

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS
NATURAIS**

**RESPOSTAS DE HERBÁCEAS AQUÁTICAS AMAZÔNICAS AO PETRÓLEO CRU
DE URUCU (COARI-AM)**

ALINE LOPES

Manaus, Amazonas

Junho, 2007

ALINE LOPES

**RESPOSTAS DE HERBÁCEAS AQUÁTICAS AMAZÔNICAS AO PETRÓLEO CRU
DE URUCU (COARI-AM)**

ORIENTADORA: Maria Teresa Fernandez Piedade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Ecologia.

Manaus – Amazonas

Junho, 2007

L864 Lopes, Aline
Respostas de herbáceas aquáticas amazônicas ao petróleo cru de Urucu (Coari-AM) / Aline Lopes. -- Manaus: INPA/UFAM, 2007.
129f. : il.

Dissertação (mestrado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2007.

Orientador (a): Dra. Maria Teresa Fernandez Piedade

Área de concentração: Ecologia

1. Ecologia. 2. Petróleo. 3. Áreas alagáveis. 4. Macrófitas aquáticas. 5. *Eichhornia crassipes*. I. Título

1 CDD 581.5

Sinopse

Estudou-se o efeito do petróleo cru de Urucu (Coari –AM) sobre a sobrevivência, crescimento e capacidade de rebrotamento de duas espécies de macrófitas aquáticas nativas da Amazônia, *Eichhornia crassipes* e *Echinochloa polystachya*.

Palavras-chave

Eichhornia crassipes, *Echinochloa polystachya*, áreas alagáveis, dosagem letal média, resposta relativa a dosagem, fitorremediação

*Dedico ao meu pai que sempre
foi exemplo de ética, respeito e
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus professores de ciências pelo fascinante mundo que me apresentaram na infância, aos meus professores de biologia que facilitaram a transformação desta fascinação em interesse profissional, e aos meus professores de ecologia que desde a graduação proporcionaram a concretização deste interesse por meio da pesquisa e desenvolvimento científico, particularmente nas áreas de ecologia e limnologia.

Aos meus pais, Wanda Laura Lopes e Segismundo Jesus Lopes (*in memoriam*) pelo incentivo e confiança incondicionais. Às minhas irmãs, Karina e Jacqueline, meus cunhados, Bruno e Flávio, minhas tias e tios que me deram todo o apoio para que eu seguisse a carreira de bióloga e por sempre terem acreditado na minha capacidade, mesmo quando eu mesma duvidava. Aos meus amigos biólogos, Mônica Elisa Buttow, Thiago Cintra Maniglia e Kátia Fialho que desde a graduação têm me incentivado a alcançar meus objetivos.

À Prefeitura do Município de Maringá por autorizar minha licença permitindo assim que eu pudesse cursar o mestrado, especialmente ao então Secretário Municipal de Saúde Dr. Paulo Mathias, e as “amigas-chefes-confidêntes” Solange Marega, Solange Dalla Vecchia e Fátima Natsue pelos conselhos e pelo incentivo.

Agradeço ao Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e ao Curso de Ecologia pela oportunidade concedida na realização desse curso.

Agradeço ao Cnpq pela concessão de bolsa de mestrado, à Capes e Fapeam pelo apoio financeiro ao Curso de Ecologia e ao Projeto INPA/Max-Planck, PPI 1090-5 pelo financiamento desta pesquisa.

À minha orientadora, Maria Teresa Fernandez Piedade, Maitê, por ter aceitado me orientar em uma área na qual ainda não trabalhava, por ter acreditado na possibilidade de desenvolvimento deste projeto, por toda confiança, carinho, bate-papos, cafezinhos, conselhos e principalmente pela amizade.

Aos professores Gonçalo Ferraz, Vera Maria de Fonseca Almeida Val, Jansen Zuanon, Assad José Darwich, Carlos Edwar de Carvalho Freitas, Bruce Forsberg, Sidinei Magela Thomaz e César S. B. Costa pelas correções e contribuições ao projeto e a dissertação.

Agradeço a todos os alunos do INPA que nos receberam e nos integraram a esta grande família, especialmente ao Domingos, Rafael, Luciana, Pedro Ivo, Graziela, Maria Clara, Tiago Izzo, Dri, Sol, Ciro e André Galuch.

Aos meus colegas de mestrado, Boguinho, Carol, Carolina, Daniel, Fábio, Feliz, Forga, Jô, Heldo, Helena, Manô, Mapi, Régis, Rodrigo, Sandrex, Silva, Simone, Thaise e Vivi agradeço não só pelo apoio, mas também pelas “puxadas-de-orelha”, que me fizeram crescer muito nesses dois anos de constante convivência.

Agradeço especialmente aos meus queridos amigos Joana D’Arc de Paula, Carlos Alberto Abraão e Fábio Chicuta Franco que foram essenciais em todas as etapas do mestrado e tornaram a minha estadia em Manaus muito agradável.

Agradeço a toda a equipe do Projeto INPA/Max-Planck. Ao Valdinei e Wallace que me auxiliaram na coleta das plantas e dos dados. A Lúcia pelas conversas e apoio na coleta dos dados. Ao Celso por todo o apoio e por me ajudar a resolver todos os problemas, como o ataque de gafanhotos e de macacos, teto rasgado, aparelhos descalibrados, sempre com pensamento positivo e “sem pensar em atraso”. A Cris, Astrid, Suzana, Maria Astrid, Keilah, Robson, Sinomar, Terezinha, Florian, Jochen, Araceli, Nina, Rafael, Tatiane, Auristela, Edivaldo e todos os outros alunos e técnicos do projeto pela parceria e amizade.

À Sonia Maciel da Rosa Osman pelo auxílio na confecção das lâminas e análises das estruturas foliares e ao Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica, onde foram fotografadas as lâminas foliares.

À Dra. Vera Maria de Fonseca Almeida Val, pelas sugestões desde a elaboração do projeto e por ter cedido a estrutura do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM). Ao Rafael Duarte, Rubens, Luciana e Nazaré por todo o apoio.

Ao LBA pela cessão dos dados da Estação Climatológica localizada no INPA. Ao Julio Tota pelas dicas imprescindíveis para a análise dos dados climáticos.

Meu agradecimento especial aos “Pollos de Peruka”, Fabito, Jô, Berô, Carol Moura, Marília, Klayber, Paulera, Flex, Diogo Percussão, Luca, Thais, Fuad, Lenizi, Arley, Caipirol, Eduardo, Nirvana, Kátia, Gustavo, Ricardo, Cláudio, Michela, Itelvina, e tantos outros, pelo interesse, amizade, e pelos momentos inesquecíveis compartilhados.

Ao Carlão e Nadir que sempre tiveram o jornal do dia em mãos para oferecer quando eu mais precisei de uma leitura. Obrigada pela amizade e pelo carinho.

Por último, mas não por menos merecimento, agradeço a Deus, fonte de todos os mistérios que buscamos desvendar cientificamente.

*“Tudo era caos
Tudo era sombra
E fez-se a luz*

*Tudo era pó
E era água
E fez-se a lama
E veio o sopro
E fez-se a vida*

*Tudo era dado
Tudo colhido
E fez-se a flecha
E fez-se o arado
E veio a caça
E veio a guerra*

*Tudo era aberto
Tudo era solto
E fez-se a cerca
E veio a posse
E fez-se a fome
E fez-se a morte*

*Tudo era medo
Tudo era estranho
E fez-se a letra
E fez-se a ciência
E veio a arte
E fez-se o mundo”.*

(Sergio Antonio Barreto de Faria, Gênesis)

RESUMO

Regiões com atividades petrolíferas, como a planície de inundação (várzea) dos rios Urucu e Amazonas, estão constantemente sob o risco de acidentes. Entretanto, os estudos sobre a toxicidade de petróleo em plantas aquáticas focam principalmente espécies marinhas e salobras. Estudos sobre o efeito da contaminação de águas continentais são escassos e, em se tratando de plantas amazônicas, são mais raros ainda. As várzeas possuem uma grande diversidade de macrófitas aquáticas que são responsáveis pela maior parte de sua produtividade primária e servem de habitat para diversas espécies de animais. A contaminação destas plantas por petróleo poderia desencadear uma série de efeitos diretos e indiretos em todo o ecossistema. A recuperação de áreas impactadas por poluentes exige a escolha de métodos que não agridam as espécies vegetais predominantes. Métodos químicos e físicos, muitas vezes, podem ser mais prejudiciais que o próprio poluente, por isso a fitorremediação é uma alternativa promissora para recuperação destes ambientes. Para que seja possível a utilização da fitorremediação na várzea amazônica é necessário que se determine a toxicidade do petróleo, especialmente nas fases críticas como a germinação e o rebrotamento de espécies de plantas nativas abundantes. No presente estudo foi avaliado, em casa de vegetação, o efeito do petróleo cru de Urucu sobre o rebrotamento e desenvolvimento de *Echinochloa polystachya* e *Eichhornia crassipes* com a finalidade de contribuir para as estimativas de danos no caso de contaminação da várzea por petróleo, e como uma tentativa de encontrar espécies com potencial para atuar na fitorremediação do ambiente aquático e terrestre contaminado. Para que os objetivos fossem alcançados foram delineados quatro experimentos, adicionando diferentes dosagens de petróleo sobre o substrato de cada uma das espécies. As duas espécies mostraram alta sensibilidade ao petróleo, porém, *E. polystachya* foi particularmente afetada apresentando mortalidade mesmo em tratamentos com baixíssimas dosagens como 1,5 mL petróleo 2L⁻¹ solo. Se estes resultados se confirmarem em campo o prejuízo de um derramamento de petróleo será catastrófico, pois esta espécie é considerada fundamental para a ciclagem de carbono e nutrientes da várzea. Experimentos utilizando o plantio direto de *E. polystachya* em solo contaminado mostraram que esta planta tem potencial para ser utilizada para fitorremediação de solos com até 0,66 mL de petróleo m⁻² solo. Estes resultados permitirão o desenvolvimento de métodos em campo para remediação com baixo custo, pois o plantio é feito por meio do colmo de plantas adultas, não havendo a necessidade de produção e estoque de mudas.

ABSTRACT

Regions with petroliferous activities, as Urucu and Amazonas River floodplains (varzea) are constantly under risk of accidents. However, the studies about the oil toxicity in aquatic plants focus mainly on brackish and salt marsh species. Studies about the effects of contamination in freshwater habitats are scarce and, even scarcer are those dealing with Amazonian plant species. The varzeas have a large diversity of aquatic macrophytes which are responsible by most of the primary productivity and are used as habitat for several animal species. The contamination of these plant species by oil spills could start a series of direct and indirect effects in the ecosystem, among them the impact over the associated fauna. The recovery of areas contaminated for pollutants demand the selection of methods that avoid endanger the predominant plant species. Many times chemical and physical methods for restoration are more harmful than the pollutant itself; therefore, the phytoremediation is an alternative that has shown promising results for environmental recovery. In order to use phytoremediation in Amazonian varzea it is necessary to establish the toxicity of the oil, especially in the critical phases as germination and vegetative propagation of the selected plant species. This study have assessed, in greenhouse, the effects of the Urucu crude oil on the vegetative propagation and development of the abundant native plant species *E. polystachya* and *E. crassipes* as a mean to contribute for damage estimates related to oil spill events, and as an attempt to find species able to act in the phytoremediation of contaminated aquatic and terrestrial environments. To accomplish these aims four experiments were performed, utilizing the two plant species and adding different volumes of oil in their media (soil or water). Both plants have shown high sensitivity to the oil. *E. polystachya* was particularly affected with high mortality levels even in treatments with lower dosages as 1.5 mL oil 2 L⁻¹ soil. If these results may confirm in field experiments, the damage of oil spilling would be catastrophic, since this specie plays a key role for the carbon and nutrient budgets and cycles. The direct plantation of *E. polystachya* in contaminated soil have shown that the specie has potential to be used for phytoremediation of contaminated soils with up to 0,66 mL oil m⁻² soil. These results will allow the development of field methods of remediation with low cost. As the plantation is made by means of the cut of adult plant stems, there is no need of production and supply of seedlings.

LISTA DE TABELAS

Artigo I

1. Tabela 1: Composição do óleo cru de Urucu (Petrobrás, 1997 apud Brauner et al., 1999).....18
2. Tabela 2: Dosagens de petróleo aplicadas baseadas no volume por unidade amostral, volume por unidade de área superficial, massa por peso da água e peso seco do solo e a porcentagem de óleo em relação ao volume de substrato.....19

Artigo II

3. Tabela 1: Número de plantas mortas após a exposição ao petróleo, de acordo com as dosagens de petróleo aplicadas baseadas no volume por unidade amostral e o tempo de retirada de cada planta para.....39
4. Tabela 2: Resultados da ANOVA para as variáveis dependentes em relação aos fatores dosagem de petróleo (Dose) e tempo de exposição (Tempo), e as interações entre os fatores (interação). g.l. (graus de liberdade).....45
5. Tabela 3: Resultados da ANCOVA para as variáveis dependentes em relação ao fator dosagem de petróleo (Dose) e a co-variável tempo de exposição (Tempo). g.l. (graus de liberdade).....48

Artigo III

6. Tabela 1: Número de plantas mortas após a exposição ao petróleo de acordo com as dosagens aplicadas baseadas no volume por unidade amostral e no tempo (dias) de retirada de cada planta para biomassa.60
7. Tabela 2: Resultados da ANOVA para as variáveis dependentes em relação aos fatores dosagem de petróleo (Dose) e tempo de exposição (Tempo), e as interações entre os fatores (interação). g.l. (graus de liberdade).....65
8. Tabela 3: Resultados da ANOVA para as variáveis dependentes em relação aos fatores dosagem de petróleo (Dose) e tempo de exposição (Tempo), e as interações entre os fatores (interação). g.l. (graus de liberdade)69

Artigo IV

9. Tabela 1: Valores de temperatura média (T), temperatura média máxima (TM), temperatura média mínima (Tm), umidade relativa do ar (UR), precipitação total (Pp) e número de dias de chuva (Dc) no ano de 2006 no Aeroporto Internacional de Manaus (Fonte: Tutiempo.net)81
10. Tabela 2: Resultados da ANOVAmr para verificar o efeito da dosagem de petróleo (mL) e do tempo de exposição em *E. polystachya* sobre as variáveis avaliadas, nos dois períodos de plantio dos propágulos, A (jul./set.), B (set./nov.). T (tempo); D (dose); T*D (interação); g.l. (graus de liberdade).....89
11. Tabela 3: Resultados da ANOVA para verificar o efeito da dosagem de petróleo (D); do período de plantio dos propágulos (PP), A (jul./set.) e B (set./nov.); e da interação entre esses fatores (D*PP) sobre as variáveis dependentes. g.l. (graus de liberdade).....93

LISTA DE FIGURAS

Materiais e métodos

1. Figura 1. Banco de macrófitas aquáticas na Ilha de Marchantaria. A) *Echinochloa polystachya*; B) *Eichhornia crassipes*.....11
2. Figura 2. Imagem Landsat da área de coleta, Ilha de Marchantaria, 1999. No detalhe o posicionamento da Ilha em relação ao Município de Manaus.....12
3. Figura 3. Casa de Vegetação onde foram realizados os experimentos com: A) *Echinochloa polystachya*; B) *Eichhornia crassipes*.....13

Artigo I

4. Fig. 1. a): *Echinochloa polystachya* após 2 dias de tratamento nas dosagens de 0, 1,5, 6 e 25 mL de petróleo 2 L⁻¹ solo; b) *Eichhornia crassipes* 48 dias após a aplicação de petróleo nas dosagens, respectivamente de 0, 100, 200 e 300 mL 2 L⁻¹ água.....21
5. Fig. 2. Secções transversais das folhas de *Eichhornia crassipes* após 90 de exposição ao petróleo cru nas dosagens de: a) 0 mL; b) 50 mL; c)100 mL; d) 300 mL 2 L⁻² de água. ei (epiderme inferior); es (epiderme superior); pp (parênquima paliçádico); ph (parênquima homogêneo); ae (lacuna do aerênquima); e (estômato) fx (feixes vasculares). Aumento de 400x para o controle e 200x para os demais tratamentos.....22
6. Fig. 3. Secções transversais do bulbo de *Eichhornia crassipes* após 90 dias de exposição ao petróleo cru nas dosagens de: a) 0 mL; b) 50 mL; c)100 mL; d) 300 mL 2 L⁻¹ de água. ae (lacuna do aerênquima); ph (parênquima homogêneo). Aumento de 25x.....23
7. Fig. 4: Efeito da dosagem do petróleo e do tempo de exposição (dias) sobre o número de folhas de: a) *Eichhornia crassipes*; b) *Echinochloa polystachya* . Valores médios com erro padrão ($n=13$).....23
8. Fig. 5: Efeito da dosagem do petróleo e do tempo de exposição (dias) sobre o comprimento de folhas: a) *Eichhornia crassipes*; b) *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão ($n=13$).....24
9. Fig. 6. Efeito da dosagem do petróleo sobre o comprimento das raízes ao término do experimento. Valores médios com erro padrão ($n = 13$). * indica os tratamentos onde

- houve diferença significativa entre o valor inicial e final do comprimento da raiz ($\alpha = 0,05$).25
10. Fig.7. Toxicidade das dosagens do petróleo cru de Urucu expressa em valores de DL₅₀ para: a) *E. crassipes*; b) *E. polystachya* de acordo com o tempo de exposição. Valores com intervalo de confiança de 95%, (--- curva de tendência exponencial).....26

Artigo II

11. Fig. 1. *Eichhornia crassipes* após 20 dias exposição ao petróleo de Urucu, nas dosagens de indicadas ao lado de cada pote (mL 2L⁻¹ de água).....41
12. Fig. 2. Efeito da dosagem do petróleo e do tempo de exposição sobre a mortalidade (%) de *Eichhornia crassipes*. Os pontos escuros são as dosagens e tempos amostrados.....42
13. Fig. 3. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L⁻¹ água) e do tempo de exposição (dias) sobre o número de folhas de *Eichhornia crassipes*. Valores médios com erro padrão. * indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido a ampla mortalidade das plantas.....43
14. Fig. 4. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L⁻¹ água) e do tempo de exposição (dias) sobre o número de folhas de *Eichhornia crassipes* com comprometimento fitossanitário. Valores médios com erro padrão. * indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido a alta mortalidade das plantas..... 44
15. Fig. 5. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L⁻¹ água) e do tempo de exposição (dias) sobre o comprimento máximo de folhas de *Eichhornia crassipes*. Valores médios com erro padrão. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido a alta mortalidade das plantas. 44
16. Fig. 6. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L⁻¹ água) e do tempo de exposição (dias) sobre a biomassa aérea de *Eichhornia crassipes*. Valores médios com erro padrão. * indicam valores com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido a ampla mortalidade das plantas.....47
17. Fig. 7. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L⁻¹ água) e do tempo de exposição (dias) sobre o biomassa aérea morta de *Eichhornia crassipes*.Valores médios com erro

padrão. * indicam valores com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido a ampla mortalidade das plantas.....	48
18. Fig. 8. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L ⁻¹ água) e do tempo de exposição (dias) sobre a proporção de biomassa aérea viva/total de <i>Eichhornia</i> . Valores médios com erro padrão. * indicam valores com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle.....	49

Artigo III

19. Fig. 1. a) <i>Echinochloa polystachya</i> nos tratamentos de 0, 1,5, 6 e 25 mL de petróleo 2L ⁻¹ de solo após 1 dia de exposição ao petróleo de Urucu; b) detalhe da base da folha de uma planta exposta a 25 mL de petróleo.....	62
20. Fig. 2. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L ⁻¹ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre a mortalidade (%) de <i>Echinochloa polystachya</i> . Os pontos escuros são as dosagens e tempos amostrados.	63
21. Fig. 3. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L ⁻¹ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre o número de folhas de <i>Echinochloa polystachya</i> . Valores médios com erro padrão.* indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.....	64
22. Fig. 4. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L ⁻¹ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre o número de folhas com comprometimento fitossanitário de <i>Echinochloa polystachya</i> . Valores médios com erro padrão. * indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.....	64
23. Fig. 5. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L ⁻¹ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre o comprimento de folhas de <i>Echinochloa polystachya</i> . Valores médios com erro padrão. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.	65
24. Fig. 6. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L ⁻¹ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre a biomassa aérea de <i>Echinochloa polystachya</i> . Valores médios com erro padrão. * indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.....	67

25. Fig. 7. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L⁻¹ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre a biomassa aérea morta de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão. * indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.....67
26. Fig. 8. Efeito da dosagem do petróleo (mL 2L⁻¹ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre a proporção de biomassa aérea viva/ biomassa aérea total de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão. * indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.....68

Artigo IV

27. Fig 1. Ciclo de vida de *E. polystachya* acompanhando o nível da água do rio. Valores médios mensais do nível das águas do Rio Negro (metros acima do nível do mar), tributário do Rio Amazonas no ano de 2006. Fonte: Porto de Manaus.....80
28. Fig 2. Climatologia de temperatura para o Aeroporto de Manaus, Amazonas e para o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) nos anos de 2005 e 2006. Fonte: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) e Experimento de Larga Escala Biosfera-Atmosfera.....81
29. Fig. 3. Efeito do petróleo de Urucu sobre a média do número de brotos de *Echinochloa polystachya* por unidade amostral ao longo do tempo de exposição, nos períodos de plantio: a) A (jul./set.) e b) B (set./nov.).84
30. Fig. 4. Efeito do petróleo cru de Urucu sobre a média do número de folhas de *Echinochloa polystachya* ao longo do tempo de exposição, nos períodos de plantio: a) A (jul./set.) e b) B (set./nov.).85
31. Fig. 5. Efeito do petróleo cru de Urucu sobre a média do número de folhas com comprometimento fitossanitário de *Echinochloa polystachya* ao longo do tempo de exposição, nos períodos de plantio: a) A (jul./set.) e b) B (set./nov.).....86
32. Fig. 6. Efeito do petróleo cru de Urucu sobre a média do comprimento máximo das folhas de *Echinochloa polystachya* ao longo do tempo de exposição, nos períodos de plantio: a) A (jul./set.) e b) B (set./nov.).....87

33. Fig. 7. Efeito do petróleo Cru de Urucu sobre a altura média de inserção da primeira folha de *Echinochloa polystachya* ao longo do tempo de exposição, nos períodos de plantio: a) A (jul./set.) e b) B (set./nov.).....88
34. Fig. 8. Efeito da dosagem do petróleo cru de Urucu sobre: a) o número de rebrotamentos; b) o número de folhas de *Echinochloa polystachya* nos dois períodos de plantio dos propágulos, A (jul./set.) e (set./nov.). Valores médios com erro padrão.....90
35. Fig. 9. Efeito da dosagem do petróleo cru de Urucu sobre: a) o comprimento da folha; b) a altura de inserção da primeira folha de *Echinochloa polystachya*, nos dois períodos de plantio, A (jul./set.) e B (set./nov.). Valores médios com erro padrão. Letras distintas dentro de cada período indicam tratamentos significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$).....90
36. Fig. 10. Efeito da dosagem do petróleo cru de Urucu sobre a biomassa aérea em cada período de plantio dos propágulos de *Echinochloa polystachya*, A (jul./set.) e B (set./nov.). Valores médios com erro padrão. Letras distintas, dentro de cada período, indicam tratamentos significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$).....91
37. Fig. 11. Efeito da dosagem do petróleo cru de Urucu e do período de plantio dos propágulos, A (jul./set.) e B (set./nov.) sobre: a) a biomassa aérea morta; b) a biomassa da raiz; c) a biomassa do colmo de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão.....92
38. Fig. 12. Efeito da dosagem do petróleo cru de Urucu sobre: a) a biomassa total, nos dois períodos de plantio dos propágulos, A (jul./set.) e B (set./nov.); b) a proporção de biomassa aérea viva/ aérea total de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão. Letras distintas indicam tratamentos significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$).....92

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Impactos do petróleo sobre o ambiente.....	2
1.2. Potenciais riscos de contaminação da várzea.....	4
1.2. Breve descrição das macrófitas aquáticas utilizadas.....	6
1.3. Métodos de remoção e limpeza do petróleo.....	8
2. OBJETIVO GERAL.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3. ARTIGOS.....	14
3.1. Determinação da dosagem letal média (DL_{50}) para <i>Echinochloa polystachya</i> (H.B.K.) Hitchcock e <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms. expostas ao petróleo cru de Urucu.....	14
3.2. Respostas da herbácea aquática amazônica <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms ao tempo de exposição e à dosagem do petróleo cru de Urucu.....	35
3.3. Respostas da herbácea aquática amazônica <i>Echinochloa polystachya</i> (H.B.K.) Hitchcock ao tempo de exposição e à dosagem do petróleo cru de Urucu.....	55
3.4. Estabelecimento de <i>Echinochloa polystachya</i> (H.B.K.) Hitchcock em solo contaminado com petróleo cru de Urucu.....	77
4. CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS.....	104
ANEXOS.....	109
1. Anexo A: Normas da Revista <i>Environmental Pollution</i>	109

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o petróleo e seus derivados são as formas de energia mais utilizadas no mundo. Mais de 65 milhões de barris de petróleo são extraídos por dia para suprir a demanda energética mundial. Essa crescente demanda tem justificado a exploração em áreas de difícil acesso como a região amazônica, onde têm sido encontradas grandes reservas de petróleo nas proximidades do Rio Urucu, tributário do Rio Amazonas (Val & Almeida-Val, 1999). O Estado do Amazonas é, atualmente, o terceiro maior produtor de gás natural, produzindo uma média de 9,7 milhões $\text{m}^3 \text{dia}^{-1}$, e o segundo maior produtor terrestre de petróleo do Brasil, produzindo cerca de 56,5 mil barris de óleo diariamente (Castelões, 2002, Conpet, 2005; Petrobrás, 2006).

A extração, o armazenamento e especialmente o transporte de petróleo são atividades que trazem um risco em potencial e podem causar danos irreparáveis ao ambiente (Val & Almeida-Val, 1999; Keramitsoglou, 2003). O petróleo extraído de Urucu é transportado por navios petroleiros pelo Rio Solimões, por cerca de 650 Km, até a Refinaria Isaac Sabbá, localizada às margens do Rio Negro, em Manaus (Val & Almeida-Val, 1999). A Refinaria possui capacidade de produção diária de 46 mil barris e cerca de 92% de sua capacidade é ocupada pelo petróleo de Urucu, o qual é extremamente leve e de alta qualidade (Petrobrás, 2006). Os principais derivados produzidos pelo petróleo de Urucu são o gás liquefeito do petróleo (G.L.P.), nafta petroquímica, gasolina, querosene de aviação, óleo diesel, óleos combustíveis, óleo leve para turbina elétrica e óleo para geração de energia. A região Amazônica já é auto-suficiente em petróleo e parte de sua produção é exportada para outras refinarias da Petrobrás, localizadas em diferentes regiões do Brasil (Petrobrás, 2006).

O impacto ambiental da exploração e transporte do petróleo é tido como uma consequência inevitável da industrialização e desenvolvimento econômico de um país (Osuji & Onajake, 2006). Entretanto, diante de eventos de graves proporções como o derramamento de petróleo pelo petroleiro Exxon Valdez no Alasca em 1989, cujos inúmeros efeitos foram monitorados e relatados ao longo de 14 anos, constatou-se a necessidade de se prever impactos ecológicos decorrentes do derrame de petróleo e derivados (Peterson *et al.*, 2003). Os efeitos do petróleo sobre a fauna e flora em ambientes marinhos e terrestres são bem documentados, entretanto, em ambientes aquáticos continentais existem poucos estudos

realizados, por isso, o derramamento de petróleo pode se tornar um sério problema para as áreas alagáveis expostas a esse risco (Val & Almeida-Val, 1999).

Acidentes envolvendo derramamentos de petróleo e derivados vêm ocorrendo freqüentemente nos últimos anos no Brasil e no mundo. O derramamento de petróleo de grande ou pequeno porte pode ocorrer em áreas continentais, costeiras ou até mesmo no mangue. Estes derramamentos, em sua maioria, geram efeitos negativos na flora e fauna local das áreas atingidas (Muratova *et al.*, 2003). Na região amazônica já ocorreram derramamentos de petróleo em países limítrofes, como o Peru e a Venezuela, entretanto, praticamente inexistem informações sobre os impactos provocados. Couceiro *et al.* (2006; 2007) avaliaram os efeitos do derramamento de petróleo no Lago Cururu em Manaus (AM), ocorrido em agosto de 1999, devido ao rompimento de um oleoduto. Este estudo concluiu que a riqueza da entomofauna litoral no solo do lago poluído era menor que no controle não perturbado (Igarapé Cristalino), devido aos efeitos diretos e indiretos dos resíduos de petróleo. Já a riqueza de macrófitas aquáticas mostrou-se maior no lago Cururu que no controle, porém, similar ao Igarapé Bom Jardim (nível intermediário de poluição) devido ao alto grau de eutrofização dos dois igarapés, não sendo possível a separação do efeito de eutrofização do efeito da contaminação por petróleo (Forsberg *et al.*, 2001).

Na possibilidade de ocorrer um derramamento de petróleo acredita-se que as áreas mais afetadas serão as planícies de inundação mais férteis, as várzeas, dos rios Solimões e Urucu, pois, nesses ambientes a ciclagem de nutrientes depende do pulso de inundação (Junk *et al.*, 1989) e, por isso, os nutrientes, assim como os poluentes, são reincorporados ao ambiente a cada ciclo de inundação do rio. A contaminação das várzeas prejudicaria importantes atividades econômicas como a pesca e o turismo.

1.1. Impactos do petróleo sobre o ambiente

O derramamento de petróleo e as modificações ambientais decorrentes podem influenciar a composição da comunidade de plantas aquáticas, pois o efeito varia com o tipo de óleo e a espécie de planta. Os óleos leves, como o de Urucu, atuam em nível celular, alterando a permeabilidade da membrana ou interrompendo vários processos do metabolismo da planta. Deste modo, seus efeitos parecem ser imediatamente tóxicos às plantas, enquanto que óleos mais pesados recobrem as plantas provocando asfixia e impedindo a troca de gases (Pezeshki *et al.*, 2000).

O óleo pode causar efeitos tóxicos físicos e químicos nas plantas (Lin & Mendelssohn, 1996). Os impactos químicos do óleo nas plantas variam com o tipo e a quantidade de óleo (Pezeshki *et al.*, 2000). Alguns estudos com *Spartina alterniflora* mostraram que os óleos refinados e leves são mais tóxicos que os óleos crus e pesados, pois penetram nas plantas e, subsequentemente, impedem a regeneração de folhas e raízes (Pezeshki *et al.*, 1995; 1997 *apud* Pezeshki *et al.*, 2000). Os impactos físicos do óleo sobre as folhas e sobre a superfície do solo parecem ocorrer antes dos impactos químicos (Lin & Mendelssohn, 1996). O recobrimento da superfície foliar pelo óleo causa a obstrução dos poros impedindo a transpiração e a fotossíntese, aumentando a temperatura interna da planta (Pezeshki & DeLaune, 1993). A gravidade dessas alterações depende da espessura da lâmina de óleo que recobre as plantas, a qual varia com a quantidade de óleo derramado, as condições hidrológicas, o tipo de óleo e a possibilidade de dispersão. A cobertura total da superfície foliar pelo óleo provoca o fechamento dos estômatos e pode causar a morte das plantas (Pezeshki *et al.*, 2000; 2001). Quando o óleo bloqueia os estômatos a difusão de oxigênio para as raízes diminui, devido ao interrompimento do transporte de oxigênio atmosférico pelas folhas, aumentando o estresse de oxigênio das raízes, comum em plantas aquáticas. Da mesma forma, se o óleo atinge o substrato ele irá restringir o movimento de oxigênio dentro do solo, podendo resultar no aumento de atividades anaeróbicas e, assim, aumentar o estresse de oxigênio nas raízes (Ranwell, 1968).

Os efeitos do óleo sobre as folhas parecem ser mais imediatos que os efeitos sobre o solo, porém, estes podem persistir por mais tempo quando ocorre o contato do petróleo com novas raízes (Lin & Mendelssohn, 1996). O tipo de solo e a quantidade de matéria orgânica são importantes na determinação da contaminação desse compartimento. Solos ricos em matéria orgânica, como os da várzea, proporcionam um maior tempo de exposição das plantas às toxinas, pois a matéria orgânica lábil, forma assimilável pelas plantas, pode ser utilizada como substrato para as bactérias consumidoras de hidrocarbonetos. Este efeito é agravado porque a matéria orgânica contaminada torna-se menos viável às plantas resultando em seu acúmulo no solo (Pezeshki *et al.*, 2000). Lin & Mendelssohn (1996) encontraram 279 vezes maior quantidade de óleo em solos com matéria orgânica que em solos sem esta.

Em longo prazo, a contaminação no solo afeta a produtividade total do sistema, pois causa danos às plantas aquáticas que contribuem para a base de detritos da teia alimentar dos ecossistemas aquáticos (Pezeshki *et al.*, 2000). A textura do solo pode afetar a concentração residual de óleo no solo e na vegetação, devido às diferenças do tamanho e espaçamento dos

poros. Substratos com areia possuem poros maiores, permitindo uma penetração do óleo mais rápida e profunda que em solos de textura fina (Pezeshki *et al.*, 2000). Na Amazônia o petróleo, provavelmente, ficaria acumulado sobre o solo da várzea, pois de acordo com Irion *et al.* (1997) o solo da várzea é composto principalmente por silte (grânulos de 2 a 63µm) e argila (grânulos < 2 µm), sedimentos finos ricos em elementos essenciais às plantas. Este acúmulo resultaria em uma prolongação dos efeitos do petróleo sobre a vegetação.

Estudos em regiões temperadas (Pezeshki *et al.*, 2000) mostraram que a sazonalidade influencia o impacto do óleo na vegetação, havendo para *S. alterniflora* maior efeito em maio, período de crescimento das plantas, que em novembro, final do período de crescimento. Além disso, na maioria dos estudos, as plantas mostraram-se mais sensíveis à limpeza do óleo no período de crescimento que durante a pré-dormência e dormência. Outros estudos mostraram uma diminuição da floração e da viabilidade das sementes, com redução da taxa de germinação (Pezeshki *et al.*, 2000).

Na Amazônia, a vegetação das áreas alagáveis é estruturada pelo pulso de inundação (Junk *et al.* 1989), notadamente em função da marcada sazonalidade de crescimento e decomposição das macrófitas aquáticas. Assim, por exemplo, plantas como *E. polystachya* que rebrotam durante a fase terrestre, podem ser fortemente afetadas por um derramamento de petróleo nesse período, com conseqüências mais graves do que aquelas da fase aquática, quando as plantas são adultas.

1.2. Potenciais riscos de contaminação da várzea

As áreas alagáveis associadas aos grandes rios são de extrema importância nas regiões tropicais. Na Amazônia brasileira as várzeas ocupam cerca de 200.000 km² e representam um dos ecossistemas mais produtivos do mundo, promovendo o enriquecimento regular de matéria orgânica para os rios (Junk *et al.*, 1989), por isso, sua contaminação seria prejudicial a todo ecossistema aquático. Segundo Melack & Forsberg (2001) a produtividade primária deste ecossistema depende basicamente de quatro grupos de produtores: fitoplâncton (2%), algas perifíticas associadas à floresta alagável e associadas às herbáceas aquáticas (5%), floresta alagável (28%) e as herbáceas aquáticas (65%). As herbáceas aquáticas (Junk & Piedade, 1993) contribuem de forma capital aos balanços de carbono e às cadeias alimentares de detritos da várzea. Supõe-se, então, que os efeitos da contaminação de petróleo possam ser catastróficos.

As herbáceas aquáticas são encontradas, geralmente, em ambientes de água branca, ricos em nutrientes, como o Rio Amazonas. A distribuição desse grupo de plantas na planície de inundação depende da duração das fases aquática e terrestre, da estabilidade física do hábitat, que é influenciada pelos processos de sedimentação e erosão, dos processos sucessionais relacionados com o período de vida e idade das plantas e de impactos humanos (Junk & Piedade, 1997). A taxa de crescimento de macrófitas aquáticas flutuantes é diretamente proporcional à intensidade e quantidade de luz e nutrientes disponíveis (Petruccio & Esteves, 2000). As raízes geralmente constituem o principal órgão da planta envolvido na absorção, entretanto, em plantas aquáticas, as folhas estabelecem contato direto com a água e, portanto, teoricamente, também podem absorver como as raízes (Oliveira *et al*, 2001). Assim, o petróleo pode afetar as plantas fisicamente agindo como uma barreira sobre as folhas impedindo a penetração da luz e quimicamente ao ser absorvido pelas folhas e raízes.

Na várzea próxima a Manaus foram identificadas 388 espécies de plantas herbáceas, pertencentes a 64 famílias e 182 gêneros. Dentre as espécies mais abundantes encontram-se as aquáticas flutuantes *Pistia stratiotes*, *Scirpus cubensis*, *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*; as semi-aquáticas *Echinochloa polystachya*, *Hymenachne amplexicaulis*, *Leersia Hexandra*, *Oryza perennis* e *Paspalum repens*; e as terrestres *Alternanthera pilosa*, *A. brasiliana*, *Paspalum conjugatum*, *Ludwigia densiflora* e *Sorghum arundinaceum* (Junk & Piedade, 1997). Estas plantas compõem uma comunidade de estrutura complexa que poderia ser modificada pela entrada de fatores estressantes não previsíveis, como um derramamento de petróleo.

Os poucos estudos realizados com a utilização de petróleo de Urucu mostram a alta toxicidade deste petróleo sobre as plantas aquáticas. Crema (2003) observou que a dosagem de 3L de petróleo m⁻² de água (cerca de 4775 mL por unidade amostral) provocou a morte de *Eichhornia crassipes*. Já Prado & Rubin (2003) demonstraram que quantidades de 1mL L⁻¹ de água (140 mL por unidade amostral) foram limitantes para o desenvolvimento desta mesma espécie, após 90 dias de exposição. Para *Pistia stratiotes*, Silva (2005) observou a mortalidade de todos os indivíduos após 98 dias de exposição a 0,3L de petróleo m⁻² de água (cerca de 477,5 mL L⁻¹ água). Somente Victório *et al.* (2006) encontraram aumento de biomassa total após a exposição por 20 dias de *Egeria densa* a dosagens de petróleo 0,061L m⁻² e 0,122L m⁻² de água, sugerindo que essa planta é beneficiada pela exposição ao petróleo.

Espécie-chave pode ser definida como uma espécie cuja posição no sistema é crítica, sendo capaz de deslocar o caráter de um hábitat de um estado para outro qualitativamente

diferente (Ricklefs, 1993), ou ainda cuja presença ou abundância pode ser utilizada para avaliar até que ponto o recurso de uma área ou hábitat pode ser explorado (Allaby, 1994). O estudo destas espécies é importante porque, devido a seu papel no ecossistema, podem indicar o funcionamento e a integridade deste. A seleção e o estudo de espécies indicadoras, sejam animais ou vegetais, são necessários se quisermos descrever o nível de conectividade, o nível do distúrbio de unidades da vegetação, a integridade hidrológica, a qualidade da água e o nível de intoxicação (Junk & Piedade, 2004). Por isso, foram escolhidas para este estudo espécies consideradas fundamentais para o ecossistema de várzea, uma de hábito aquático, *E. crassipes*, e outra de hábito semi-aquático, *E. polystachya*, para que pudesse ser avaliado o efeito do petróleo em dois diferentes meios passíveis de contaminação.

1.3. Descrição das macrófitas aquáticas utilizadas

1.3.1. *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock (canarana)

E. polystachya (Poaceae) é um capim emergente, perene e C4 (Piedade *et al.*, 1992). Esta planta possui ampla distribuição nas Américas, ocorrendo do México a Argentina (Hitchcock, 1936), no Brasil é mais freqüente na Amazônia. Os elevados valores de produção primária líquida ($108 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) desta planta, distribuídos em 65% de caules, 30% de folhas e 5% de raízes (Piedade, 1988), fazem com que ela se destaque e tenha grande importância ecológica na várzea. A produtividade dessa espécie está acima da faixa sugerida para macrófitas aquáticas ($8 \text{ a } 60 \text{ t ha}^{-1}$), sendo 4 vezes maior que a sugerida para florestas tropicais chuvosas (Lieth, 1975). Essa biomassa é aproveitada para o alimento de capivaras e algumas tartarugas; as folhas são consumidas por invertebrados terrestres e as raízes proporcionam substrato para invertebrados aquáticos e hábitat para peixes jovens (Piedade *et al.*, 1992).

Na Amazônia, *E. polystachya* forma bancos grandes e homogêneos em águas ricas em nutrientes (Piedade *et al.*, 1991, Piedade, 1993). Seu ciclo de vida é regulado pelo pulso de inundação e apresenta duas fases distintas, uma terrestre e outra aquática. A fase terrestre se inicia com a redução do nível da água e a exposição dos sedimentos, que na região de Manaus ocorre de outubro a novembro. Neste período, novas raízes são formadas nos antigos nós e estas, quando em contato com o sedimento, formam novos indivíduos. As plantas crescem verticalmente atingindo cerca de 1 a 2 m de altura no início da fase aquática. O florescimento inicia-se na fase aquática e se estende de março a setembro. Após o florescimento, com o nível da água alto, os indivíduos continuam a crescer, porém com uma taxa reduzida. Com a queda do nível da água, as porções superiores dos colmos são expostas ao ar, e com a

exposição dos sedimentos em outubro/novembro, inicia-se uma nova fase vegetativa (Piedade *et al.*, 1992).

Em seu ambiente natural de ocorrência, *E. polystachya*, além da reprodução sexuada, apresenta propagação vegetativa, por meio da rebrota dos nós presentes no colmo. Os caules, de até 15m de comprimento, têm como função principal manter as folhas acima da crescente coluna de água. Contudo, ao serem depositados nos sedimentos, quando da descida das águas, também tem função propagativa. Estudos prévios mostram que a concentração de elementos químicos é muito semelhante entre as diferentes partes do colmo e entre os períodos do ano (Piedade *et al.*, 1997), de tal forma que cada propágulo vegetativo tem porções adequadas e equiparáveis de nutrientes para o seu rebrotamento (Piedade *et al.*, 1992).

Alguns estudos realizados com esta espécie no México, em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo intemperizados, mostram que a planta é capaz de sobreviver nestes ambientes, embora possa apresentar uma redução de até 53% em sua biomassa (Rivera-Cruz *et al.*, 2004a; 2004b; 2005)

1.3.2. *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé, mureru, jacinto da água)

A herbácea aquática livre flutuante, *E. crassipes* (Pontederiaceae) é estolonífera, perene, nativa da Amazônia (Pott & Pott, 2000) e uma das macrófitas aquáticas mais comuns nos ambientes aquáticos brasileiros, principalmente devido à eutrofização destes por esgotos domésticos, industriais e resíduos agrícolas (Esteves, 1982). *E. crassipes* tem uma alta capacidade de estocar nutrientes, apresentando uma média de 518 g de peso seco m⁻² de biomassa aérea e 470 g de peso seco m⁻² de biomassa submersa em represas no Estado de São Paulo (Esteves, 1982). As plantas são comumente utilizadas para forrageio de peixes, aves, capivaras e porcos e, em condições naturais, servem como alimento para o peixe-boi (Colares & Colares, 2002). Além disso, são habitats de peixes, alevinos, insetos e outros organismos aquáticos. Segundo Hoehne (1948), *E. crassipes* floresce quase o ano todo e na frutificação o eixo floral se inverte e libera as sementes na água, onde estas permanecem até a próxima seca. Entretanto, durante o período de cheia do rio a planta forma grandes bancos por meio da propagação vegetativa com a produção de estolões que desenvolvem novas touceiras, que mais tarde podem se soltar e flutuar livremente. A espécie pode duplicar de biomassa a cada 13 dias (Junk & Howard-Williams, 1984).

E. crassipes é considerada uma das macrófitas aquáticas mais estudadas em todo o mundo, porém, poucos estudos são desenvolvidos com esta espécie em seu ambiente natural,

e pouco se sabe sobre as respostas destas plantas relacionadas às alterações das condições ambientais (Esteves, 1982; Thomaz & Bini, 2003; Thomaz *et al.*, 2006).

1.4. Métodos de remoção e limpeza do petróleo

A variação de respostas das plantas a descontaminação de petróleo pode ser atribuída tanto à sensibilidade da espécie, quanto a forma de limpeza utilizada. Segundo Peterson *et al.* (2003), para as comunidades costeiras, as tentativas de limpeza do óleo podem ser mais prejudiciais que o próprio derramamento, pois seu impacto, devido aos métodos químicos e físicos empregados são prolongados, gerando uma cascata de impactos indiretos, especialmente na cadeia trófica, acarretando em perda de habitats. Segundo Couceiro *et al.* (2006) a retirada das plantas aquáticas durante a remoção do petróleo no Igarapé Cururu em Manaus (AM, Brasil) foi um dos fatores que pode explicar a redução de insetos aquáticos neste local.

A limpeza do óleo só é indicada em locais onde seu acúmulo superficial é grande, em áreas afetadas por vazamentos extensos ou crônicos, ou para prevenir que o óleo atinja outras áreas mais sensíveis, como as áreas alagáveis. Atualmente, as metodologias de limpeza são classificadas em mecânicas, queimadas em campo, químicas e biorremediação. Os métodos físicos, que necessitam de tráfego de máquinas e o constante pisoteio humano, são os mais prejudiciais à vegetação (Pezeshki *et al.*, 2000). As queimadas em campo vêm demonstrando grande potencial para aplicação em áreas alagáveis. Bryner *et al.* (2003) observaram que uma lâmina de 2 cm de água foi capaz de proteger a vegetação do estresse térmico e eliminar o óleo superficial. Este método, contudo, tem influências negativas pela produção de gases tóxicos aos animais (Newman *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2003) e gases de efeito estufa. Burridge & Shir (1995) estudaram o efeito de dispersores de óleo sobre *Phyllospora comosa*, a qual apresentou significativa redução da taxa de germinação, porém, o efeito do óleo sobre a mesma mostrou ser mais prejudicial que o do dispersor de óleo. A escolha do método adequado deve considerar o potencial dano que causará às áreas alagáveis durante a limpeza e os efeitos tóxicos do óleo ao ambiente, em curto e longo prazo (Pezeshki *et al.*, 2000), pois estas áreas são particularmente vulneráveis a danos mecânicos durante as operações de remoção (Pezeshki *et al.*, 2001).

As plantas, na maioria das vezes, são os primeiros organismos a serem atingidos por derramamento de óleo (Mallah *et al.*, 1996). Os efeitos da poluição nas plantas podem variar de acordo com o tipo e a quantidade de óleo envolvido, a idade da planta, a época do ano e as espécies de plantas atingidas (Baker, 1970). Algumas espécies são capazes de crescer sobre

ambientes contaminados, desenvolvendo mecanismos de desintoxicação por meio dos quais os efeitos do excesso das substâncias tóxicas podem ser minimizados (Larcher, 2000). A fitorremediação é o processo que utiliza plantas e a microbiota associada às raízes destas para remover, restaurar, conter ou tornar inofensivos os contaminantes ambientais, com o objetivo de recuperar áreas degradadas (Cunningham *et al.*, 1995; Adam & Duncam, 2002). Estudos atuais comprovam que solos contaminados por óleo degradam o poluente mais rápido com o auxílio das plantas (Muratova *et al.*, 2003). O uso de sistemas vegetativos para a remediação de ambientes aquáticos contaminados não é novo, porém, a utilização de plantas para remediar solo contaminado é recente e tem se tornado uma área de intenso estudo científico (Adam & Duncan, 2002).

O solo contaminado por óleo pode se tornar completamente estéril, sendo preciso introduzir sementes e mudas para sua revegetação e quando a contaminação é extremamente alta, a mortalidade das plântulas pode atrasar por décadas a reinstalação da vegetação (Adam & Duncam, 2002). Porém, plantas que têm capacidade de crescer em solo contaminado conseguem reduzir o poluente orgânico, principalmente pela criação de um ambiente favorável para a proliferação de microorganismos na rizosfera. Estes processos de degradação são influenciados não apenas pelos microorganismos da rizosfera, mas também pelas propriedades únicas das plantas hospedeiras (Adam & Duncam, 2002). Dessa forma, é relevante a identificação de espécies resistentes para utilização na recuperação de áreas contaminadas.

Além de financeiramente vantajosa em relação a outros métodos clássicos de recuperação ambiental, a fitorremediação é o método menos perturbador ao ambiente, pois não necessita desocupação do local, possui uma maior probabilidade de aceitação pública, evita a escavação e tráfego pesado, além de dispor de um potencial versátil para tratar uma diversa gama de materiais perigosos (Macek *et al.*, 2000).

No presente trabalho, as espécies nativas, *Echinochloa polystachya* e *Eichhornia crassipes* foram testadas com a finalidade de analisar a resistência destas plantas à exposição ao petróleo cru de Urucu e sua capacidade de crescer em ambientes contaminados por este óleo.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do petróleo cru proveniente de Urucu (Coari, AM – BR) sobre duas espécies de herbáceas aquáticas nativas da Amazônia, *Echinochloa polystachya* e *Eichhornia crassipes*. Para atingir esse objetivo foram feitas as seguintes perguntas: (1) o petróleo altera o tempo de sobrevivência das plantas? (2) quais seriam as respostas das plantas expostas a diferentes dosagens de petróleo? (3) seria possível a utilização dessas espécies para a bioindicação e/ou fitorremediação de ambiente aquático e terrestre contaminado com petróleo? (4) existe influência do período de coleta/plantio para o estabelecimento de *E. polystachya* em solo contaminado por petróleo?

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para que os objetivos fossem alcançados foram delineados quatro experimentos que serão apresentados em quatro artigos:

- I. Determinação da dosagem letal média (DL₅₀) para *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock e *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. expostas ao petróleo cru de Urucu (objetivo 1);
- II. Respostas da herbácea aquática amazônica *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms ao tempo de exposição e à dosagem do petróleo cru de Urucu. (objetivos 2 e 3);
- III. Respostas da herbácea aquática amazônica *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock ao tempo de exposição e à dosagem do petróleo cru de Urucu. (objetivo 2);
- IV. Estabelecimento de *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock em solo contaminado com petróleo cru de Urucu (objetivos 3 e 4).

As macrófitas aquáticas *Echinochloa polystachya* (Fig. 1A) e *Eichhornia crassipes* (Fig.1B) utilizadas nos experimentos, foram escolhidas devido a sua ampla distribuição na planície de inundação, por serem nativas da Amazônia e por serem fundamentais para o ecossistema, sobretudo para a ciclagem de nutrientes.

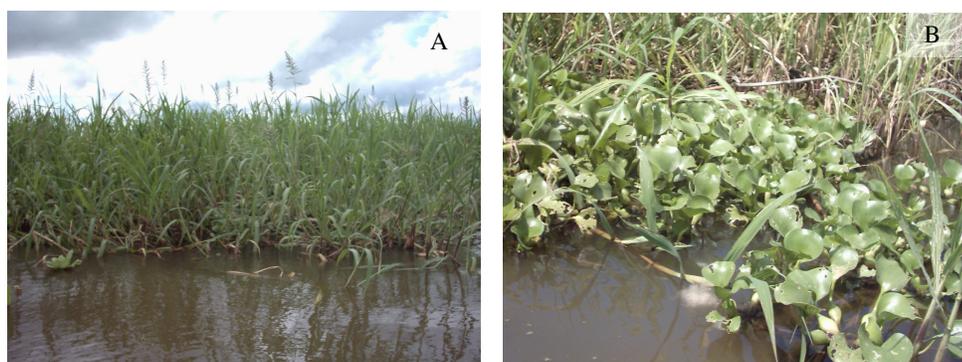


Figura 1. Bancos de macrófitas aquáticas na Ilha de Marchantaria. A) *Echinochloa polystachya*; B) *Eichhornia crassipes*.

As plantas foram coletadas manualmente com o auxílio de tesoura de poda e terçado, na Ilha da Marchantaria (03°15'S, 60°00'W), localizada no Rio Solimões, Amazônia Central, próxima a Manaus, Amazonas-Brasil (Fig. 2), durante o ano de 2006. Esta ilha é inundada

anualmente pelas águas do Rio Solimões. Para que fosse possível a realização das coletas foi necessário o transporte até a Ilha por meio de canoa de alumínio com motor de popa. Após a coleta, as plantas foram devidamente acondicionadas em bandejas plásticas com água do próprio rio para minimizar o estresse do transporte do campo para o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus, AM.

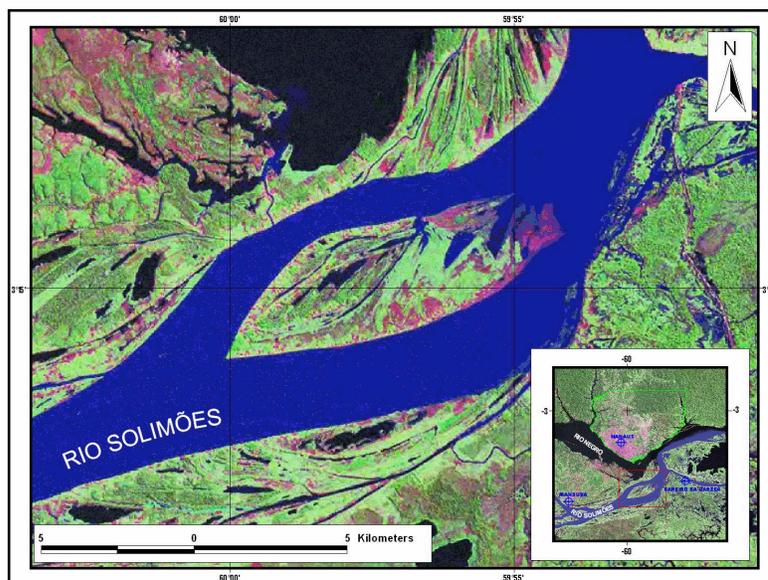


Figura 2. Imagem Landsat da área de coleta, Ilha de Marchantaria, 1999. No detalhe o posicionamento da Ilha em relação ao Município de Manaus

O Clima na Amazônia Central é quente e úmido e caracterizado por uma baixa periodicidade termal ao longo do ano. A média de temperatura é de 26,6°C. As temperaturas mais altas ocorrem entre agosto e novembro, com as médias variando entre 27,2 e 27,6°C. Entre janeiro e abril ocorrem as temperaturas mais baixas, com médias entre 25,9 e 26,1°C. A umidade relativa permanece alta durante todo o ano, com média de 75,6% em setembro e 86,7% em abril (Salati & Marques, 1984; Ribeiro & Adis, 1984). Durante os meses de seca a evapotranspiração pode exceder a precipitação. A precipitação é claramente periódica, com uma média anual de 2100mm. A estação mais chuvosa ocorre entre dezembro e abril e o período mais seco entre junho e outubro (Irion *et al.*, 1997).

O petróleo utilizado foi proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas e foi gentilmente cedido pela Petrobrás através do Projeto PIATAM (Potenciais Impactos e Riscos Ambientais na Indústria do Petróleo e Gás no Amazonas). As dosagens de petróleo foram escolhidas por meio da realização de um estudo prévio com dosagens agudas, até 300 mL de

petróleo $3,5L^{-1}$ de solo (Lopes et al., 2005). Os experimentos foram realizados na Casa de Vegetação do Projeto INPA/Max-Planck entre abril e novembro de 2006 (Fig. 3 A e B), por meio do plantio das plantas coletadas em frascos plásticos de 18,5 cm altura x 20 cm diâmetro com 2 litros de solo da várzea para *E. polystachya*, e 2 litros de água do poço artesiano do INPA, Manaus, Amazonas, para *E. crassipes*. As plantas foram irrigadas diariamente com água proveniente do poço do INPA.



Figura 3. Casa de Vegetação onde foram realizados os experimentos com: A) *Echinochloa polystachya*; B) *Eichhornia crassipes*.

Para que fosse obtida a biomassa (peso seco), após as coletas e tendo as partes separadas em folhas normais, folhas com comprometimento fitossanitário (menos de 30% de área verde) e raízes, as plantas foram secas em estufa de ventilação forçada (Memmert) a $65^{\circ}C$ até peso constante e em seguida pesadas em balança analítica modelo Belmarq 210 A, com precisão de 0,0001g.

Os resultados serão apresentados em forma de artigo de revista científica. Os Artigos I, II, III e IV que se seguem, estão de acordo com as normas da revista *Environmental Pollution* ISSN: 0269-7491 (Anexo A). A revista está classificada na categoria de Ciências Ambientais, com fator de impacto 2,451 (JCR-2005).

Detalhes específicos da metodologia utilizada em cada experimento foram descritos em cada um dos artigos.

ARTIGO I

DETERMINAÇÃO DA DOSAGEM LETAL MÉDIA (DL₅₀) PARA *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock e *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. EXPOSTAS AO PETRÓLEO CRU DE URUCU



Determinação da dosagem letal média (DL₅₀) para *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock e *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. expostas ao petróleo cru de Urucu

Aline Lopes^a

^a Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Departamento de Ecologia. Manaus, Brasil
alopes@inpa.gov.br

A mortalidade de Eichhornia crassipes e Echinochloa polystachya aumenta com a dosagem do petróleo e com o tempo de exposição.

Resumo

As dosagens letais médias (DL₅₀) foram determinadas para as macrófitas aquáticas *Eichhornia crassipes* e *Echinochloa polystachya* em um experimento realizado em casa de vegetação no qual foram utilizadas 10 dosagens de petróleo cru, oriundo de Urucu, distribuídas entre 0 e 300 mL 2L⁻¹ de substrato. Para *E. crassipes* a DL₅₀ em 126 dias de exposição ao petróleo foi calculada em 8,57 mL de petróleo 2L⁻¹ de água, enquanto que para *E. polystachya*, com uma quantidade muito próxima a esta (8,91mL de petróleo 2L⁻¹ de solo) foram necessários somente 4 dias para atingir o mesmo nível de mortalidade, mostrando que esta planta é extremamente sensível ao petróleo. O petróleo provocou uma redução significativa do número de folhas de ambas as espécies. Além disso, para *E. crassipes*, houve uma inibição do crescimento das raízes e das folhas, bem como modificações anatômicas foliares nas dosagens mais elevadas de petróleo.

Palavras-chave: áreas alagáveis, macrófitas aquáticas, petróleo, fitorremediação, dose letal média.

1. Introdução

O derramamento de petróleo e as mudanças que este ocasiona no ambiente são fatores que afetam a composição da comunidade de plantas aquáticas (Pezeshki et al., 2000), pois a susceptibilidade a esse poluente varia com a espécie considerada. Burk (1977), em um estudo de 4 anos, verificou que em um derramamento de petróleo em ambiente de água doce pelo petroleiro Santa Barbara, nos USA, 18 espécies de plantas foram eliminadas, 14 espécies

tiveram sua abundância relativa diminuída, e 23 espécies não tiveram alteração significativa ou até mesmo aumentaram sua abundância relativa.

A ocorrência de derramamentos de petróleo no solo pode resultar, entre outras respostas, em um aumento substancial de matéria orgânica (Alkinluyi & Odeyemi, 1984, 1987), em alterações no pH do solo e na introdução de metais pesados como cobre, níquel e mercúrio, os quais prejudicam a biota do solo devido a sua toxicidade (Ekundayo & Obuekwe, 2000). Quando ocorre um derramamento de petróleo no ambiente terrestre ele afeta diretamente o ecossistema através da contaminação do solo. Já em ambientes aquáticos, o óleo flutuante na superfície da água é disperso pela ação do vento e das ondas para a região litorânea, afetando também o ambiente terrestre e a vegetação (Pezeshki, et al., 2000). No caso da região amazônica essa dispersão poderia ser maximizada pela oscilação do nível da água, devido ao pulso de inundação (Junk et al., 1989).

O transporte de petróleo cru de Urucu (Coari-AM) até a Refinaria em Manaus, AM, se dá pelo Rio Solimões, onde ocorrem ambientes com composição florística variada, dentre estes, a várzea baixa (Wittmann et al., 2002) que possui uma grande densidade de herbáceas aquáticas, algumas das quais chegam a produzir cerca de $100 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de matéria seca (Piedade et al., 1991). A maior parte desta biomassa não é aproveitada por herbívoros e se decompõe causando alterações químicas no ambiente. A grande densidade destas plantas faz com que o ciclo biogeoquímico das áreas alagáveis seja dependente da quantidade e da qualidade da matéria orgânica produzida por elas (Furch & Junk, 1997).

As herbáceas aquáticas amazônicas são muito importantes para o ecossistema aquático, pois suas partes submersas formam um ambiente complexo, composto de caules e raízes que são colonizados por algas e invertebrados (Junk, 1973), e no qual estão associadas muitas espécies de peixes (Junk *et al.*, 1984; Sánchez-Botero & Araujo-Lima, 2001; Claro-Jr et al., 2004). Entretanto, são praticamente inexistentes estudos acerca da toxicidade do petróleo sobre essas plantas.

Diversas pesquisas têm utilizado plantas aquáticas para detectar possíveis contaminações (Watmough & Hutchinson, 1996; Martins et al., 1999) e encontrar meios que possibilitem a descontaminação do ambiente (Dushenkov et al., 1997; Gisbert et al., 2003; Kirk et al., 2005). Dentre as plantas aquáticas que têm sido estudadas e sugeridas como alternativas para solução destes problemas, destaca-se *Eichhornia crassipes* (aguapé), que apresenta grande capacidade de absorver e tolerar elevadas quantidades de íons de metais pesados, sendo uma das mais promissoras para esse propósito (Harley, 1990).

As gramíneas são comumente utilizadas para a fitorremediação devido ao seu crescimento rápido e pela sua extensiva ramificação radicular que proporciona uma ampla superfície para a microbiota, facilitando a interação planta-microbiota (Hutchinson et al., 2001; Glick, 2003). Entretanto, essas vantagens podem ser neutralizadas pelo efeito tóxico do contaminante, alterando não somente o acúmulo de biomassa como também a morfologia das plantas (Merlk et al., 2005). Assim, é indispensável que sejam desenvolvidos estudos que prevejam os impactos do petróleo sobre a várzea amazônica, principalmente sobre plantas de grande importância ecológica como *Eichhornia crassipes* e *Echinochloa polystachya*.

Neste estudo foram determinadas às dosagens letais médias para as espécies *E. crassipes* e *E. polystachya* expostas ao petróleo cru de Urucu. Adicionalmente, foram avaliadas as mudanças no incremento de folhas, no comprimento das folhas e das raízes das plantas. Além disso, foi realizada a análise anatômica das folhas de *E. crassipes* com modificações anatômicas visíveis e associáveis à exposição ao petróleo.

2. Materiais e Métodos

As macrófitas aquáticas *Eichhornia crassipes* (flutuante) e *Echinochloa polystachya* (emersa) foram coletadas manualmente na Ilha de Marchantaria (03°15'S, 060°00'W), na Amazônia Central, Amazonas-Brasil. O solo utilizado no plantio de *E. polystachya* foi coletado no mesmo local. O experimento foi realizado na Casa de Vegetação do Projeto INPA/Max-Planck, Manaus, Amazonas, Brasil. A água utilizada nos experimentos foi proveniente do poço artesiano do mesmo local.

As herbáceas aquáticas utilizadas foram escolhidas devido a sua ampla distribuição na planície de inundação, por serem nativas da Amazônia e por serem fundamentais para o ecossistema de várzea.

Foi utilizado no experimento petróleo cru, proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas, Brasil. Este petróleo é considerado leve e de alta qualidade (ver Tabela 1 para composição).

Tabela 1

Composição do óleo cru de Urucu (Petrobrás, 1997 apud Brauner et al., 1999)

Número de octanos motores (destilação entre 16-180°C)	38,0
Tipos de hidrocarbonetos (% total; destilação entre 16 - 180°C)	
Parafina	64,8
Nafta	20,2
Aromático	15,0
Tipos de hidrocarbonetos (% total; destilação entre 144 - 244°C)	
Saturados	85,7
Aromáticos	13,2
Oleaginosos	1,1

2.1. Desenho Experimental

Indivíduos jovens de *E. crassipes*, em um total de 130 plantas, com três a cinco folhas de aproximadamente 4 x 7 cm, foram lavados em água corrente, no laboratório, para a retirada do sedimento das raízes e colocados em frascos com 2 litros de água, onde permaneceram por 30 dias para crescimento e aclimação. Sempre que necessário foi completado o nível da água para repor as perdas por evapotranspiração. A irrigação das plantas com água de poço artesiano foi diária, durante todo o período experimental.

Para *E. polystachya* foram coletadas plantas adultas, das quais foi cortado um colmo de 15 cm contendo um nó. Estes propágulos foram plantados em frascos com 2 litros de solo da várzea (70,5% de argila, 17,92% de silte, 8,97% de área grossa, 2,61% de areia fina), onde permaneceram por 30 dias para crescimento. Para o experimento foram selecionadas 130 plantas jovens com, no mínimo, 30 cm de altura.

Após o período de aclimação e crescimento foi colocado petróleo nos frascos evitando o contato direto com as folhas. O petróleo foi adicionado na superfície do solo e da água, sem revolver os substratos. As herbáceas foram distribuídas aleatoriamente, por sorteio, em 9 tratamentos (Tabela 2) mais um controle (sem petróleo).

A cada 7 dias foram contadas as folhas normais e com comprometimento fitossanitário (folhas com menos de 30% da área verde) e medido o comprimento e largura das folhas. No início e no final do experimento foi medido o comprimento das raízes de *E. crassipes*.

As análises anatômicas das folhas de *E. crassipes* foram realizadas após 90 dias de exposição ao petróleo, por meio da coleta de folhas que apresentavam alterações visíveis e folhas do tratamento controle, armazenando-as em etanol 70%. Foram realizadas secções transversais no bulbo e na região mediana das folhas para montagem de lâminas

semipermanentes. Os cortes histológicos foram diafanizados com hipoclorito de sódio, lavados em água destilada, corados com Safrablau (Azul de Astra 70% e Safranina 30%), montados sob lâmina e lamínula com uma gota de glicerina e lutados com esmalte incolor. As observações das lâminas foram feitas utilizando microscópio óptico da marca Leica, nas objetivas de 5x a 40x. Foram feitas fotomicrografias com microscópio óptico Zeiss MC 63 nas objetivas de 2,5x, 20x e 40x.

Tabela 2

Dosagens de petróleo aplicadas baseadas no volume por unidade amostral, volume por unidade de área superficial, massa por peso da água e peso seco do solo seco e a porcentagem de óleo em relação ao volume de substrato.

mL óleo 2 L ⁻¹ solo	L óleo m ⁻² superficial	mg óleo g ⁻¹ água	mg óleo g ⁻¹ solo seco	g óleo mL ⁻¹ substrato (%)
0	0	0	0	0
1,5	0,07	0,56	0,55	0,0006
3	0,15	1,13	1,09	0,0011
6	0,31	2,35	2,28	0,0023
12,5	0,66	4,7	4,56	0,0047
25	1,32	9,4	9,12	0,0094
50	2,64	18,8	18,24	0,0188
100	5,29	37,6	36,47	0,0376
200	10,59	75,2	72,94	0,0752
300	15,89	112,8	109,45	0,1128

Para a obtenção da curva de DL₅₀ as plantas permaneceram nos tratamentos, sendo observada a mortalidade, por 132 dias para *E. crassipes* e 49 dias para *E. polystachya*. As demais medidas foram feitas por 35 dias para *E. polystachya* e 90 dias para *E. crassipes*. Essa diferença no tempo de observação se deve a rápida mortalidade de *E. polystachya* em comparação com *E. crassipes*. Apesar da dosagem letal média ser um método normalmente utilizado para avaliar a mortalidade em populações animais, foi utilizado neste estudo por permitir a modelagem da mortalidade, integrando a dosagem de petróleo e o tempo de exposição e permitindo, com isso, uma melhor avaliação dos impactos ao longo do tempo. Adicionalmente, este método permite determinar a dosagem crítica do petróleo para as populações de plantas.

As unidades amostrais consistiram em 260 frascos de 20cm de diâmetro e 18,5cm de altura distribuídos em um experimento fatorial inteiramente casualizado 2x10 (espécies x dosagens de petróleo) com 13 réplicas para cada tratamento.

2.2. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas: Systat 10.2 (Wilkinson, 1998); Microsoft Office Excel 11.0 (Microsoft Corporation, 2003) e Trimmed Spearman-Karber Method (Hamilton et al., 1977).

Para avaliar o efeito do tempo e da dosagem de petróleo sobre o comprimento das folhas e o incremento no número de folhas das plantas foi realizada Análise de Variância bifatorial com medidas repetidas (ANOVA_{mr}), respeitando-se os pressupostos de homocedasticidade e esfericidade. Para análise do efeito do petróleo sobre o comprimento das folhas foram utilizados somente dados até o 35º dia de exposição das plantas ao petróleo, para minimizar o efeito da redução do número de amostras devido à mortalidade nos tratamentos de maior concentração. Além disso, para *E. polystachya* foram utilizados somente os dados das dosagens até 6mL, devido à alta mortalidade das plantas desde o início do experimento. Foi utilizado Teste T pareado para cada grupo de tratamento, para avaliar o efeito do petróleo sobre o comprimento da raiz de *E. crassipes*. O cálculo da DL₅₀, dosagem capaz de matar 50% da população testada, foi obtido pelo método estatístico de Spearman-Karber, com intervalo de confiança de 95% (Hamilton et al., 1977).

3. Resultados

Setenta dias após a aplicação do petróleo foi observada a morte de todas as plantas de *E. crassipes* expostas às concentrações de 200 e 300mL de petróleo. Já *E. polystachya* se mostrou ainda mais sensível ao petróleo, pois, após quatro dias de exposição morreram todas as plantas das dosagens de 100, 200 e 300mL e após 35 dias já haviam morrido todas as plantas expostas a dosagens acima de 12,5 mL de petróleo (Fig. 1). Foram observadas em *E. crassipes* várias modificações nas plantas expostas ao petróleo, entre elas a diminuição do tamanho geral da planta, encurtamento do bulbo, diminuição da área foliar e espessura da folhas.



Fig. 1. a) *Echinochloa polystachya* após 2 dias de tratamento nas dosagens de 0, 1,5, 6 e 25 mL de petróleo 2 L^{-1} solo; b) *Eichhornia crassipes* 48 dias após a aplicação de petróleo nas dosagens, respectivamente de 0, 100, 200 e 300 mL 2 L^{-1} de água.

A análise anatômica das folhas de *E. crassipes* mostrou um aumento no tamanho das lacunas de aerênquima nos tratamentos com 50 mL e 100 mL de petróleo e em dosagens maiores ocorreu o desaparecimento desse tecido (Fig. 3 a-d). Houve ainda um deslocamento das lacunas do aerênquima nos tratamentos de 50 mL e 100 mL (Fig. 2b-c), as quais estavam organizadas na região central da folha no tratamento controle (Fig. 2a). O parênquima paliçádico foi gradualmente reduzido com o aumento da dosagem de petróleo, não podendo mais ser visualizado no tratamento de 300mL (Fig. 2d). Apesar de não ter sido feita a contagem de estômatos pôde-se perceber a diminuição destes com o aumento da dosagem de petróleo. Notamos ainda que no tratamento controle (Fig. 2a) os feixes vasculares se posicionavam na linha central da lâmina foliar e sofreram uma drástica desorganização devido à exposição ao petróleo (Fig. 2b-d).

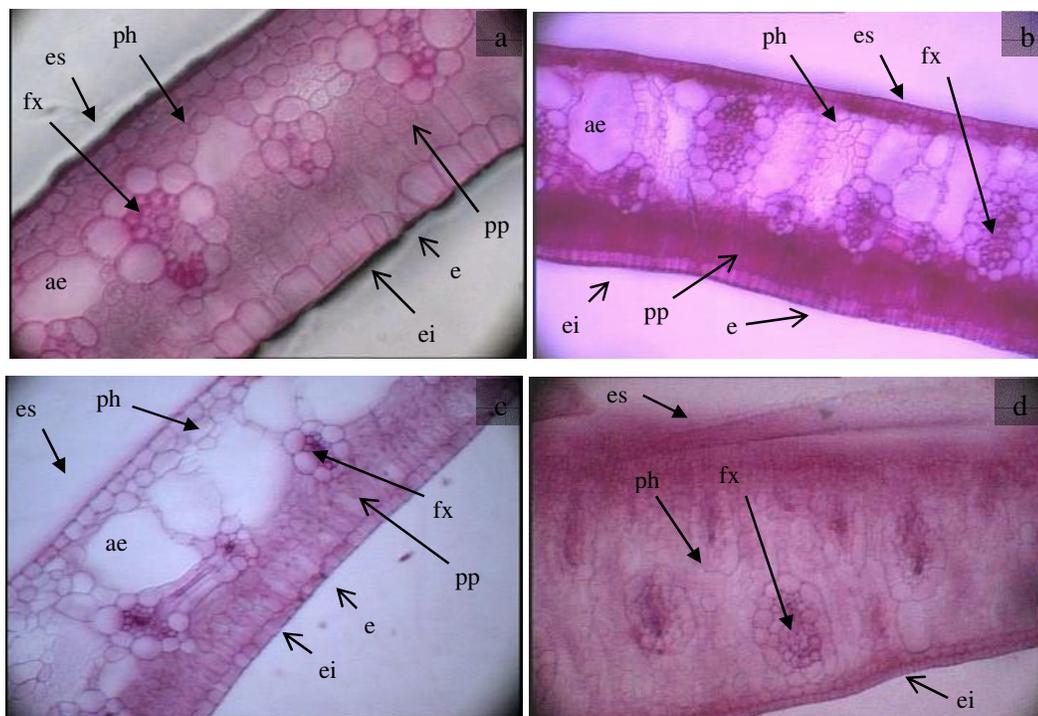


Fig. 2. Secções transversais das folhas de *Eichhornia crassipes* após 90 de exposição ao petróleo cru de Urucu, nas dosagens de: a) 0 mL; b) 50 mL; c) 100 mL; d) 300 mL 2 L⁻² de água. ei (epiderme inferior); es (epiderme superior); pp (parênquima paliçádico); ph (parênquima homogêneo); ae (lacuna do aerênquima); e (estômato) fx (feixes vasculares). Aumento de 400x para o controle e 200x para os demais tratamentos.

A principal mudança observada no bulbo de *E. crassipes*, além das alterações morfológicas como a drástica redução do tamanho e espessura do bulbo, foi a diminuição do tamanho celular com o aumento da dosagem de petróleo (Fig. 3a-d). Além disso, houve o desaparecimento do tecido aerenquimatoso nos tratamentos com maiores dosagens de petróleo (Fig. 3b-d).

A ANOVAmr mostrou que o incremento de folhas de *E. crassipes* ao longo de 35 dias foi afetado pela dosagem de petróleo ($F_{(9, 120)} = 9,127, p < 0,0001$), pelo tempo de exposição ($F_{(5, 600)} = 18,848, p < 0,0001$) e pela interação entre a dosagem e tempo de exposição ($F_{(45, 600)} = 6,557, p < 0,0001$). Neste mesmo período de tempo *E. polystachya* também foi afetada por todos esses fatores, porém, como mostra a figura 4, esses efeitos foram mais acentuados, tendo a dosagem apresentado $F_{(9, 120)} = 23,135 (p < 0,0001)$, o tempo de exposição $F_{(5, 600)} = 625,647 (p < 0,0001)$ e a interação entre a dosagem e o tempo de exposição $F_{(45, 600)} = 12,222 (p < 0,0001)$.

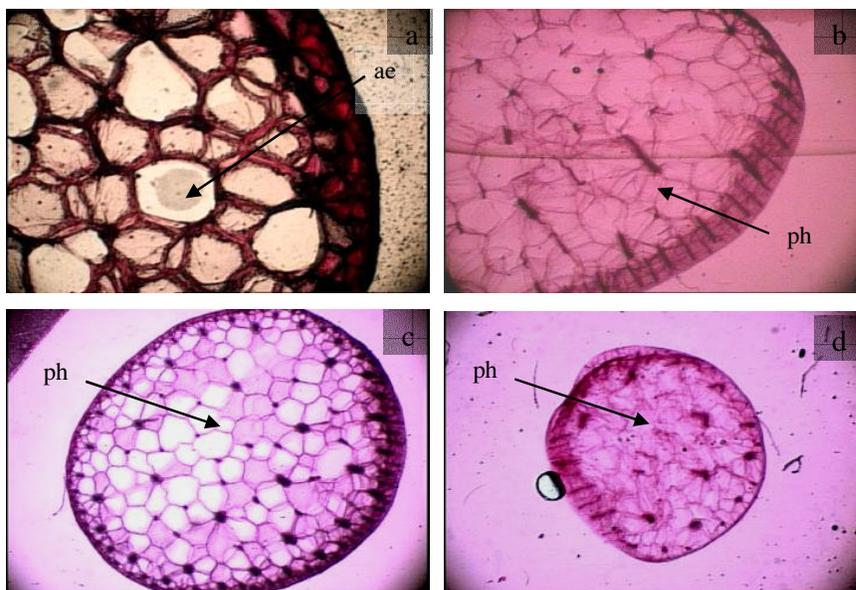
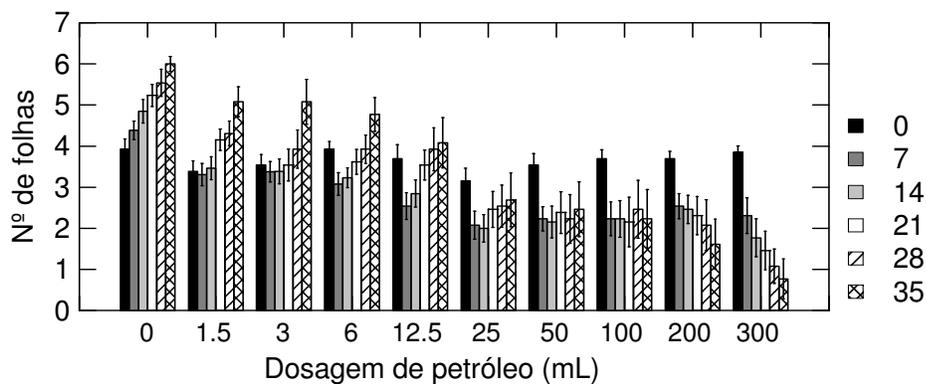


Fig. 3. Secções transversais do bulbo de *Eichhornia crassipes* após 90 dias de exposição ao petróleo cru nas dosagens de: a) 0 mL; b) 50 mL; c) 100 mL; d) 300 mL 2 L^{-2} de água. ae (lacuna do aerênquima); ph (parênquima homogêneo). Aumento de 25x.

a)



b)

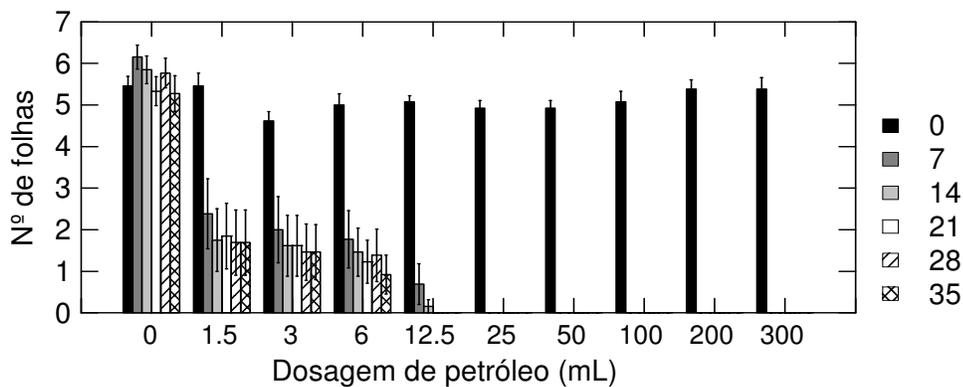
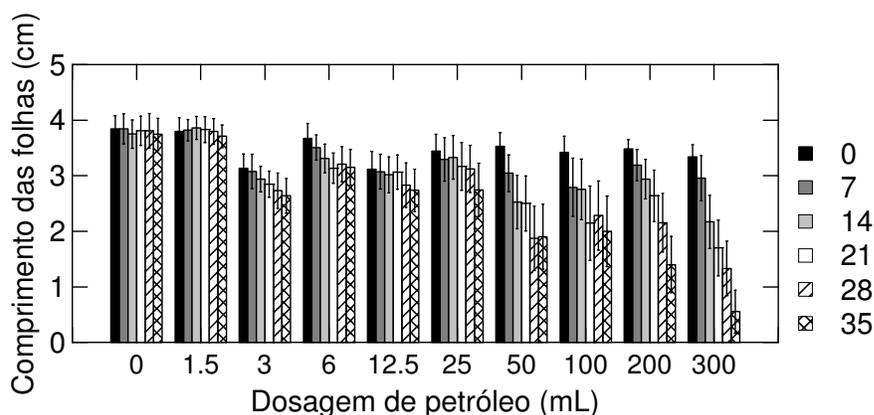


Fig. 4. Efeito da dosagem do petróleo e do tempo de exposição (dias) sobre o número de folhas de: a) *Eichhornia crassipes*; b) *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão ($n=13$).

Como o comprimento e a largura das folhas de *E. crassipes* mostraram-se fortemente correlacionados ($r = 0,89$), só serão apresentados os resultados para o comprimento. Houve uma redução do comprimento das folhas de *E. crassipes* devido à dosagem do petróleo ($F_{(9, 119)} = 2,842$, $p = 0,005$) e ao tempo de exposição ($F_{(5, 595)} = 48,216$, $p < 0,0001$), havendo ainda uma interação significativa entre estes fatores ($F_{(45, 595)} = 4,103$, $p < 0,0001$). Na figura 5a podemos notar que o padrão de estabilização do crescimento das folhas é muito semelhante nos tratamentos de 0 e 1,5 mL, enquanto que há uma acentuada redução do crescimento nas dosagem acima de 25 mL. Não houve efeito significativo da dosagem do petróleo sobre o comprimento das folhas de *E. polystachya* ($F_{(3, 21)} = 1,48$, $p = 0,249$), embora o tempo de exposição tenha apresentado um efeito significativo ($F_{(5, 105)} = 26,469$, $p < 0,0001$). Como mostra a figura 5b, não houve interação significativa entre a dosagem de petróleo e o tempo de exposição ($F_{(45, 105)} = 1,391$, $p = 0,165$).

a)



b)

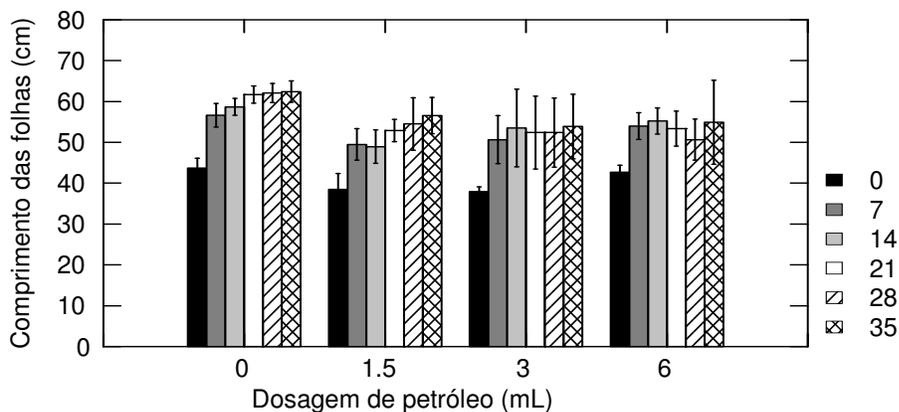


Fig. 5. Efeito da dosagem do petróleo e do tempo de exposição (dias) sobre o comprimento de folhas: a) *Eichhornia crassipes*; b) *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão ($n=13$).

O petróleo de Urucu provocou uma inibição do crescimento das raízes de *E. crassipes*, exceto na dosagem de 12,5 mL onde houve estimulação do crescimento, assim como no controle (fig. 6). Nas demais dosagens não houve diferença significativa entre o comprimento inicial e o comprimento final da raiz.

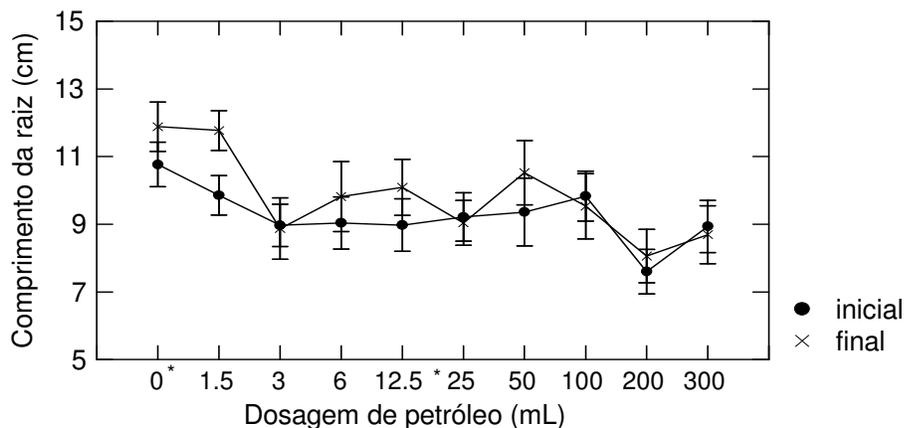
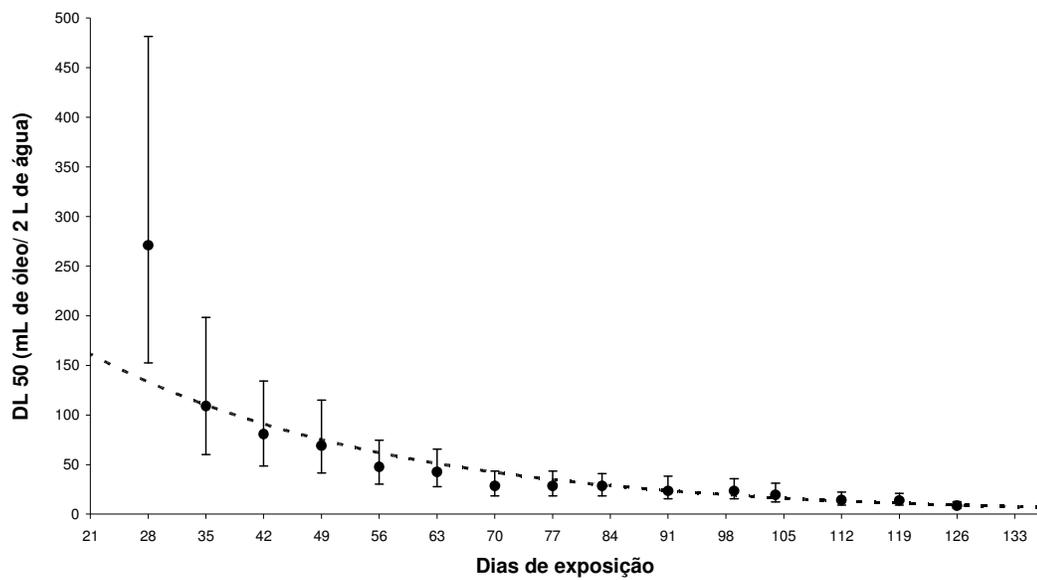


Fig. 6. Efeito da dosagem do petróleo sobre o comprimento das raízes ao término do experimento. Valores médios com erro padrão ($n = 13$). * indica os tratamentos onde houve diferença significativa entre o valor inicial e final do comprimento da raiz ($\alpha = 0,05$).

A figura 7a mostra a curva ajustada para os valores de DL_{50} para *E. crassipes* ao longo do tempo de observação, sendo a equação para a curva exponencial de melhor ajuste: $y = 286,71e^{-0,0274x}$ ($R^2 = 0,91$). Apesar da espécie *E. polystachya* ter sido acompanhada por 49 dias, a DL_{50} só pode ser calculada para os quatro primeiros dias (Fig. 7b) pelo fato de após este período a planta ter atingido 100% de mortalidade em quase todos os tratamentos. Para essa espécie a curva que melhor se ajustou aos dados também foi a exponencial $y = 570,45e^{-1,0659x}$ ($R^2 = 0,97$).

a)



b)

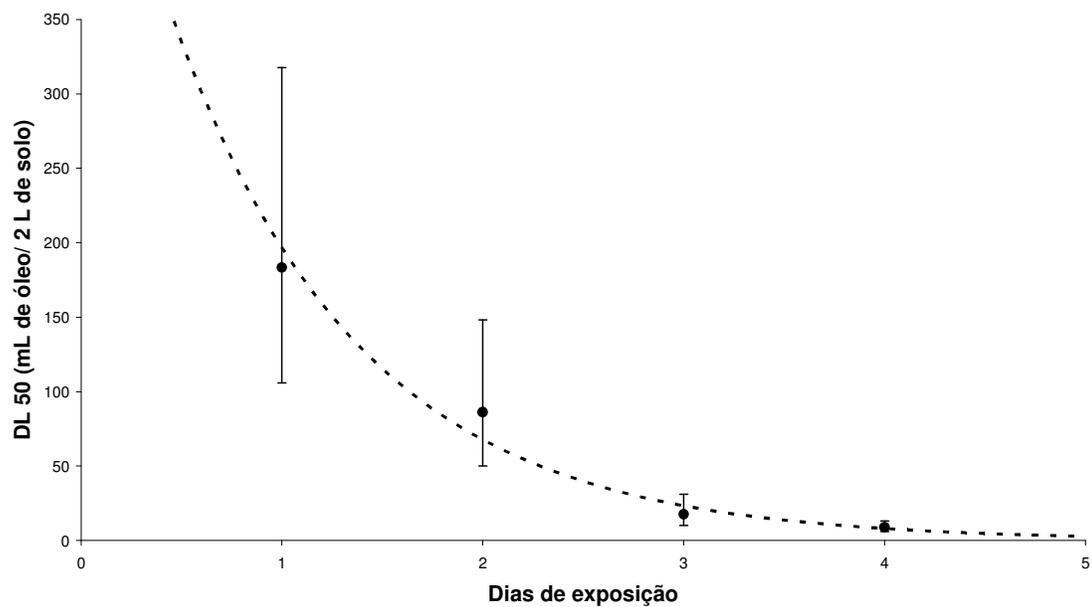


Fig. 7. Toxicidade do petróleo cru de Urucu expressa em valores de DL₅₀, para: a) *E. crassipes*; b) *E. polystachya* ao longo do tempo de exposição. Valores com intervalo de confiança de 95%, (--- curva de tendência exponencial).

4. Discussão

O efeito dos hidrocarbonetos derivados do petróleo sobre a mortalidade das plantas vindo sendo relatado por vários autores (Mendelssohn & McKee, 1988; Pezeshki et al., 2001; Lin et al., 2002), como uma medida eficiente do impacto do petróleo sobre o ecossistema atingido. A magnitude deste impacto para o ambiente pode ser avaliada por meio de alterações no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Devido à alta mortalidade de *E. polystachya* não foi possível avaliar o efeito do petróleo sobre o crescimento desta espécie, já que as análises foram realizadas somente com dosagens até 6mL de petróleo por unidade amostral, sugerindo que dosagens superiores a esta sejam limitantes para esta espécie. Para *E. crassipes* o petróleo causou uma redução do tamanho das folhas e, embora algumas tenham sobrevivido por mais tempo, estas apresentaram modificações anatômicas e morfológicas, como a redução do número de estômatos, distribuição irregular das lacunas do aerênquima ou até mesmo a sua ausência. A redução da espessura e das lacunas do aerênquima ocorreu no bulbo das plantas expostas a dosagens acima de 12,5 mL por unidade amostral. O aerênquima é uma adaptação das plantas aquáticas para a flutuação e permite que as partes fotossintetizantes fiquem acima da coluna de água (Junk & Piedade, 1997). A perda desta adaptação, tanto na lâmina foliar quanto no bulbo, pode causar o afundamento da planta, aumentando ainda mais a sua contaminação e resultando na sua morte.

Os óleos leves, como o de Urucu, atuam em nível celular, alterando a permeabilidade da membrana ou interrompendo vários processos do metabolismo da planta, deste modo, seus efeitos parecem ser imediatamente tóxicos às plantas (Pezeshki & DeLaune, 1993). Neste estudo foram encontradas modificações anatômicas que sugerem uma drástica modificação do metabolismo das plantas. A redução do tamanho das folhas e a diminuição e perda do parênquima paliçádico em *E. crassipes*, resultantes da exposição ao petróleo, indicam o alto grau de estresse causado pelo poluente e podem ser considerados fatores muito importantes para a conseqüente morte das plantas.

O parênquima paliçádico fica posicionado geralmente na superfície adaxial das folhas, consiste de células alongadas, ricas em cloroplastos, dispostas perpendicularmente à superfície do limbo foliar, apresentando espaços intercelulares (Souza, 2003). Este tecido é o principal responsável pela fotossíntese dos traqueófitos. De acordo com Justo et al. (2005) é o tecido que apresenta maior plasticidade em resposta aos fatores ambientais para diversas

espécies de plantas. A diminuição da espessura e até mesmo a perda deste tecido em decorrência da exposição ao petróleo indica que ainda que a planta produza novas folhas elas terão suas funções comprometidas, pois não realizarão fotossíntese.

Lin et al. (2002) encontraram um efeito inibitório do óleo N° 2 em dosagem acima de 114 mg g^{-1} de solo (200 mL por unidade amostral) sobre o comprimento das raízes de *Spartina alterniflora*. O mesmo ocorreu no presente estudo com *E. crassipes* em dosagens de petróleo muito inferiores a esta, 0,53 a $112,8 \text{ mg g}^{-1}$ de água. A diminuição do comprimento das raízes poderia reduzir a absorção de nutrientes, aumentando o estresse das plantas e prejudicando o seu desenvolvimento.

Os resultados indicam que o petróleo cru causa efeitos mais severos à *Echinochloa polystachya* que a *Eichhornia crassipes*. Assim, após 126 dias de exposição, a dose letal média calculada para *E. crassipes* foi 8,57 mL de petróleo em 2 L de água, e para *E. polystachya* foram necessários somente 4 dias de exposição para atingir índice semelhante, 8,91 mL de petróleo em 2 L de solo. Uma das possíveis explicações para esse fato, além da sensibilidade da espécie, é que na água o óleo forma uma camada flutuante não solúvel (Val & Almeida Val, 1999) que não dissolve na coluna d'água tendo pouco contato com as raízes, enquanto que no solo, além da parte solúvel em água, a parte insolúvel do petróleo penetra no solo recobrando as raízes e ficando disponível para ser absorvido pela planta. As implicações desta diferença na sensibilidade das espécies, no caso de um derramamento de petróleo na várzea, é que o petróleo causaria danos imediatos a *E. polystachya*, enquanto que para *E. crassipes* os danos seriam evidenciáveis apenas com uma exposição mais prolongada.

Experimentos realizados com a ingestão oral do petróleo cru de Urucu por *Hoplosternum littorale* (tamoatá), que possui respiração aérea facultativa, mostram que uma única ingestão de 3 mL kg^{-1} provoca um efluxo de Na^+ , resultando em uma redução de 7% deste no plasma em 72 horas após a ingestão, provocando também efluxo de K^+ e sua redução no plasma em 24 horas após a ingestão. Porém, nenhuma morte foi observada durante o tempo de exposição, 72 horas (Brauner et al., 1999). No presente estudo, neste mesmo período de tempo, houve a morte de 80% dos indivíduos de *E. polystachya* submetidos a dosagens entre 1,5mL e 300mL de petróleo. Assim, mesmo que o petróleo não seja imediatamente letal para os peixes, provocaria perda de hábitat e acúmulo de matéria orgânica morta no ambiente, cuja decomposição poderia reduzir ainda mais a disponibilidade de oxigênio, que já é baixa na várzea. Além disso, essa matéria orgânica morta estaria contaminada por metais pesados como cobre, níquel, vanádio e mercúrio que são comumente

encontrados no petróleo cru (Osuji & Adesiyi, 2005) e quando houvesse a decomposição, estes elementos tóxicos seriam incorporados ao ambiente, ou poderiam entrar na cadeia trófica pela ingestão de invertebrados que se alimentam das macrófitas aquáticas e dos peixes que deles se alimentam.

Considerando o potencial uso deste estudo para avaliação do impacto do petróleo sobre a várzea, quais seriam as implicações da mortalidade destas macrófitas aquáticas? Além dos peixes como o *Arapaima gigas* (pirarucu), que possui respiração aérea obrigatória, e com isso podem se contaminar com a fração flutuante do óleo, alguns peixes da Amazônia se alimentam de invertebrados terrestres que ficam sobre as macrófitas aquáticas durante o período de inundação da várzea, como o *Parauchenipterus galeatus* (cangati), o *Mylossoma duriventre* (pacú-manteiga) e o *Triportheus elongatus* (sardinha) (Claro-Jr et al., 2004) e a morte destas, ou mesmo a contaminação das folhas pelo petróleo, causaria o aumento do contato corporal do peixe com o óleo. Outros animais, como o peixe-boi (*Trichechus inunguis*), utilizam *E. polystachya* (13,8%) e *E. crassipes* (11,2%) como um dos principais itens de sua alimentação (Colares & Colares, 2002) e a morte dessas plantas poderia provocar uma redução drástica na oferta de alimento para este mamífero. Além disto, um dos efeitos preocupantes da morte destas plantas, principalmente de *E. polystachya*, seria a incorporação de uma enorme quantidade de biomassa morta ao sistema, aliada à quantidade de carbono que deixaria de ser fixada por estas plantas, calculada por Piedade et al. (1991) em 3,99 Kg de carbono m⁻². Assim, um derramamento de petróleo nas várzeas, além de causar danos à flora, indireta ou diretamente causaria danos também à fauna desses ambientes. Adicionalmente, impactos de grande magnitude poderiam ser desencadeados por mudanças nos balanços de carbono, com conseqüências eventualmente alarmantes, dada à reconhecida importância das áreas alagáveis nos balanços globais de carbono (Richey et al., 2002).

5. Conclusão

A dosagem e o tempo de exposição são dois fatores importantes na determinação do efeito do petróleo sobre *E. polystachya* e *E. crassipes*. A determinação da dose letal média (DL₅₀) mostrou ser um método eficiente para avaliar a influência destes fatores sobre a vegetação dos ecossistemas expostos ao risco de contaminação por esse poluente. Em baixas dosagens *E. crassipes* sobreviveu por um longo período de tempo, entretanto, para *E.*

polystachya, foram necessários apenas poucos dias para que houvesse uma massiva mortalidade.

Apesar de *E. crassipes* ter sobrevivido durante um longo período de tempo em ambiente contaminado, as plantas foram extremamente afetadas pelo petróleo, fato que pôde ser observado pelas modificações anatômicas e morfológicas das folhas.

O presente estudo mostrou ainda que, o petróleo proveniente de Urucu além de causar uma alta mortalidade de *E. crassipes* e *E. polystachya*, causa uma inibição do crescimento destas espécies. Através deste estudo poderão ser delineados experimentos que possam esclarecer as modificações no metabolismo das plantas que geram essa inibição de crescimento, entre elas, medidas de taxa de fotossíntese, quantificação de nutrientes e metais pesados na biomassa viva e no substrato. Além disso, esses resultados poderão auxiliar na determinação do impacto do petróleo nas áreas alagáveis.

Agradecimentos

Os recursos necessários para este estudo foram providos pelo Projeto INPA/Max-Planck, PPI 1090-5, e o petróleo cedido pela Petrobrás através do Projeto PIATAM. Agradeço ao CNPq pela Bolsa de Mestrado de Aline Lopes. À Joana D'arc de Paula, Daniel Maurenza e Rafael Duarte pela correção do manuscrito. Meus agradecimentos à equipe do Projeto INPA/Max-Planck e do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução (LEEM), principalmente a Dra. Vera Almeida Val pela valorosa contribuição nas discussões desde o planejamento do projeto, e pela infraestrutura cedida. Aos técnicos Valdenei, Lucia e Celso agradeço pelo auxílio na coleta dos dados, e aos barqueiros Mário e Luiz pelo auxílio em campo.

Referências

- Akinluyi, T. O., Odeyemi, O., 1984. Human waste disposal and fecal pollution of the River Nigeria delta waters. *Water International* 9, 37–41.
- Akinluyi, T. O., Odeyemi, O., 1987. Decreasing fish productivity in the Niger delta of Nigeria. A microbiological perspective. *Nigerian Journal of Applied Science* 5, 97–105.
- Brauner, C. J., Ballantyne, M. M., Val A. L., 1999. Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate level and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 123, 127-134

- Burk, C.J., 1977. A four year analysis of vegetation following an oil spill in a freshwater marsh. *The Journal of Applied Ecology* 14, 515-522.
- Claro-Jr, L., Ferreira, E., Zuanon, J., Araújo-Lima, C., 2004. O efeito da floresta alagada na alimentação de três espécies de peixes onívoros em lagos de várzea da Amazônia Central, Brasil. *Acta Amazônica* 34(1), 133 – 137
- Colares, I. G., Colares, E. P., 2002. Food Plants Eaten by Amazonian Manatees (*Trichechus inunguis*, Mammalia : Sirenia) *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45(1), 67 – 72.
- Dushenkov, S., Vasudev, D., Kapulnik, Y., Gleba, D., Fleisher, D., Ting, K.C., 1997. Removal of uranium from water using terrestrial plants. *Environmental Science and Technology* 31, 3468–3474.
- Ekundayo, E. O., Obuekwe, O. 2000. Effects of an oil spill on soil physico-chemical properties of a spill site in a typical udipsamment of the Niger delta basin of Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment* 60, 235–249.
- Esteves, F. A. 1992. Biomass and analysis of the major inorganic components of floating aquatic macrophyte (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) in six reservoirs of São Paulo State (Brazil). *Ciência e Cultura* 34(9),1197-1200.
- Furch, K., Junk, W.J., 1997. The Chemical Composition, Food Value, and Decomposition of Herbaceous Plants, Leaves, and litter of floodplain forests, in: Junk, W. J. (Ed.) *The Central Amazon Floodplain*. Springer-Verlag, New York 126, 187– 205.
- Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walker, D.J., Bernal, M. P. , Serrano, R., 2003. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303,440– 445.
- Glick, B.R., 2003. Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* 21, 383-393.
- Hamilton, M. A., Russo, R.C.,Thurst, R. V., 1977. Thirrmmed Spearman-Kraber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environmental Science Technology* 11(7),714-719; Correction 12(4),417 (1978).
- Harley, K. L. S., 1990. The role of biological control in the management of water hyacinth. *Biocontrol News and Information* 11, 11–22.
- Hutchinson, S. L., Banks, M. K., Shwab, A.P., 2001. Phytoremediation of age petroleum sluge: effect of inorganic fertilizer. *Journal of Environmetal Quality* 30,395-403.

- Junk, W.J., 1973. Investigations on the ecology and production biology of the “floating meadows” (*Paspalo-Echinocloetum*) on the middle Amazon. Part II: The aquatic fauna in the root zone of floating vegetation. *Amazoniana* 4(1), 9-12.
- Junk, W. J., Bayley, P. B., Sparks, R. E. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems, in: Dodge, D. P. (Ed.). Proceedings of the International Large River Symposium. Ottawa, Canadian Special Publication of Fisheries Aquatic Sciences 110-127.
- Junk, W.J., Howard_Williams C. 1984. Ecology of aquatic macrophytes in Amazonia. in: Sioli, H. (Ed.) The Amazon Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin. Dordrecht, Boston, Lancaster, pp.269-293.
- Junk, W. J., Piedade, M. T. 1997. Plant life in the floodplain with special reference to herbaceous plants,. in: Junk, W. J. (Ed.) The Central Amazon Floodplain. Springer-Verlag, New York 126, 147– 181.
- Justo, C. F., Soares, Â. M., Gavilanes, M. L., Castro, E. M. de. 2005. Leaf anatomical plasticity of *Xylopia brasiliensis* Sprengel (Annonaceae). *Acta Botanica Brasilica* 19(1), 112-123.
- Kirk, J.L., Klironomosb, J. N., Leea, H. , Trevors, J. T., 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution* 133, 455–465
- Lieth, H. 1975. Primary production of the major vegetation units of the world, in: Lieth , H., Whittaker, R. H. (Eds.) Primary Productivity of the Biosphere, Springer - Verlag, New York, pp. 203-215.
- Lin, Q. Mendelssohn, I. A., Suidam, M. T., Lee, K. , Venosa, A.D. 2002. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Marine Pollution Bulletin* 44, 897-902.
- Martins, V. J., Artaxo, P., Ferraz, E. S. B. , Tabacniks, M. H. 1999. Chronological studies of tree-rings from the Amazon basin using thick target PIXE and proton backscattering analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 150, 240– 247.
- Merkel, N., Schlütze-Kraft, R., Infante, C. 2005. Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environment Pollution* 138, 86–91.
- Mendelssohn, I. A., McKee, K. L., 1988. *Spartina alterniflora* dieback in Louisiana: time-course investigation of soil waterlogging effects. *The Journal of Ecology* 76, 509-521.

- Osuji, L. C., Adesiyi, S. O., 2005. Extractable hydrocarbons, nickel and vanadium contents of Ogbodo-isiokpo oil spill polluted soils in Niger Delta, Nigeria. *Journal of Environmental Management* 110, 129–139
- Pezeshki, S. R., Hester, M. W., Lin, Q. , Nyman, J.A., 2000. The effect of oil spill and cleanup on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environment Pollution* 180, 129–139.
- Pezeshki, S. R., DeLaune, R. D., 1993. Effect of crude oil on gas exchange functions of *Juncus roemerianus* and *Spartina alterniflora*. *Water, Air, and Soil Pollution* 68, 461-468.
- Pezeshki, S. R., DeLaune, R. D. , Jugsujinda, A., 2001. The effect of crude oil and the effectiveness of cleaner application following oiling on US Gulf of Mexico coastal marsh plants. *Environment Pollution* 112, 483–489.
- Piedade, M. T. F., Junk, W. J. , Long, S. P., 1991. The productivity of the C4 grass *Echinochloa polystachya* on the Amazon floodplain. *Ecology* 72(4), 1456-1463.
- Piedade, M. T. F., Junk, W. J. , Mello, J. A. S. N. 1992. A floodplain grassland of the Central Amazon, in: Long, S. P., Jones, M. B., Roberts, J. M. (Eds.). *Productivity of grass ecosystems of the Tropics and Sub-Tropics*. Chapman , Hall/UNEP, London, pp. 127-158.
- Pott, V. J., Pott, A. 2000. *Plantas Aquáticas do Pantanal*. Embrapa, Brasília.
- Richey, J. E., Melack, J. M., Aufdenkampe, A. K., Ballester, V. M., Hess, L. L. 2002. Outgassing from Amazonian rivers and wetlands as a large tropical source of atmospheric CO₂. *Nature* 416, 6,17-620.
- Sanchez-Botero, J.I.S., Araujo-Lima, C.A.R.M., 2001. As macrófitas aquáticas como berçário para a ictiofauna da várzea do rio Amazonas. *Acta Amazonica* 31(3), 37-448.
- Souza, L. A. de. 2003. *Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântula*. Editora da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- Val, A. L., Almeida-Val, V. M. 1999. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon, in: Val , A. L. , Almeida-Val, V. M. F. (Eds.) *Biology of Tropical Fishes*, INPA, Manaus 22, 277-291.
- Watmough, S.A., Hutchinson, T. C. 1996. Analysis of tree rings using inductively coupled plasma mass spectrometry to record fluctuations in a metal pollution episode. *Environment Pollution* 93,93 –102.
- Wilkinson, L. 1998. *Systat: the system for statistics*. Systat Inc. Evanston, Illinois, USA.

Wittmann, F. Anhuf, D., Junk, W. J., 2002. Tree distribution and community structure of central Amazonian várzea forests by remote-sensing techniques. *Journal of Tropical Ecology* 18, 905-820.

ARTIGO II

RESPOSTAS DA HERBÁCEA AQUÁTICA AMAZÔNICA *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. AO TEMPO DE EXPOSIÇÃO E À DOSAGEM DO PETRÓLEO CRU DE URUCU



**Respostas da herbácea aquática amazônica *Eichhornia crassipes* (Mart.)
Solms. ao tempo de exposição e à dosagem do petróleo cru de Urucu.**

Aline Lopes^a

^a Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Departamento de Ecologia. Manaus, Brasil.
alopes@inpa.gov.br

*A exposição de *Eichhornia crassipes* ao petróleo cru de Urucu causa redução da proporção de biomassa viva em relação a biomassa total, podendo auxiliar nas estimativas do dano do petróleo para as áreas alagáveis.*

Resumo

Foi estudado o efeito do petróleo cru de Urucu sobre a produção de biomassa de uma herbácea aquática flutuante, *Eichhornia crassipes*, em um experimento realizado em casa de vegetação. Foram utilizadas 6 dosagens de petróleo cru de Urucu, distribuídas entre 0 e 300 mL de petróleo 2L⁻¹ de água e as plantas foram avaliadas após 1, 5, 10, 15 e 20 dias de exposição. Vinte dias após a aplicação do petróleo houve uma significativa diminuição do número de folhas, do comprimento das folhas, da biomassa aérea, da proporção de biomassa aérea viva/total e aumento da biomassa aérea morta como resposta ao aumento da dosagem do petróleo. O aumento do tempo de exposição causou a diminuição da biomassa aérea, da proporção de biomassa aérea viva/total, comprimento das folhas, e aumento do número de folhas comprometidas e biomassa aérea morta. Foi verificado um efeito de interação entre a dosagem e o tempo de exposição que contribuiu para o aumento do número de folhas comprometidas. A biomassa total, assim como a biomassa submersa e o comprimento das raízes não foram afetados pela exposição ao petróleo. Concluiu-se que *E. crassipes* possui uma baixa tolerância ao petróleo cru de Urucu.

Palavras-chave: áreas alagáveis, macrófitas aquáticas, fitorremediação, petróleo.

1. Introdução

Nas regiões tropicais, as áreas alagadas associadas aos grandes rios, são de extrema importância. Na Amazônia brasileira as várzeas, regiões periodicamente alagadas por rios de

água branca, ocupam cerca de 200.000 km² e representam um dos ecossistemas mais produtivos do mundo, recebendo regularmente nutrientes dos rios e promovendo o enriquecimento destes com matéria orgânica (Junk et al., 1989). Segundo Melack & Forsberg (2001) a produtividade primária deste ecossistema depende basicamente de quatro grupos vegetais: fitoplâncton (2%), algas perifíticas associadas à floresta alagável e algas perifíticas associadas às herbáceas aquáticas (5%), floresta alagável (28%) e as macrófitas aquáticas (65%), que são, portanto, as principais produtoras.

As macrófitas aquáticas são encontradas em ambientes de água branca, ricos em nutrientes, como o Rio Solimões. A distribuição desse grupo de plantas na planície de inundação depende da duração das fases aquática e terrestre, da estabilidade física do hábitat (influenciada pelos processos de sedimentação e erosão), dos processos sucessionais relacionados com o período de vida e idade das plantas e de impactos humanos (Junk & Piedade, 1997). Embora algumas plantas aquáticas possam produzir cerca de 100 t ha⁻¹ ano⁻¹ de matéria seca, a maior parte desta biomassa não é aproveitada por herbívoros e se decompõe causando alterações químicas no ambiente, por isso, o ciclo biogeoquímico das áreas alagáveis dependem da quantidade e da qualidade da matéria orgânica produzida por estas plantas (Furch & Junk, 1997).

O derramamento de petróleo representa um sério risco para a integridade das áreas alagáveis em todo o mundo, pois nesses ambientes a ciclagem de nutrientes depende da variação do nível da água (pulso de inundação), o que implica na reincorporação ao ambiente dos nutrientes e poluentes a cada ciclo (Furch & Junk, 1997). Entretanto, embora existam estudos prévios acerca da toxicidade do petróleo sobre as plantas aquáticas, são raros estudos com plantas amazônicas.

A maior parte dos estudos com plantas aquáticas (Mendelssohn & McKee, 1988; Lin & Mendelssohn, 1996; 1998; Lin et al., 2002) têm investigado os efeitos de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes marinhos enfocando a espécie dominante do Golfo dos Estados Unidos, *Spartina alterniflora*. Os impactos químicos do óleo nas plantas variam com o tipo e a quantidade de óleo (Pezeshki et al., 2000). Alguns estudos com *S. alterniflora* mostram que os óleos refinados e leves são mais tóxicos que os óleos crus e pesados, pois aparentemente penetram nas plantas e, conseqüentemente, impedem a regeneração de folhas e raízes (Pezeshki et al., 2000).

Os óleos leves como o de Urucu atuam em nível celular, alterando a permeabilidade da membrana ou interrompendo vários processos do metabolismo da planta (Pezeshki et al.,

2000). Dessa forma, seus efeitos parecem ser imediatamente mais tóxicos às plantas. Além disso, as plantas aquáticas sofrem, naturalmente, limitação de absorção de oxigênio pelas raízes (Armstrong, 1979), que é um dos mais importantes fatores limitantes para o seu crescimento em áreas alagadas (Mendelsohn & McKee, 1988; Pezeshki et al., 1989). Quando o óleo bloqueia os estômatos a difusão de oxigênio para as raízes diminui, devido ao interrompimento do transporte de oxigênio atmosférico pelas folhas, aumentando ainda mais o estresse de oxigênio das raízes.

Segundo Peterson et al. (2003), para as comunidades costeiras, as tentativas de limpeza do óleo podem ser mais prejudiciais que o próprio derramamento, pois seu impacto, devido aos métodos químicos e físicos empregados, é prolongado, gerando uma cascata de impactos indiretos, especialmente sobre a cadeia trófica, devido à perda de hábitat. Como opção a utilização de tais métodos, passou-se a dar preferência, atualmente, à fitorremediação para restabelecer e limpar a contaminação de petróleo das áreas alagáveis (Lin et al., 2002).

Estudos de dosagem-resposta são importantes especialmente se quisermos utilizar plantas para a fitorremediação, pois o sucesso deste método em determinada área depende da identificação de plantas resistentes e da determinação da concentração de hidrocarbonetos que permitirá o sucesso do transplante e estabelecimento das plantas no substrato contaminado.

Neste estudo foi avaliado o efeito do petróleo de Urucu sobre o crescimento da herbácea aquática *E. crassipes*, com três objetivos principais: (1) Avaliar a magnitude das respostas das plantas expostas a diferentes dosagens de petróleo; (2) Avaliar o efeito do tempo de exposição sobre as respostas das plantas; (3) Avaliar o potencial da espécie para bioindicação e/ou fitorremediação em caso de vazamento de petróleo.

2. Materiais e Métodos

As macrófitas aquáticas foram coletadas manualmente na Ilha de Marchantaria (03°15'S, 060°00'W), Amazonas, Brasil. O experimento foi realizado na Casa de Vegetação do Projeto INPA/Max-Planck, Manaus, Amazonas, Brasil e a água utilizada proveniente do poço artesiano localizado no mesmo local.

O petróleo utilizado foi proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas, Brasil. Este petróleo é considerado leve e de alta qualidade (ver artigo 1 para composição).

A herbácea aquática *Eichhornia crassipes* foi escolhida devido a sua ampla distribuição na planície de inundação, por ser nativa da Amazônia e por ser uma das espécies fundamentais para o ecossistema aquático amazônico.

2.1. Desenho experimental

Foram coletados indivíduos jovens de *E. crassipes* com, em média, três folhas de aproximadamente 4 x 7 cm, os quais foram lavados com água corrente no laboratório para a retirada do sedimento das raízes e colocados em frascos com 2 litros de água. Sempre que necessário foi completado o nível de água para repor as perdas por evapotranspiração.

Após o período de aclimação e crescimento de 30 dias, foi colocado petróleo na superfície da água sem que houvesse contato direto deste com as folhas. As herbáceas foram distribuídas aleatoriamente por sorteio nos tratamentos (Tabela 1). Para melhor controle foi medido o pH da água durante o experimento.

As unidades amostrais consistiram em 300 recipientes plásticos de 20 cm de diâmetro e 18,5cm de altura distribuídos em um experimento fatorial inteiramente casualizado 6x5 (dosagens de petróleo, tempos de retirada), com 10 réplicas para cada tratamento.

Tabela 1

Número de plantas mortas após a exposição ao petróleo, de acordo com as dosagens de petróleo aplicadas baseadas no volume por unidade amostral e o tempo (dias) de retirada de cada planta para biomassa.

tempo	Dosagem de petróleo (mL 2L ⁻¹ de água)					
	0	6	25	50	150	300
1	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	2
10	0	0	1	1	2	6
15	0	0	1	2	5	7
20	0	0	0	0	6	10

2.2. Parâmetros das respostas das plantas à toxicidade

2.2.1. Mortalidade

A planta foi considerada morta quando apresentou menos de 30% de área total verde. A mortalidade foi estimada pelo número de plantas que morreram em cada lote de 10 indivíduos, de acordo com o tratamento. A taxa de mortalidade em cada tratamento foi utilizada para indicar a sensibilidade da espécie ao petróleo.

2.2.2. Número de estolões

Estolão é um caule rastejante capaz de desenvolver raízes nos entrenós. O número de estolões foi utilizado como um indicativo da capacidade reprodutiva

da planta. Esta medida foi feita pela contagem direta do número de estolões em cada unidade experimental.

2.2.3. *Número de folhas saudáveis e com comprometimento fitossanitário.*

A contagem do número de folhas indica o quanto à planta investiu em manutenção e produção de folhas. Além disso, foi verificado o número de folhas com comprometimento fitossanitário (folhas com menos de 30% da área verde).

2.2.4. *Comprimento da folha e da raiz*

Foi medido o comprimento da maior folha de cada planta e o comprimento da raiz no início e ao término de cada etapa do experimento.

2.2.5. *Biomassa aérea*

A biomassa aérea foi coletada, separada em componentes mortos e vivos, e seca em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir peso constante.

2.2.6. *Biomassa submersa*

A biomassa submersa foi coletada, havendo a lavagem das raízes e secagem até peso constante. Não foi separado o material morto do vivo.

2.3. *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Systat 10.2 (Wilkinson, 1998). A sobrevivência das plantas foi analisada utilizando o estimador não-paramétrico Kaplan-Meier. Este método estima a probabilidade de ocorrência de eventos ao longo de um período de tempo curto, de dias ou meses com intervalos de tempo não necessariamente igualmente espaçados (Ayres & Ayres Jr., 1998). Para modelar a mortalidade das plantas em função dos fatores testados foi utilizado o método de superfície de resposta. Este método permite o agrupamento de n variáveis independentes, definindo um espaço de resposta n -dimensional com cada uma das variáveis em um eixo (Doehlert, 1970; Barros-Neto, 2003), permitindo assim que a interação entre esses fatores seja analisada coletivamente (Doehlert, 1970). As variáveis são escalonadas de forma que suas grandezas não interfiram no desenvolvimento do processo de otimização, segundo a função: $X_n = \frac{X - X_i}{\Delta X / 2}$, onde: X_n é a variável escalonada; X_i é o valor inicial; ΔX é o passo.

O efeito dos tratamentos foi analisado utilizando um modelo linear geral. Para os dados de crescimento foi utilizada Análise de Variância bifatorial (ANOVA). Para os dados de biomassa foi utilizada Análise de Covariância (ANCOVA), mantendo-se o tempo como co-variável e testando-se previamente a homogeneidade entre os ângulos e o paralelismo entre

os interceptos. Para estas análises foram excluídas as plantas mortas e as expostas a dosagem de 300mL devido à morte de todas as plantas nos tratamento de 20 dias (Tabela 1). Quando houve diferenças significativas entre os tratamentos ($\alpha < 0,05$), aplicou-se o teste *a posteriori* de Tukey para comparação das médias. Para a análise das dosagens em cada um dos tempos foi excluída a dosagem de 300mL nos tempos 15 dias e 20 dias devido à alta mortalidade de plantas neste tratamento. As diferenças significativas são relatadas no nível de 0,05 de probabilidade, a menos que indicadas de outra maneira. Os dados de biomassa foram normalizados utilizando $\log(g)$ para obedecer aos pressupostos dos métodos empregados.

3. Resultados

A análise de sobrevivência mostrou que a dosagem de petróleo diminuiu significativamente a sobrevivência de *E. crassipes* ($t_{(294)} = 3,282, p = 0,001$) ao longo do tempo de exposição. Na figura 1 podem ser vistas as diferenças entre as plantas após 20 dias de tratamento. Enquanto que a planta do tratamento controle apresenta um eixo de inflorescência a do tratamento de 300mL está com comprometimento fitossanitário acentuado.

Na figura 2 é apresentada a superfície de resposta, na qual são ilustradas as curvas com o percentual de morte em função da dosagem de petróleo e do tempo de exposição. A mortalidade foi modelada pela equação polinomial de segundo grau: **Morte = $0.984 + 2.6*x + 0.814*y - 0.095*x*x + 2.651*x*y - 0.45*y*y$** , onde a mortalidade é expressa em função da dosagem de petróleo (x) e do tempo de exposição (y). Por meio desta modelagem pode-se estimar que dosagens de 30mL em 51,5 dias de exposição sejam limitantes para esta espécie causando quase 100% de mortalidade.



Fig. 1. *Eichhornia crassipes* após 20 dias exposição ao petróleo de Urucu. As dosagens estão indicadas ao lado de cada pote (mL 2L⁻¹ de água).

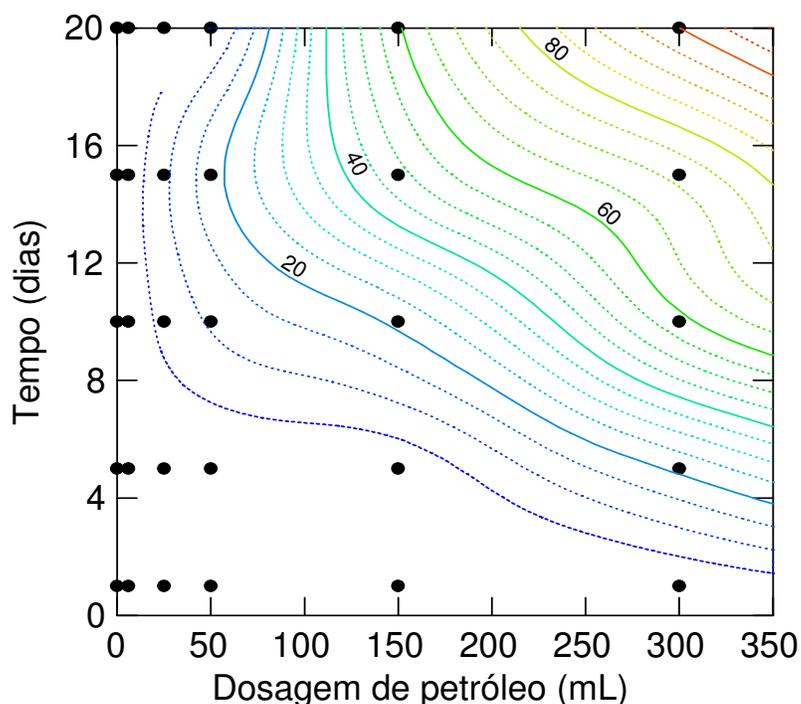


Fig. 2. Efeito da dosagem do petróleo e do tempo de exposição sobre a mortalidade (%) de *Eichhornia crassipes*. Os pontos escuros são as dosagens e tempos amostrados.

Houve um aumento significativo do número de plantas com estolões ao longo do tempo de exposição independentemente da exposição ao petróleo (Tabela 2). No início do experimento nenhuma planta apresentava estolão, com 20 dias de exposição a média de plantas com estolão que era de 0,16 ($\pm 0,37$) no quinto dia, aumentou para 0,29 ($\pm 0,46$). O incremento de folhas de *E. crassipes* foi afetado pela dosagem de petróleo, havendo uma tendência de diminuição com o aumento do tempo de exposição (Tabela 2). A dosagem de petróleo, após um dia de exposição, provocou diminuição do número de folhas nos tratamentos de 50 e 300 mL de petróleo ($F_{(5, 54)} = 2,768$, $p = 0,027$) em relação ao controle, após 5 dias houve uma redução do número de folhas nos tratamentos de 150 e 300 mL ($F_{(5, 52)} = 5,921$, $p < 0,001$). Com 10 dias de exposição ao óleo, as plantas tiveram um menor número de folhas nos tratamentos de 150 mL e 300 mL de petróleo ($F_{(5, 44)} = 5,650$, $p < 0,001$) quando comparado com o controle. Após 15 e 20 dias de exposição não houveram diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 3).

Além do efeito da dosagem de petróleo e do tempo de exposição houve interação esses fatores que resultou no incremento de folhas com comprometimento fitossanitário (Tabela 2; Fig. 4). A análise do efeito da dosagem do petróleo, nos diferentes tempos, mostrou que o petróleo causa um aumento de folhas com comprometimento após 5 dias de exposição ($F_{(5, 52)}$

= 5,402, $p < 0,001$) no tratamento de 300mL em relação ao controle. Após 10 dias de exposição houve diferença significativa do número de folhas com comprometimento em relação ao controle nas dosagens de 150 e 300 mL ($F_{(5, 44)} = 4,362$, $p = 0,003$). Com 15 de exposição ao petróleo houve um aumento de folhas com comprometimento nos tratamentos com dosagens acima de 25mL de petróleo ($F_{(4, 37)} = 4,614$, $p = 0,004$), sendo o mesmo padrão observado após 20 dias de exposição ($F_{(4, 39)} = 4,994$, $p = 0,004$).

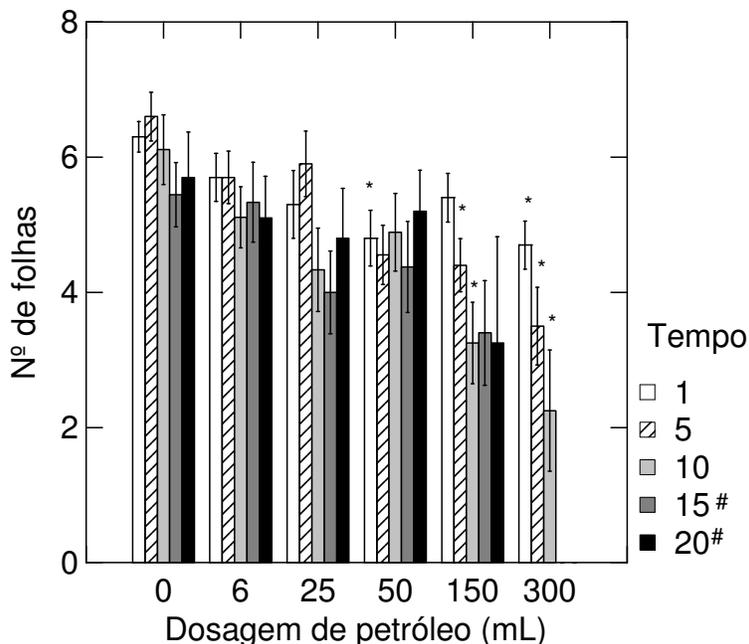


Fig. 3. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ água) e do tempo de exposição (dias) sobre o número de folhas de *Eichhornia crassipes*. Valores médios com erro padrão. * indicam valores com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido à alta mortalidade das plantas.

Houve redução do comprimento da folha de *E. crassipes* em resposta ao tempo de exposição e a dosagem de petróleo (Tabela 2), porém essa redução foi menor no tratamento controle (de $7,4 \pm 0,9$ cm para $5,0 \pm 1,0$ cm após 20 dias) e no tratamento de 6 mL (de $7,7 \pm 1,1$ cm para $4,9 \pm 1,9$ cm após 20 dias) que nos tratamentos de 25 mL, 50mL e 150 mL (de $8,0 \pm 0,8$ cm para $3,7 \pm 0,7$ cm após 20 dias). Quando analisado cada tempo separadamente não houve efeito significativo da dosagem nos tratamentos (Fig. 5). Já o comprimento da raiz de *E. crassipes* manteve-se estável, não sendo afetado nem pela dosagem do petróleo, nem pelo tempo de exposição (Tabela 2) e apresentou em média $13,5 \pm 4,3$ cm.

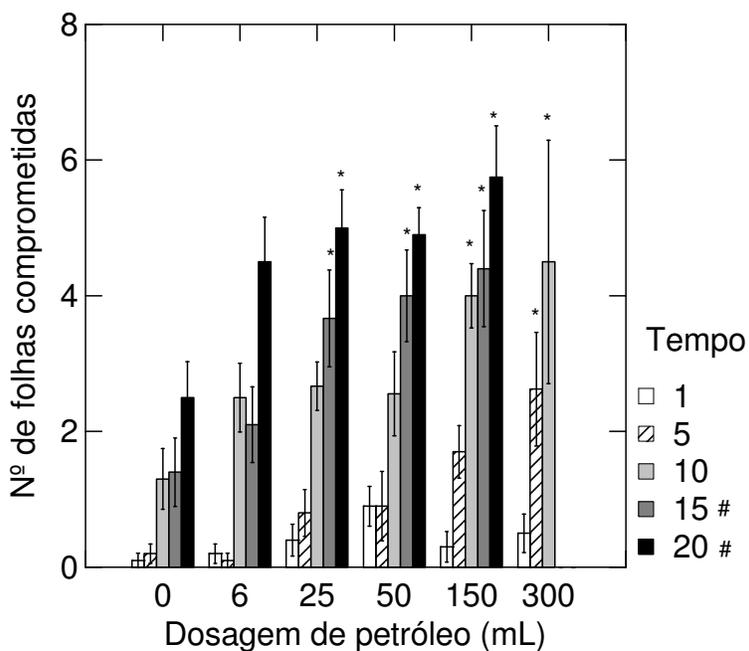
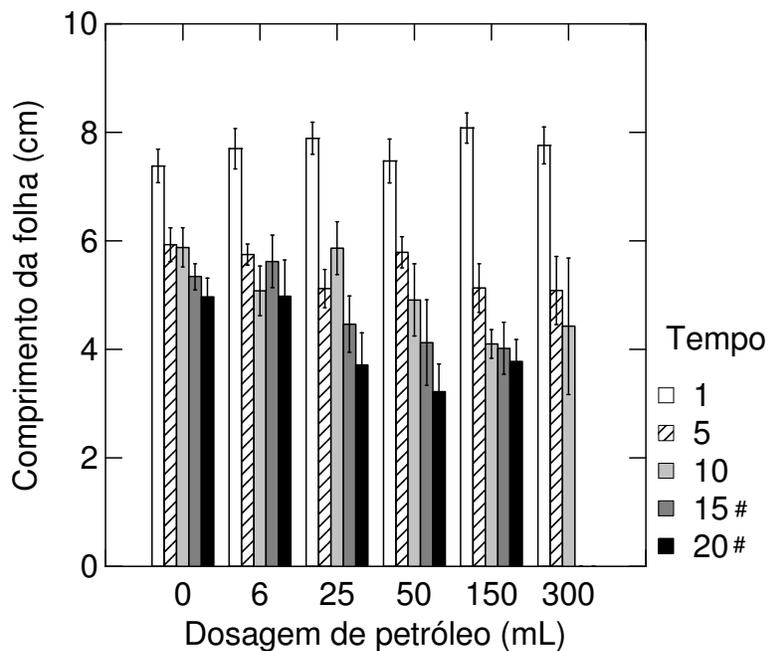


Fig. 4. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ água) e do tempo de exposição (dias) sobre o número de folhas de *Eichhornia crassipes* com comprometimento fitossanitário. Valores médios com erro padrão. * indicam valores com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido à alta mortalidade das plantas.



5. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ água) e do tempo de exposição (dias) sobre o comprimento máximo de folhas de *Eichhornia crassipes*. Valores médios com erro padrão. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido à alta mortalidade das plantas.

Tabela 2

Resultados da ANOVA para as variáveis dependentes em relação aos fatores dosagem de petróleo (Dose) e tempo de exposição (Tempo), e as interações entre os fatores (interação). g.l. (graus de liberdade)

Variável dependente	Fator	g.l.	F	p
<i>Nº de estolões</i>	Dose	4	0,124	0,974
	Tempo	4	4,330	0,002
	Interação	16	1,037	0,419
	Erro	207		
<i>Nº de folhas</i>	Dose	4	10,341	< 0,0001
	Tempo	4	2,343	0,056
	Interação	16	0,764	0,724
	Erro	207		
<i>Nº de folhas com comprometimento fitossanitário</i>	Dose	4	16,987	< 0,0001
	Tempo	4	73,382	< 0,0001
	Interação	16	2,015	0,013
	Erro	207		
<i>Comprimento da folha</i>	Dose	4	4,372	0,002
	Tempo	4	53,967	< 0,0001
	Interação	16	1,674	0,053
	Erro	207		
<i>Comprimento máximo da raiz</i>	Dose	4	0,346	0,846
	Tempo	4	0,648	0,628
	Interação	16	0,832	0,647
	Erro	207		

A dosagem de petróleo e o tempo de exposição causaram uma diminuição da biomassa área das plantas (Tabela 3). Após 10 dias de exposição houve uma redução significativa no tratamento de 300mL em relação ao controle ($F_{(5, 43)} = 3,008$, $p = 0,002$). (Fig. 6).

Na figura 7 podemos observar o efeito significativo tanto da dosagem de petróleo quanto do tempo de exposição sobre a produção de biomassa aérea morta de *E. crassipes* (Tabela 3). O petróleo causou um aumento na produção de biomassa aérea morta a partir de 5 dias de exposição na dosagem de 300 mL ($F_{(5, 23)} = 3,667$, $p = 0,014$). Após 10 dias de exposição houve aumento da biomassa morta nos tratamentos de 150 e 300 mL ($F_{(5, 36)} = 3,996$, $p = 0,006$). Com 15 dias de exposição houve um aumento significativo na biomassa morta nos tratamentos acima de 25 mL ($F_{(4, 32)} = 8,934$, $p < 0,0001$), o mesmo foi verificado com 20 dias de exposição ($F_{(4, 37)} = 7,255$, $p < 0,0001$). Não houve efeito significativo do tempo e da dosagem do petróleo sobre a biomassa submersa de *E. crassipes* (Tabela 3)

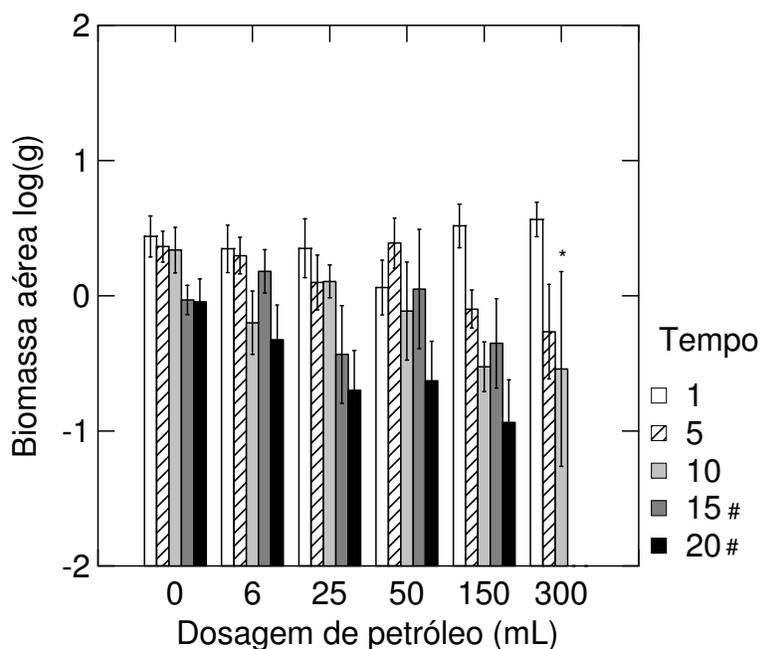


Fig. 6. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ água) e do tempo de exposição (dias) sobre a biomassa aérea (g) de *Eichhornia crassipes*. Valores médios com erro padrão. * indicam valores com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido à alta mortalidade das plantas.

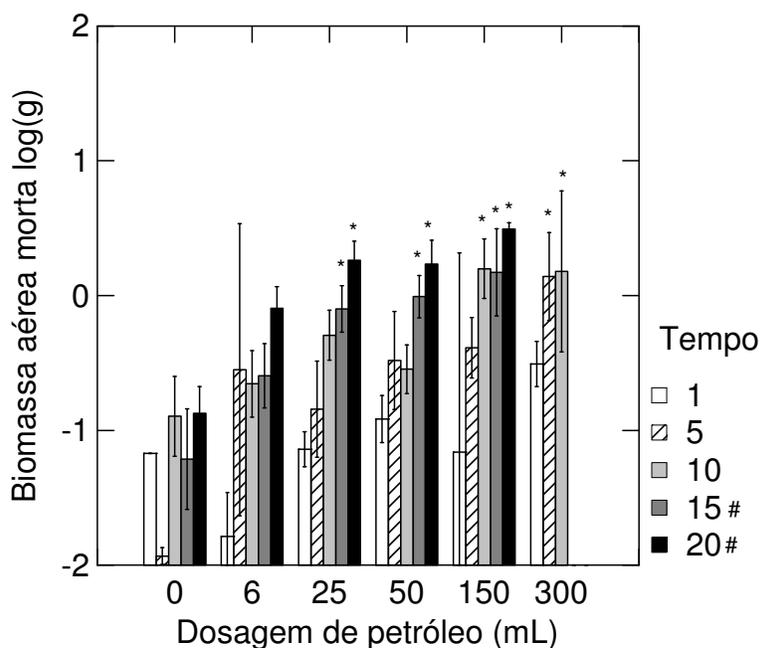
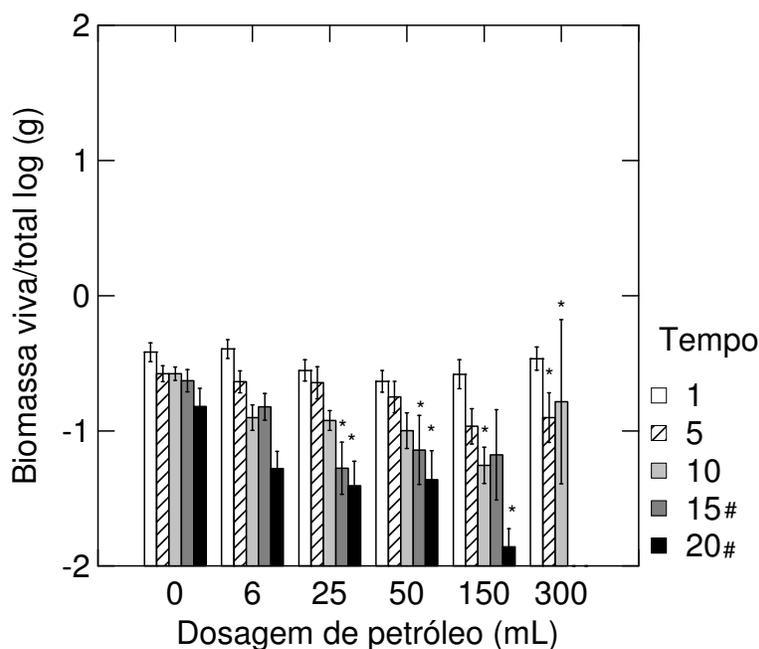


Fig. 7. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ água) e do tempo de exposição (dias) sobre o biomassa aérea morta de *Eichhornia crassipes*. Valores médios com erro padrão. * indicam valores com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido à alta mortalidade das plantas.

Não houve efeito significativo nem da dosagem de petróleo, nem do tempo de exposição sobre a biomassa total de *E. crassipes* (Tabela 3). Como o efeito da dosagem do petróleo sobre a biomassa total muitas vezes é mascarado porque enquanto a biomassa viva diminui a biomassa morta aumenta, alguns autores utilizam a proporção biomassa viva/total para avaliar o efeito do petróleo sobre a biomassa das plantas (Lin e Mendelssohn, 1996). Quando foi analisado o efeito do petróleo cru de Urucu sobre a proporção de biomassa aérea viva/total de *E. crassipes*, houve um efeito tanto da dosagem quanto do tempo de exposição que provocou uma diminuição na proporção de biomassa viva em relação à morta (Tabela 3). Além disso, houve um efeito significativo desta diminuição a partir de 5 dias de exposição no tratamento de 300mL em relação ao controle ($F_{(5, 52)} = 3,806, p = 0,005$). Após 10 dias de exposição houve redução da proporção de biomassa viva/total nos tratamentos de 150 e 300 mL ($F_{(5, 43)} = 5,608, p < 0,0001$), enquanto que após 15 dia a redução foi significativa nas dosagens de 25 e 50 mL e de petróleo ($F_{(4, 36)} = 5,291, p = 0,002$) e após 20 dias nos tratamentos com mais de 25 mL de petróleo ($F_{(4, 38)} = 6,949, p < 0,0001$) (Fig. 8).



8. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ água) e do tempo de exposição (dias) sobre a proporção de biomassa aérea viva/total de *Eichhornia crassipes*. Valores médios com erro padrão. * indicam valores com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 300mL nestes tempos devido à alta mortalidade das plantas.

Tabela 3

Resultados da ANCOVA para as variáveis dependentes em relação ao fator dosagem de petróleo (Dose) e a co-variável tempo de exposição (Tempo). g.l. (graus de liberdade)

Variável dependente	Fator	g.l.	F	p
<i>Biomassa aérea</i>	Dose	4	4,380	0,002
	Tempo	1	58,256	<0,0001
	Erro	223		
<i>Biomassa aérea morta</i>	Dose	4	21,920	<0,0001
	Tempo	1	55,826	<0,0001
	Erro	147		
<i>Biomassa submersa</i>	Dose	4	1,340	0,255
	Tempo	1	0,066	0,797
	Erro	223		
<i>Biomassa total</i>	Dose	4	1,119	0,348
	Tempo	1	0,475	0,491
	Erro	223		
<i>Proporção biomassa aérea viva/total</i>	Dose	4	18,778	<0,0001
	Tempo	1	167,380	<0,0001
	Erro	223		

4. Discussão

Diversos estudos mostraram que o petróleo pode afetar as plantas retardando a germinação de sementes, reduzindo o crescimento, densidade, taxa fotossintética, biomassa ou resultando na mortalidade completa das mesmas (Mendelssohn & Mckee, 1988; Lin & Mendelssohn, 1996; Pezeshki et al, 2000; Li et al., 2002). Apesar de *E. crassipes* ser muito tolerante a ambientes poluídos por diferentes tipos de efluentes, tais como cana-de-açúcar, esgoto doméstico, agroindustriais e de piscicultura (Harley, 1990; Esteves, 1992; Esteves, 1998; Pott & Pott, 2000), este estudo mostrou claramente que o petróleo cru de Urucu, quando derramado na superfície da água causa impactos significativos sobre a sobrevivência e crescimento desta planta.

Os hidrocarbonetos derivados do petróleo podem afetar as plantas interrompendo a relação planta-água, agindo diretamente sobre o metabolismo, por exemplo, sobre a absorção de nutrientes, intoxicando as células e reduzindo as trocas gasosas de oxigênio nas raízes (Lin e Mendelssohn, 1996; Ko & Day, 2004). Neste estudo, o impacto do petróleo sobre *E. crassipes* durante os 20 dias de exposição foi expresso pela redução do número de folhas, da proporção de biomassa aérea viva/total, aumento do número de folhas com comprometimento fitossanitário e da biomassa aérea morta. Houve ainda uma interação entre a dosagem de petróleo e tempo de exposição que causou aumento mais acentuado de folhas com comprometimento fitossanitário nos tratamentos com maiores dosagens de petróleo, como o de 150 mL (média de 4,5 folhas aos 10 dias) que no tratamento controle (média de 1,3 aos 10

dias) ou mesmo no tratamento de 6 mL (média de 2,5 folhas aos 10 dias). Porém, não foi observado efeito sobre o comprimento máximo da raiz, biomassa submersa e total das plantas.

A intensidade do dano do petróleo depende dos fatores bióticos e abióticos envolvidos, incluindo o tipo e a quantidade do óleo, as espécies e a extensão da lâmina de óleo, a estação em que ocorreu o derramamento e as condições climáticas (Burk, 1977; Mendelssohn e Mckee, 1988, Lin & Mendelssohn, 1996; Pezeshki et al, 2000). Crema (2003) observou que a dosagem de até 3L de petróleo de Urucu m^{-2} de água (cerca de 4775 mL por unidade amostral), inicialmente, não afetavam o crescimento de *Eichhornia crassipes*, só encontrando biomassa morta após 45 dias de exposição. Já Prado & Rubin (2003) demonstraram que quantidades de 1mL do mesmo petróleo L^{-1} de água (140 mL por unidade amostral) foram limitantes para o desenvolvimento desta mesma espécie, após 90 dias de exposição. No presente estudo os efeitos do petróleo já ficaram evidentes em dosagens de 25 mL de petróleo $2L^{-1}$ de água com apenas 15 dias de exposição. Essa diferença na reposta das plantas pode estar relacionada às condições experimentais. Prado & Rubin (2003) utilizaram seis indivíduos em cada unidade experimental, ou seja 23,33 mL de petróleo por indivíduo, muito próximo ao valor encontrado no presente estudo, no qual cada unidade experimental continha apenas um indivíduo. Crema (2003) realizou seu estudo em Rio Claro, São Paulo, onde as condições ambientais de temperatura e qualidade da água são diferentes da região amazônica, o que pode haver causado um aumento no tempo de sobrevivência das plantas.

As folhas de *E. crassipes* contêm de 11 a 15% de proteína (Junk, 1979) e servem de alimento para diversas espécies de animais, dentre eles o peixe-boi e algumas espécies de tartarugas (Piedade et al., 1992; Colares & Colares, 2002). Além disso, a espécie possui um apelo paisagístico muito positivo, e produz sombra na superfície da lâmina de água, impedindo o crescimento explosivo de algas. O efeito da penetração da luz faz-se sentir diretamente sobre a fotossíntese e o balanço de oxigênio dissolvido e indiretamente sobre as comunidades animais que são predadas por peixes ou outros animais que se orientam visualmente (Beyruth, 1992). Portanto, a redução do comprimento da folha e consequentemente da biomassa aérea desta planta, resultantes da exposição a dosagens de 300 mL de petróleo, causaria efeitos negativos indiretos a todo o ecossistema aquático.

A penetração do petróleo na raiz pode causar uma grande mortalidade inicial quando as plantas são expostas a altas dosagens, e efeitos em longo prazo sobre o crescimento destas. Lin e Mendelssohn (1996) encontraram efeito do petróleo da Louisiana sobre a biomassa das raízes de *S. alterniflora* e *S. patens* após um ano da aplicação. Entretanto, no presente estudo

não foi encontrada relação entre o comprimento e a biomassa das raízes e a dosagem de petróleo. Isso pode ter acontecido devido ao tempo de exposição que foi apenas de 20 dias, pois em outro estudo com a mesma espécie, em 126 dias de exposição (ver artigo 1) houve uma redução significativa do comprimento da raiz.

Lin e Mendelssohn (1996) demonstraram que uma dosagem de 8 L m⁻² de solo (400mL por unidade amostral) de petróleo cru do sul da Louisiana não afetaram a biomassa total de *S. alterniflora* um ano após a aplicação, porém quando testado o impacto do óleo Nº 2 sobre a mesma espécie foram necessários 1,2 L m⁻² de solo (50 mL por unidade amostral) para causar redução de biomassa total, após 3 meses da exposição (Lin et al., 2002). No presente estudo com 20 dias de monitoramento, em dosagens de no máximo 300 mL por unidade amostral, o petróleo também não causou redução da biomassa total da planta, porém houve uma grande diminuição da proporção de biomassa aérea viva em relação a biomassa total devido a exposição ao petróleo. Esses dois fatores futuramente levaram a diminuição do tempo de sobrevivência das plantas, que foi significativamente reduzido já com 15 dias de exposição à dosagem de petróleo de 25 mL 2L⁻¹ água. Assim, o petróleo de Urucu pode ser considerado mais tóxico para *E. crassipes* que outros óleos como o óleo Nº 2 ou o óleo do sul da Louisiana sobre *S. alterniflora*. Essas diferenças devem-se não somente a sensibilidade das espécies, mas principalmente ao tipo de petróleo testado, pois óleos mais leves como o de Urucu e o óleo Nº 2 costumam ser mais tóxicos às plantas que os óleos mais pesados com o da Louisiana.

A decomposição da matéria orgânica libera nutrientes que estavam retidos na estrutura orgânica, tornando-os disponíveis para o ambiente (Luizão & Schubart, 1987). Esses nutrientes podem ser transportados no ambiente aquático sendo absorvidos por plantas de lugares mais distantes, ou mesmo sendo incorporados ao solo podendo ser absorvidos por plantas terrestres (Vannote et al., 1980). O aumento da biomassa aérea morta de *E. crassipes* no presente estudo pela exposição a dosagens acima de 25 mL acarretaria em uma elevada carga de matéria orgânica contaminada que entraria no ambiente. Esta matéria orgânica contaminada poderia liberar por meio de sua decomposição os elementos tóxicos, dentre eles, metais pesados como cobre, níquel e mercúrio, comumente encontrados no petróleo cru, (Ekundayo & Obuekwe, 2000) que haviam sido absorvidos.

Após o vazamento do petroleiro Torrey Canyon na região costeira da Inglaterra, Burk (1977) observou que estandes de *Dulichium arundinaceus* e *Eleocharis palustris* tiveram sua abundância diminuída, enquanto que *Elodea nuttallii*, *Potamogeton crispus* e *P. epihydrus*

tiveram um vigoroso crescimento. O petróleo cru presente no ambiente, que possuía uma toxicidade relativamente baixa, aparentemente estimulou o crescimento de *S. lancifolia* em dosagens de 16 L m⁻² de solo (Lin e Mendelssohn, 1996) e *S. alterniflora* em dosagens de até 24 L m⁻² ou 500 mg óleo g⁻¹ solo seco (Lin e Mendelssohn, 1998) . No presente estudo a capacidade de reprodução vegetativa foi estimada pelo número de estolões, o qual não sofreu alterações relacionadas à dosagem de petróleo, a redução deste parâmetro foi significativa somente ao longo do tempo de exposição. Isto indica que apesar da espécie ser capaz de se reproduzir vegetativamente por meio da formação de estolões quando exposta ao petróleo, quando o tempo de exposição é prolongado, a planta tende a perder essa capacidade.

O presente estudo mostrou que a taxa de mortalidade de *E. crassipes* é diretamente proporcional à dosagem de petróleo e aumenta consideravelmente com o aumento do tempo de exposição ao petróleo. Isto pode ser claramente visto quando a dosagem de petróleo aumentou de 6mL para 300mL resultando em um aumento de 60% da mortalidade, e quando o tempo de exposição aumentou de 5 dias para 20 dias, a mortalidade aumentou em 40%. Além disso, a interação entre os fatores tempo e dosagem de petróleo resultou em um aumento de 10% na mortalidade de *E. crassipes*.

5. Conclusão

O presente estudo mostrou que a exposição de *E. crassipes* ao petróleo pode causar não somente a morte das plantas como uma redução da taxa de crescimento das plantas sobreviventes. Baixas dosagens de petróleo podem causar redução do número de folhas e da biomassa das plantas, enquanto que altas dosagens podem causar até mesmo a morte destas. Baixas dosagens do petróleo de Urucu, como 6 mL 2L⁻¹ de água não causaram efeitos significativos sobre os parâmetros analisados. Dosagens moderadas, como 25 e 50 mL 2L⁻¹ de água, causam aumento da biomassa aérea morta, diminuição da proporção biomassa aérea viva/total, diminuição do número de folhas de *E. crassipes* e aumento do número de folhas com comprometimento fitossanitário. Dosagens mais altas, como 150 e 300mL 2L⁻¹ de água, além de afetarem esses fatores, causaram diminuição da biomassa aérea e aumento da mortalidade das plantas. Entretanto, mesmo as dosagens mais altas utilizadas neste trabalho são baixas quando comparadas com a bibliografia disponível. A biomassa total de *E. crassipes* foi reduzida pelo aumento da dosagem de petróleo, e por isso a restauração de áreas

afetadas por petróleo cru de Urucu, utilizando *E. crassipes* pode ser extremamente limitada a locais com baixas concentrações de petróleo.

Pode-se concluir, devido à redução dos diversos parâmetros decorrente da exposição da espécie a dosagens acima de 25mL 2L⁻¹ de água, que esta espécie pode ser utilizada para indicar a presença deste poluente no ambiente aquático.

Agradecimentos

Os recursos necessários para este estudo foram providos pelo Projeto INPA/Max-Planck, PPI 1090-5, e o petróleo cedido pela Petrobrás através do Projeto PIATAM. Agradeço ao CNPq pela Bolsa de Mestrado de Aline Lopes. Meus agradecimentos à Joana D'arc de Paula pela leitura e sugestões do manuscrito e a equipe do Projeto INPA/Max-Planck e do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução (LEEM), principalmente a Dra. Vera Val pela valorosa contribuição nas discussões desde o planejamento do projeto e pela infraestrutura cedida, aos técnicos Valdenei e Celso agradeço pelo auxílio na coleta dos dados e aos barqueiros Mário e Luiz pelo auxílio em campo.

Referências

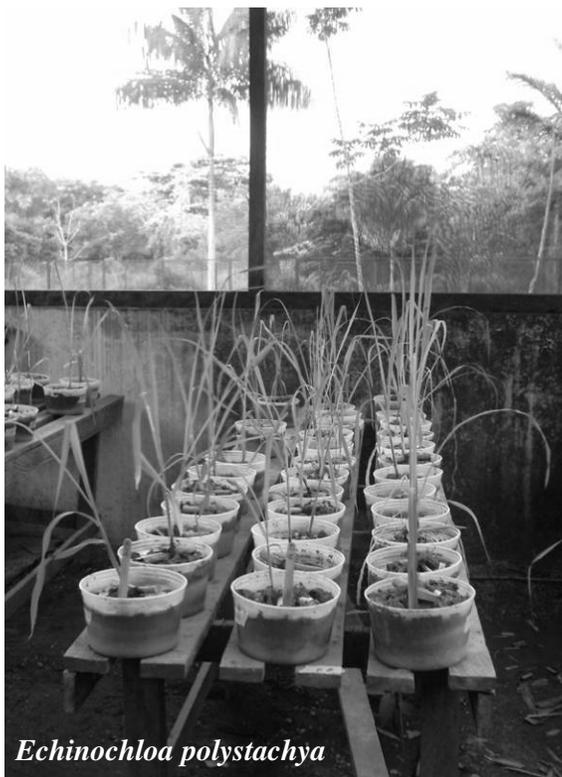
- Armstrong, W., 1979. Aeration in higher plants. *Advances Botanical in Research* 7, 225-332.
- Ayres, M., Ayres Jr., M. A., 1998. *BioEstat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Sociedade Civil Mamirauá/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Manaus.
- Barros-Neto, B. de, Scarminio, I. S., Brung, R. E., 2003. *Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Unicamp, Campinas.
- Beyruth.,1992. Aquatic macrophytes from a marginal pond at Embu-mirim river, S. Paulo, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 26, 272-282.
- Burk, C. J., 1977. A four year analysis of vegetation following an oil spill in a freshwater marsh. *The Journal of Applied Ecology* 14, 515-522.
- Crema L.C., 2003. Efeito de diferentes concentrações de petróleo sobre o crescimento da macrófita aquática *Eichhornia crassipes*. Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 16p.

- Esteves, F. A., 1992. Biomass and analysis of the major inorganic components of floating aquatic macrophyte (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) in six reservoirs of São Paulo State (Brazil). *Ciência e Cultura* 34 (9),1197-1200.
- Esteves, F. A., 1998. *Fundamentos de Limnologia*, segunda ed. Interciência, Rio de Janeiro.
- Furch, K., Junk, W. J., 1997. The chemical composition, food value, and decomposition of herbaceous plants, leaves, and litter of floodplain florets. in: Junk, W. J. (Ed.) *The Central Amazon Floodplain*. Springer-Verlag, New York 126, 187– 205.
- Harley, K. L. S., 1990. The role of biological control in the management of water hyacinth. *Biocontrol News and Information* 11, 11–22.
- Junk, W. J., 1979. Macrófitas aquáticas nas várzeas da Amazônia e possibilidades do seu uso da agropecuária. *Imprensa Oficial do estado do Amazonas*, 24p.
- Junk, W. J., Bayley, P. B. , Sparks, R. E., 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems, in: Dodge, D. P. (Ed.). *Proceedings of the International Large River Symposium*. Ottawa: Canadian Special Publication of Fisheries Aquatic Sciences 110-127.
- Junk, W. J., Piedade, M. T., 1997. Plant life in the floodplain with special reference to herbaceous plants, in: Junk, W. J. (Ed.) *The Central Amazon Floodplain*. Springer-Verlag, New York 126,147– 181.
- Ko, J.-Y., Day, J. W., 2004. A review of ecological impacts of oil and gas development on coastal ecosystems in the Mississippi Delta. *Ocean , Coastal Management* 47, 597–623.
- Lin, Q., Mendelsohn, I. A., 1996. A comparative investigation of the effects of Louisiana crude oil on the vegetation of fresh, brackish, and salt marsh. *Marine Pollution Bulletin* 32 (2), 202–209.
- Lin, Q., Mendelsohn, I.A., 1998. The combined effects of phytoremediation and biostimulation in enhancing hábitat restoration and oil degradation of petroleum contaminated wetlands. *Ecological Engineering* 10, 263–274.
- Lin, Q., Mendelsohn, I. A., Suidam, M. T., Lee, K., Venosa, A. D., 2002. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Marine Pollution Bulletin* 44, 897-902.
- Luizão, F.J., Schubart, H.O.R. 1987. Litter production and decomposition in a terra-firme forest of Central Amazonian. *Experientia* 43,259-265.
- Melack, J. M., Forsberg, B. R. 2001. Biochemistry of Amazon floodplain lakes and associates wetlands, in: McClain, M. E., Victoria, R. L., Richey, J. E. (Eds.) *The Biochemistry of the Amazon Basin*. Oxford University Press, Oxford 235-274.

- Mendelssohn, I. A., McKee, K. L., 1988. *Spartina alterniflora* dieback in Louisiana: time-course investigation of soil waterlogging effects. *The Journal of Ecology* 76, 509-521.
- Prado, K. L. L., Rubin, M. A. L., 2003. Efeito de petróleo sobre a macrófita aquática *Eichhornia crassipes* em experimento de laboratório. *Anais do VI Congresso de Ecologia do Brasil* 83-85.
- Peterson, C. H., Rice, S. D., Short, J. W., Esler, D., Bodkin, J. L., Ballachey, B. E., Irons, D. B., 2003. Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science* 302, 2082-2086.
- Pezeshki, S. R., DeLaune, R. D., Patrick Jr., W. H., 1989. Effect of fluctuating rhizosphere redox potential on carbon assimilation of *Spartina alterniflora*. *Oecologia* 80, 132-135.
- Pezeshki, S. R., Hester, M. W., Lin, Q., Nyman, J.A., 2000. The effect of oil spill and cleanup on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environmental Pollution* 180, 129–139.
- Pott, V. J., Pott, A., 2000. *Plantas Aquáticas do Pantanal*. Embrapa, Brasília.
- Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R., Cushing, C.E. 1980. The river continuum concept. *Canadian Journal of fisheries and aquatic science* 37(1), 130-137.
- Wilkinson, L. 1998. *Systat: the system for statistics*. Systat Inc. Evanston, Illinois, USA.

ARTIGO III

RESPOSTAS DA HERBÁCEA AQUÁTICA AMAZÔNICA, *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock AO TEMPO DE EXPOSIÇÃO E À DOSAGEM DO PETRÓLEO CRU DE URUCU



Respostas da herbácea aquática amazônica, *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock, ao tempo de exposição e à dosagem do petróleo cru de Urucu

Aline Lopes^a

^a Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Departamento de Ecologia. Manaus, Brasil
alopes@inpa.gov.br

A redução da biomassa de Echinochloa polystachya em resposta a dosagem e ao tempo de exposição ao petróleo de Urucu pode indicar a presença deste na várzea.

Resumo

Os efeitos do petróleo cru de Urucu sobre o crescimento e a produção de biomassa da herbácea aquática amazônica *Echinochloa polystachya* foram estudados experimentalmente em casa de vegetação. *E. polystachya* foi plantada em frascos com 2 L de solo da várzea, aos quais foram adicionadas 5 dosagens de petróleo, distribuídas entre 0 e 50 mL por unidade amostral, tendo as mesmas sido avaliadas aos 1, 5, 10, 15 e 20 dias da exposição. Ao término do experimento foi verificada uma significativa diminuição da proporção de biomassa aérea viva/total, da umidade das folhas e aumento do número de folhas com comprometimento fitossanitário em resposta ao aumento da dosagem do petróleo. O aumento do tempo de exposição causou a diminuição do número de folhas, biomassa aérea, proporção de biomassa aérea viva/total, biomassa total e um aumento do número de folhas comprometidas e biomassa aérea morta. Foi verificada uma interação entre a dosagem e o tempo de exposição que contribuiu para a diminuição do número de folhas e da proporção de biomassa aérea viva/total. A biomassa de raízes e o comprimento das folhas não foram afetados pela exposição ao petróleo. Assim, devido a sua baixa tolerância ao petróleo cru de Urucu, *E. polystachya* responde rapidamente aos efeitos negativos desse poluente, podendo ser utilizada como indicadora de impacto do petróleo sobre as áreas de várzea da Amazônia Central.

Palavras-chave: áreas alagáveis, macrófitas aquáticas, petróleo, bioindicação.

1. Introdução

O derramamento de petróleo é um dos fatores que causam sérios riscos às áreas alagáveis em todo o mundo (Val & Almeida-Val, 1999), pois seus efeitos alteram a composição, diversidade e estrutura das comunidades, devido à sua ação diferencial sobre as espécies dominantes (Burk, 1977). Diante de eventos de graves proporções como o do petroleiro Exxon Valdez no Alasca e o Torrey Canyon na Inglaterra, constatou-se a necessidade de se prever possíveis impactos ecológicos decorrentes do derrame de petróleo e derivados (Peterson et al., 2003).

O óleo pode causar efeitos tóxicos físicos e químicos nas plantas (Pezeshki et al., 2000). Estudos de curto prazo mostram que o óleo causa bloqueio dos estômatos causando redução da respiração, transpiração e fotossíntese, resultando na perda das folhas e morte das plantas (Pezeshki & DeLaune, 1993; Pezeshki et al., 2001). Os óleos leves (como o de Urucu) atuam em nível celular, alterando a permeabilidade da membrana ou interrompendo vários processos do metabolismo da planta (Pezeshki et al., 2000). Deste modo, seus efeitos parecem ser imediatamente tóxicos às plantas, enquanto que os óleos mais pesados causam danos físicos, provocando asfixia e impedindo a troca de gases.

As plantas aquáticas sofrem, naturalmente, limitação de absorção de oxigênio pelas raízes (Armstrong, 1979), que é o primeiro fator limitante para o crescimento de plantas em áreas alagáveis (Mendelsohn & McKee, 1988; Pezeshki et al., 1989). Quando o óleo bloqueia os estômatos, a difusão de oxigênio para as raízes diminui, devido à interrupção do transporte de oxigênio atmosférico pelas folhas, aumentando o estresse de oxigênio das raízes. Da mesma forma, se o óleo atinge o substrato ele irá restringir o movimento de oxigênio dentro do solo, podendo resultar no aumento de atividades anaeróbicas e, assim, aumentar o estresse de oxigênio nas raízes (Ranwell, 1968).

Solos ricos em matéria orgânica, como o da várzea amazônica, proporcionam um maior tempo de exposição das plantas às toxinas, pois, a matéria orgânica lábil, forma assimilável pelas plantas, diminui a degradação do petróleo, substituindo os hidrocarbonetos como substrato para as bactérias consumidoras destes. Por outro lado, a matéria orgânica contaminada por toxinas torna-se menos disponível para a vegetação, diminuindo a capacidade de assimilação dos hidrocarbonetos pelas plantas, o que leva ao seu acúmulo no solo (Pezeshki et al., 2000) prolongando, com isso, seus efeitos. Lin & Mendelsohn (1996) encontraram 279 vezes maior quantidade de óleo em solos com matéria orgânica que sem

esta. Portanto, espera-se que a contaminação das várzeas provoque efeitos prolongados do petróleo nesses ambientes.

Diversas pesquisas têm utilizado plantas aquáticas para detectar possíveis contaminações (Watmough & Hutchinson, 1996; Martins et al., 1999), pois algumas espécies são extremamente sensíveis às alterações ambientais. Plantas com essas propriedades funcionam como bioindicadoras, ou seja, indicadoras de atividade química ou da decomposição de um sistema natural. Tais espécies são organismos que vivem exclusiva ou preferencialmente em determinados ambientes e são capazes, portanto, de caracterizar as propriedades físicas e químicas deste ambiente, indicando tanto as etapas do desenvolvimento das comunidades, quanto o nível de nutrientes do ecossistema aquático. Enquanto algumas espécies têm uma alta produtividade em ambientes eutrofizados como *Eichhornia crassipes* (Harley, 1990), outras como a *Mourera aspera* são encontradas somente em ambientes aquáticos pouco poluídos (Pedralli, 2003).

Na várzea próxima a Manaus foram identificadas 388 espécies de plantas herbáceas, pertencentes a 64 famílias e 182 gêneros. Dentre as espécies mais abundantes encontram-se as aquáticas flutuantes *Pistia stratiotes*, *Scirpus cubensis*, *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*; as semi-aquáticas *Echinochloa polystachya*, *Hymenachne amplexicaulis*, *Leersia hexandra*, *Oryza perennis* e *Paspalum repens*; e as terrestres *Alternanthera pilosa*, *A. brasiliana*, *Paspalum conjugatum*, *Ludwigia densiflora* e *Sorghum arundinaceum* (Junk & Piedade, 1997), o que proporciona muitas opções para a identificação de plantas com características para a fitorremediação ou bioindicação de contaminação por petróleo.

As gramíneas são comumente utilizadas para a recuperação de áreas contaminadas devido ao seu crescimento rápido e pela sua extensiva ramificação radicular que proporciona uma ampla superfície para a microbiota, facilitando a interação planta-microbiota (Hutchinson et al., 2001; Glick, 2003). A herbácea aquática emergente *Echinochloa polystachya* (canarana) forma grandes bancos monoespecíficos na planície alagável do Rio Amazonas, tendo o ciclo de vida controlado pelo pulso de inundação, constituindo-se na comunidade de plantas mais produtiva conhecida, atingindo cerca de 100 t ha⁻¹ (Piedade et al., 1991; 1992).

Estudos de dosagem-resposta são importantes particularmente se quisermos utilizar plantas como fitorremediadoras ou bioindicadoras, pois por meio destes é possível identificar as dosagens limitantes ao desenvolvimento das plantas. Além disso, os efeitos do petróleo sobre as plantas aquáticas, sobretudo sobre as espécies de grande importância ecológica,

permitem prever os efeitos de poluentes sobre a biodiversidade, e contribuem para o estabelecimento de custos e técnicas para a recuperação de áreas impactadas.

Neste estudo foi avaliado o efeito do petróleo de Urucu sobre o crescimento da herbácea aquática *E. polystachya*, com três objetivos principais: (1) Avaliar a magnitude das respostas das plantas expostas a diferentes dosagens de petróleo; (2) Avaliar o efeito do tempo de exposição sobre as respostas das plantas; (3) Avaliar o potencial da espécie para bioindicação em caso de vazamento de petróleo cru de Urucu.

2. Materiais e Métodos

2.1. Área de estudo

Echinochloa polystachya foi coletada manualmente na Ilha de Marchantaria (03.15S, 060.00W), na Amazônia Central, Amazonas-Brasil. O solo para o plantio foi coletado no mesmo local. O experimento foi realizado na casa de vegetação do Projeto INPA/Max-Planck, Manaus, Amazonas, Brasil, e a água utilizada para irrigação foi proveniente do poço artesiano localizado no mesmo local.

O petróleo utilizado foi proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas, Brasil. Este petróleo é considerado leve e de alta qualidade (ver artigo 1 para composição)

A herbácea aquática emergente, *E. polystachya* foi escolhida devido a sua ampla distribuição na planície de inundação, por ser nativa da Amazônia e por ser considerada fundamental para o ecossistema de várzea.

2.2. Desenho experimental

Foram coletadas plantas adultas, das quais foi cortado um colmo de aproximadamente 15 cm contendo um nó. Os propágulos foram plantados em frascos com 2 litros de solo da várzea (70,5% de argila, 17,92% de silte, 8,97% de área grossa, 2,61% de areia fina), onde permaneceram por 35 dias para crescimento.

Após o período de aclimação e crescimento, foi colocado petróleo na superfície do solo de cada um dos frascos, sem que este entrasse em contato direto com as folhas. As herbáceas foram distribuídas, aleatoriamente, por sorteio, nos tratamentos (Tabela 1).

O pH do solo foi mensurado por meio de pHmetro (Jenway) em cinco amostras de cada um dos tratamentos. As amostras consistiram de 10g de solo seco diluído com 25 mL de água destilada.

As unidades amostrais consistiram em 250 frascos plásticos de 20 cm de diâmetro e 18,5 cm de altura distribuídos em um experimento fatorial inteiramente casualizado 5x5 (dosagens de petróleo, tempos de exposição) com 10 réplicas para cada tratamento.

Tabela 1

Número de plantas mortas após a exposição ao petróleo de acordo com as dosagens aplicadas baseadas no volume por unidade amostral e no tempo (dias) de retirada de cada planta para biomassa.

tempo	Dosagem de petróleo (mL 2L ⁻¹ de substrato)				
	0	1,5	6	25	50
1	0	0	0	0	2
5	0	1	2	2	7
10	0	2	4	2	10
15	0	3	5	8	8
20	0	3	4	5	9

2.3. Parâmetros das respostas das plantas à toxicidade

2.3.1. Mortalidade

A planta foi considerada morta quando apresentou menos de 30% de área total verde. A mortalidade foi estimada pelo número de plantas que morreram em cada lote de 10 indivíduos, de acordo com o tratamento. A taxa de mortalidade em cada tratamento foi utilizada para indicar a sensibilidade da espécie ao petróleo.

2.3.2. Número de folhas saudáveis e com comprometimento fitossanitário.

A contagem do número de folhas indica o quanto à planta investiu em manutenção e produção de folhas. Além disso, foi verificado o número de folhas com comprometimento fitossanitário (folhas com menos de 30% da área verde).

2.3.3. Comprimento da folha

Foi medido o comprimento da maior folha de cada planta para indicar o quanto a planta investiu em crescimento no período experimental.

2.3.4. Altura da inserção da primeira folha

A altura entre o solo e a inserção da primeira folha foi utilizada para indicar o quanto a planta cresceu em determinado período de tempo.

2.3.5. Biomassa aérea

A biomassa acima do solo foi coletada, separada em componentes mortos e vivos, e seca em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir peso constante.

2.3.6. Biomassa de raízes

A biomassa das raízes foi coletada, cuidadosamente lavada e seca até peso constante. Não foi separado o material morto do vivo.

2.3.7. Percentagem de água nas folhas (U%)

Para calcular a U% foi utilizada a seguinte fórmula: $U\% = ((Pua - Psa)/Pua) * 100$. Onde: Pua = peso úmido da amostra em gramas (g), Psa = peso seco da amostra em gramas (g) e U% é a porcentagem de umidade presente em cada fração avaliada.

2.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Systat 10.2 (Wilkinson, 1998). A sobrevivência das plantas foi analisada utilizando o estimador não-paramétrico Kaplan-Meier. Este método estima a probabilidade de ocorrência de eventos ao longo de um período de tempo curto, de dias ou meses e os intervalos não precisam ser necessariamente igualmente espaçados. (Ayres & Ayres Jr., 1998). Para modelar a mortalidade das plantas em função dos fatores testados foi utilizado o método de superfície de resposta. Este método permite o agrupamento de n variáveis independentes, definindo um espaço de resposta n -dimensional com cada uma das variáveis em um eixo (Doehlert, 1970; Barros-Neto, 2003), permitindo assim que a interação entre esses fatores seja analisada coletivamente (Doehlert, 1970). As variáveis são escalonadas de forma que suas grandezas não interfiram no desenvolvimento do processo de otimização, segundo a função: $X_n = \frac{X - X_i}{\Delta X / 2}$, onde: X_n é a variável escalonada; X_i é o valor inicial; ΔX é o passo.

O efeito dos tratamentos foi analisado utilizando um modelo linear geral. Para analisar o efeito dos fatores dosagem e tempo de exposição foi utilizada Análise de Variância bifatorial (ANOVA). Para esta análise foram excluídas as plantas mortas e as expostas a dosagem de 50mL devido à morte de todas as plantas no tratamento de 10 dias (Tabela 1). Quando houve diferenças significativas entre os tratamentos ($\alpha < 0,05$), aplicou-se o teste *a posteriori* de Tukey para comparar as médias. Para as análises de efeito da dosagem em cada um dos tempos foram excluídas as plantas mortas e as expostas à dosagem de 50mL no tratamento de 10 dias e 20 dias devido a alta mortalidade nestes tratamentos. As diferenças significativas são relatadas no nível de 0,05 de probabilidade, a menos que indicadas de outra maneira. Com exceção dos dados de biomassa aérea morta, os dados de biomassa foram normalizados utilizando $\log(g)$, para obedecer aos pressupostos dos métodos empregados.

3. Resultados

Logo após a aplicação do petróleo cru de Urucu sobre o solo foi observado, nas plantas dos tratamentos de 25 e 50 mL, um escurecimento da base das folhas o que resultou na murcha e conseqüentemente na morte das plantas (Fig. 1). Essa mortalidade ocorreu apesar de as dosagens de petróleo utilizadas serem relativamente mais baixas que as utilizadas por outros autores com diferentes óleos e diferentes espécies de plantas.

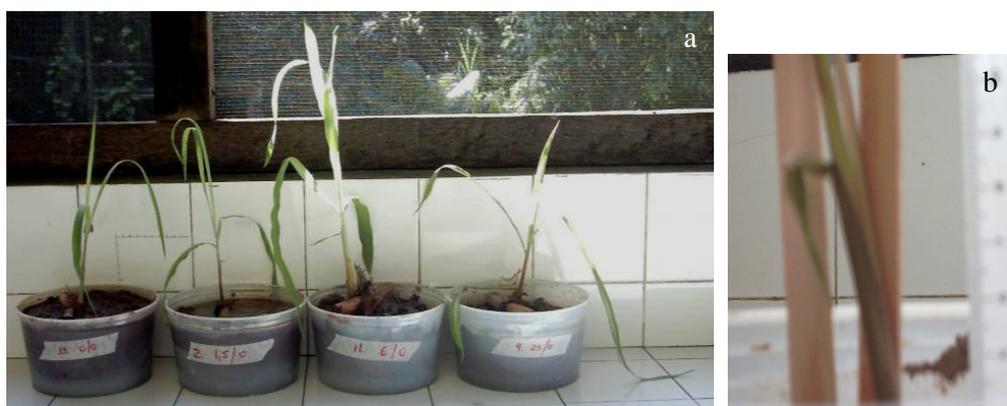


Fig. 1. a) *Echinochloa polystachya* nos tratamentos de 0, 1,5, 6 e 25 mL de petróleo $2L^{-1}$ de solo após 1 dia de exposição ao petróleo de Urucu; b) detalhe da base da folha de uma planta exposta a 25 mL de petróleo.

A análise de sobrevivência mostrou que a dosagem de petróleo causou uma diminuição significativa da sobrevivência de *E. polystachya* ($t_{(245)} = 4,141$, $p < 0,001$) ao longo do tempo de exposição. Na figura 2 é apresentada a superfície de resposta, na qual são ilustradas as curvas com as percentagens de morte em função da dosagem de petróleo e do tempo de exposição. A mortalidade foi modelada segundo uma equação polinomial de segunda ordem: **Morte = 4.595 + 2.37*x + 2.754*y + 1.027*x*x + 0.613*x*y - 2.04*y*y**, onde a mortalidade é expressa em função da dosagem de petróleo (x) e do tempo de exposição (y). Por meio desta modelagem pode-se estimar que dosagens de 300mL em apenas 9,6 dias de exposição seriam limitantes para esta espécie causando quase 100% de mortalidade. Além disso, morte de *E. polystachya* aumentou em 60% quando o tempo de exposição aumentou de 5 para 20 dias e 20% quando a dosagem aumentou de 1,5 mL para 50 mL de petróleo. A interação dos dois fatores resultou em um aumento de 20% na mortalidade das plantas.

O incremento de folhas das plantas que sobreviveram foi afetado pela dosagem de petróleo e pelo tempo de exposição (Tabela 2). A análise de cada tempo separadamente mostrou que após 10 dias de exposição houve uma diminuição significativa do número de folhas no tratamento de 25 mL ($F_{(3, 28)} = 4,270$, $p = 0,013$). Com 15 dias de exposição houve redução significativa do número de folhas ($F_{(4, 21)} = 2,932$, $p = 0,045$; Fig. 3).

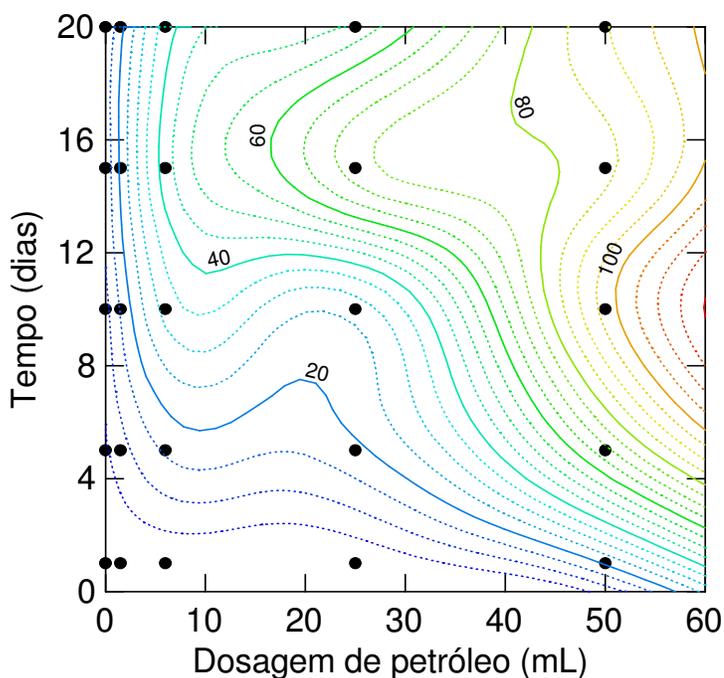


Fig. 2. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre a mortalidade (%) de *Echinochloa polystachya*. Os pontos escuros são as dosagens e tempos amostrados.

Houve um aumento significativo de folhas com comprometimento fitossanitário em função da dosagem e do tempo de exposição (Tabela 2). A análise do efeito da dosagem do petróleo de Urucu nos diferentes tempos mostrou que o petróleo causa um aumento de folhas com comprometimento fitossanitário após 1 dia de exposição ($F_{(4, 43)} = 2,986$, $p = 0,029$) no tratamento de 50 mL em relação ao controle e após 5 dias de exposição houve diferença significativa do número de folhas com comprometimento em relação ao controle na dosagem de 25 mL ($F_{(4, 33)} = 3,050$, $p = 0,03$; Fig. 4).

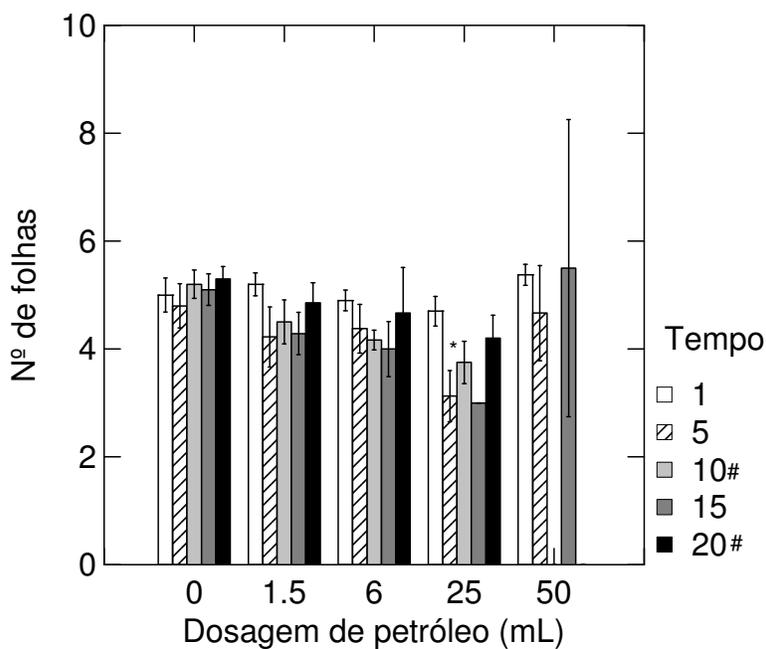


Fig. 3. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre o número de folhas de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão.* indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.

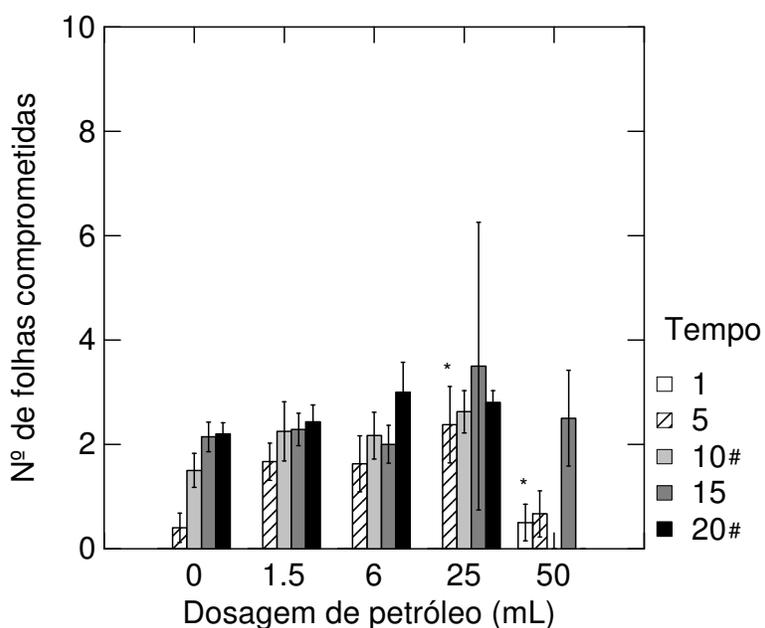


Fig. 4. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre o número de folhas com comprometimento fitossanitário de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão. * indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.

O comprimento da folha de *E. polystachya* exposta ao petróleo de Urucu não foi afetado pela dosagem de petróleo nem pelo tempo de exposição (Tabela 2). Entretanto a dosagem apresentou efeito significativo após 5 dias de exposição ($F_{(4, 33)} = 3,104$, $p = 0,028$; Fig. 5). Já a altura da inserção da primeira folha mostrou-se relacionada somente com o tempo de exposição (Tabela 2), embora também tenha apresentado efeito significativo da dosagem, após 5 dias de exposição ($F_{(4, 33)} = 6,803$, $p < 0,0001$).

Tabela 2

Resultados da ANOVA para as variáveis dependentes em relação aos fatores dosagem de petróleo (Dose) e tempo de exposição (Tempo), e as interações entre os fatores (interação). g.l. (graus de liberdade)

<i>Variável dependente</i>	Fator	g.l.	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Nº de folhas</i>	Dose	3	9,655	<0,0001
	Tempo	4	4,305	0,003
	Interação	12	0,718	0,732
	Erro	139		
<i>Nº de folhas com comprometimento fitossanitário</i>	Dose	3	8,354	<0,0001
	Tempo	4	39,226	<0,0001
	Interação	12	1,197	0,291
	Erro	139		
<i>Comprimento da folha</i>	Dose	3	0,306	0,820
	Tempo	4	1,804	0,131
	Interação	12	0,685	0,763
	Erro	139		
<i>Altura da inserção da primeira folha</i>	Dose	3	1,468	0,225
	Tempo	4	12,445	<0,0001
	Interação	12	0,822	0,627
	Erro	139		

Na figura 6 podemos notar que a biomassa aérea, apesar de não apresentar diferença significativa em relação à dosagem, apresentou um aumento significativo com o tempo (Tabela 3). Novamente, após 5 dias de exposição o tratamento de 25mL mostrou diferença significativa com o controle ($F_{(4, 33)} = 3,434$, $p = 0,019$) e após 15 dias nos tratamento de 50 mL ($F_{(4, 21)} = 18,470$, $p < 0,0001$). Entretanto, houve uma diminuição significativa da umidade das folhas (U%) em função da dosagem de petróleo e do tempo de exposição (Tabela 3), sendo encontrado no tratamento de 25mL 86,3% da umidade, após 1 dia de exposição, e 80% após 20 dias de exposição. Tanto a biomassa de raízes quanto o pH do solo não apresentaram diferença significativa nem em decorrência da dosagem de petróleo, nem relacionada ao tempo de exposição (Tabela 3). O pH do solo em todos os tratamentos foi ácido, com valores médios no tratamento de 20 dias de 5,27 ($\pm 0,6$) no controle, 5,07 ($\pm 0,28$) no tratamento de 1,5

mL, 5,07 ($\pm 0,19$) no tratamento de 6mL, 5,39 ($\pm 0,33$) no tratamento de 25 mL e 5,4 ($\pm 0,17$) no tratamento de 50 mL.

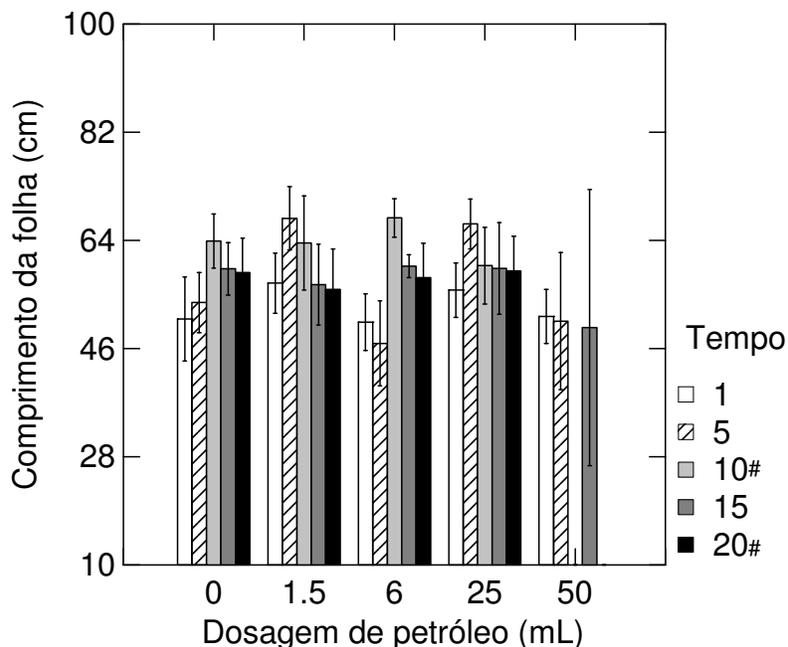


Fig. 5. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre o comprimento de folhas de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.

Houve efeito significativo tanto da dosagem de petróleo quanto do tempo de exposição sobre a produção de biomassa aérea morta de *E. polystachya* (Tabela 3). O petróleo causou um aumento na produção de biomassa aérea morta após 15 dias de exposição ($F_{(4, 42)} = 2.932$, $p = 0,045$), houve também um aumento significativo no tratamento de 25mL após 20 dias ($F_{(3, 24)} = 3.264$, $p = 0,039$) como apresentado na figura 7.

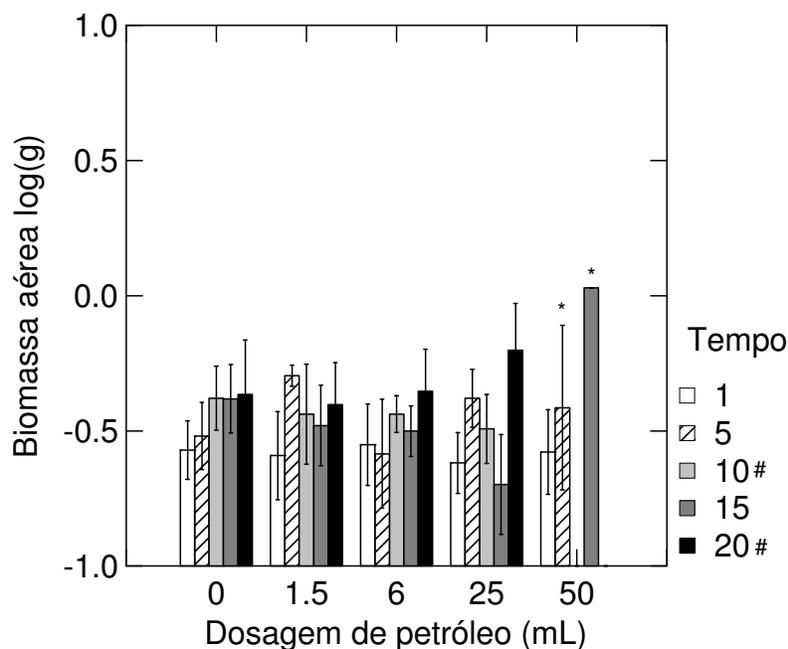


Fig. 6. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre a biomassa aérea de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão. * indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.

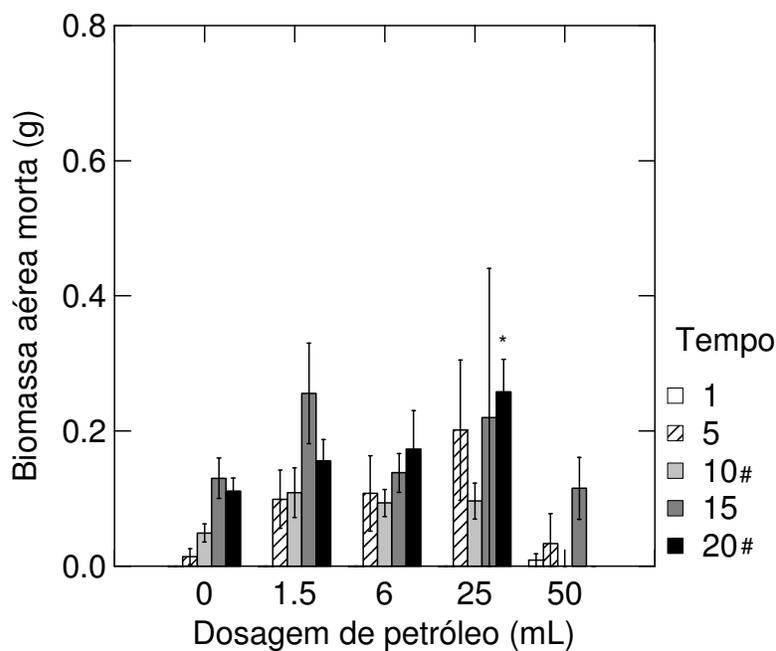


Fig. 7. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre a biomassa aérea morta de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão. * indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.

Não houve efeito significativo da dosagem do petróleo sobre a biomassa total de *E. polystachya*, embora tenha ocorrido diferença significativa entre os tempos de exposição (Tabela 2). Como o efeito da dosagem do petróleo sobre a biomassa total muitas vezes é mascarado porque, enquanto a biomassa viva diminui a biomassa morta aumenta, alguns autores utilizam a proporção biomassa viva/biomassa total para avaliar o efeito do petróleo sobre a biomassa das plantas (Lin e Mendelsohn, 1996). Quando foi analisado o efeito do petróleo cru de Urucu sobre a proporção de biomassa aérea viva/total houve efeito tanto da dosagem quanto do tempo de exposição, e observou-se a interação entre esses fatores, o que causou uma diminuição na proporção de biomassa viva em relação à total (Tabela 3). Além disso, houve um efeito significativo desta diminuição a partir de 15 dias de exposição no tratamento de 50 mL ($F_{(4, 21)} = 9,747, p < 0,0001$; Fig. 8).

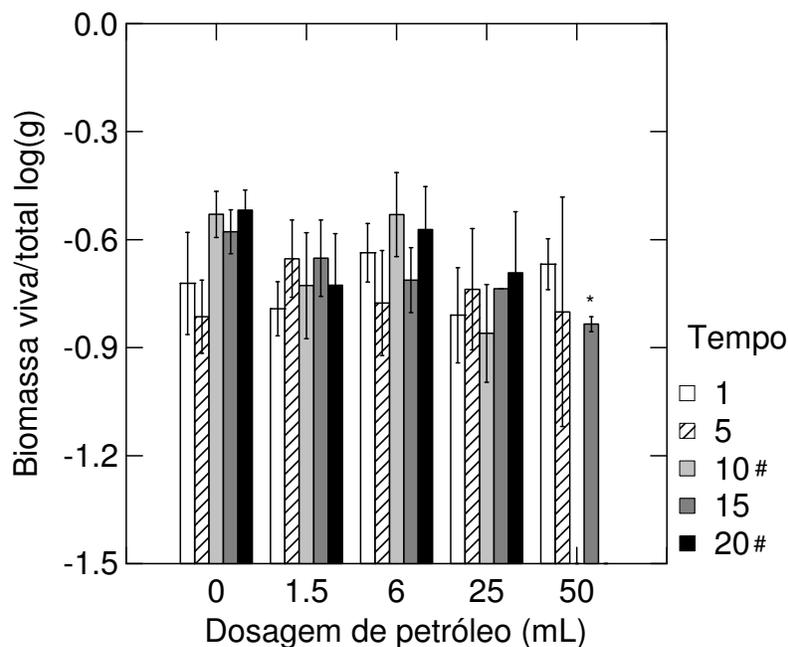


Fig. 8. Efeito da dosagem do petróleo ($\text{mL } 2\text{L}^{-1}$ solo) e do tempo de exposição (dias) sobre a proporção de biomassa aérea viva/ biomassa aérea total de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão. * indicam tratamentos com diferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao controle. # foi excluída a dosagem de 50 mL destes tempos devido a alta mortalidade.

Tabela 3

Resultados da ANOVA para as variáveis dependentes em relação aos fatores dosagem de petróleo (Dose) e tempo de exposição (Tempo), e as interações entre os fatores (interação). g.l. (graus de liberdade)

<i>Variável dependente</i>	Fator	g.l.	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Biomassa aérea</i>	Dose	3	0,058	0,982
	Tempo	4	5,368	0,000
	Interação	12	0,492	0,917
	Erro	139		
<i>Porcentagem de Umidade das folhas</i>	Dose	3	33,968	0,015
	Tempo	4	136,619	0,000
	Interação	12	9,596	0,437
	Erro	139	9,436	
<i>Biomassa de raízes</i>	Dose	3	0,316	0,813
	Tempo	4	12,055	0,000
	Interação	12	0,247	0,995
	Erro	139		
<i>Biomassa aérea morta</i>	Dose	3	6,767	<0,0001
	Tempo	4	15,893	<0,0001
	Interação	12	1,353	0,196
	Erro	139		
<i>Biomassa total</i>	Dose	3	2,375	0,073
	Tempo	4	4,137	0,003
	Interação	12	0,432	0,948
	Erro	139		
<i>Proporção biomassa aérea viva/total</i>	Dose	3	5,031	0,002
	Tempo	4	1,178	0,323
	Interação	12	0,758	0,693
	Erro	139		
<i>pH do solo</i>	Dose	4	0,629	0,643
	Tempo	4	4,232	0,003
	Interação	16	1,133	0,335
	Erro	105		

4. Discussão

Os resultados do presente estudo mostram claramente que o petróleo cru de Urucu quando aplicado sobre o solo causa impactos muito severos à *E. polystachya* em condições experimentais controladas. O crescimento de macrófitas aquáticas é diretamente proporcional à intensidade e quantidade de luz e nutrientes disponíveis (Petruccio & Esteves, 2000). No presente estudo, o cultivo de *E. polystachya* nos frascos foi realizado em casa de vegetação a qual possuía uma cobertura transparente para impedir a entrada de água da chuva e permitir a radiação solar, usando solo da várzea, reconhecidamente rico em nutrientes (Furch & Junk 1997), como substrato. Além disso, as plantas foram irrigadas diariamente para evitar o estresse hídrico. Portanto, como as condições oferecidas eram propícias para o desenvolvimento das plantas ficou claro que as diferenças encontradas entre os tratamentos com diferentes dosagens de petróleo deveram-se ao efeito deste sobre as plantas.

A sensibilidade das plantas a diferentes tipos de óleo é relatada por diversos autores (Mendelssohn & Mckee, 1988; Pezeshki & DeLaune, 1993; Lin & Mendelssohn, 1996; Pezeshki et al, 2000; Li et al., 2002, Ko & Day, 2004). Como algumas plantas são muito resistentes a poluentes esta diferença de sensibilidade resulta em mudança da composição florística das áreas afetadas. Lin & Mendelssohn (1996) observaram que *Spartina patens* é mais sensível que *S. alterniflora* quando exposta ao petróleo cru da Louisiana, ocorrendo a morte de todas as plantas desta espécie em dosagens acima de 8 L m^{-2} solo. O presente estudo mostrou que o petróleo cru de Urucu, quando derramado na superfície do solo, ocasiona a morte de 90% das plantas em 20 dias de exposição a $25 \text{ mL } 2\text{L}^{-1}$ de solo ($2,64 \text{ L m}^{-2}$ solo), evidenciando a alta sensibilidade desta espécie a este tipo de petróleo.

Como relatado por diversos autores, os efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na vegetação dependem geralmente do volume de óleo que entrou em contato com esta ou da sua concentração no solo (Lin & Mendelssohn, 1996; Pezeshki et al, 2000; Lin et al., 2002). A dosagem do petróleo de Urucu mostrou ser um importante agravante do efeito deste para *E. polystachya*, pois enquanto que $25 \text{ mL } 2\text{L}^{-1}$ solo causaram redução do número de folhas e da altura de inserção das folhas e aumento do número de folhas comprometidas, $50 \text{ mL } 2\text{L}^{-1}$ solo causaram, além deste efeitos, diminuição da biomassa aérea, biomassa total e da proporção de biomassa viva/total, além de ser limitante para a sobrevivência das plantas. Outra evidência do efeito da dosagem pôde ser constatada pela análise de superfície de resposta que mostrou que *E. polystachya* teve a sua mortalidade aumentada em 20% quando a dosagem de petróleo aumentou de 1,5 mL para 50 mL por unidade experimental.

A intensidade do dano do petróleo varia com o número de fatores bióticos e abióticos envolvidos, incluindo o tipo e a quantidade do óleo, as espécies atingidas, a extensão da lâmina de óleo, a estação em que ocorreu o derramamento, as condições climáticas, entre outros (Burk, 1977; Mendelssohn e Mckee, 1988, Lin & Mendelssohn, 1996; Pezeshki et al, 2000). O tempo de exposição mostrou ser um fator determinante para a gravidade dos efeitos do petróleo sobre *E. polystachya*, tendo maximizado o efeito da dosagem de petróleo. A ação conjunta da dosagem com o tempo de exposição afetou importantes indicativos do crescimento da planta como o número de folhas e a proporção biomassa aérea viva/total. O efeito do tempo de exposição também foi determinante para a mortalidade desta espécie, pois o aumento de 5 dias para 20 dias de exposição aumentou em 60% a mortalidade das plantas.

Além de ocorrer uma alta mortalidade, as plantas que sobreviveram tiveram o seu crescimento prejudicado. Isto foi evidenciado pela redução da proporção de biomassa aérea

viva/total, que após 15 dias de exposição foi 57,2% maior no controle que no tratamento com 25 mL de petróleo. Lin e Mendelssohn (1996) demonstraram que foi necessária uma dosagem de 8 L m^{-2} (400mL por unidade amostral) de petróleo cru da Louisiana para haver uma diminuição da proporção biomassa viva/morta desta espécie após um ano de aplicação. Para *E. polystachya* no presente estudo, dosagens de apenas 50mL de petróleo por unidade amostral foram suficientes para causar uma diminuição significativa da proporção de biomassa aérea viva/total após 15 dias de exposição.

O efeito de inibição causado pelo petróleo sobre o crescimento das plantas, particularmente sobre o crescimento de raízes, é relatado por vários autores (Xu & Johnson, 1995; Lin e Mendelssohn, 1996; Lin et al., 2002; Merkl et al. 2005). Lin e Mendelssohn (1996) encontraram um efeito inibitório do petróleo da Louisiana, em dosagens de 16 e 24 L m^{-2} de solo, sobre a biomassa total das raízes de *Spartina alterniflora* e *S. patens* após um ano de aplicação, enquanto que dosagens mais baixas não provocaram nenhum efeito. Já Lin et al. (2002) encontraram redução da biomassa de raízes de *S. alterniflora* pelo óleo Nº 2 em dosagens de $0,3 \text{ L m}^{-2}$ de solo. No presente estudo não foi encontrada relação entre a biomassa das raízes e a dosagem de petróleo. Isso pode ter ocorrido devido ao tempo de exposição que foi de apenas 20 dias, e por *E. polystachya* não possuir normalmente uma massa radicular acentuada (Piedade et al. 1991).

Os efeitos indiretos da contaminação das plantas pelo petróleo ocorrem principalmente pela decomposição da biomassa contaminada que causa alterações na microbiota do solo, afetando a remineralização dos nutrientes (Pezeshki et al, 2000). Lin e Mendelssohn (1996) encontraram efeito do petróleo da Louisiana, em dosagens de 16 e 24 L m^{-2} solo, sobre *Spartina alterniflora* e *S. patens* com aumento da biomassa aérea morta após um ano da aplicação. No presente estudo, dosagens de 25 mL de petróleo por unidade amostral ($2,64 \text{ L m}^{-2}$ solo) em 20 dias de exposição foram suficientes para aumentar a biomassa aérea morta de *E. polystachya*, confirmando novamente a alta sensibilidade desta espécie.

Victório et al. (2006) em um estudo realizado em Rio Claro, São Paulo, com a exposição da macrófita aquática submersa enraizada *Egeria densa* ao petróleo de Urucu, encontraram um aumento de biomassa total em tratamentos com dosagens de $0,061 \text{ L m}^{-2}$ de água e $0,122 \text{ L m}^{-2}$ de água em relação ao controle em um período de 20 dias, sugerindo que essa planta é beneficiada pela exposição ao petróleo. O mesmo não ocorreu com *E. polystachya*, pois em nenhuma das dosagens utilizada e em nenhum dos tempos amostrados, a

planta apresentou diferenças positivas significativas em sua biomassa total, sendo, portanto mais sensível ao petróleo de Urucu que *E. densa*.

A eliminação de indivíduos jovens de *E. polystachya* por dosagens relativamente baixas de petróleo indica que caso ocorra um derramamento de petróleo na várzea durante o período de rebrota das plantas essas seriam extremamente afetadas. Consequentemente, a ciclagem de nutrientes nessas áreas alagáveis viria a ser drasticamente alterada, já que esta herbácea é a principal espécie produtora de biomassa nesses ambientes (Piedade et al. 1992). Dado o papel ecossistêmico de *E. polystachya* no ciclo de carbono da várzea, um acidente grave com derramamento de petróleo de Urucu, fatalmente terá importantes implicações negativas no balanço de carbono dessas áreas e, eventualmente, de outras regiões da bacia Amazônica.

5. Conclusão

A dosagem e o tempo de exposição ao óleo são muito importantes para determinar o impacto do petróleo na vegetação. Baixas dosagens de petróleo podem causar redução do número de folhas e da proporção biomassa aérea viva/total das plantas, enquanto que altas dosagem podem causar até mesmo a morte destas. Baixas dosagens do petróleo de Urucu, como 1,5 e 6 mL 2L⁻¹ de solo, apesar de causarem a morte de algumas plantas não apresentaram outros efeitos significativos sobre elas. Dosagens moderadas, como 25 mL 2L⁻¹ de solo causam redução do número de folhas, aumento do número de folhas comprometidas e aumento da altura de inserção da primeira folha. Dosagens mais altas como 50 mL 2L⁻¹ de solo, além de afetar esses parâmetros, causam diminuição da biomassa aérea e da proporção biomassa aérea viva/total. Como o tempo de exposição foi determinante para o impacto do petróleo sobre as plantas, a diminuição da densidade de *E. polystachya* pode indicar uma contaminação do ambiente por petróleo. Estudo complementares, em campo, são necessários para confirmar o potencial desta planta como bioindicadora.

Agradecimentos

Os recursos necessários para este estudo foram providos pelo Projeto INPA/Max-Planck, PPI 1090-5, e o petróleo cedido pela Petrobrás através do Projeto PIATAM. Agradeço ao CNPq pela Bolsa de Mestrado de Aline Lopes. Meus agradecimentos à equipe do Projeto

INPA/Max-Planck e do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução (LEEM), principalmente a Dra. Vera Val pela valorosa contribuição nas discussões desde o planejamento do projeto e pela infraestutura cedida, aos técnicos Valdenei, Lucia e Celso agradeço pelo auxílio na coleta dos dados e aos barqueiros Mário e Luiz pelo auxílio em campo.

Referências

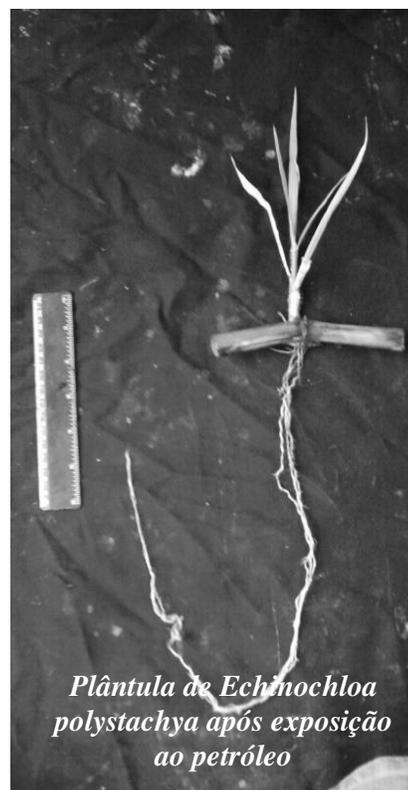
- Armstrong, W., 1979. Aeration in higher plants. *Advances Botanical in Research*. 7, 225-332.
- Ayres, M., Ayres Jr., M. A., 1998. *BioEstat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Sociedade Civil Mamirauá/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Manaus.
- Barros-Neto, B. de, Scarminio, I. S., Brung, R. E., 2003. *Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Unicamp, Campinas.
- Burk, C. J., 1977. A four year analysis of vegetation following an oil spill in a freshwater marsh. *The Journal of Applied Ecology* 14, 515-522.
- Furch, K., Junk, W.J., 1997. The Chemical Composition, Food Value, and Decomposition of Herbaceous Plants, Leaves, and litter of floodplain forests, in: Junk, W. J. (Ed.) *The Central Amazon Floodplain*. Springer-Verlag, New York 126, 187– 205.
- Glick, B.R., 2003. Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* 21, 383-393.
- Harley, K. L. S., 1990. The role of biological control in the management of water hyacinth. *Biocontrol News and Information* 11, 11–22.
- Hutchinson, S. L., Banks, M. K., Shwab, A.P., 2001. Phytoremediation of age petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. *Journal of Environmental Quality* 30, 395-403.
- Junk, W.J., Piedade, M. T., 1997. Plant life in the floodplain with special reference to herbaceous plants, in: Junk, W. J. (Ed.) *The Central Amazon Floodplain*, Springer-Verlag, New York 126, 147– 181.
- Ko, J.-Y., Day, J. W., 2004. A review of ecological impacts of oil and gas development on coastal ecosystems in the Mississippi Delta. *Ocean , Coastal Management* 47, 597–623.
- Lin, Q., Mendelssohn, I. A., 1996. A comparative investigation of the effects of Louisiana crude oil on the vegetation of fresh, brackish, and salt marsh. *Marine Pollution Bulletin* 32 (2), 202–209.

- Lin, Q., Mendelsohn, I.A., 1998. The combined effects of phytoremediation and biostimulation in enhancing hábitat restoration and oil degradation of petroleum contaminated wetlands. *Ecological Engineering* 10, 263–274.
- Lin, Q., Mendelsohn, I. A., Suidam, M. T., Lee, K. , Venosa, A.D. 2002. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Marine Pollution Bulletin* 44, 897-902.
- Merkel, N., Schlütze-Kraft, R., Infante, C., 2005. Phytoremediation of petroleum-contaminated soil in the tropics assessment tropical grasses and legumes for enhancing oil-degradation. *Water, Air and Soil Pollution* 165, 195-209.
- Martins, V. J., Artaxo, P., Ferraz, E. S. B., Tabacniks, M. H. 1999. Chronological studies of tree-rings from the Amazon basin using thick target PIXE and proton backscattering analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 150, 240– 247.
- Mendelsohn, I. A., McKee, K. L., 1988. *Spartina alterniflora* dieback in Louisiana: time-course investigation of soil waterlogging effects. *The Journal of Ecology* 76, 509-521.
- Pedralli, G., 2003. Macrófitas aquáticas como bioindicadoras da qualidade da água: alternativas para usos múltiplos de reservatórios, in: IN Thomaz, S. M., Bini, L. M. (Eds.) *Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas*. Universidade estadual de Maringá, EDUEM, Maringá 171-188.
- Peterson, C. H., Rice, S. D., Short, J. W., Esler, D., Bodkin, J. L., Ballachey, B. E. , Irons, D. B. 2003. Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science* 302, 2082-2086.
- Petruccio, M. M., Esteves, F. A. 2000. Uptake rates of nitrogen and phosphorus in the water by *Eichhornia crassipes* and *Salvinia auriculata*. *Revista Brasileira de Biologia* 60 (2), 229-236.
- Pezeshki, S. R., DeLaune, R. D., Patrick Jr., W. H., 1989. Effect of fluctuating rhizosphere redox potential on carbon assimilation of *Spartina alterniflora*. *Oecologia* 80, 132-135.
- Pezeshki, S. R., DeLaune, R. D., 1993. Effect of crude oil on gas exchange functions of *Juncus roemerianus* and *Spartina alterniflora*. *Water, Air, and Soil Pollution* 68, 461-468.
- Pezeshki, S. R., Hester, M. W., Lin, Q., Nyman, J.A., 2000. The effect of oil spill and cleanup on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environment Pollution* 180, 129–139.

- Pezeshki, S. R., DeLaune, R. D., Jugsujinda, A. 2001. The effect of crude oil and the effectiveness of cleaner application following oiling on US Gulf of Mexico coastal marsh plants. *Environment Pollution* 112, 483–489.
- Piedade, M. T. F., Junk, W. J., Long, S. P. 1991. The productivity of the C4 grass *Echinochloa polystachya* on the Amazon floodplain. *Ecology* 72(4), 1456-1463.
- Piedade, M. T. F., Junk, W. J., Mello, J. A. S. N. 1992. A floodplain grassland of the Central Amazon, in: Long, S. P., Jones, M. B., Roberts, J. M. (Eds.). *Productivity of grass ecosystems of the Tropics and Sub-Tropics*. Chapman , Hall/UNEP, London 127-158.
- Pott, V. J., Pott, A., 2000. *Plantas Aquáticas do Pantanal*. Embrapa, Brasília.
- Ranwell, D. S., 1968. Lichen mortality due to 'Torrey Canyon' oil and decontamination measures. *Lichenologist* 4, 55-56.
- Val, A. L., Almeida-Val, V. M., 1999. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon, in: Val , A. L., Almeida-Val, V. M. F. (Eds.) *Biology of Tropical Fishes*, INPA, Manaus 22, 277-291.
- Victorio, S. S., Camargo, A. F. M., Henry-Silva, G. G. 2006. Influência de diferentes concentrações de petróleo sobre macrófita aquática submersa enraizada *Egeria densa*. Livro de Resumos da Reunião Anual de Avaliação PRH-ANP 2006 117-120.
- Watmough, S.A., Hutchinson, T. C., 1996. Analysis of tree rings using inductively coupled plasma mass spectrometry to record fluctuations in a metal pollution episode. *Environmental Pollution* 93, 93 –102.
- Wilkinson, L. 1998. *Systat: the system for statistics*. Systat Inc. Evanston, Illinois, USA.

ARTIGO IV

ESTABELECIMENTO DE *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO CRU DE URUCU



Estabelecimento de *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock em solo contaminado com petróleo cru de Urucu

Aline Lopes^a

^a Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Departamento de Ecologia. Manaus, Brasil
alopes@inpa.gov.br

O petróleo cru de Urucu, em um curto período de tempo, reduz o rebrotamento de Echinochloa polystachya plantada em solo contaminado.

Resumo

Foram estudados os efeitos do petróleo cru de Urucu e de dois períodos de plantio, A (julho a setembro) e B (setembro a novembro) sobre o rebrotamento e crescimento da herbácea aquática, *Echinochloa polystachya*, por meio do seu plantio em frascos com 2 L de solo contaminado pela mistura de 7 dosagens de petróleo, distribuídas entre 0 e 50 mL, durante 63 dias. Em resposta ao aumento da dosagem do petróleo, houve diminuição da biomassa total, da biomassa aérea viva/total, da biomassa aérea, comprimento da folha, altura de inserção da primeira folha e do número de folhas. O período de plantio influenciou a resposta das plantas à dosagem aplicada devido às alterações climáticas, com efeitos negativos acentuados no período B, de temperaturas mais elevadas. O aumento do tempo de exposição causou diminuição do número de brotos, número de folhas, comprimento da folha, altura de inserção da primeira folha e aumento do número de folhas comprometidas. A interação entre dosagem e tempo de exposição contribuiu, no período B, para diminuição do número de brotos, número de folhas, comprimento da folha, altura de inserção da primeira folha e aumento do número de folhas com comprometimento fitossanitário. Durante o período A houve redução do número de brotos e da altura de inserção da primeira folha. Assim, *E. polystachya* só pode ser indicada para fitorremediação de solos contaminados com baixas dosagens de petróleo cru de Urucu.

Palavras-chave: áreas alagáveis, macrófitas aquáticas, petróleo, fitorremediação.

1. Introdução

A recuperação de áreas contaminadas por atividades humanas pode ser feita por vários métodos, tais como, escavação, incineração, extração com solvente, oxidoredução e outros que podem ser bastante dispendiosos. Alguns processos deslocam a matéria contaminada para locais distantes, causando riscos de contaminação secundária, aumentando ainda mais os custos do tratamento (Cunningham et al., 1995), e causando mais danos à vegetação, devido a necessidade de tráfego de máquinas e o constante pisoteio humano (Pezeshki et al., 2000). Por isso, atualmente, tem-se dado preferência a métodos que perturbem menos o ambiente e sejam mais econômicos. Dentro deste contexto, surge a fitorremediação como alternativa capaz de empregar sistemas vegetais fotossintetizantes e sua microbiota associada, com a finalidade de desintoxicar ambientes degradados ou poluídos (Dinardi et al, 2003).

As substâncias alvo da fitorremediação incluem metais, compostos inorgânicos, elementos químicos radioativos, hidrocarbonetos derivados do petróleo, pesticidas, herbicidas, solventes clorados, resíduos orgânicos industriais, entre outros (Cunningham et al., 1995). Yateem et al. (1999) testaram três espécies de plantas domésticas, *Vicia faba*, *Medicago sativa* e *Lolium perenne* para fitorremediar solos contaminados com petróleo durante a Guerra do Golfo, sendo que, *V. faba* e *M. sativa* apresentaram uma alta taxa de degradação do óleo.

A fitorremediação oferece várias vantagens que devem ser consideradas, como a capacidade de tratar grandes áreas de diversas formas, a baixo custo, com possibilidades de remediar águas contaminadas, o solo e o subsolo, e ao mesmo tempo embelezar o ambiente. Para isso, a concentração do poluente e a presença de toxinas devem estar dentro dos limites de tolerância da planta usada para não comprometer o tratamento. Os riscos de que os vegetais venham a entrar na cadeia alimentar devem ser considerados ao empregar esta tecnologia. Além disso, o tempo para se obter resultados satisfatórios pode ser longo (Cunningham et al., 1995).

O sucesso do tratamento empregando plantas aquáticas reside nas inúmeras possibilidades de reciclagem da biomassa produzida, que pode ser utilizada como fertilizante, ração animal, geração de energia (biogás ou queima direta), fabricação de papel, extração de proteínas para uso em rações, extração de substâncias quimicamente ativas de suas raízes para uso como estimulante de crescimento de plantas, entre outros (Dinardi et al, 2003).

Diversas pesquisas têm utilizado plantas aquáticas para detectar possíveis contaminações (Watmough & Hutchinson, 1996; Martins et al., 1999) e encontrar meios que possibilitem a descontaminação do ambiente (Dushenkov et al., 1997; Gisbert et al., 2003; Kirk et al., 2005) seja por meio da fitoextração, que consiste no armazenamento de metais (Cd, Ni, Cu, Zn, Pb) e compostos orgânicos na biomassa da planta, ou pela fitodegradação de compostos orgânicos. As gramíneas são comumente utilizadas para a fitorremediação devido ao seu crescimento rápido e pela sua extensiva ramificação radicular que proporciona uma ampla superfície para a microbiota, facilitando a interação planta-microbiota (Hutchinson et al., 2001; Glick, 2003).

Para que haja eficácia na fitorremediação de uma área é necessária a realização de estudos prévios acerca da toxicidade dos poluentes sobre as plantas, porque as vantagens da fitorremediação podem ser neutralizadas pelo efeito tóxico do contaminante, alterando não somente o acúmulo de biomassa como também a morfologia das plantas (Merlk et al., 2005).

Trabalhos realizados em regiões temperadas mostraram que a sazonalidade influencia o impacto do óleo na vegetação (Pezeshki et al., 2000), como ocorre com *S. alterniflora*, na foz do Mississipi, para a qual um maior efeito do derramamento de óleo Nº 2 foi observado em maio, período de crescimento das plantas, em comparação a novembro, final do período de crescimento. Além disso, na maioria dos estudos, as plantas mostraram-se mais sensíveis à limpeza do óleo no período de crescimento que durante a pré-dormência e dormência. Isto ocorre porque durante a estação de crescimento os processos metabólicos nas plantas são intensos e fundamentais para o bom desenvolvimento do indivíduo adulto e, sob tais circunstâncias, o estresse da exposição ao petróleo pode levar à interrupção ou ao comprometimento irreversível de funções fisiológicas vitais (Pezeshki et al., 2000).

Na Amazônia, a vegetação das áreas alagáveis é estruturada pelo pulso de inundação (Junk et al., 1989), notadamente em função da marcada sazonalidade de crescimento e decomposição das herbáceas aquáticas. Espécies como *E. polystachya*, que rebrotam durante a fase terrestre, podem ser fortemente afetadas por um derramamento de petróleo nesse período, com conseqüências mais graves do que aquelas da fase aquática, quando as plantas são adultas.

Este estudo se propôs a avaliar a capacidade de rebrotamento e de crescimento de propágulos de *Echinochloa polystachya* e sua potencialidade para o uso prático na fitorremediação de solo contaminado por petróleo cru de Urucu, verificando, para tal, os

efeitos: a) das dosagens de petróleo; b) do tempo de exposição; c) do período de coleta/plantio dos propágulos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Área de estudo

A macrófita aquática perene *Echinochloa polystachya* foi coletada manualmente com o auxílio de tesoura de poda e terçado na Ilha da Marchantaria (03°.15'S, 060°.00'W), na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. Foram realizadas duas coletas, a primeira no mês de julho e a segunda no mês de setembro.

A hidrografia do Rio Amazonas é muito regular, exibindo uma curva de inundação monomodal e senoidal (Junk et al., 1989; Fig. 1). As áreas que oscilam entre terrestre e aquática dependendo no nível das águas do rio são denominadas de zona de transição aquático-terrestre (Junk et al., 1989). A oscilação média entre as fases aquática e terrestre é de 10m. A fase aquática ocorre normalmente entre maio e julho e a fase terrestre entre setembro e dezembro (Irion et. al., 1997).

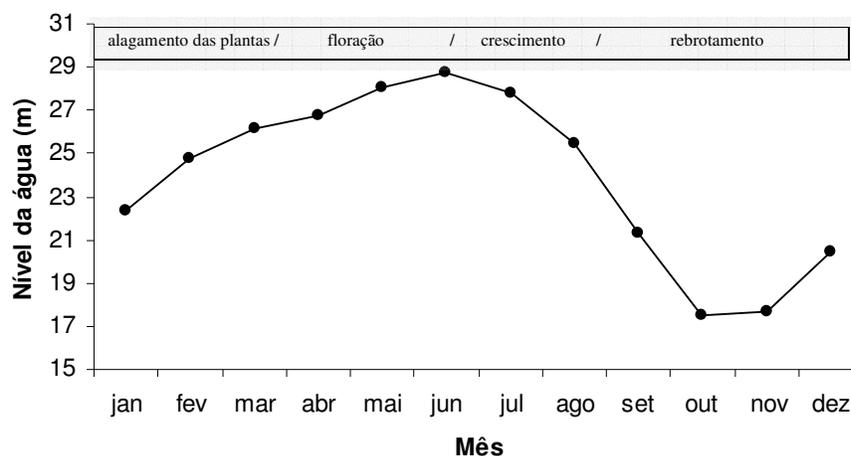


Fig 1. Ciclo de vida de *E. polystachya* acompanhando o nível da água do rio. Valores médios mensais do nível das águas do Rio Negro (metros acima do nível do mar), tributário do Rio Amazonas no ano de 2006. Fonte: Porto de Manaus.

Os experimentos foram realizados na Casa de Vegetação do Projeto INPA/Max-Planck, Manaus, Amazonas, Brasil. As duas coletas foram feitas de forma a propiciar o desenvolvimento das plantas com tratamentos experimentais em condições climáticas discretamente distintas, particularmente de precipitação e temperatura (Fig. 2), resultantes das

flutuações sazonais naturais desses parâmetros na região. As médias de temperatura, precipitação, dias de chuva e umidade relativa são apresentadas na Tabela 1.

Como os dados climáticos para o INPA no ano de 2006 não abrangiam o ano inteiro, foram utilizados os dados do Aeroporto Internacional de Manaus Eduardo Gomes (Tabela 1), que como pode ser observado na figura 2 possuem uma tendência muito similar aos do INPA.

No período A, que compreendeu de 01 de julho a 01 de setembro, a temperatura máxima foi de 34,5°C no dia 29 de agosto e a mínima de 22,8°C no dia 31 de julho. No período B, de 06 de setembro a 07 de novembro, as temperaturas foram mais elevadas com a mínima de 23,4°C no dia 2 de novembro e a máxima de 36,2°C no dia 27 de setembro (Tutiempo.net, 2006).

Tabela 1

Valores de temperatura média (T), temperatura média máxima (TM), temperatura média mínima (Tm), umidade relativa do ar (UR), precipitação total (Pp) e número de dias de chuva (Dc) no ano de 2006 no Aeroporto Internacional de Manaus (Fonte: Tutiempo.net)

Período	T (°C)	TM (°C)	Tm (°C)	UR (%)	Pp (mm)	Dc
julho	28,1	32,2	25,2	75,6	145,8	5
agosto	28,8	32,9	25,5	72,2	11,43	2
setembro	29,3	34,1	25,9	70,4	8,13	3
outubro	29,7	34,2	26,3	70,2	62,49	4
A*	28,45 ($\pm 0,35$)	32,55 ($\pm 0,35$)	25,35 ($\pm 0,15$)	73,9 ($\pm 1,7$)	157,23	7
B*	29,5 ($\pm 0,2$)	34,1 ($\pm 0,1$)	26,1 ($\pm 0,2$)	70,3 ($\pm 0,1$)	70,62	7

* valores médios \pm desvio padrão para o período.

As plantas foram irrigadas diariamente com água proveniente do poço artesiano do INPA, Manaus, Amazonas. O solo utilizado no plantio dos propágulos foi coletado no mesmo local e no mesmo período da coleta das plantas.

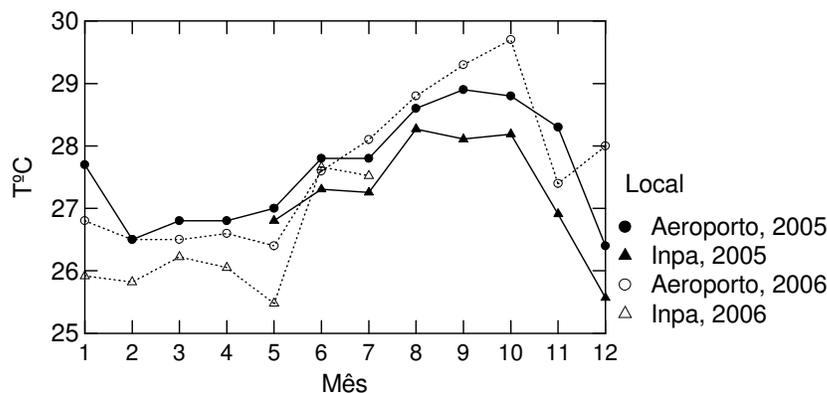


Fig 2. Climatologia de temperatura para o Aeroporto de Manaus, Amazonas e para o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) nos anos de 2005 e 2006. Fonte: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) e Experimento de Larga Escala Biosfera-Atmosfera (LBA).

2.2. *Material vegetal*

Echinochloa polystachya (Poaceae) é um capim semi-aquático, emergente, perene, amplamente distribuído na planície de inundação do Rio Amazonas. O ciclo de vida da planta é fortemente relacionado ao ciclo hidrológico (Fig. 1), e inclui uma rebrota, quando o nível da água é baixo, na fase terrestre, a partir dos nós presentes nos talos da velha geração de plantas. A rebrota ocorre quando as chuvas se intensificam. Em condições ambientais favoráveis, a espécie chega a atingir 80 Mg m^{-2} de biomassa, no pico da inundação do rio Amazonas, e uma produtividade primária em torno de $108 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ (Piedade et al. 1991), em um ciclo anual de crescimento. A produtividade da espécie está acima da faixa sugerida para macrófitas aquáticas (8 a 60t/ha), sendo 4 vezes maior que a sugerida para florestas tropicais chuvosas (Lieth, 1975). Devido a estes altos valores de produtividade primária é considerada fundamental para o ecossistema de várzea.

2.3. *O petróleo*

Foi utilizado no experimento petróleo cru, proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas, Brasil. Este petróleo é considerado leve e de alta qualidade. As dosagens de petróleo foram escolhidas por meio da realização de um estudo prévio com dosagens agudas, até 300 mL de petróleo $3,5\text{L}^{-1}$ de solo (Lopes et al., 2005).

2.4. *Desenho experimental*

Foram coletadas plantas adultas, das quais foi cortado um colmo de 15 cm contendo um nó. Estes propágulos foram plantados em frascos com 2 litros de solo da várzea que foi previamente contaminado pela adição de petróleo que foi misturado ao volume total de solo. As dosagens aplicadas foram as seguintes: 0 (controle), 1,5, 3, 6, 12,5 e 25 mL para o período de A, e foi acrescentado o tratamento com 50 mL para o período B.

A cada sete dias foram monitorados o surgimento de brotos e o número destes em cada unidade amostral, pois as plantas possuem capacidade de produzir um ou mais brotos por nó (Piedade, 1993). Foi ainda contado o número de folhas normais e com comprometimento fitossanitário (folhas com menos de 30% da área verde) e medido o comprimento das folhas e a altura de inserção da primeira folha. Após 63 dias foi obtida a biomassa (peso seco), que foi separada em biomassa aérea viva, biomassa aérea morta, biomassa de raízes e a biomassa do colmo. A biomassa total foi calculada utilizando a seguinte equação: $B_t = w_a + w_b + w_c$.,

onde, a biomassa total (Bt) é calculada pela soma da biomassa aérea viva (wa), biomassa aérea morta (wb) e a biomassa das raízes (wc).

As unidades amostrais consistiram em 120 frascos distribuídos em um experimento fatorial inteiramente casualizado 2 x 6 (períodos x dosagens de petróleo) com 10 réplicas para cada tratamento.

2.5. Análise estatística

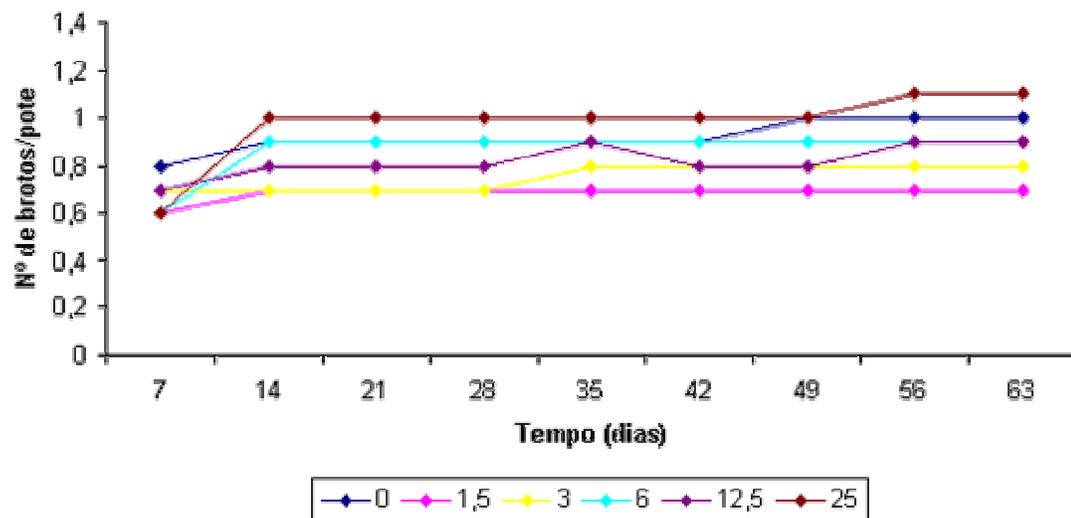
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Systat 10.2 (Wilkinson, 1998). Os efeitos do tempo e da dosagem de petróleo sobre as variáveis dependentes foram avaliados por meio de Análise de Variância bifatorial com medidas repetidas (ANOVA_{mr}) para cada um dos períodos de plantio, respeitando-se os pressupostos de homocedasticidade e esfericidade. O efeito da dosagem de petróleo e do tempo de exposição sobre as variáveis dependentes foi analisado utilizando Análise de Variância bifatorial (ANOVA two-way). Neste caso, para que fosse possível comparar os tratamentos, foi excluído o tratamento de 50mL do período B. O teste de Tukey foi utilizado para avaliar diferenças estatísticas individuais entre os níveis dos tratamentos. As diferenças significativas são relatadas no nível de 0,05 de probabilidade, a menos que indicadas de outra maneira.

3. Resultados

3.1. Efeito da dosagem de petróleo e o tempo de exposição:

Houve um aumento significativo do número de brotos por unidade amostral ao longo do tempo nos períodos, A (Fig. 3a) e B (Fig. 3b). No período B houve também um efeito significativo da dosagem sobre o número médio de brotos por unidade amostral (Tabela 2). O número de rebrotamentos por unidade amostral permaneceu praticamente constante após o 21º dia de tratamento. As diferenças a partir desta data se devem, principalmente, a morte de brotos que não se desenvolveram nos potes que apresentavam mais de um broto.

a)



b)

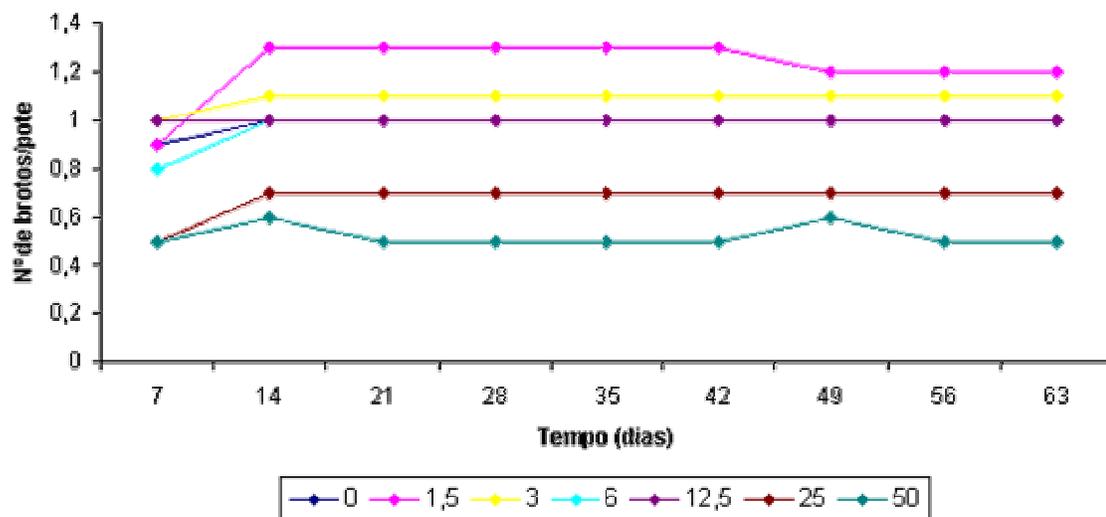
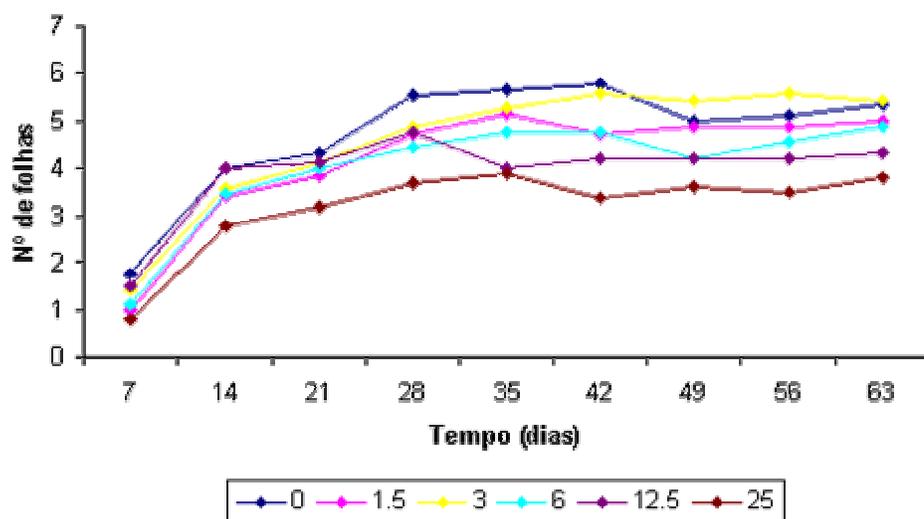


Fig. 3. Efeito do petróleo de Urucu sobre a média do número de brotos de *Echinochloa polystachya* por unidade amostral ao longo do tempo de exposição, nos períodos de plantio: a) A (jul./set.) e b) B (set./nov.).

O incremento do número de folhas de *E. polystachya* foi afetado significativamente em ambos os períodos pelo tempo de exposição (Tabela 2). No período A (Fig. 4a) houve, ainda, um efeito significativo da dosagem de petróleo que causou redução progressiva do número de folhas com o aumento da dosagem. No período B houve efeito significativo da interação entre o tempo de exposição e dosagem de petróleo (Fig. 4b) que resultou em um menor número de folhas nos tratamentos com dosagens mais elevadas de petróleo.

a)



b)

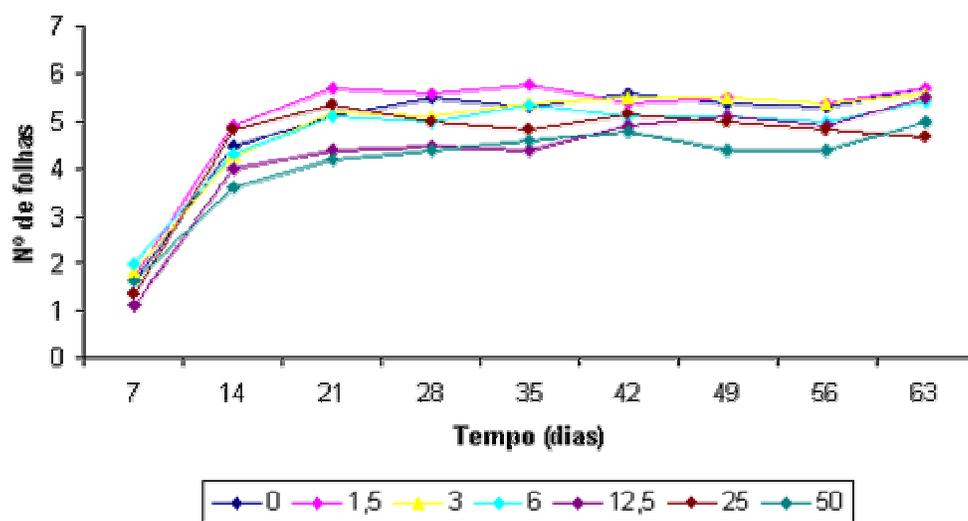
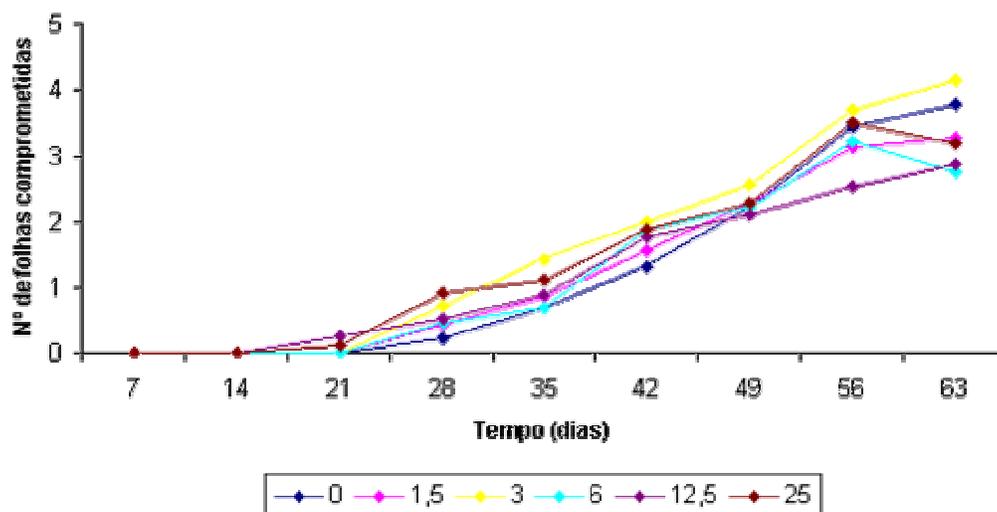


Fig. 4. Efeito do petróleo cru de Urucu sobre a média do número de folhas de *Echinochloa polystachya* ao longo do tempo de exposição, nos períodos de plantio: a) A (jul./set.) e b) B (set./nov.).

O tempo de exposição também causou um aumento de folhas com comprometimento fitossanitário em ambos os períodos de plantio dos propágulos (Tabela 2). No período B (Fig. 5a) houve também um efeito significativo de interação entre o tempo de exposição e a dosagem de petróleo que não ocorreu no período A. Na figura 5b podemos perceber o

acentuado aumento do número de folhas comprometidas no tratamento de 25 mL em relação aos demais.

a)



b)

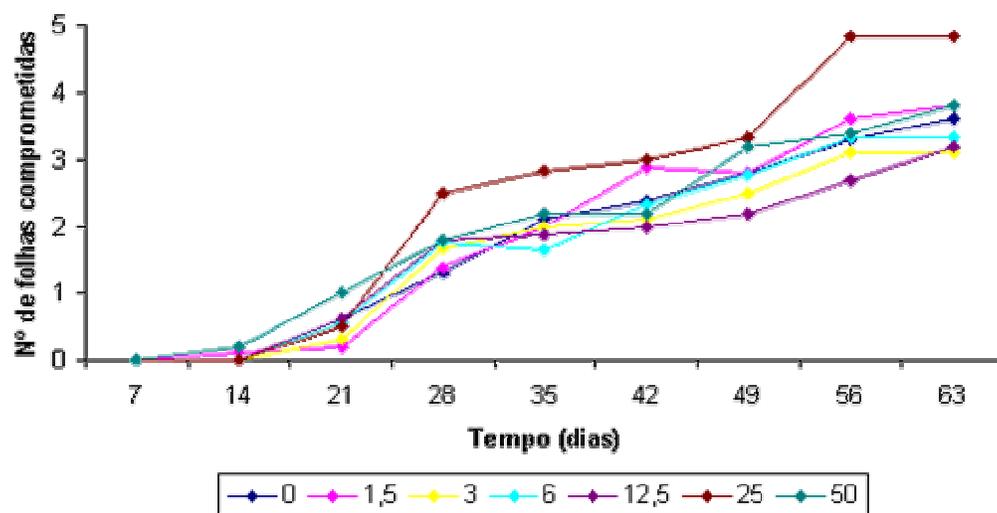
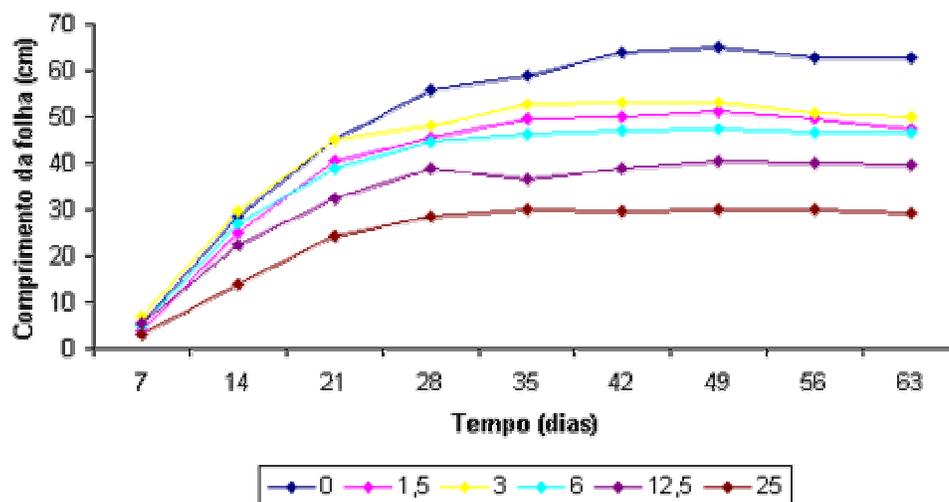


Fig. 5. Efeito do petróleo cru de Urucu sobre a média do número de folhas com comprometimento fitossanitário de *Echinochloa polystachya* ao longo do tempo de exposição, nos períodos de plantio: a) A (jul./set.) e b) B (set./nov.).

O tempo causou um aumento fortemente significativo ($p < 0,0001$) da média do comprimento das folhas em todos os tratamentos em ambos os períodos de plantio, atingindo um comprimento máximo no tratamento de 3mL de petróleo de 83,3 cm no período A e 74,5 cm no período B. Nos controles o comprimento máximo da folha atingiu 80,5 cm no período

A e 68,0 cm no período B. Porém, a dosagem apresentou um efeito mais acentuado no período B. Na figura 6a podemos observar nitidamente que o comprimento médio das folhas no período A reduz progressivamente com o aumento da dosagem de petróleo, enquanto que na figura 6b observamos a formação de dois padrões de aumento do comprimento das folhas, 0 a 6 mL e 12,5 a 50mL, que pode ser explicado pela interação significativa entre a dosagem de petróleo e o tempo de exposição no período B (Tabela 2).

a)



b)

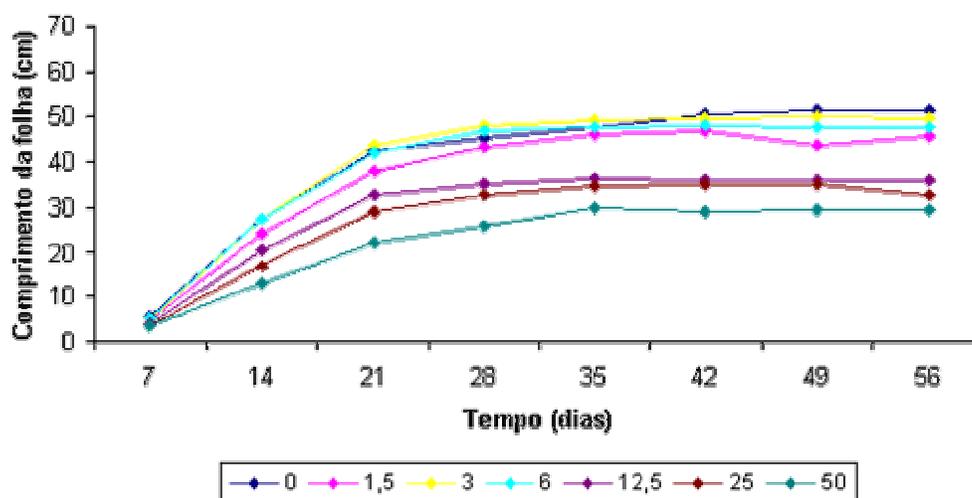
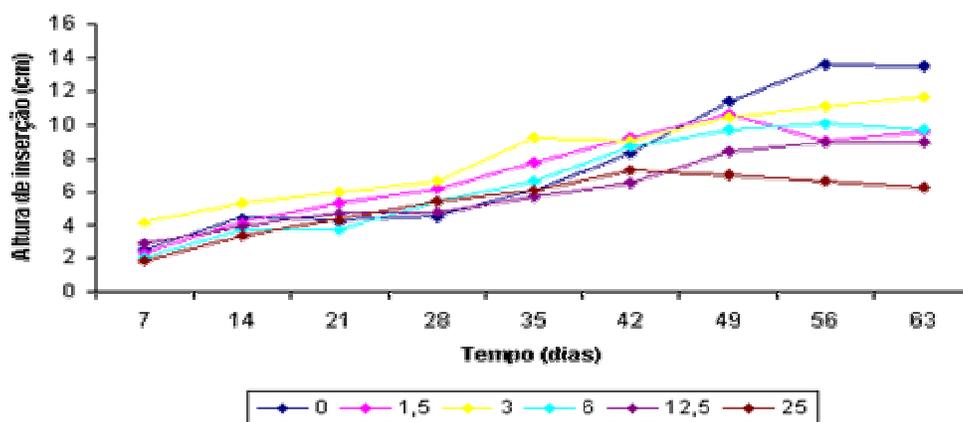


Fig. 6. Efeito do petróleo cru de Urucu sobre a média do comprimento da folha de *Echinochloa polystachya* ao longo do tempo de exposição, nos períodos de plantio: a) A (jul./set.) e b) B (set./nov.).

Na figura 7 são ilustradas as tendências para a altura de inserção da primeira folha em reposta ao efeito da dosagem de petróleo e do tempo de exposição nos dois períodos de plantio. No período A (Fig. 7a) notamos uma tendência de aumento progressivo da altura com o aumento da dosagem do petróleo, porém, esse efeito não foi estatisticamente significativo, devendo-se, assim, a interação entre o tempo de exposição e a dosagem de petróleo que foi significativa. No período de B (Fig. 7b) houve um efeito significativo da dosagem de petróleo e da interação entre dosagem e tempo de exposição que resultou na formação novamente de dois grupos distintos, 0 a 6mL e 12,5 a 50mL, indicando que dosagens acima de 12,5mL são prejudiciais ao desenvolvimento das plantas.

a)



b)

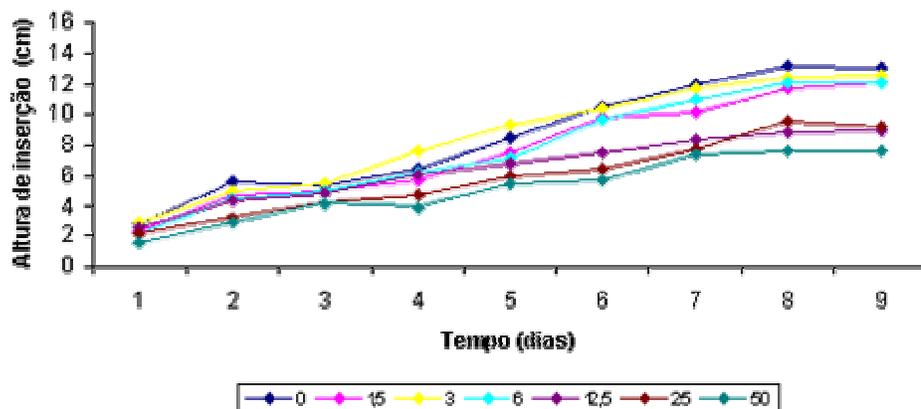


Fig. 7. Efeito do petróleo Cru de Urucu sobre a altura média de inserção da primeira folha de *Echinochloa polystachya* ao longo do tempo de exposição, nos períodos de plantio: a) A (jul./set.) e b) B (set./nov.).

Tabela 2

Resultados da ANOVAmr para verificar o efeito da dosagem de petróleo (D) e do tempo de exposição (T) em *E. polystachya* sobre as variáveis avaliadas, nos dois períodos de plantio dos propágulos, A (jul./set.), B (set./nov.). T*D (interação); g.l. (graus de liberdade)

Variável dependente	Fator	A				B			
		g.l. efeito	g.l. erro	F	p	g.l. efeito	g.l. erro	F	p
Nº de brotos/pote	D	5	54	0,737	0,599	6	63	3,475	0,005
	T	8	432	9,31	<0,001	8	504	4,597	<0,001
	T*D	40	432	0,993	0,486	48	504	0,795	0,837
Nº de folhas	D	5	44	2,764	0,003	6	53	0,939	0,475
	T	8	352	90,536	<0,001	8	424	15,114	<0,001
	T*D	40	352	0,836	0,75	48	424	1,532	0,016
Nº de folhas com comprometimento fitossanitário**	D	5	44	1,249	0,303	6	53	1,304	0,272
	T	6	270	177,49	<0,001	7	371	190,212	<0,001
	T*D	30	270	1,202	0,22	42	371	1,467	0,035
Comprimento das folhas	D	5	44	3,408	0,011	6	53	5,767	<0,001
	T	8	352	238,55	<0,001	8	424	455,31	<0,001
	T*D	40	352	3,019	<0,001	48	424	2,73	<0,001
Altura de inserção da primeira da folha	D	5	44	1,505	0,208	6	53	3,967	0,002
	T	8	352	86,49	<0,001	8	424	242,706	<0,001
	T*D	40	352	2,381	<0,001	48	424	2,401	<0,001

** foram utilizados os dados para o período A a partir do 21º dia e para o período B a partir do 14º dia de tratamento, devido a baixa ocorrência de folhas comprometidas antes destas datas.

3.2. Efeito da dosagem e do período de plantio dos propágulos:

Ocorreu uma alta taxa de rebrotamento dos propágulos do tratamento controle, sendo 90% no período A e 100% no período B, porém nos tratamentos com petróleo houve uma diferença na taxa de rebrotamentos de acordo com o período. Por exemplo, no tratamento de 25mL de petróleo houve 100% de rebrotamento no período A, e apenas 60% no período B. A interação entre a dosagem de petróleo cru de Urucu e o período de plantio dos propágulos de *E. polystachya* resultou em uma diminuição do número de rebrotamentos das plantas (Tabela 3; Fig. 8a). O número de folhas foi influenciado pelo período de plantio dos propágulos, e embora seja maior no período B, seguiu a mesma tendência de diminuição com o aumento da dosagem de petróleo (Tabela 3; Fig. 8b).

O período de plantio de propágulos não influenciou o comprimento das folhas, assim esse fator não foi considerado para a análise do efeito da dosagem de petróleo (Tabela 3). O comprimento das folhas (Tabela3; Fig. 9a.) foi reduzido significativamente pelo efeito da dosagem de petróleo. Os tratamentos de 12,5 mL e 25mL de petróleo apresentaram médias significativamente menores para o comprimento das folhas em relação ao controle. A altura de inserção da primeira folha diminuiu com a dosagem de petróleo, confirmando a redução do tamanho das plantas. Essa redução foi mais acentuada no período de plantio B, já sendo

observada na dosagem de 12,5 mL, que no período A que só mostrou redução significativa no tratamento de 25 mL (Tabela 3; Fig.9b).

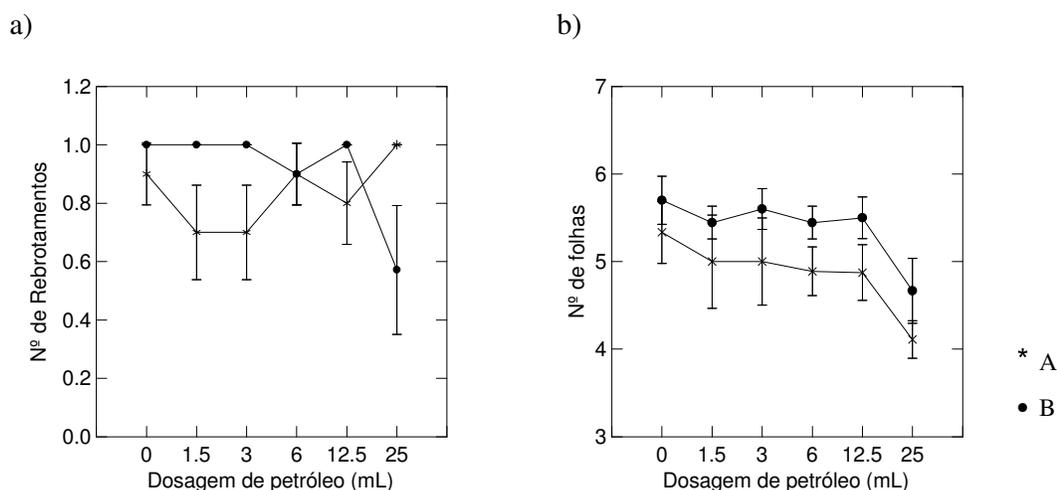


Fig. 8. Efeito da dosagem do petróleo cru de Urucu sobre: a) o número de rebrotamentos; b) o número de folhas de *Echinochloa polystachya* nos dois períodos de plantio dos propágulos, A (jul./set.) e B (set./nov.). Valores médios com erro padrão.

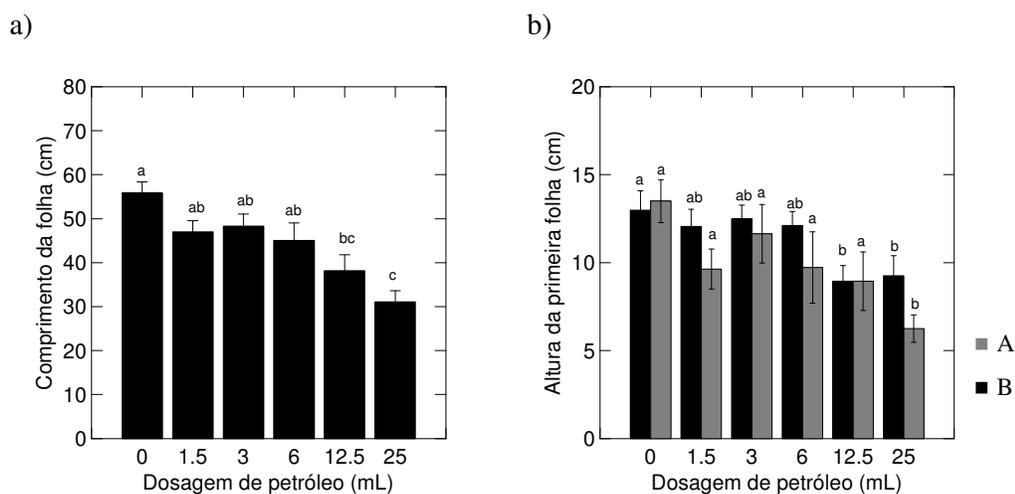


Fig. 9. Efeito da dosagem do petróleo cru de Urucu sobre: a) o comprimento da folha; b) a altura de inserção da primeira folha de *Echinochloa polystachya*, nos dois períodos de plantio, A (jul./set.) e B (set./nov.). Valores médios com erro padrão. Letras distintas dentro de cada período indicam tratamentos significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$).

A biomassa aérea das plantas foi afetada pelo petróleo, havendo uma redução com o aumento da dosagem. Essa redução foi afetada também pelo período de plantio dos propágulos, sendo que no período A a biomassa aérea média foi menor em todos os tratamentos quando comparado ao período B (1,77 vezes menor no tratamento controle e 2,77

vezes no tratamento de 25mL). Porém, enquanto que no período A, a dosagem de 25mL foi significativamente diferente do controle, no período B houve diferença significativa nos tratamentos de 12,5 mL e 25mL em relação ao controle (Fig. 10).

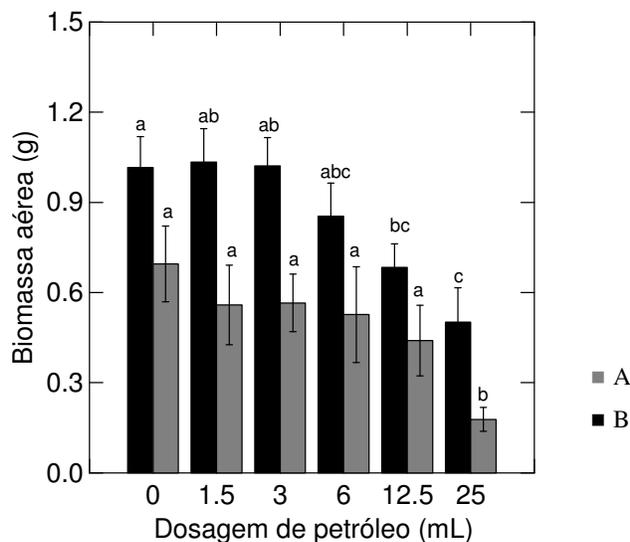


Fig. 10. Efeito da dosagem do petróleo cru de Urucu sobre a biomassa aérea em cada período de plantio dos propágulos de *Echinochloa polystachya*, A (jul./set.) e B (set./nov.). Valores médios com erro padrão. Letras distintas, dentro de cada período, indicam tratamentos significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$).

Não houve efeito da dosagem de petróleo sobre a produção de biomassa aérea morta, embora tenha ocorrido um efeito significativo do período de plantio dos propágulos (Tabela 3). A biomassa aérea morta foi maior nas plantas que haviam sido plantadas no período B, com uma média de 0,3 g quando somados todos os tratamentos, enquanto que no período A esse valor foi de apenas 0,16 g (Fig. 11a), mostrando, novamente, que as plantas no período B foram mais afetadas que no período A. Diferenças significativas entre os períodos também foram encontradas para a biomassa da raiz (Fig. 11b) e do colmo (Fig. 11c).

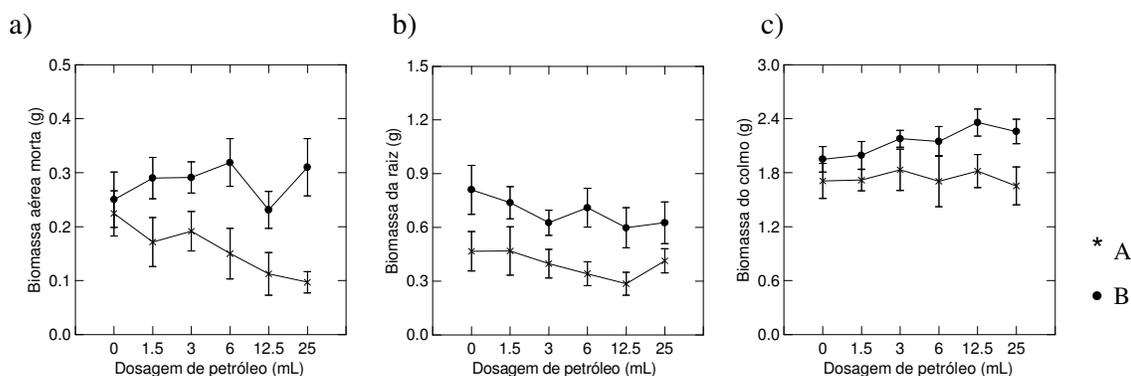


Fig. 11. Efeito da dosagem do petróleo cru de Urucu e do período de plantio dos propágulos, A (jul./set.) e B (set./nov.) sobre: a) a biomassa aérea morta; b) a biomassa da raiz; c) a biomassa do colmo de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão.

A biomassa total foi afetada tanto pela dosagem de petróleo quanto pelo período de plantio dos propágulos (Fig. 12a). Quando analisado cada período separadamente, não se detectou efeito significativo da dosagem, ainda que, no período de B possa ser observada uma forte tendência ($F_{(6,53)} = 2,217$, $p = 0,056$) de redução da biomassa com o aumento da dosagem de petróleo. Como a proporção de biomassa aérea viva/biomassa aérea total não foi afetada pelo período de plantio, esse fator foi desconsiderado para a análise do efeito da dosagem (Fig. 12b). Apenas o tratamento de 25mL de petróleo apresentou redução significativa da proporção biomassa aérea viva/total em relação ao controle.

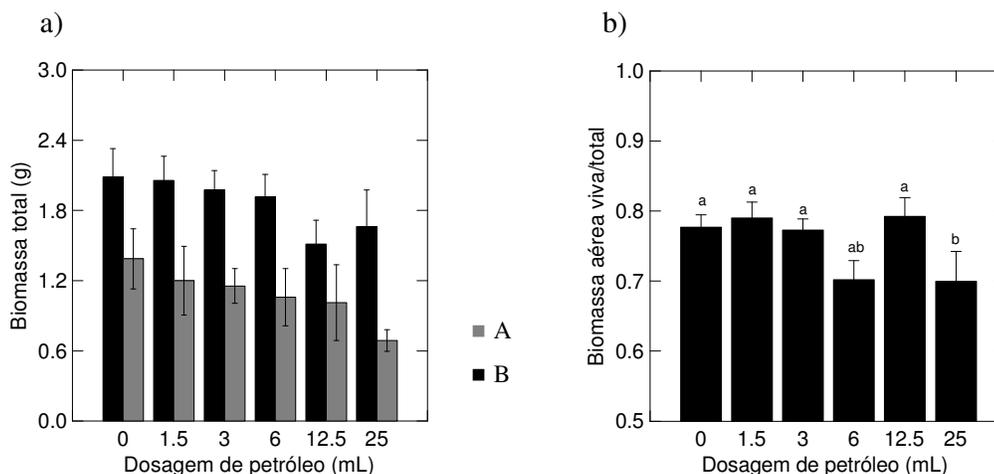


Fig. 12. Efeito da dosagem do petróleo cru de Urucu sobre: a) a biomassa total, nos dois períodos de plantio dos propágulos, A (jul./set.) e B (set./nov.); b) a proporção de biomassa aérea viva/ aérea total de *Echinochloa polystachya*. Valores médios com erro padrão. Letras distintas indicam tratamentos significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$).

Tabela 3

Resultados da ANOVA para verificar o efeito da dosagem de petróleo (D); do período de plantio dos propágulos (PP), A (jul./set.) e B (set./nov.); e da interação entre esses fatores (D*PP) sobre as variáveis dependentes. g.l. (graus de liberdade).

Variável dependente	Fator	g.l.	F	P
<i>Nº de rebrotamentos</i>	D	5	0,545	0,742
	PP	1	2,064	0,154
	D*PP	5	3,451	0,006
	erro	108		
<i>Nº de folhas</i>	D	5	3,474	0,006
	PP	1	9,582	0,003
	D*PP	5	0,514	0,765
	erro	94		
<i>Nº de folhas com comprometimento fitossanitário</i>	D	5	1,474	0,206
	PP	1	1,122	0,292
	D* PP	5	1,851	0,110
	erro	94		
<i>Comprimento das folhas</i>	D	5	7,676	<0,0001
	PP	1	0,196	0,659
	D* PP	5	0,677	0,642
	erro	94		
<i>Altura de inserção da primeira da Folha</i>	D	5	5,963	<0,0001
	PP	1	4,124	0,045
	D* PP	5	0,794	0,557
	erro	94		
<i>Biomassa aérea</i>	D	5	7,462	<0,0001
	PP	1	41,368	<0,0001
	D* PP	5	0,909	0,479
	erro	93		
<i>Biomassa aérea morta</i>	D	5	1,810	0,119
	PP	1	30,283	<0,0001
	D* PP	5	0,389	0,855
	erro	93		
<i>Biomassa da raiz</i>	D	5	0,810	0,546
	PP	1	23,024	<0,0001
	D* PP	5	0,511	0,767
	erro	93		
<i>Biomassa do colmo</i>	D	5	0,579	0,716
	PP	1	11,142	0,001
	D* PP	5	0,119	0,988
	erro	108		
<i>Biomassa total</i>	D	5	2,895	0,018
	PP	1	43,333	<0,0001
	D* PP	5	0,420	0,834
	erro	93		
<i>Proporção biomassa aérea viva/ aérea total</i>	D	5	5,320	<0,0001
	PP	1	0,281	0,597
	D* PP	5	1,169	0,331
	erro	93		

4. Discussão

A intensidade do dano do petróleo varia com o número de fatores bióticos e abióticos envolvidos, incluindo o tipo e a quantidade do óleo, as espécies atingidas, a extensão da

lâmina de óleo, a estação em que ocorreu o derramamento, as condições climáticas, entre outros (Burk, 1977; Mendelssohn e Mckee, 1988, Lin & Mendelssohn, 1996; Pezeshki et al, 2000). No presente estudo, a dosagem de petróleo, o tempo de exposição, e o período de plantio dos propágulos influenciaram a resposta de *Echinochloa polystachya* quando plantada em solo contaminado por petróleo cru de Urucu.

Os efeitos dos hidrocarbonetos do petróleo na vegetação dependem geralmente do volume do óleo, da sua concentração no solo e da quantidade que entrou em contato com esta (Lin & Mendelssohn, 1996; Pezeshki et al, 2000). Esses efeitos muitas vezes tendem a diminuir, se a exposição das plantas ao óleo ocorre após um período de tempo, pois o óleo é degradado, principalmente devido à evaporação, dissolução, oxidação e biodegradação, que podem reduzir seus componentes tóxicos. Esse processo de degradação continua ao longo do tempo e após serem evaporados ou degradados os componentes de baixo peso molecular, mais tóxicos às plantas, são degradados os hidrocarbonetos de peso molecular mais alto, diminuindo, assim, a toxicidade do óleo remanescente (Lin e Mendelssohn, 1998). Esta degradação do óleo ao longo do tempo permite que plantas que sejam sensíveis ao poluente imediatamente, possam se desenvolver no solo contaminado após determinado período de tempo. Ao estudar áreas recém contaminadas por petróleo cru do sul da Louisiana originalmente dominadas por *S. alterniflora* e *S. patens*, Lin e Mendelssohn (1996) observaram uma inibição dessas espécies pelo petróleo em níveis acima de 8 L m⁻² solo, entretanto, quando realizada a reintrodução dessas duas espécies por transplante, dois anos após o derramamento, houve o estabelecimento de ambas mesmo em áreas nas quais havia originariamente concentrações mais elevadas do óleo, indicando a redução da sua toxicidade com o tempo.

No presente estudo, os propágulos foram plantados apenas 2 horas após o petróleo ter sido misturado ao solo, e as plantas levaram entre 2 e 21 dias para rebrotar, como observado no tratamento controle. A mistura do petróleo ao substrato parece haver facilitado a eliminação de uma considerável parte dos componentes tóxicos por volatilização e a toxicidade para as plantas foi assim reduzida quando as raízes entraram em contato com o solo. Além disso, o estoque de nutrientes do colmo pode ter proporcionado às plantas os elementos necessários para o seu desenvolvimento, diminuindo a função de absorção das raízes, diminuindo adicionalmente a absorção de elementos tóxicos presentes no petróleo. Portanto, diferente de experimentos prévios realizados com *E. polystachya*, nos quais a adição de petróleo foi feita na superfície do solo de plantas com 30 dias de crescimento (ver artigos 1

e 3), as plantas neste estudo, aparentemente, foram menos afetadas quando o petróleo foi misturado ao volume total do solo antes do plantio dos propágulos. Corroborando estas afirmações, em um experimento piloto realizado em novembro de 2005 (Lopes et al., 2005) a adição de dosagens muito elevadas de petróleo (até 300 mL) à superfície do solo em potes contendo plantas com 30 dias, levou à mortalidade de todas as plantas, inclusive os controles. Tal resultado somente pode ser explicado pela intoxicação das plantas pela fração volátil do petróleo de Urucu, dado que o desenho casualizado propiciou a distribuição de diferentes dosagens em potes adjacentes.

O presente estudo, com o monitoramento do impacto do petróleo sobre *E. polystachya* por um período mais longo de tempo em relação a estudos anteriores (ver artigos 1 e 3), permitiu confirmar que a duração da exposição é um fator determinante na maximização dos efeitos desse poluente sobre esta espécie. Isto pôde ser claramente constatado pela diminuição do número de brotos por unidade amostral, número de folhas, comprimento das folhas, altura de inserção da primeira folha e aumento do número de folhas com comprometimento fitossanitário de *E. polystachya*, notadamente nas concentrações mais elevadas.

O período de plantio dos propágulos (A ou B) mostrou influenciar vários dos parâmetros analisados, como o número de folhas, altura da inserção da primeira folha, biomassa aérea, biomassa aérea morta, biomassa do colmo e biomassa das raízes. *E. polystachya* possui níveis de nutrientes semelhantes aos encontrados em outras macrófitas aquáticas (Howard-Williams & Junk, 1977), estocados nas folhas, nas raízes e nos talos (Piedade et al., 1992). Considerando a estratégia reprodutiva desta planta, caracterizada pela perenização por meio da rebrota durante a fase terrestre, fica claro o fundamental papel do colmo para a propagação vegetativa no ambiente natural. Contudo, para efeito deste experimento, no qual o cultivo de *E. polystachya* foi realizado em casa de vegetação, foram excluídos vários fatores que poderiam influenciar a resposta das plantas, dentre eles: (1) não houve entrada de água da chuva, retirando assim o efeito da variação de precipitação entre os períodos; (2) as pequenas variações de umidade relativas foram excluídas pela irrigação diária das plantas evitando com isso também o estresse hídrico; (3) a cobertura da casa de vegetação permitia que a radiação solar chegasse às plantas; (4) as mudanças de nível de alagamento às quais as plantas estariam expostas em campo foram excluídas; (5) o solo da várzea é reconhecidamente rico em nutrientes (Furch & Junk 1997); (6) a concentração de elementos químicos é muito semelhante entre os talos da planta, permitindo que cada propágulo vegetativo tenha porções adequadas de nutrientes para o seu rebrotamento (Piedade et al.,

1992), não existindo portanto efeito da parte do colmo que foi plantada. Assim, dentre os fatores climáticos que poderiam explicar a diferença de resposta das plantas, o único que teve uma variação significativa entre os períodos foi a temperatura (Tabela 1). Houve uma diferença nas temperaturas médias entre estes dois períodos em 2006, de pouco mais de 1°C, porém quando observamos as médias das temperaturas máximas e mínimas para cada um dos períodos percebemos claramente que no período B elas foram significativamente mais altas, 34,1°C e 29,5°C, respectivamente, que no período A, 32,5°C e 28,4°C, alcançando até 34,5°C no período A e 36,2°C no período B.

A temperatura é apontada como um agravante do impacto do óleo sobre as respostas das plantas (Bowen, 1996; Merkl et al., 2005). Merkl et al. (2005) explicaram as modificações no comprimento e morfologia das raízes de *Brachiaria brizantha*, *Cyperus aggregatus* e *Eleusine indica* expostas ao óleo cru da Venezuela pelo aumento de temperatura do solo. No presente estudo, o fato do número de brotos por unidade amostral, biomassa total e proporção de biomassa aérea viva/total só sofrerem redução devido ao efeito da dosagem do petróleo no período B, caracterizado por maiores temperaturas, ilustra a influência negativa desse fator sobre *E. polystachya* exposta ao petróleo.

Uma das possíveis explicações para o efeito da temperatura sobre o impacto do petróleo é que o aumento de temperatura diminui a solubilidade dos gases em água, e assim ocorre um decréscimo na quantidade de oxigênio dissolvido na água, diminuindo a disponibilidade de oxigênio para as raízes. Outra explicação possível é que solos contaminados por petróleo podem apresentar temperaturas mais altas que solos não contaminados (Merkl et al., 2005), e o aumento de temperatura é um fator que pode ser imediatamente estressante para algumas espécies de plantas (Taiz & Zeiger, 2004).

O petróleo cru é constituído por uma complexa mistura de componentes orgânicos, sendo que 75% dele consiste de hidrocarbonetos de cadeia curta ou longa (Neff, 1979). Os hidrocarbonetos de cadeia curta são voláteis possuindo um tempo de vida relativamente curto no ambiente aquático, porém esta é a fração mais tóxica para os organismos aquáticos. Já os hidrocarbonetos de cadeia longa são pouco solúveis podendo persistir por um longo tempo no ambiente, seus efeitos são principalmente físicos, criando uma barreira viscosa na interface água-ar (Val e Almeida Val, 1999; Brauner et al., 1999). A viscosidade, resistência oferecida por qualquer fluido ao movimento ou escoamento, é inversamente proporcional à temperatura. Portanto, em temperaturas mais elevadas o petróleo fica menos viscoso e a sua absorção pelo solo pode ocorrer de forma mais rápida, fazendo com que a camada superficial de óleo entre

em contato com as raízes. No presente estudo a biomassa da raiz no tratamento de 25mL foi 50,61% menor no período B que no período A. Além disso, apesar de não ter apresentado alteração significativa pelo aumento da dosagem de petróleo, a biomassa do colmo de *E. polystachya* foi maior no período B que no período A, o que pode indicar um menor aproveitamento de suas reservas pelas plantas na fase inicial de desenvolvimento que ocorre durante este período.

Além das alterações provocadas pelo período de plantio, a biomassa total também sofreu redução devido ao aumento da dosagem de petróleo, o que pode ser melhor visualizado pela proporção de biomassa aérea viva/total, na qual se observa um declínio significativo em relação ao controle no tratamento de 25mL. A biomassa aérea foi afetada pela dosagem de petróleo nos dois períodos de plantio. No período B houve redução de 54,03% da biomassa aérea do tratamento de 25mL em relação ao controle, enquanto que no período A houve a redução de 18,86% neste mesmo tratamento em relação ao controle. O período B, apresentou ainda redução da biomassa aérea na dosagem de 12,5 mL de 84,74%. Essa redução da biomassa aérea, aliada a redução da proporção de biomassa viva/total, sugere que *E. polystachya* pode ser utilizada para fitorremediação em solo com até 12,5mL de petróleo, entretanto, estudos em campo são necessários para confirmação destes valores.

Conclusão

A comparação dos indivíduos de *E. polystachya* que foram plantados em diferentes períodos (A e B) mostrou que a resposta dessa planta é influenciada pelo clima, sendo que todos os parâmetros mensurados indicam que temperaturas mais elevadas (período B) maximizam os efeitos negativos do petróleo sobre esta espécie.

Doses mais altas do petróleo, como 50 mL L⁻² solo foram limitantes para o estabelecimento de *E. polystachya*, o que pode ser constatado pelo reduzido número de rebrotamento neste tratamento. O tempo de exposição foi um fator agravante do impacto, e produziu efeito sobre todos os parâmetros avaliados, em ambos os períodos.

Pode-se sugerir a partir desses resultados, que como *E. polystachya* foi capaz de se desenvolver em solos contaminados com baixas quantidades de petróleo cru de Urucu, ou seja, menores que 12,5 mL, (aproximadamente 0,66 L m⁻² solo) que experimentos em campo devem ser delineados para analisar a capacidade desta planta de reduzir os componentes tóxicos do petróleo e assim poder ser utilizada na fitorremediação.

Agradecimentos

Os recursos necessários para este estudo foram providos pelo Projeto INPA/Max-Planck, PPI 1090-5, e o petróleo cedido pela Petrobrás através do Projeto PIATAM. Agradeço ao CNPq pela Bolsa de Mestrado de Aline Lopes. Meus agradecimentos à equipe do Projeto INPA/Max-Planck e do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução (LEEM), principalmente a Dra. Vera Val pela valorosa contribuição nas discussões desde o planejamento do projeto, e pela infraestrutura cedida. Aos técnicos Valdenei, Lucia e Celso agradeço pelo auxílio na coleta dos dados, e aos barqueiros Mário e Luiz pelo auxílio em campo.

Referências

- Brauner, C. J., Ballantyne, M. M., Val A. L., 1999. Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate level and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 123, 127-134.
- Bowen, G.D. 1996. Soil temperature, root growth and plant function, in: Waisel, Y., Eshel, U., Kafkafi, U., (Eds.), *Plant Roots – The hidden half*, Marcel Dekker, New York (chapter 9).
- Burk, C.J., 1977. A four year analysis of vegetation following an oil spill in a freshwater marsh. *The Journal of Applied Ecology* 14, 515-522.
- Centro de Previsão do Tempo de Estudos Climáticos. Monitoramento Brasil. Acesso em: 01 de março. 2007. Disponível em: <<http://www.cptec.inpe.br>>
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* 13, 393–397.
- Dinardi, A. L., Formagi, V. M., Coneglian, C. M. R., Brito, N. M.de, Sobrinho, G. D., Tonso, S., Pelegrini, R., 2003. Fitorremediação. *Anais do III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro*.
- Dushenkov, S., Vasudev, D., Kapulnik, Y., Gleba, D., Fleisher, D., Ting, K.C., 1997. Removal of uranium from water using terrestrial plants. *Environmental Science and Technology* 31, 3468–3474.
- Furch, K., Junk, W.J., 1997. The Chemical Composition, Food Value, and Decomposition of Herbaceous Plants, Leaves, and litter of floodplain forests, in: Junk, W. J. (Ed.) *The Central Amazon Floodplain*. Springer-Verlag, New York 126, 187– 205.

- Glick, B. R., 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnological Advances* 21, 383-393.
- Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walker, D.J., Bernal, M. P. , Serrano, R., 2003. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303,440– 445.
- Howard_Williams C., Junk, W. J., 1977. The chemical composition of Central Amazonian aquatic macrophytes with special reference to their role in the ecosystem. *Fresh Water Biology* 5, 445-459.
- Hutchinson, S. L., Banks, M. K., Shwab, A.P., 2001. Phytoremediation of age petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. *Journal of Environmental Quality* 30,395-403.
- Junk, W. J., Bayley, P. B., Sparks, R. E. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems, in: Dodge, D. P. (Ed.). *Proceedings of the International Large River Symposium*. Ottawa: Canadian Special Publication of Fisheries Aquatic Sciences 110-127.
- Irion, G., Junk, W. J., Mello, J. A. S. N. de. 1997. The large Central Amazonian river floodplain near Manaus: geological, climatological, and geomorphological aspects, in: Junk, W. J (Ed.) *The Central Amazon Floodplain*. Springer-Verlag, New York 126,23-46.
- Kirk, J.L., Klironomos, J. N., Leea, H., Trevors, J. T., 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution* 133, 455–465.
- Lieth, H. 1975. Primary production of the major vegetation units of the world, in: Lieth , H., Whittaker, R. H. (Eds.) *Primary Productivity of the Biosphere*, Springer - Verlag, New York, pp. 203-215.
- Lin, Q., Mendelssohn, I. A., 1996. A comparative investigation of the effects of Louisiana crude oil on the vegetation of fresh, brackish, and salt marsh. *Marine Pollution Bulletin* 32 (2), 202–209.
- Lin, Q., Mendelssohn, I.A., 1998. The combined effects of phytoremediation and biostimulation in enhancing habitat restoration and oil degradation of petroleum contaminated wetlands. *Ecological Engineering* 10, 263–274.
- Lopes, A., Piedade, M. T. F., Almeida-Val, V.M.F. 2005. Efeito da dosagem do petróleo de Urucu (Coari-AM) sobre a sobrevivência de *Echinochloa polystachya* (Projeto Piloto), in: *Anais do I Congresso Internacional do PIATAM*. Universidade Federal do Amazonas / Centro de Pesquisas da Petrobrás, Manaus 113-113.

- Martins, V. J., Artaxo, P., Ferraz, E. S. B., Tabacniks, M. H. 1999. Chronological studies of tree-rings from the Amazon basin using thick target PIXE and proton backscattering analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 150, 240– 247.
- Mendelssohn, I. A., McKee, K. L., 1988. *Spartina alterniflora* dieback in Louisiana: time-course investigation of soil waterlogging effects. *The Journal of Ecology* 76, 509-521.
- Merkl, N., Schlitz-Kraft, R., Infante, C., 2005. Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environment Pollution* 138, 86–91.
- Neff, J. M., 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. Essex: Applied Science Publishers Ltd.
- Pezeshki, S. R., Hester, M. W., Lin, Q. , Nyman, J.A., 2000. The effect of oil spill and cleanup on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environment Pollution* 180, 129–139.
- Piedade, M. T. F., 1993. Biologia e ecologia de *Echinochloa polystachya* (H.B.K) Hitchcock (Gramineae=Poaceae), capim semi-aquático da várzea amazônica. *Acta Limnologica Brasiliensis* 4, 173-185.
- Piedade, M. T. F., Junk, W. J., Long, S. P., 1991. The productivity of the C4 grass *Echinochloa polystachya* on the Amazon floodplain. *Ecology* 72(4), 1456-1463.
- Piedade, M. T. F., Junk, W. J. , Mello, J. A. S. N. 1992. A floodplain grassland of the Central Amazon, in: Long, S. P., Jones, M. B., Roberts, J. M. (Eds.). *Productivity of grass ecosystems of the Tropics and Sub-Tropics*. Chapman , Hall/UNEP, London, pp. 127-158.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2004. *Fisiologia Vegetal* terceira ed. Atmed, Porto Alegre,.
- TuTiempo.net - El Tiempo. Historical Weather: Manaus Aeroporto, year 2006. Acesso em: 01 de março. 2007. Disponível em: < <http://www.tutiempo.net> >
- Val, A. L., Almeida-Val, V. M. 1999. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon, in: Val , A. L. , Almeida-Val, V. M. F. (Eds.) *Biology of Tropical Fishes*, INPA, Manaus 22, 277-291.
- Watmough, S.A. , Hutchinson, T. C., 1996. Analysis of tree rings using inductively coupled plasma mass spectrometry to record fluctuations in a metal pollution episode. *Environmental Pollution* 93,93 –102.
- Wilkinson, L. 1998. *Systat: the system for statistics*. Systat Inc. Evanston, Illinois, USA.
- Yateem, A., Balba, M. T., El-Nawawy, A. S., Al-Awadhi N., 1999. Experiments in phytoremediation of Gulf War contaminated soil. *Soil and Groundwater Cleanup* 2,31–33.

CONCLUSÃO

A dosagem e o tempo de exposição mostraram ser fatores muito importantes na determinação do efeito do petróleo sobre *Echinochloa polystachya* e *Eichhornia crassipes*. Em todos os experimentos realizados *E. polystachya* mostrou ser mais sensível ao petróleo que *E. crassipes*, o que era esperado, pois esta última é amplamente encontrada em ambientes poluídos, sendo muitas vezes utilizada para a limpeza destes. A eliminação de indivíduos jovens de *E. polystachya* por dosagens relativamente baixas de petróleo indica que caso ocorra um derramamento de petróleo na várzea durante o período de rebrota das plantas essas seriam extremamente afetadas.

Se classificarmos as dosagens em baixa (1,5 a 6 mL de petróleo), moderada (12,5 a 50 mL de petróleo) e alta (100 a 300 mL de petróleo), observamos que para ambas as espécies baixas dosagens não causaram efeitos significativos sobre os parâmetros analisados, apesar de causarem a morte de alguns indivíduos de *E. polystachya*. Dosagens moderadas causaram diminuição do número de folhas e aumento do número de folhas com comprometimento fitossanitário tanto de *E. polystachya* quanto de *E. crassipes*, porém esta última ainda apresentou aumento da biomassa aérea morta e diminuição da proporção biomassa aérea viva/total. Além disso, *E. polystachya* apresentou aumento da altura de inserção da primeira folha e houve uma acentuada mortalidade no tratamento de 50mL. Dosagens mais altas, além de afetarem esses fatores, causaram diminuição da biomassa aérea e um aumento da mortalidade de *E. crassipes*, causando diminuição da biomassa aérea e da proporção biomassa aérea viva/total de *E. polystachya*, sendo extremamente letais em um curto período de tempo para esta espécie.

A mortalidade destas macrófitas aquáticas poderia resultar em diversas implicações para a várzea. A perda de abrigo para os peixes jovens seria um fator imediatamente agravante do impacto do petróleo sobre estes. A redução da biomassa poderia resultar também na maximização dos efeitos sobre os animais aquáticos como o peixe-boi que utilizam *E. polystachya* e *E. crassipes* como um dos principais itens de sua alimentação. Animais terrestres também seriam prejudicados, pois muitos invertebrados se alimentam de macrófitas

aquáticas e estes são fonte de alimento para uma gama de animais tanto terrestres quanto aquáticos.

Além desses efeitos indiretos sobre a fauna a morte destas plantas, principalmente de *E. polystachya*, resultaria na incorporação de uma enorme quantidade de biomassa morta ao sistema, já que esta herbácea é a principal espécie produtora nesses ambientes. Dado o papel ecossistêmico de *E. polystachya* no ciclo de carbono da várzea, um acidente grave com derramamento de petróleo de Urucu, fatalmente trará importantes implicações negativas no balanço de carbono dessas áreas e, eventualmente, de outras regiões da bacia Amazônica.

As características peculiares da várzea amazônica, que são alagadas anualmente devido o pulso de inundação, também poderiam agravar os efeitos do petróleo, que como demonstrado foram extremamente severos para as duas espécies de plantas estudadas. O alagamento de uma área contaminada poderia provocar a reincorporação do petróleo ao ambiente aquático, dificultando assim a eliminação deste poluente do sistema. Além disto, a elevada coluna de água pode distribuir o petróleo pelas margens florestadas, contaminando, entre outros, árvores e solos utilizados para propósitos agrícolas. Se os estudos dos efeitos em plantas herbáceas são modestos, aqueles com árvores inexistem. Por isso, pesquisas de métodos eficientes para a retirada ou estabilização do petróleo no solo são notadamente importantes neste ambiente. Apesar de *E. polystachya* ter rebrotado em solos contaminados com quantidades moderadas de petróleo, estudos em campo são necessários para comprovar sua eficácia para biorremediação.

O clima, por meio de alterações na temperatura, mostrou influenciar a resposta de *E. polystachya* ao petróleo. No experimento realizado no período de julho a setembro, quando o clima é mais ameno, as plantas foram menos afetadas que no período entre setembro e novembro, quando as temperaturas são mais elevadas nesta região da Amazônia. Isto mostra que as estimativas de impacto devem levar em consideração o período em que ocorreu o derramamento e mostra a necessidade de realizar estudos com as plantas coletadas no próprio ambiente, e com condições climáticas similares as áreas passíveis de contaminação.

Além da contribuição para as estimativas de danos da contaminação da várzea por petróleo, este estudo mostrou que métodos de fácil aplicação como a dose letal média (DL₅₀) e a análise de superfície de resposta, que não costumam ser empregados com a finalidade aqui utilizada, podem ser muito eficientes para a avaliação do efeito do petróleo sobre a vegetação, por permitirem a integração de vários fatores, podendo ser utilizados tanto no planejamento de experimentos, quando para prever os impactos de poluentes no ambientes. Experimentos

que esclareçam as modificações no metabolismo das plantas que geram a inibição do crescimento, entre elas, medidas de taxa de fotossíntese, quantificação de nutrientes e metais pesados na biomassa viva e no substrato, são fundamentais. Tais experimentos seriam facilitados e teriam seus custos reduzidos com a escolha da dosagem por meio de experimentos prévios como a análise de superfície de reposta.

REFERÊNCIAS

- Adam, G. & Duncan, H. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*, 120: 363–370
- Allaby, M. 1994. Oxford Concise Dictionary of Ecology. Oxford University Press, Oxford and New York, 415 pp.
- Baker, J.M. 1970. The effects of oils on plants. *Environmental Pollution* 1: 27-44.
- Bryner, P., Walton, D., Mendelsohn, I. A., Lin, Q. & Mullin, J. V. 2003. Effects of in-situ oil burning on costal wetlands: soil temperatures and regrowth of marsh plant species. *International Oil Spill Conference*, 115-121.
- Burridge, T. R., Shir, M-A. 1995 The Comparative Effects of Oil Dispersants and Oil/Dispersant Conjugates on Germination of the Marine Macroalga *Phyllospora comosa* (Fucales: Phaeophyta). *Marine Pollution Bulletin*, 31 (4-12): 446-452.
- Castelões, L. 2002. Bacia sedimentar do Amazonas é a terceira em produção de petróleo. *Com Ciência: SBPC/Labjor*. Acesso em 27 de novembro de 2005. <http://www.comciencia.br>
- Colares, I. G., Colares, E. P. 2002. Food Plants Eaten by Amazonian Manatees (*Trichechus inunguis*, Mammalia: Sirenia) *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(1):67 – 72.
- Conpet – Programa Nacional da Racionalização do Uso dos Derivados do Petróleo e do Gás natural. *Amazônia é alvo de investimentos em geração de energia para 2007*. Ministério de Minas e Energia. Acesso em: 29 de nov. 2005. Disponível em: <http://www.conpnet.gov.br>.
- Couceiro, S. R. M., Hamada, N., Ferreira, R. L. M., Forsberg, B.R. 2006. Effects of an oil spills and discharge of domestic sewage on the insect fauna of Cururu Stream, Manaus, Amazonas, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 66(1a), 35-44.
- Couceiro, S. R. M., Hamada, N., Ferreira, R. L. M., Forsberg, B.R., Silva, J. O. da. 2007. Domestic Sewage and Oil Spills in Streams: effects on edaphic invertebrates in flooded forest, Manaus, Amazonas, Brazil. *Water, Air Soil Pollution*, 180: 249-259.

- Crema L.C. 2003. Efeito de diferentes concentrações de petróleo sobre o crescimento da macrófita aquática *Eichhornia crassipes*. Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 16p.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R. & Huang, J.W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*, 13:393–397.
- Esteves, F. A. 1982. Biomass and analysis of the major inorganic components of floating aquatic macrophytes *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms in six reservoirs of São Paulo State, Brazil. *Ciência e Cultura*, 34: 1197-1200.
- Forsberg, B. R., Hamada, N., Ferreira, R., Conserva, A., Frickmann, F., Couceiro, S., Silva, J. 2001. *Avaliação da Integridade da Biota do Ecossistema do Cururu Após o Vazamento de Petróleo: Relatório Final*. Manaus: Fundação Djalma Batista, CD-rom.
- Hitchcock, A. S. 1936. *Manual of the grasses of the West Indies*. In: Miscellaneous Publications. Washington: United States Department of Agriculture, 243-439
- Hoehne, F. C. 1948. *Plantas Aquáticas*. São Paulo: Secretaria de Agricultura, 168p.
- Irion, G., Junk, W. J., Mello, J. A. S. N. de. 1997. The large Central Amazonian river floodplain near Manaus: geological, climatological, and geomorphological aspects. In: W. J. Junk (ed.) *The Central Amazon Floodplain*. New York: Springer-Verlag, 126:23-46.
- Junk, W. J., Bayley, P. B., Sparks, R. E. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems, In: D. P. Dodge (ed.). *Proceedings of the International Large River Symposium* Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci, 106.
- Junk, W. J., Howard-Williams C. 1984. Ecology of aquatic macrophytes in Amazonia. In: H. Sioli (ed.) *The Amazon Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin*. Dordrecht: Boston, Lancaster, 269-293.
- Junk, W. J., Piedade, M.T. 1993. Biomass and primary-production of herbaceous plant communities in the Amazon floodplain. *Hydrobiology*, 263: 155-162,
- Junk, W. J., Piedade, M.T. 1997. Plant life in the floodplain with special reference to herbaceous plants. In: W. J. Junk (ed.) *The Central Amazon Floodplain*. New York: Springer-Verlag, 126:147– 181.
- Junk, W. J., Piedade, M.T. 2004 Status of knowledge, ongoing research, and research needs in Amazonian wetlands. *Wetlands Ecology and Management*, 12(6): 597-609.
- Keramitsoglou, I., Certalis, C. & Kassomenos, P. 2003. Decision Support System for Managing Oil Spill Events. *Environmental Management*, 32(2): 290-298.
- Larcher, W. 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. RiMa, São Carlos, 365 pp.

- Lieth, H. 1975. Primary production of the major vegetation units of the world. In: H. Lieth & R. H. Whittaker (eds.) *Primary Productivity of the Biosphere*, New York: Springer - Verlag, 203-215.
- Lin, Q., Mendelssohn, I. A., 1996. A comparative investigation of the effects of Louisiana crude oil on the vegetation of fresh, brackish, and salt marsh. *Marine Pollution Bulletin*, 32 (2):202–209.
- Lopes, A., Piedade, M. T. F., Almeida-Val, V.M.F. 2005. Efeito da dosagem do petróleo de Urucu (Coari-AM) sobre a sobrevivência de *Echinochloa polystachya* (Projeto Piloto). In: Anais do I Congresso Internacional do PIATAM. Manaus: Universidade Federal do Amazonas / Centro de Pesquisas da Petrobrás 113-113.
- Macek, T., Mackova, M., Kas, J. 2000. Research review paper: exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances*, 18: 23–34.
- Melack, J. M., Forsberg, B. R. 2001. Biochemistry of Amazon floodplain lakes and associated wetlands. In: M. E. McClain, R. L. Victoria & J. E. Richey (eds.) *The Biochemistry of the Amazon Basin*. Oxford: Oxford University Press, 235-274.
- Malallah, G.; Afzal, M.; Gulshan, S.; Kurian, M.; Dhimi, M. S. I. 1996. *Vicia faba* as a bioindicator of oil pollution. *Environmental Pollution*, 92: 213-217.
- Muratova, A. Y.; Turkovskaya, O. V.; Hübner, T. E Kusch, P. 2003. Studies of the Efficacy of Alfalfa and Reed in the Phytoremediation of Hydrocarbon-Polluted Soil. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39: 681-688.
- Newman, S. H., Anderson, D. W., Ziccardi, M. H., Trupkiewicz, J. G., Tseng, F. S., Christopher, M. M., Zinkl, J. G. 2000. An experimental soft-release of oil-spill rehabilitated American coots (*Fulica americana*): II. Effects on health and blood parameters. *Environmental Pollution*, 107 : 295-304.
- Oliveira, J. A., Cambraia, J., Cano, M. A. O., Jordão, C. P. 2001 Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13 (3): 329-341
- Osuji, L. C., Onajake, C. M. 2006. Field reconnaissance and estimation of petroleum hydrocarbon and heavy metal contents of soil affected by the Ebocha-8 oil spillage in Niger Delta, Nigeria. *Journal of Environmental Management*, 79:133-139
- Peterson, C. H., Rice. S. D., Short, J. W., Esler, D., Bodkin, J. L., Ballachey, B. E., Irons, D. B. 2003. Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science*, 302: 2082-2086.

- Petrobrás. 2006. Província Petrolífera de Urucu. Acesso em 05 de março de 2006. Disponível em: <<http://www2.petrobras.com.br>>.
- Petrucchio, M. M., Esteves, F. A. 2000. Uptake rates of nitrogen and phosphorus in the water by *Eichhornia crassipes* and *Salvinia auriculata*. *Revista Brasileira de Biologia*, 60 (2): 229-236.
- Pezeshki, S. R., DeLaune, R. D. 1993. Effect of crude oil on gas exchange functions of *Juncus roemerianus* and *Spartina alterniflora*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 68: 461-468.
- Pezeshki, S. R., DeLaune, R. D., Patrick Jr., W. H. 1989. Effect of fluctuating rhizosphere redox potential on carbon assimilation of *Spartina alterniflora*. *Oecologia*, 80: 132-135.
- Pezeshki, S. R., DeLaune, R. D. & Jugsujinda, A. 2001. The effect of crude oil and the effectiveness of cleaner application following oiling on US Gulf of Mexico coastal marsh plants. *Environmental Pollution*, 112:483-489.
- Pezeshki, S. R., Hester, M. W., Lin, Q., Nyman, J.A. 2000. The effect of oil spill and cleanup on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environment Pollution*, 180:129-139.
- Piedade, M. T. F. 1988. Biomassa, produtividade e atividade fotossintética de *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock (Gramineae = Poacea), capim semi-aquático da várzea amazônica. Tese de Doutorado. INPA/FUA. 154p.
- Piedade, M. T. F. 1993. Biologia e ecologia de *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock (Gramineae=Poaceae), capim semi-aquático da várzea amazônica. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 4: 467-484.
- Piedade, M. T. F., Junk, W. J., Long, S. P. 1991. The productivity of the C4 grass *Echinochloa polystachya* on the Amazon floodplain. *Ecology*, 72(4): 1456-1463.
- Piedade, M. T. F., Junk, W. J., Long, S. P. 1997. Nutrients dynamics of the highly productive C4 macrophyte *Echinochloa polystachya* on the Amazon floodplain. *Functional Ecology*, Reino Unido, 11:60-65.
- Piedade, M. T. F., Junk, W. J., Mello, J. A. S. N. 1992. A floodplain grassland of the Central Amazon. In: S. P. Long, M. B. Jones. & J. M. Roberts (eds.). Productivity of grass ecosystems of the Tropics and Sub-Tropics. London: Chapman & Hall/UNEP, 127-158.
- Pott, V. J., Pott, A. 2000. Plantas Aquáticas do Pantanal. Brasília: Embrapa, 404p.

- Prado, K. L. L., Rubin, M. A. L. 2003. Efeito de petróleo sobre a macrófita aquática *Eichhornia crassipes* em experimento de laboratório. Anais do VI Congresso de Ecologia do Brasil. 83-85.
- Ranwell, D. S. 1968. Lichen mortality due to 'Torrey Canyon' oil and decontamination measures. *Lichenologist*, 4: 55-56.
- Ribeiro, M. de N. G., Adis, J. 1984. Local rainfall variability – a potencial bias for bioecological studies in the Central Amazon. *Acta Amazonica*, 14(21): 159-174.
- Ricklefs, R.E. 1993. A economia da natureza: um livro texto de ecologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 470p.
- Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía, A. 2004a. Estudio de toxicidad vegetal em suelos com petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia*, 29(7): 369-376.
- Rivera-Cruz, M.C., Ferrera-Cerrato, R.; Sanches-García, P., Volke, H.V.; Rodríguez, V.R. 2004b. Problación microbiana em perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco. *Agrociencia*, 36: 149-160.
- Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía, A., De La Cruz, A. M., Chávez, E. M. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados com petróleos nuevo e intemperizado mediante esayos con Leguminosas. *Interciencia*, 30 (6): 326-330.
- Salati, E. & Marques, J. 1984. Climatology of the Amazon region. In: Sioli H (ed) The Amazon – Limnology and landscape, ecoly of a mighty tropical river and its basin. Monographie Biologicae. Junk, Dordrecht, 85- 126.
- Silva, R. S. de. 2005. Efeito do Petróleo sobre o Crescimento da Macrófita Aquática *Pistia stratiotes*. Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 20p.
- Thomaz, S. M., Esteves, F. A. 1986. Valores energéticos da biomassa de algumas espécies de macrófitas aquáticas tropicais. *Ciência e Cultura*, 38(10): 1691 – 1695.
- Thomaz, S. M., Bini, L. M. 2003. Ecologia e Manejo de Macrófitas Aquáticas. Eduem, Maringá.
- Thomaz, S. M., Pagioro, T. A., Bini, L. M., Murphy, K. J. 2006. Effect of reservior drawdown on biomass of three species of aquatic macrophytes ina large sub-tropical reservoir (Itaipu, Brazil). *Hydrobiologia*, 570:53-59
- Val, A. L., Almeida-Val, V. M. 1999. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon. In: A. L. Val & V. M. F. Almeida-Val (ed.) Biology of Tropical Fishes, Manaus: INPA, 22:277-291.

Victorio, S. S., Camargo, A. F. M., Henry-Silva, G. G. 2006. Influência de diferentes concentrações de petróleo sobre macrófita aquática submersa enraizada *Egeria densa*. Livro de Resumos da Reunião Anual de Avaliação PRH-ANP 2006 . 117-120.

Anexo A

Seguem abaixo as normas para publicação da Revista *Environmental Pollution* que foram utilizadas para a formatação dos artigos desta dissertação.

Description

Environmental Pollution is an international journal that addresses issues relevant to the nature, distribution and ecological effects of all types and forms of chemical pollutants in air, soil and water. The Editors welcome articles based on original research, findings from re-examination and interpretation of existing data and reviews of important issues. In addition, the journal also publishes articles on new methods of detection, study and remediation of environmental pollutants.

A subscription to *Environmental Pollution* gives you wide-ranging information on all topics of current interest and importance. You will benefit from:

- * original and timely discussions of the ecological implications of pollution problems from a variety of viewpoints.
- * results of new research into all aspects of pollution. Papers focus particularly on the distribution and ecological effects of environmental pollutants, and on new techniques for their study and measurement
- * review articles by international authorities giving up-to-date critical reviews of particular pollution problems
- * occasional themed issues on topics of particular interest
- * the expertise of an active international Editorial Board
- * a bibliography surveying current available literature compiled with the assistance of Excerpta Medica.

All types of pollution are covered, including atmospheric pollutants, detergents, fertilizers, industrial effluents, metals, mining wastes, oil, pesticides, plastics, radioactive materials and sewage.

(...)

Abstract. A concise and factual abstract is required (maximum length 100-150 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

Capsule: In addition to the abstract for the manuscript, authors are required to submit a one-sentence statement that describes the significance of their work to the rest of the scientific community. When necessary, the capsule may be edited before publication.

Keywords. Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. Note that these keywords will be used for indexing purposes.

N.B. Acknowledgements. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Arrangement of the article

Subdivision of the article. Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text."

Introduction. State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Materials and methods. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results. Results should be clear and concise.

Discussion. This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

Conclusions. A short Conclusions section is to be presented.

Acknowledgements. Place acknowledgments, including information on grants received, before the references in a separate section, and not as a footnote on the title page.

References. See separate section, below. Units and symbols. The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if in certain instance, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius.

Figure legends, tables, figures, schemes. Present these, in this order, at the end of the article.

They are described in more detail below. High-resolution graphic files must always be provided separate from the main text file (see the Preparation of Artwork section below).

Table footnotes. Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Tables. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. (...)

References

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors.

Citations in the text. Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Citing and listing of Web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (Author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single Author:* the Author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. *Two Authors*: both Authors' names and the year of publication;

3. *Three or more Authors*: first Author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same Author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Maiores detalhes podem ser obtidos em:

<http://authors.elsevier.com/JournalDetail.html?PubID=405856&Precis=DESC>