community in the rhizosphere and roots of *Cyperus rotundus* L. grown in a petroleum-contaminated soil. **J. Microbiol. Biotechnol.** **20**, p.862–870, 2010.

DOU, J.; LIU, X.HU, Z.; DENG, D. Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. **Journal of Hazardous Materials: in press**. 2007.

DREW, M.C.; HE, C.J.; MORGAN, P.W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science** **5**, p.123-127, 2000.

ESPINOSA, E.E.; MARTÍNEZ, M.E.G.; TORRES, E.F.; ROJAS, M.G. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam.

inoculated with a microbial consortium in a model system. **Chemosphere** **59**, p.405-413, 2005.

EZEZIKA, C.O.; SINGER, A.P. Genetically engineered oil-eating microbes for bioremediation: Prospects and regulatory challenges. **Technology in Society**, p.331–335, 2010.

FAHL, K.; NÖTHIG, E.M. Lithogenic and biogenic particle fluxes on the Lomonosov Ridge (central Arctic Ocean) and their relevance for sediment accumulation: vertical vs. lateral transport. **Deep-Sea Research I** **54**, p. 1256–1272, 2007.

FARIAS, V.; MARANHO, L.T.; VASCONCELOS, E.C.; FILHO, M.A.S.; LACERDA, L.G.; AZEVEDO, J.A.M.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Phytodegradation potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae, in petroleum-contaminated soil. **Appl Biochem Biotechnol** **157**, p.10–22, 2009.

FERNÁNDEZ, M.D.; PRO, J.; ALONSO, C.; ARAGONESE, P.; TARAZONA, J.V. Terrestrial microcosms in a feasibility study on the remediation of diesel-contaminated soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **74**, p.2133–2140, 2011.

FERREIRA, D.G. **Biorremediação de solo argiloso contaminado com gasolina aditivada com diferentes teores de etanol**. 116p. Dissertação de Mestrado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

FIECHTER, A., Biosurfactants, moving toward industrial application. **Tibtech** **10**, p.208-217, 1992.

FOGHT, J. Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects. **Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology** **15**, p.93-120, 2008.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu, p. 182, 2002.

FRITSCHÉ, W. & HOFRIKTER, M., Aerobic degradation by microorganisms. **Biothechnology: Environmental Processes- Soil Decontamination II (11b)**, p.146–155, 2000.

FRUEHAUF, S.P. ***Rhizophora mangle* (Mangue vermelho) em áreas contaminadas de manguezal da Baixada Santista**. 223p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

FRY, B.; BERN, A.L.; ROSS, M.S.; MEEDER, J.F.  $\delta^{15}\text{N}$  Studies of nitrogen use by the red mangrove, *Rhizophora mangle* L. in South Florida. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** **50**, 291–296, 2000.

GAO, X.; CHEN, S.; XIE, X.; LONG, A.; MA, F. Non-aromatic hydrocarbons in surface sediments near the Pearl River estuary in the South China Sea. **Environmental Pollution** **148**, p.40-47, 2007.

GARCIA, K. S. **Estudos biogeoquímicos em folhas de *Avicennia shaueriana* Stapf & Leechman em zonas de manguezal da região de São Francisco do Conde e Madre de Deus-BA.** 130p. 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, 2005.

GASPARIN, F.G.M.; MAGRI, A.; NEVES, A.F.; CELLIGOI, M.A.P.C. Produção de lipase e biossurfactante por isolado de efluente de laticínio. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, p.28, 2012.

GELPI, E.; SCHNEIDER, H.; MANN, J.; ORO, J. Hydrocarbons of geochemical significance in microscopic algae. **Phytochemistry** **9**, p.603–612, 1970.

GEORGIU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Nature Biotechnology**, p.60-65, 1992.

GHAZALI, F.M.; ZALIHA, A.R.; SALLEH, A.B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration; Biodegradation**, 54:61-67, 2004.

GLICK, B.R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. **Biotechnological Advances** **21**, p. 383-393, 2003.

HUANG, X-D.; EL-ALAWI, Y.; GURSKA, J.; GLICK, B.R. & GREENBERG, B.M. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (HTPs) from soils. **Microchem. J.**, 81:139- 147, 2005.

HU, X.; ZHU, L.; WANG, Y.; WANG, J.; PENG, P.; MA, Q.; HU, J.; LIN, X.; Climate significance of n-alkanes and their compound-specific  $\delta D$  values from lake surface sediments on the Southwestern Tibetan Plateau. **Chinese Science Bulletin**, v. 59, p. 3022-3033, 2014.

IRFAN, M.; HAYAT, S.; HAYAT, Q.; AFROZ, S.; AHMAD, A. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma** **241**, p.3–17, 2010.

JACQUES, R.S.S.; BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natura** **29**, p. 17- 24, 2007.

JAIN, D.K.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. **Journal of Industrial Microbiology**, London, v.10, p.87-93, 1992.

JENG, W.L. Higher plant n-alkane average chain length as an indicator of petrogenic hydrocarbon contamination in marine sediments. **Marine Chemistry**, p.242-251, 2006.

JIMENEZ, J.A. **Rhizophora mangle: red mangrove**. Rio Piedras: Institute of Tropical Forestry; UNESCO, 1985.

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

KNIEMEYER, O.; MUSAT, F.; SIEVERT, S.M.; KNITTEL, K.; WILKES, H.; BLUMENBERG, M.; MICHAELIS, W.; CLASSEN, A.; CARSTEN, B.; JOYE, S.B.; WIDDEL, F. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. **Nature** **449**, p.898–901, 2007.

KREPSKY, N.; DA SILVA, F.S.; FONTANA, L.F.; CRAPEZ, M.A.C., Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. **Brazilian Journal of Biology** (1), p.117-124, 2007.

KRISTENSEN, E.; BOUILLON, S.; DITTMAR, T.; MARCHAND, C. Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. **Aquatic Botany** **89**, p.201–219, 2008.

LAMBERTI, A. **Contribuição ao conhecimento da ecologia das plantas de manguezal de Itanhém**. 217p. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 1966.

LAMEGO, F.P.; VIDAL, R.A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? **Pesticidas: ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 17, p. 9-18, 2007.

LAURENTINO, I.C.; SOUZA, S.C., Uma análise do plano de recuperação de área degradada com vegetação de mangue no Rio Apodi Mossoró do Projeto Margem Viva. **Holos**, Ano 29, Vol. 3, 2013.

LEÃO, Z.M.A.N.; DOMINGUEZ, J.M.L. Tropical coast of Brazil. **Marine Pollution** **41**, p.112-122, 2000.

LIN, C.; GAN, L.; CHEN, Z.L. Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN). **Journal of Hazardous Materials** **182**, p.771–777, 2010.

LOPES, P.F. **Diversidade taxonômica e potencial de biodegradação de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo da Bacia de Campos (RJ)**. 68p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2010.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.P.; DONATO, V.M.T.S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, p.89-111, 2004.

MARÍN, A.R.; LORIA, J.C.Z.; LÓPEZ, C.Y.; QUIROZ, A.V.C. Tropical bacteria isolated from oil-contaminated mangrove soil: bioremediation by natural attenuation and bioaugmentation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**,



Vol. 12, p. 553-560, 2013.

MARQUES, M.; AGUIAR, C.R.C. & SILVA, J.J.L.S. Desafios, técnicas e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **R Bras. Ci. Solo** **35**, p.1-11, 2011.

MAZUCCO, L.M. **Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com óleo diesel**. 98p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MEAD, R. & GONI, M.A. A lipid molecular marker assessment of sediments from the Northern Gulf of Mexico before and after the passage of Hurricane Lili. **Organic Geochemistry** **37**, p.1115-1129, 2006.

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

MESQUITA, A.C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. 158p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MEYERS, P.A. Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic and paleoclimatic processes. **Org. Geochem.** **27**, p.213–250, 1997.

MONTEIRO, M.T. **Fitorremediação de rejeito contaminado proveniente do canal do fundão, na Baía da Guanabara-RJ**. 317p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

MOREIRA, I.T.A.; FREITAS, P.F.; NASCIMENTO, R.S.A.; OLIVEIRA, O.M.C.; TRIGUIS, J.A. Selection of species plant mangrove for assessment phytoremediation of contaminated sediments by in oil and derivatives. **Rio Oil & Gas Expo and Conference**, 2010.

MOREIRA, I.T.A. **Avaliação da eficiência de modelos de remediação aplicados em sedimentos de manguezal impactados por atividades petrolíferas**. 163p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2011.

MORENO, C.M.; BECERRA, A.G.; SANTOS, M.J.B. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. **Revista Iberoamericana de Micología**, p.103-120, 2004.

MORTON, L.H.G. & SURMAN, S.B. Biofilms in biodeterioration – a Review. **Internat Biodeter Biodeg.** (32), p. 203-221, 1994.

MIZUKAWA, A. **Avaliação de hidrocarbonetos no litoral do paraná, através de análises de HPAs e n-alcanos no sedimento e de alguns parâmetros**

**abióticos na água.** 84p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2012.

NAWAWI, W.M.F.W. & JAMAL, P. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology** 101: 9241 – 9247, 2010.

NIE, Y.; CHI, C.Q.; FANG, H.; LIANG, J.L.; LU, S.L.; LAI, G.L.; TANG, Y.Q.; WU, X.L. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. **Scientific Reports** 4, 2014.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química nova**, p. 772-776, 2002.

NOAA. **Oil Spills in Mangroves: Planning and response considerations.** Washington, D.C., 2002.

NOERNBERG, M. A. & LANA P. C., A Sensibilidade de Manguezais e Marismas a impactos por óleo: fato ou mito? Uma ferramenta para a avaliação da vulnerabilidade de sistemas costeiros a derrames de óleo. **Geografares**, Vitória, nº 3, 2002.

NOVELLI, Y.S. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. **Caribbean Ecological Research**, 64p. São Paulo, 1995.

NOVELLI, Y.S.; LACERDA, L.D. Lagoas costeiras, manguezais, marismas, dunas e restingas. In: PANITZ, C.M.N. **Diagnóstico ambiental oceânico e costeiro das regiões Sul e Sudeste do Brasil.** São Paulo: Fundespa; I USP; Petrobras, p. 128-347, 1994.

OLIVEIRA, L.S.; BONA, C.; SANTOS, G.O.; KOEHLER, H.S. Crescimento de crescimento de *Schinus terebinthifolius raddi* (Anacardiaceae) em solo contaminado com petróleo. **Acta Ambiental Catarinense**, 2008.

PALLERONI, N. J.; COLLIER, L.; BALLOWS, A.; SUSSMAN, M. Microbiology and Microbial Infection. **Systematic Bacteriology**, 1998.

PATEL, V.; JAIN, S.; MADAMWAR, D. Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. **Bioresource Technology** 107, p.122–130, 2012.

PATHAK, H.; KANTHARIA, D.; MALPANI, A.; MADAMWAR, D. Naphthalene degradation by *Pseudomonas sp.* HOB1: In vitro studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms. **Journal of Hazardous Materials** 166, p.1466–1473, 2009.

PAULA, A.M.; SIQUEIRA, J.O.; SOARES, C.R.F.S. Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 31, p.805-811, 2007.

PEIXOTO, R.; CHAER, G.M.; CARMO, F.L.; ARAÚJO, F.V.; PAES, J.E.; VOLPON, A.; SANTIAGO, G.A.; ROSADO, A.S. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. **Springer Science Business Media B.V.** 99:341–354, 2011.

**PETRÓLEO BRASILEIRO SA.** Disponível em: <http://www.br.com.br> Acesso em: Agosto de 2013.

**PETRÓLEO BRASILEIRO SA.** Disponível em: <http://www.br.com.br> Acesso em: Julho de 2014.

PINHATI, F.R.; AGUILA, E.M.D.; TÔRRES, A.P.R.; SOUSA, M.P.; SANTIAGO, V.M.J.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. **Quim. Nova** **37**, p.1269-1274, 2014.

POTIN, O.; RAFIN, C.; VEIGNIE, E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v.54, n.1, p.45-52, 2004.

PROCÓPIO, S.O.; CARMO, M.L.; PIRES, F.R.; FILHO, A.C.; BRAZ, G.B.P.; SILVA, W.F.P.; BARROSO, A.L.L.; SILVA, G.P.; CARMO, E.L.; BRAZ, A.J.B.P.; PACHECO, L.P. Efeito da densidade populacional de *Panicum maximum* (cultivar Tanzânia) na fitorremediação de solo contaminado com o herbicida picloram. **Semina** **30**, p.295-304, 2009.

RAMOS, S. **Manguezais da Bahia: breves considerações.** 104p., Editora Editus, Ilhéus, BA, 2002.

RAVIKUMAR, S.; INBANESON, S.J.; SENGOTTUVEL, R.; RAMU, A. Assessment of endophytic bacterial diversity among mangrove plants and their antibacterial activity against bacterial pathogens. **Annals of Biological Research** **(4)**, p.240-247, 2010.

RODRIGUES, S.A. 2008 **O manguezal e a sua fauna.** Disponível em: <[noticias.cebimar.usp.br/artigos/76-o-manguezal-e-a-sua-fauna](http://noticias.cebimar.usp.br/artigos/76-o-manguezal-e-a-sua-fauna)> Acesso em: 25 de Junho de 2014.

ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology** **11**, p.2477–2490, 2009.

ROSA, R. Excursão de Campo à Bacia do Recôncavo com a Universidade Federal da Bahia (UFBA); **Roteiro de Campo.** PETROBRÁS – UN-BA/ATEX/GL, Salvador, 2003.

SÁ, A.L.B.; DIAS, A.C.F.; QUECINE, M.C.; COTTA, S.R.; FASANELLA, C.C.; ANDREOTE, F.D.; MELO, I.S. Screening of endoglucanase-producing bacteria

in the saline rhizosphere of *Rhizophora mangle*. **Brazilian Journal of Microbiology** **45**, p.193-197, 2014.

SAKATA, S.; HAYES, J.M.; MCTAGGART, A.R.; EVANS, R.A.; LECKRONE, K.J.; TOGASAKI, R.K. Carbon isotopic fractionation associated with lipid biosynthesis by a cyanobacterium: relevance for interpretation of biomarker records. **Geochim. Cosmochim. Acta** **61 (24)**, p.5379–5389, 1997.

SANTOS, C.B.; CARVALHO, R.C.; LESSA, G., **Distribuição dos manguezais na Baía de Todos os Santos e seu impacto no balanço hídrico**. Trabalho apresentado no II Congresso sobre Planejamento e Gestão das Zonas Costeiras dos Países de Expressão Portuguesa, IX Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário e II Congresso do Quaternário dos Países de Língua Ibéricas, 2003.

SEO, J.; KEYN, Y & LI, Q.X. Bacterial degradation of aromatic compounds. **International journal of environmental research and public health** **6**, p.278-309. 2009.

SKIPPER, H.D. Bioremediation of contaminated soils. In: Sylvia, D.M. (Ed.), **Principles and Applications of Soil Microbiology**, p.469–481, 1999.

SILVA, M. A. B.; BERNINI, E.; CARMO, T. M. S. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. **Acta Botânica Brasílica** **19**, p. 465-471, 2005.

SILVA, M.L.B.; ALVAREZ, P.J.J. Enhanced anaerobic bic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzenexilene- ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. **Applied and Environmental Microbiology** (**8**), p.4720- 4726, 2004.

SILVA, R. F. **Estratégia de bioestímulo de sedimento de manguezal contaminado com hidrocarbonetos empregando fertilizantes de liberação lenta**. 116p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

SINGH, C. & LIN, J. Bioaugmentation efficiency of diesel degradation by *Bacillus pumilus* JLB and *Acinetobacter calcoaceticus* LT1 in contaminated soils. **African Journal of Biotechnology** (**41**), p. 6881-6888, 2010.

SINGH, S. N.; KUMARI, B.; MISHRA, S. Microbial degradation of alkanes. **Microbial degradation of xenobiotics**. Environmental Science and Engineering. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012.

SOARES, M.L.G. **Estudo da biomassa aérea de manguezais do sudeste do Brasil – análise de modelos**. 294p. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 1997.

SOJINU, O.S.; SONIBARE, O.O.; EKUNDAYO, O.; ZENG, E.Y. Biomonitoring potentials of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by higher plants from an

oil exploration site, Nigeria. **Journal of Hazardous Materials** **184**, p.759–764, 2010.

SOLANO, F.S.; MARCHAL, R.; HUET, T.; LEBEAULT, J.M.; VANDECASTEELE, J.P. Biodegradability of volatile hydrocarbons of gasoline. **Applied Microbiology and Biotechnology** **54**, p.121-125, 2000.

SOUZA, M.C.; MACRAE, A.; VOLPON, A.G.T.; FERREIRA, P.S.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. Chemical and microbiological characterization of mangrove sediments after a large oil-spill in Guanabara bay - RJ – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** (**37**), p.262-266, 2006.

SPORMANN, A.M. & WIDDEL, F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. **Biodegradation** **11**, p.85–105, 2000.

TELHADO, M.C.S.C.L. **Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo**. 124p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

THAPA, B.; KC, K.A.; GHIMIRE, A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and technology** **8**, p.164-170, 2012.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I.M. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresource Technology** **102**, p.772–778, 2011.

TOMLINSON, P.B. **The botany of mangroves**. Cambridge, University Press, 1986.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRAVITOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**. (**4**), p.1027-1035, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4th ed., Atheneu: Rio de Janeiro, 2005.

TROVÃO, R.H. & CARREIRA, R.S. Hidrocarbonetos alifáticos em sedimentos superficiais da enseada do flamengo, Baía de Guanabara–RJ. **Geochimica Brasiliensis**, p.193-202, 2009.

UDE, S.; ARNOLD, D.L.; MOON, C.D.; WILSON, T.T.; SPIERS, A.J. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. **Environmental Microbiology** (**11**), p.1997–2011, 2006.

van BEILEN, J.B.; LI, Z.; DUETZ, W.A.; SMITS, T.H.M.; WITHOLT, B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. **Oil Gas Sci Technology** **58**, p.427–440, 2003.

- van BEILEN, J.B.; WUBBOLTS, M.G.; WITHOLT, B. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. **Biodegradation** **5**, p.161–174, 1994.
- van DILLEWIJN, P.; NOJIRI, H.; van der MEER, J.R. & WOOD, T.K. Bioremediation, a broad perspective. **Microbial Biotechnol.** **2**, p.125-127, 2009.
- VISSER, E.J.W.; NABBEN, R.H.M.; BLOM, C.W.P.M.; VOESENEK, L.A.C.J. Elongation by primary lateral roots and adventitious roots during conditions of hypoxia and high ethylene concentration. **Plant, Cell and Environmental** **20**, p.647-53, 1997.
- WANG X-C, SUN S, MA H-Q, LIU Y. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Jiaozhou Bay, Qingdao, China. **Marine Pollution Bulletin.** V. 52, p.129–138, 2006.
- WANG, X.C.; SUN, M.Y.; LI, A.C. Contrasting chemical and isotopic compositions of organic matter in Changjiang (Yangtze River) estuarine and East China Sea shelf sediments. **Journal of Oceanography** **64**, p.311-321, 2008.
- WANG, L.; WANG, W.; LAI, Q.; SHAO, Z. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. **Environmental Microbiology** **12**, p.1230–1242, 2010.
- WATKINSON, R.J. & MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Biodegradation** **1**, p.79-92, 1990.
- WENTZEL, A.; ELLINGSEN, T.E.; KOTLAR, H.K.; ZOTCHEV, S.B.; THRONE-HOLST, M. Bacterial metabolism of longchain n-alkanes. **Appl Microbiol Biotechnol** **76**, p.1209–1221, 2007.
- WIDDEL, F. & RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology** **12**, p.259-276, 2001.
- YAMAMOTO, M.; OKINO, T.; SUGISAKI, S.; SAKAMOTO, T. Late Pleistocene changes in terrestrial biomarkers in sediments from the central Arctic Ocean. **Organic Geochemistry** **39**, p.754–763, 2008.
- YUNKER, M.B.; BELICKA, L.L.; HARVEY, H.R.; MACDONALD, R.W. Tracing the inputs and fate of marine and terrigenous organic matter in Arctic Ocean sediments: a multivariate analysis of lipidbiomarkers. **Deep-Sea Research II** **52**, p. 3478–3508, 2005.
- YUNKER, M.B.; MACDONALD, R.W.; SNOWDON, L.R.; FOWLER, B.R. Alkane and PAH biomarkers as tracers of terrigenous organic carbon in Arctic Ocean sediments. **Organic Geochemistry** **42**, p.1109–1146, 2011.
- XING, L.; ZHANG, H.; YUAN, Z.; SUN, Y.; ZHAO, M. Terrestrial and marine biomarker estimates of organic matter sources and distributions in surface sediments from the East China Sea shelf. **Continental Shelf Research** **31**, p.1106–1115, 2011.

ZHANG, Y., & MILLER, R. M. Effect of a *Pseudomonas rhamnolipides* biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. **Applied and Environmental Microbiology** **60**, p.2101–2106, 1994.

ZHANG, X.; LIU, X.; WANG, Q.; CHEN, X.; LI, H.; WEI, J.; XU, G. Diesel degradation potential of endophytic bacteria isolated from *Scirpus triqueter*. **International Biodeterioration & Biodegradation** **87**, p.99-105, 2014.

ZHOU, H.W.; WONG, A.H.Y.; YU, R.M.K.; PARK, Y.S.; TAM, N.F.Y. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. **Microbial Ecology** **58**, p.153-16. 2009.

ZHUANG, X.; CHEN, J., SHIM, H. & BAI, Z. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. **Environ. Intern.** **33**, p.406-413, 2007.

## APÊNDICE A

Curva de aquecimento para as análises dos HPAs

Curva de aquecimento		
Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
-	45	1
22	130	0
10	240	1
10	310	3
20	325	4

Massas monitoradas no método SIM

Monitoramento de íons		
Tempo		Razão massa/carga
Início	Fim	
3,6	6,5	127; 128; 129
6,5	10,5	151; 152; 153; 154; 166
10,5	12,5	178; 179
12,5	16,5	200; 202
16,5	19,5	226; 228
19,5	22,5	250; 252
22,5	32	276; 277

Curva de aquecimento para as análises dos *n*-alcanos

Curva de aquecimento		
Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
	50	2
10	200	0
15	300	0
20	320	9

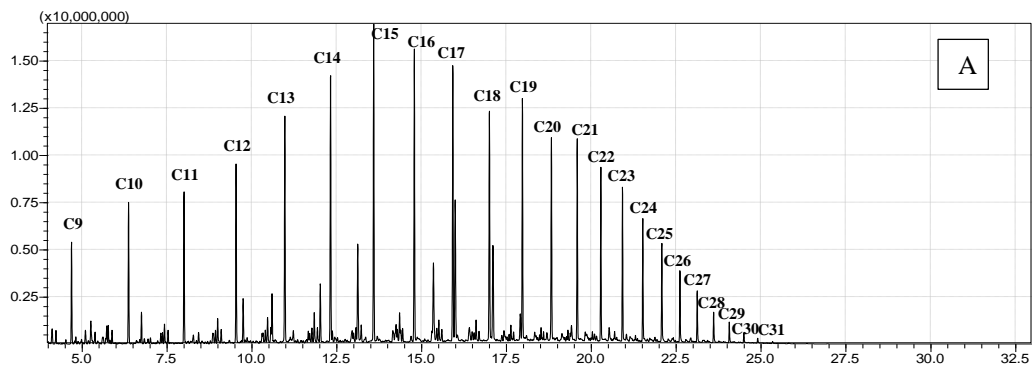


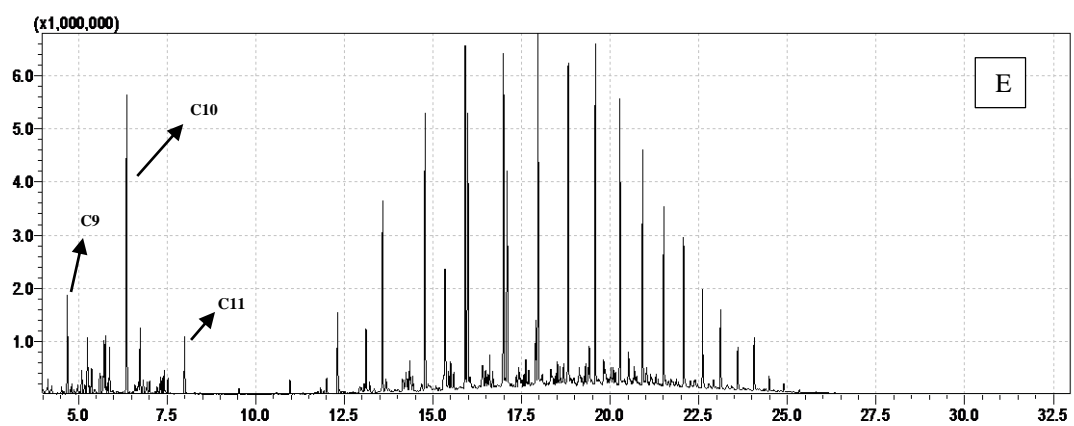
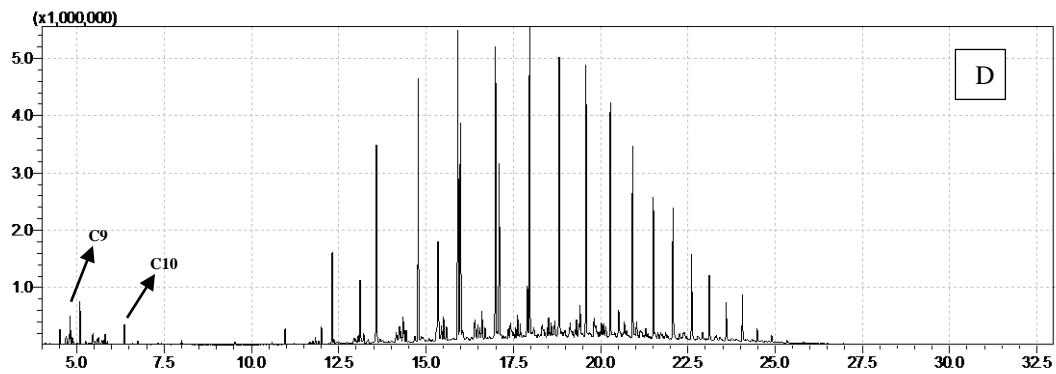
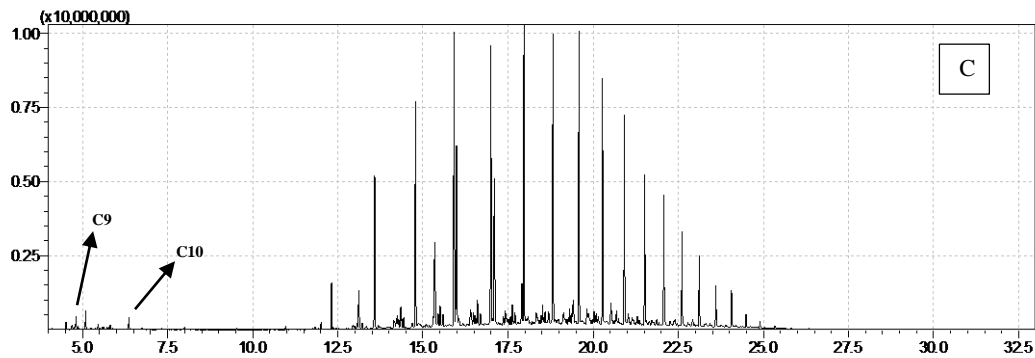
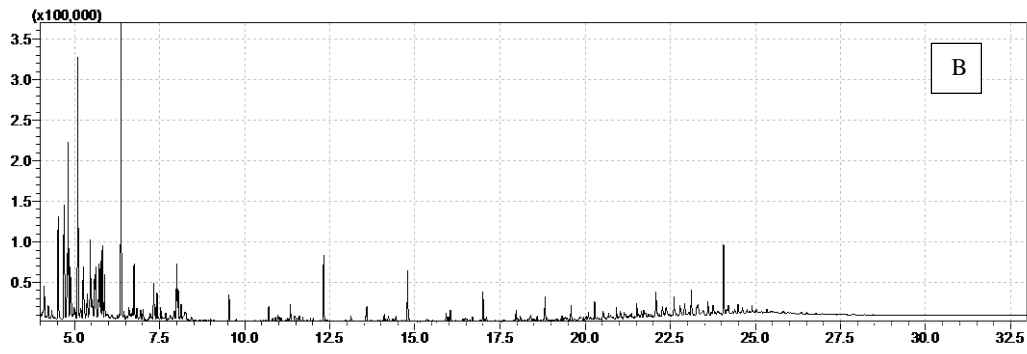
## APÊNDICE B

Concentração, em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , de *n*-alcanos nas amostras de sedimento após 120 dias de experimento.

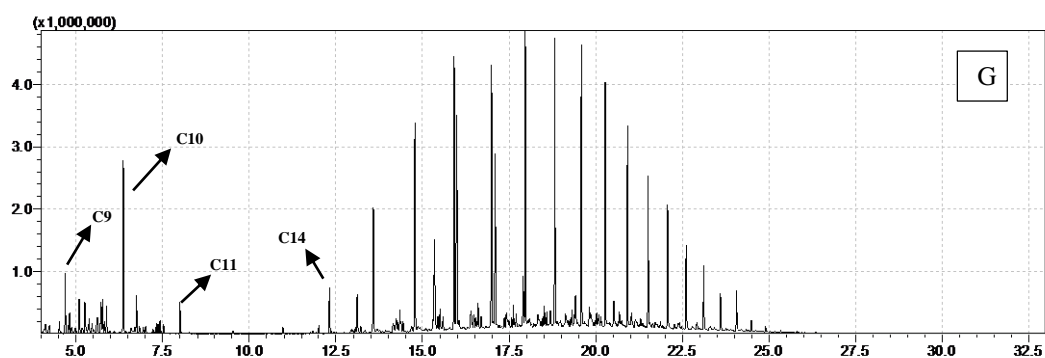
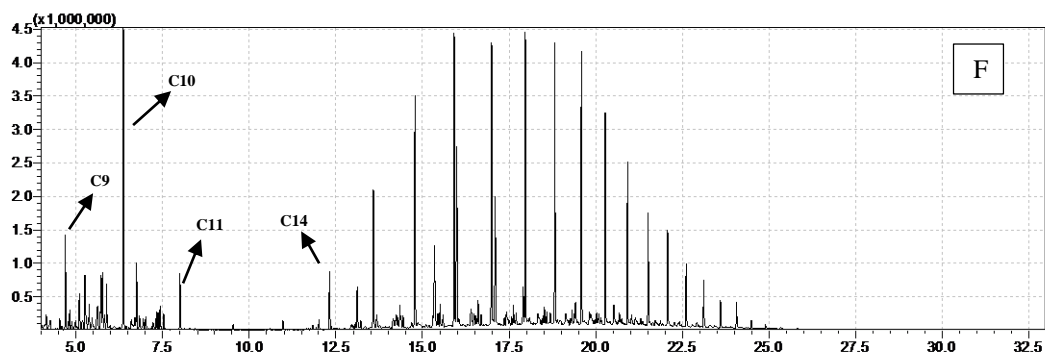
<i>n</i> -Alcano	DIESEL + Sedimento	DIESEL	C1	C2	C3	T1	T2	T3
C9	97.97	22.81	3.16	36.27	23.45	3.99	3.69	39.88
C10	137.43	22.36	15.36	119.67	70.07	9.68	8.50	28.91
C11	141.11	26.85	3.17	23.37	12.76	2.07	1.82	84.79
C12	179.62	35.00	1.46	2.28	1.39	1.33	1.28	16.20
C13	244.99	41.74	0.39	4.72	3.26	3.50	8.03	2.58
C14	309.66	49.48	4.56	30.02	22.66	46.73	46.37	13.77
C15	373.97	45.94	1.11	79.08	69.74	159.40	105.15	51.34
C16	360.71	53.05	3.50	132.48	115.64	254.57	145.92	103.54
C17	453.24	25.17	0.79	225.25	196.97	416.69	224.03	140.73
Pristano	188.66	45.81	0.28	111.00	125.22	215.19	129.73	187.85
C18	361.79	21.54	2.44	210.51	183.54	383.72	198.36	127.96
Fitano	152.43	46.99	0.33	103.94	104.16	201.69	107.49	176.98
C19	332.20	47.81	0.87	202.94	192.34	376.74	194.53	116.27
C20	315.00	59.61	2.01	199.15	187.40	376.13	190.77	174.05
C21	295.47	46.93	1.31	186.80	176.67	355.42	178.54	170.71
C22	262.22	44.90	1.48	159.78	164.55	327.56	161.65	160.78
C23	267.32	34.89	1.22	141.62	154.43	326.32	151.45	158.95
C24	204.68	32.68	1.56	101.16	114.84	254.81	113.47	136.31
C25	215.96	21.40	4.70	114.64	124.58	269.84	130.25	101.69
C26	156.71	16.81	3.57	77.32	87.23	199.40	94.34	113.24
C27	126.93	9.89	4.07	64.04	73.72	168.03	78.36	75.67
C28	83.35	5.96	2.63	41.73	46.24	110.51	50.47	62.10
C29	57.91	1.82	11.34	43.50	55.35	109.64	60.53	42.03
C30	31.43	1.41	1.72	14.66	17.75	44.13	20.40	48.39
C31	16.51	0.79	1.71	8.79	10.08	24.23	11.62	17.21
C32	5.58	0.50	0.58	2.96	3.40	8.85	4.10	9.16
C33	2.23	0.06	0.42	1.35	1.56	3.80	1.81	3.84
C34	1.16	0.17	0.52	0.61	0.73	1.80	0.85	2.15

Obs: Diluição do diesel - (2 $\mu\text{L}$  de diesel/1mL de Diclorometano P.A.).





Cromatograma de íons totais, em  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , de *n*-alcanos no óleo diesel (A), Controle 1 (B), Tratamento 1 (C), Tratamento 2 (D) e Tratamento 3 (E) após 120 dias de experimento.



Cromatograma de íons totais, em  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , de *n*-alcanos dos Controle 2 (F) e Controle 3 (G) após 120 dias de experimento.

Concentração, em  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , dos 16 HPAs prioritários nas amostras de sedimento após 120 dias de experimento.

HPA	DIESEL + Sedimento	DIESEL	C1	C2	C3	T1	T2	T3
Naftaleno	2148.0	2218.07	746.78	2210.67	2258.43	385.36	444.41	1090.49
Acenaftileno	1.93	0.00	2.20	0.00	4.98	1.69	1.79	4.36
Acenafteno	177.91	164.65	27.40	69.37	71.14	57.74	14.64	20.30
Fluoreno	381.48	19.17	173.10	678.28	638.87	315.51	277.94	165.34
Fenantreno	997.56	336.96	172.03	925.51	848.85	767.35	582.89	745.96
Antraceno	166.62	2.58	48.76	263.92	238.64	85.90	52.86	105.52
Fluoranteno	7.87	2.72	50.33	5.44	6.30	13.56	11.31	11.48
Pireno	111.12	31.63	66.19	106.20	100.79	138.11	117.51	15.01
Benzo (a) antraceno	39.96	0.22	10.31	67.01	57.64	14.57	13.84	38.83
Criseno	112.37	39.55	11.58	82.29	98.12	175.35	158.67	195.79
Benzo (b) fluoranteno	17.55	0.13	2.53	21.06	17.93	18.55	17.51	36.44
Benzo (K) fluoranteno	13.55	0.07	5.71	11.38	9.20	12.91	13.24	14.37
Benzo (a) pireno	32.16	0.18	20.22	51.36	44.34	14.51	14.77	28.11
Indeno (123cd) pireno	10.82	0.11	0.05	16.41	15.49	4.49	5.02	17.72

<b>Dibenzo (ah) antraceno</b>	18.19	0.16	1.42	21.85	28.90	1.46	0.76	9.37
<b>Benzo (ghi) perileno</b>	12.98	0.56	7.85	20.16	16.63	9.01	8.14	24.89

Concentração, em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , de *n*-Alcanos nas plantas do Controle 1 e dos Tratamentos 1 e 2 após 120 dias de experimento.

<i>n</i> -Alcano	C1	T2	T3
<b>C9</b>	43.02	18.51	22.07
<b>C10</b>	128.87	53.71	64.38
<b>C11</b>	24.97	10.54	13.07
<b>C12</b>	2.27	1.15	2.49
<b>C13</b>	2.31	1.20	3.44
<b>C14</b>	5.63	3.05	7.87
<b>C15</b>	6.34	3.04	9.72
<b>C16</b>	6.20	3.77	12.75
<b>C17</b>	1.75	2.20	12.22
<b>Pristano</b>	0.61	1.10	6.80
<b>C18</b>	3.52	4.16	14.75
<b>Fitano</b>	0.79	1.61	7.04
<b>C19</b>	1.63	6.67	18.56
<b>C20</b>	2.36	12.52	32.34
<b>C21</b>	1.42	17.04	45.50
<b>C22</b>	1.49	19.73	56.17
<b>C23</b>	1.33	20.13	57.22
<b>C24</b>	1.21	17.37	49.73
<b>C25</b>	2.33	23.84	59.47
<b>C26</b>	1.60	15.61	42.52
<b>C27</b>	5.66	17.87	36.54
<b>C28</b>	1.03	8.83	22.43
<b>C29</b>	9.15	13.46	27.13
<b>C30</b>	0.85	3.66	9.90
<b>C31</b>	1.67	3.32	6.53
<b>C32</b>	0.23	1.09	2.47
<b>C33</b>	0.69	0.64	1.43
<b>C34</b>	0.86	0.56	1.20
<b>C35</b>	1.76	0.35	0.60
<b>C36</b>	1.61	0.77	1.21

Concentração, em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , de HPA nas plantas do Controle 1 e dos Tratamentos 1 e 2 após 120 dias de experimento.

HPA	C1	T2	T3
<b>Naftaleno</b>	2240.99	503.53	513.96
<b>Acenaftileno</b>	4.84	2.02	1.05
<b>Acenafteno</b>	67.50	18.43	15.89
<b>Fluoreno</b>	500.28	82.07	80.14

<b>Fenantreno</b>	926.79	163.91	175.91
<b>Antraceno</b>	316.27	40.37	40.87
<b>Fluoranteno</b>	2.71	1.94	2.16
<b>Pireno</b>	13.18	3.72	5.73
<b>Benzo (a) antraceno</b>	101.26	19.93	19.03
<b>Criseno</b>	49.41	55.51	58.90
<b>Benzo (b) fluoranteno</b>	35.41	10.12	10.31
<b>Benzo (K) fluoranteno</b>	26.23	6.23	2.22
<b>Benzo (a) pireno</b>	82.47	22.68	21.99
<b>Indeno (123cd) pireno</b>	26.25	9.45	8.63
<b>Dibenzo (ah) antraceno</b>	14.66	2.45	3.74
<b>Benzo (ghi) perileno</b>	32.84	10.56	9.77

## APÊNDICE C

Peso fresco das plantas do Controle 1 após 120 dias de experimento

<b>Raiz (g)</b>	<b>Parte aérea (g)</b>
0.92	10.2
1.71	16.2
1.02	13.65
1.37	15.61
2.06	22.76
1.59	16.61

Peso fresco das plantas do Tratamento 2 após 120 dias de experimento

<b>Raiz (g)</b>	<b>Parte aérea (g)</b>
0.62	12.82
2.42	29.47
0.33	8.15
0.32	19.81
0.17	18.38
0.35	15.35

Peso fresco das plantas do Tratamento 3 após 120 dias de experimento

<b>Raiz (g)</b>	<b>Parte aérea (g)</b>
1.75	22.11
0.74	14.42
-	13.33
-	19.69
-	12.37
-	4.37

Peso seco das plantas do Controle 1 após 120 dias de experimento

<b>Raiz (g)</b>	<b>Caule (g)</b>
0.44	3.8
0.57	6
0.44	4.96
0.57	6.38
0.78	8.32
0.68	6.81

Peso seco das plantas do Tratamento 2 após 120 dias de experimento

<b>Raiz (g)</b>	<b>Caule (g)</b>
0.26	6.45
0.87	14.37
0.15	3.63
0.2	11.63
0.13	11.13
0.21	9.08

Peso seco das plantas do Tratamento 3 após 120 dias de experimento

<b>Raiz (g)</b>	<b>Caule (g)</b>
0.6	10.51
0.45	7.3
-	8.5
-	10.7
-	7.52
	3.02