

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DA TOXIDEZ E POTENCIAL DE
FITORREMEDIAÇÃO DA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE
PETRÓLEO SALINA PELA HALÓFITA *Spartina
alterniflora* LOISEL. (POACEAE)**

AFRÂNIO GOMES NETO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE.

Orientador: César Serra Bonifácio Costa



RIO GRANDE

Maio de 2008

Dedico este trabalho à Thaís de Lima Alves, minha mulher e amiga, que me apoiou ao longo desta empreitada.

Amanhã...

Vai ser outro dia...

...

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar às minhas mulheres, Thaís e Júlia, minhas razões de ser.

Muito obrigado aos meus pais, pelo apoio incondicional.

Não há palavras para expressar minha gratidão ao professor César Costa, sempre nos estimulando, com uma aptidão ímpar para fazer ciência.

Obrigado também aos membros da banca de avaliação, professores David Marques, Paulo Abreu e Ulrich Seeliger, pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Sou extremamente grato ao Programa de Formação de Recursos Humanos no. 27 da Agência Nacional de Petróleo (PRH27-ANP), representado na FURG pelos professores Gilberto Griep e Isabel Machado, pela concessão da bolsa e suporte logístico e com as análises químicas realizadas neste trabalho.

A toda a rapaziada do laboratório de ECOVECO, que me ajudou em muito, tanto no desenvolvimento deste trabalho quanto na manutenção da minha sanidade mental.

Obrigado a todo o pessoal da Base Oceanográfica, começando pelos alunos, vários dos quais hoje são meus amigos, aos professores, funcionários administrativos, em especial ao Voto e à Vera, pessoas incríveis que permitem o bom andamento do trabalho de todos os pesquisadores, à rapaziada da limpeza, sempre com um sorriso no rosto, aos vigilantes, enfim, aos que fizeram parte da minha vida esses últimos anos.

Um agradecimento especial ao Nicolas e à Gabizinha; sem a parceria deles este trabalho não aconteceria.

Agradeço ainda a todas as pessoas que cruzaram meu caminho nestes anos de 'papa-areia'.

Por fim, expresso minha eterna gratidão a toda a parentaiada, com atenção especial à Bel, e aos meus amigos eternos de Peruíbe, Itajaí e de todos os outros cantos.

ÍNDICE

Agradecimentos	III
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
Resumo.....	X
Abstract.....	XII
Capítulo 1: INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Introdução Geral	2
OBJETIVO	7
Capítulo 2: SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DA GRAMA DE MARISMAS <i>Spartina alterniflora</i> LOISEL. CULTIVADA EM ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO SALINA.....	8
Introdução	9
Materiais e Métodos.....	12
Montagem do experimento.....	12
Análise dos dados.....	15
Sobrevivência.....	15
Crescimento	16
Resultados	16
Sobrevivência.....	16
Crescimento	18
Discussão.....	20

Capítulo 3: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DA GRAMA HALÓFITA <i>Spartina alterniflora</i> LOISEL. PARA A FITORREMEDIAÇÃO DE ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO SALINA.	25
Introdução	26
Materiais e Métodos.....	29
Montagem do experimento.....	29
Parâmetros abióticos e bióticos monitorados.....	30
Análise de dados.....	34
Resultados	36
Condições do ambiente experimental	36
Nitrogênio Amoniacal, Nitrato e Nitrito	39
Óleos e Graxas	40
Desenvolvimento de <i>Spartina alterniflora</i>	43
Biomassa	44
Medidas não-destrutivas	44
Concentração de N no tecido.....	45
Discussão.....	50
Capítulo 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
LITERATURA CITADA.....	62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Variedades de petróleo presentes no tanque de onde foi retirada a água de produção de petróleo salina para o cultivo de *S. alterniflora*. A concentração relativa e a densidade de cada variedade de petróleo no tanque, assim como as concentrações de nitrogênio (N) e enxofre (S) das duas variedades mais representativas são apresentadas. A densidade da mistura foi de 24,7 °API. Fonte: Terminal Almirante Soares Dutra ‘TEDUT’..... 13
- Tabela 2. Concentrações iniciais de óleos e graxas (O&G), NaCl e nitrogênio amoniacal dissolvido ($N-NH_4^+ + N-NH_3^+$) estimados para cada tratamento – concentração – de água de produção de petróleo salina..... 15
- Tabela 3. Variação na concentração de óleos e graxas (O&G) na água de produção proveniente de diferentes locais..... 21
- Tabela 4. Diferença percentual entre as concentrações médias de nitrogênio amoniacal dissolvido ($N-NH_4^+ + N-NH_3^+$) dos tratamentos controle e com *S. alterniflora*. Valores negativos indicam redução do nitrogênio amoniacal na presença de *S. alterniflora*. * indica que houve diferença significativa na concentração do composto entre os tratamentos ($p < 0,05$; Teste de LSD). 40

Tabela 5. Diferença percentual entre as concentrações médias de óleos e graxas (O&G) entre os tratamentos controle e com *S. alterniflora*. Valores negativos indicam redução na presença de *S. alterniflora*. 41

Tabela 6. Testes de diferenças entre réplicas (tanques) das variáveis de crescimento das plantas de *S. alterniflora* cultivada em água de produção de petróleo salina. Número de réplicas (n), F e H (ANOVA e Kruskal-Wallis, respectivamente) calculados e nível de significância 'p' são apresentados. * = utilizada Análise de Variância não paramétrica de Kruskal-Wallis. 43

Tabela 7. Quantidade total de N (mg) em cada componente da biomassa das plantas de *S. alterniflora* e a percentagem da quantidade global contida em cada tecidos. 47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Curvas de sobrevivência comparando o desempenho de *S. alterniflora* em seis concentrações de água de produção (AP). As sobrevivências nas concentrações de AP com as mesmas letras minúsculas não apresentaram diferenças significativas após sete semanas de cultivo. 17
- Figura 2. Efeito da concentração de água de produção nas biomassas aérea de folhas vivas (A) e mortas (B), de raízes (C) e de brotos (D) de *S. alterniflora*, após sete semanas em cultivo hidropônico. São apresentadas as médias com as barras verticais mostrando o erro-padrão. Não foram observadas diferenças significativas nas biomassas de folhas vivas (A) e mortas (B). Médias com as mesmas letras minúsculas são estatisticamente iguais. 19
- Figura 3. Variações nas temperaturas máximas, médias e mínimas diárias do ar dentro da casa de vegetação (A), pH (B), oxigênio dissolvido (C) e concentração de clorofila-*a* (D) da água de produção diluída dos tanques contendo *S. alterniflora* e sem plantas (controle) ao longo do período experimental. 38
- Figura 4. Concentração de nitrogênio amoniacal dissolvido, nitrato e óleos e graxas (média \pm erro-padrão) ao longo do tempo, em tanques de água de produção contendo *S. alterniflora* e sem plantas (controle). * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos no dia amostral..... 42

- Figura 5. Biomassa aérea viva (A) e de raízes (B) (média + erro padrão) de *S. alterniflora* no início (Dia '0') e no final (Dia '21') do experimento. 44
- Figura 6. Comprimento da haste (A) e número de folhas (B) (média + erro padrão) de *S. alterniflora* no início (Dia '0') e no final (Dia '21') do experimento. 45
- Figura 7. Concentrações inicial e final de N nos tratamentos de AP com e sem a presença de *S. alterniflora*, tanto na água quanto nos tecidos da planta. Os valores entre parênteses indicam o percentual de aumento (+) ou redução (-) na concentração N e as caixas pretas simbolizam o N contido na biomassa dos microorganismos presentes na água. 49

Resumo

A água de produção (AP) é um efluente de composição complexa e variada proveniente da extração de petróleo. Visando avaliar o potencial de crescimento e fitorremediação da AP pela grama de marismas *Spartina alterniflora*, esta planta foi cultivada em algumas concentrações deste efluente para determinar sua sensibilidade e, posteriormente, ser quantificada sua capacidade de alterar a composição química da AP em um experimento piloto. Propágulos de *S. alterniflora* foram cultivados por sete semanas em vasos com AP salina bruta (concentração salina = 30 g NaCl L⁻¹) e diluída em água destilada. Foram utilizadas 20 repetições para cada uma das seguintes concentrações: 100%, 80%, 50%, 30% e 10% AP e solução salina controle (10 g NaCl L⁻¹ – na qual o crescimento da planta é ótimo). As sobrevivências diferiram significativamente entre os tratamentos (Chi-quadrado *post hoc* Log Rank). As sobrevivências em 30% AP e 10% AP (ambas 75% de sobrevivência) foram significativamente superiores que em 100% AP (35% de sobrevivência). As biomassas médias de raízes em 50% AP, 30% AP e 10% AP (116,3 - 151,6 mg) foram significativamente maiores (ANOVA *post hoc* LSD) do que no controle (39,5 mg). Já as biomassas de brotos produzidos em 30% AP e 10% AP (102,9 e 99,8 mg) foram significativamente maiores que em 80% AP e controle (25,7 e 28,4 mg). Estes resultados demonstraram a viabilidade de cultivar *S. alterniflora* em AP. O melhor desempenho de *S. alterniflora* cultivada em AP diluída (10% AP e 30% AP) em relação ao controle sugere que, uma vez diluídos os poluentes da AP, os

nutrientes dissolvidos neste efluente podem sustentar um crescimento vigoroso desta planta. No segundo experimento, propágulos de *S. alterniflora* foram cultivados durante 21 dias em galões (n = 5) com 50 L de AP diluída a 30% (concentração salina = 10 g NaCl L⁻¹) e as alterações nas concentrações de N-NH₄⁺ e óleos e graxas (O&G) no efluente foram comparadas com galões controle, sem a presença de plantas. Foi também avaliado o acúmulo de N nos diferentes tecidos de *S. alterniflora*. Ao final do experimento, a concentração de N-NH₄⁺ foi significativamente menor (ANOVA medidas repetidas) nos galões com *S. alterniflora* (49 mg L⁻¹ contra 60 mg L⁻¹ do controle). Entretanto, em ambos os tratamentos ocorreram semelhantes oscilações temporais na concentração de N-NH₄⁺, com magnitudes maiores do que diferença final entre os tratamentos, sugerindo que a microbiota exerceu uma maior influência sobre o nitrogênio amoniacal do que a presença da planta. *S. alterniflora*, contudo, acumulou N em seus tecidos, sendo a maior concentração nos brotos e a menor nas folhas mortas, demonstrando sua capacidade de absorver e acumular este nutriente. A concentração de O&G não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, mas sua redução, na primeira semana, foi mais acentuada no tratamento contendo *S. alterniflora*. São levantadas hipóteses sobre a influência da planta no crescimento da microbiota, além dos efeitos da temperatura, pH e da microbiota na redução do N-NH₄⁺ e na degradação dos O&G.

Palavras-chave: sobrevivência; crescimento; petróleo; nitrogênio; óleos e graxas; *Spartina*.

Abstract

Produced water (PW) is an oil industry wastewater with a complex and variable composition. Aiming to evaluate *Spartina alterniflora* growth and phytoremediation potential on PW this plant species was grown in several PW concentrations to determine its sensitivity and later its ability to modify PW composition, quantified in a pilot experiment. *S. alterniflora* propagules were grown for seven weeks in glass vessels (2.5 L) with raw and diluted saline PW (salt concentration = 30 g NaCl L⁻¹). Twenty repetitions with the following concentrations have been used: 100%, 80%, 50%, 30% and 10% PW, plus a saline control solution (10 g NaCl L⁻¹). Survival has been significantly affected by PW concentrations (Chi-square *post hoc* Log Rank). Survival rates in 30% PW and 10% PW (both 75%) were significantly higher than in 100% PW (35%). Root mean biomass of plants cultivated in 50% PW, 30% PW and 10% PW (116.3-151.6 mg) were significantly higher (ANOVA *post hoc* LSD) than those in control (39.5 mg). Sprouts mean biomass of 30% PW (102.9 mg) and 10%PW (99.8 mg) plants were significantly higher than 80% PW plants (25.7 mg) and control (28.4 mg). Results demonstrated the viability of growing *S. alterniflora* in PW. Higher survivals and growth rates in 10% PW and 30% PW concentrations than in control suggest that once the toxic components of PW are diluted its nutrients are able to sustain *S. alterniflora* growth. In the following experiment *S. alterniflora* propagules were grown during 21 days in vessels (n = 5) containing 50 L of 30% AP (salt concentration = 10 g NaCl L⁻¹). Changes in N-NH₄⁺ and O&G contents of this diluted PW were compared with control vessels without plants. N

uptake by distinct plant parts was also evaluated. After 21 days the N-NH_4^+ mean concentration in the vessels with plants (49 mg L^{-1}) was significantly lower than in control (60 mg L^{-1}). However this difference was smaller than the range of temporal oscillations of N-NH_4^+ occurring through out the experiment in both treatments, suggesting that microorganisms had a stronger influence over ammoniacal nitrogen concentration than the plant itself. Thereafter, *S. alterniflora* accumulated N, with higher N content in the sprouts and lower in the dead leaves showing its capacity to absorb and accumulate this nutrient. Although O&G concentration showed no significant differences between treatments the O&G reduction in the first week of cultivation was stronger in the treatment with *S. alterniflora*. Hypotheses about the plant influence over the microorganisms growth and temperature and microorganisms effects on N-NH_4^+ and O&G concentrations were also raised.

Keywords: survival; growth; oil; nitrogen; oil & grease; *Spartina*.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

Introdução Geral

A água de produção (AP; em inglês: “produced water”, “formation water” ou “oilfield brine”) é um efluente complexo da indústria do petróleo, composto por água de formação (água do mar naturalmente presente no reservatório), água injetada no poço para manutenção da pressão de extração do óleo e fluidos diversos utilizados durante o processo de extração (Neff, 2002). Este efluente contém concentrações variadas de sais inorgânicos, elementos traço, como metais pesados e radionuclídeos naturais, hidrocarbonetos dispersos e dissolvidos, além de químicos adicionados na separação água/óleo e na linha de produção (Utivik, 1999; Neff, 2002; OGP, 2005).

À medida que ocorre uma diminuição do volume de óleo no poço mais água é injetada para aumentar a pressão necessária para a extração, fazendo variar o volume de água de produção trazida à superfície com o tempo de vida do reservatório. Em algumas situações o volume de AP pode exceder o volume de óleo (Stephens *et al.*, 2000), chegando, em casos extremos, a ser até dez vezes maior (Campos *et al.*, 2002). Esta água residual gera um enorme volume de efluente para as indústrias petrolíferas ao redor do mundo (Stephenson, 1992; CAPP, 2001; Neff 2002), acarretando em custos substanciais para seu tratamento (Neff, 2002).

Segundo a OGP (2005), em torno de 17 milhões de metros cúbicos de água são produzidos diariamente em plataformas *offshore* ao redor do mundo. Na Bacia

de Campos, o principal pólo nacional de produção de petróleo, são gerados cerca de 3600 metros cúbicos de AP por dia (Freire *et al.*, 2001). Segundo a GESAMP (1993), estimativas de 1990 apontam que cerca de 47000 toneladas ano⁻¹ de hidrocarbonetos sejam lançadas no oceano, oriundos de descarte de água de produção.

Os óleos e graxas (O&G) são abundantes na AP. A concentração de O&G na AP pode chegar a mais de 200 mg L⁻¹ (Neff, 2002); no estado de Wyoming (EUA), as concentrações de O&G encontradas em águas de produção descartadas em banhados podem variar de 2,2 a 54,2 mg L⁻¹ (Ramirez Jr., 2002). No Brasil, o limite estabelecido pela resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) para o despejo de efluentes é de no máximo 20 mg O&G L⁻¹, concentração bastante restritiva quando comparada à de outros países produtores de petróleo (Neff, 2002).

Apesar das propriedades físico-químicas deste efluente variarem consideravelmente (Veil *et al.*, 2004; OGP, 2005), os sais inorgânicos são um de seus principais constituintes (OGP, 2005), com a maioria das APs produzidas *offshore* apresentando salinidade superior à da água do mar (35 g NaCl L⁻¹), chegando, em casos extremos à superar 300 g NaCl L⁻¹; por outro lado, a salinidade de algumas águas de produção pode ser próxima de zero (Neff, 2002).

Os níveis de amônia presente na AP não tratada podem ser muito altos. No Golfo do México, variam de 14 a 246 mg L⁻¹ (Veil *et al.*, 2005) mas, de acordo com Neff (2002), sua concentração neste efluente pode variar de <0,1 a 650 mg L⁻¹. A

amônia forma-se durante a degradação bacteriana de compostos organonitrogenados, durante a formação ou armazenamento da água de produção e, por ser altamente tóxica para os organismos, esta deve ter sua concentração reduzida antes do lançamento do efluente no ambiente (Neff, 2002). A Resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) estabelece o limite de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de amônia para despejo em águas salgadas ou salobras onde haja recreação e de 5 mg L^{-1} também para estas águas, porém quando utilizadas apenas para navegação. As concentrações de nitrato e nitrito geralmente são pequenas na água de produção (Myers *et al.*, 2001).

Outros aspectos químicos que tornam o despejo de AP um problema ambiental são a DBO e a concentração de sulfetos. A DBO em APs varia de 80 a mais de 11000 mg L^{-1} (Veil *et al.*, 2005), sendo o limite estabelecido pela Resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) de 5 mg L^{-1} . A concentração média de sulfeto (H_2S) em AP, segundo a OGP (2005) é de 140 mg L^{-1} . Badaró-Pedroso (1999) encontrou concentrações de sulfeto na ordem de 80 mg L^{-1} em uma AP proveniente de petróleo brasileiro, em São Sebastião. Conforme a Resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) a concentração de sulfeto para despejo no ambiente deve ser inferior a $0,3 \text{ mg L}^{-1}$.

No Brasil, como em outros países onde se explora petróleo no oceano, a maior parte da AP recebe um pré-tratamento e é descartada em mar aberto onde, segundo alguns pesquisadores, é rapidamente diluída (Utvik, 1999; Veil *et al.*, 2004; OGP, 2005). O tratamento mais tradicional em plataformas faz-se com

separadores água/óleo, seguido de descarte no mar ou disposição através de emissários submarinos, quando na zona costeira. A injeção desta água em poços desativados ou para manutenção de pressão em poços ativos também é comumente realizada (GESAMP, 1993)

Parte desta AP, no entanto, é transportada por navios tanque misturada ao óleo até os terminais aquaviários no litoral (Neff, 2002), onde o petróleo é armazenado temporariamente antes de seguir para as refinarias. Nos terminais aquaviários a AP deve ser separada do óleo antes do refino e passa a ser um efluente que pode apresentar riscos ambientais (Henderson *et al.*, 1999; Washburn *et al.*, 1999; Stephens *et al.*, 2000; Holdway, 2002; OGP, 2002; Thomas *et al.*, 2004; Durell *et al.*, 2006; Tollefsen *et al.*, 2006; Lu *et al.* 2006).

A avaliação dos riscos associados ao descarte de AP ainda gera controvérsias (Gray, 2002; Ekins *et al.*, 2007). Estudos indicam que em ambientes de baixa energia podem ser observados efeitos sobre a comunidade aquática e, *offshore*, mesmo com o efluente sendo rapidamente diluído, os riscos não são irrelevantes (GESAMP, 1993). A fim de mitigar possíveis danos a organismos marinho-costeiros a AP deve passar por um sistema de tratamento eficiente, que acaba por envolver custos mais altos.

Avanços recentes na tecnologia de tratamento de AP sugerem o uso de tanques com macrófitas emergentes (Myers *et al.*, 2001), ou seja, a fitorremediação do efluente. Ji *et al.* (2007) encontraram alta eficiência na redução da DQO, da DBO e na remoção de nitrogênio de AP utilizando um sistema de

banhado construído colonizado com macrófitas ('reed', nome científico não mencionado; provavelmente *Phragmites australis*).

O termo fitorremediação (do grego *phyto* = planta + remediação = tratamento) designa o uso de plantas para o tratamento de águas ou solos contaminados, envolvendo tanto processos biológicos, quanto químicos e físicos. Inclui-se aí, portanto, o tratamento de efluentes através de banhados construídos, um método eficiente e de baixo custo (Knight *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2002). Um dos desafios para a fitorremediação da AP, no entanto, é a usual alta concentração de NaCl deste efluente (Freire *et al.*, 2001), levando à necessidade da utilização de macrófitas tolerantes ao sal.

A espécie vegetal *Spartina alterniflora* Loisel. é uma macrófita emergente dominante de marismas, ocorrendo em planos entremarés de estuários ao longo de boa parte da costa leste do continente americano (Costa & Davy, 1992). Esta espécie é altamente adaptada a flutuações na salinidade e possui certa resistência ao óleo (Lin & Mendelsohn, 1996; Smith & Proffit, 1999; Lin *et al.*, 2002a), já tendo inclusive sido utilizada para a recuperação de planos lamosos e marismas afetados por derramamentos de óleo (Bergen *et al.*, 2000; Vitaliano *et al.*, 2002).

S. alterniflora, além de assimilar compostos nitrogenados e ter sua capacidade fotossintética estimulada por este nutriente (Daí & Wiegert, 1997), auxilia na degradação de hidrocarbonetos de petróleo (Lin *et al.*, 2003). Possui um tecido esponjoso que forma um sistema de vasos comunicantes, conhecido por aerênquima, que é capaz de oxigenar o substrato no qual a planta está

estabelecida. Desta forma a planta pode ainda auxiliar na degradação de diversos compostos sensíveis às condições físico-químicas e estimular também a degradação microbiana destes.

OBJETIVOS

Este trabalho visou 1) avaliar a capacidade de *S. alterniflora* sobreviver e crescer em diferentes concentrações de AP salina gerada em um terminal da Transpetro e 2) analisar o potencial de utilização desta planta em um sistema hidropônico de fitorremediação deste efluente.

Capítulo 2

SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DA GRAMA DE MARISMAS *Spartina alterniflora* LOISEL. CULTIVADA EM ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO SALINA

Introdução

A água de produção (AP), também conhecida como água produzida, é uma mistura complexa da água que é co-produzida com o petróleo. Esta contém concentrações variáveis de sais inorgânicos, elementos traço, tais como metais pesados e radionuclídeos naturais, hidrocarbonetos dissolvidos e aditivos usados durante a extração do petróleo (Stephenson, 1992; Oliveira & Oliveira, 2000; CAPP, 2001; Neff, 2002; OGP, 2005; Dórea, 2007).

O volume de AP é o maior dentre os efluentes resultantes das atividades de exploração e produção do petróleo (Stephenson, 1992; Utvik, 1999; Sirivedhin & Dallbauman, 2004; Veil *et al.*, 2004; Al-Masri, 2006; Lu *et al.*, 2006) e enormes volumes são gerados por todo o mundo (Lin, 1999; Veil *et al.*, 2004; CAPP, 2001; Neff, 2002; OGP, 2005). O volume de AP trazida à superfície depende da tecnologia de extração, características do reservatório e da fase de extração do óleo. Em alguns casos o volume de AP pode exceder em dez vezes o volume de óleo produzido (Stephenson, 1992; Campos *et al.*, 2002; OGP, 2005). Esta água deve ser separada do óleo antes do refino (Neff, 2002) e após a separação esta geralmente é injetada em um poço ou descartada em águas superficiais após tratamento (Lin, 1999; Utvik, 1999; CAPP, 2001; Neff *et al.*, 2006).

Isoladamente, muitos constituintes da AP são tóxicos para vários organismos (Peterson *et al.*, 1996; Henderson *et al.*, 1999; Neff, 2002; OGP, 2002; Thomas *et al.*, 2004; Durell *et al.*, 2006; Tollefsen *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006). Também já foram encontradas respostas crônicas e agudas em organismos

marinhos (peixes, larvas de invertebrados e misidáceos) expostos a AP (Washburn *et al.*, 1999; Stephens *et al.*, 2000; Raimondi & Boxshall, 2002; Elias-Samlalsingh & Agard, 2004). Entretanto, os potenciais efeitos negativos do lançamento de AP em águas costeiras e oceânicas ainda são controversos (Gray, 2002; Ekins *et al.*, 2007).

É possível que a AP não represente riscos à vida marinha quando descartada longe da costa e que seus efeitos nocivos sejam percebidos apenas próximos ao ponto de despejo (Girling, 1989; Reed & Lewis, 1994; Strømgren *et al.*, 1995; Odeigah *et al.*, 1997; Negri & Heyward, 2000; Gray, 2002; Holdway, 2002; Jerrez Vegueira *et al.*, 2002). Entretanto, processos de bioacumulação e biomagnificação podem ocorrer quando AP é descartada em águas costeiras-rasas com baixa hidrodinâmica (Neff, 2002), particularmente nas proximidades de banhados e outros habitats colonizados por vegetais superiores que incorporam compostos tóxicos tanto da coluna d'água quanto do sedimento. Portanto, é necessário que se conheça a toxicidade da AP para os organismos de banhados costeiros e que se desenvolvam maneiras eficazes de tratar este efluente a fim de evitar impactos ambientais nos locais de despejo ao longo da costa.

O tratamento da AP geralmente possui etapas físicas, químicas e biológicas e é um dos procedimentos mais onerosos para a indústria do petróleo (Curtice & Dalrymple, 2004). Um método alternativo poderia ser a fitorremediação através da utilização de banhados construídos que, quando comparados aos métodos tradicionais, apresentam menor custo (Knight *et al.*, 1999; Gratão, 2005). Porém,

as usuais altas salinidades deste efluente impõem dificuldades de tratamento, especialmente para as etapas biológicas (Campos *et al.*, 2002). A fim de desenvolver um sistema de fitorremediação eficiente, plantas tolerantes ao sal devem ser selecionadas.

Embora o uso de banhados para a redução da carga tóxica da AP já tenha sido reportado (Anonymous, 1997; Canning, 1998; Knight *et al.*, 1999; Myers *et al.*, 2001; Ji *et al.*, 2007), as espécies utilizadas assim como as respostas destas à exposição a AP não foram especificadas. Além disso, não foram encontrados durante a revisão bibliográfica estudos a respeito da toxicidade letal da AP a vegetais superiores de marismas.

Spartina alterniflora (macega-mole), halófito amplamente distribuída nas regiões costeiras do continente americano (Costa & Davy, 1992), já foi utilizada na restauração de marismas impactadas por derrames de petróleo (Bergen *et al.*, 2000; Vitaliano *et al.*, 2002). Apesar de respostas de *S. alterniflora* à contaminação por petróleo já terem sido estudadas (DeLaune *et al.*, 1984; Lin e Mendelsohn, 1996; Lindau *et al.*, 1999; Smith & Proffit, 1999; Pezeshki *et al.*, 2000; Pezeshki, *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002a; Lin *et al.*, 2002b; Lindau, *et al.*, 2003), ainda não é conhecida a viabilidade desta planta em crescer em AP e seu potencial para tratamento deste efluente. Este trabalho, por conseguinte, objetiva avaliar a sobrevivência e o crescimento de *S. alterniflora* cultivada em hidroponia, sob diferentes concentrações da AP salina. Este procedimento é essencial para posterior avaliação do potencial de uso desta halófito na fitorremediação da AP.

Materiais e Métodos

Montagem do experimento

Propágulos de *S. alterniflora* foram coletados em uma marisma no município de Rio Grande – RS (32°02'37" S; 52°04'09" W), em uma área de 8 m² para reduzir a variabilidade genética. Os propágulos contendo uma haste (colmo) com 2 - 4 folhas e fragmentos de rizoma e raízes foram individualizados, plantados em uma mistura de areia fina e composto orgânico (1:1) dentro de bandejas plásticas de 0,3 m², onde foram mantidos por um mês em casa de vegetação (estufa) não-climatizada. Após este período, 120 plantas saudáveis medindo entre 20 - 55 cm (37,5 ± 0,9 cm; média ± erro padrão) foram cuidadosamente retiradas das bandejas e individualmente alocadas em hidroponia, em vasos de vidro de 3 L. Os vasos continham 2,5 L de seis diferentes concentrações de AP salina proveniente do Terminal Almirante Soares Dutra 'TEDUT', localizado em Osório (RS).

Foi utilizada uma haste por vaso (réplica), cada qual encaixada em uma bóia de isopor para rede de pesca, tamanho 2. Em cada haste, no limite entre a base da bainha das folhas e o primeiro nó de onde partiam as raízes, foi enrolada frouxamente uma fita plástica com 0,5 cm de largura e 15 cm de comprimento, para manter pressão entre a haste e a bóia, evitando que a planta se soltasse da bóia e afundasse no líquido, mantendo assim apenas as raízes submersas.

A AP utilizada foi coletada de um tanque 'maracanã' contendo uma mistura de quatro variedades de petróleo. O percentual e a densidade de cada variedade

de petróleo contido no tanque, assim como as concentrações de nitrogênio e enxofre dos dois tipos mais expressivos (em percentagem do volume total) foram fornecidos pelo TEDUT (Tab. 1). As concentrações de óleos e graxas (O&G), NaCl e nitrogênio amoniacal dissolvido da AP eram de, respectivamente, 120 mg L⁻¹, 30 g L⁻¹ e 381 mg L⁻¹.

Tabela 1. Variedades de petróleo presentes no tanque de onde foi retirada a água de produção de petróleo salina para o cultivo de *S. alterniflora*. A concentração relativa e a densidade de cada variedade de petróleo no tanque, assim como as concentrações de nitrogênio (N) e enxofre (S) das duas variedades mais representativas são apresentadas. A densidade da mistura foi de 24,7 °API.

Variedade de Petróleo	% no tanque	Densidade do óleo (°API)	N (% em massa)	S (% em massa)
Marlin P-33	78.5	20.5	0.47	0.09
Qua lboe	10.2	36.6	0.74	0.23
Bonny Light	6.1	-	-	-
Roncador Brasil	5.2	-	-	-

Fonte: Terminal Almirante Soares Dutra 'TEDUT'.

As seguintes concentrações de AP foram utilizadas: 100%, 80%, 50%, 30%, 10% e 0%. As diluições foram obtidas com a adição de água destilada. Ao tratamento sem AP (controle) foram adicionados 10 g NaCl L⁻¹ para garantir uma condição de salinidade, na qual *S. alterniflora* apresenta crescimento ótimo (entre

5 e 10 g NaCl L⁻¹; Bradley & Morris, 1992; Cunha *et al.*, 2005; USDA, 2000) e permitir comparações entre o controle e os tratamentos com AP salina. As concentrações iniciais de O&G, NaCl e nitrogênio amoniacal dissolvido para cada tratamento são apresentadas na Tabela 2. Cada tratamento foi repetido 20 vezes. Semanalmente foram adicionados 20 ml de solução nutriente padrão Hoagland (Hoagland, 1920 *apud* Bannister, 1976) em cada réplica e o volume evaporado foi repostado com água destilada para manutenção da salinidade inicial.

Após sete semanas as partes aéreas vivas (hastes + folhas vivas, que, a partir deste momento serão tratados apenas como 'folhas vivas'), folhas mortas, raízes e brotos foram separadas, secas a 60 °C por 72 horas e pesadas. As médias das temperaturas máxima e mínima na casa de vegetação foram de, respectivamente, 11.5 ± 0.5 °C e 30.7 ± 1.1 °C (média \pm erro padrão).

Tabela 2. Concentrações iniciais de óleos e graxas (O&G), NaCl e nitrogênio amoniacal dissolvido (N-NH_4^+ + N-NH_3^+) estimados para cada tratamento – concentração – de água de produção de petróleo salina.

Componente	Tratamento					
	Controle	10% AP	30% AP	50% AP	80% AP	100% AP
O&G (mg L^{-1})	0	12	36	60	96	120
NaCl (g L^{-1})	10	3	9	15	24	30
N-NH_4^+ + N-NH_3^+ (mg L^{-1})	0	38	114	191	305	381

Análise dos dados

Sobrevivência

Curvas de sobrevivência de *S. alterniflora* foram geradas a partir do ajuste de polinômios de segunda ordem para o percentual de sobrevivência de cada tratamento, em intervalos de dez dias; todos r^2 obtidos foram maiores do que 0,95. A sobrevivência final foi comparada entre os tratamentos pelo teste de Chi-quadrado, considerando um nível de significância de 0,05 (Kleinbaum, 1996). Uma vez que foram encontradas diferenças significativas nas sobrevivências entre os tratamentos, foram efetuadas comparações par-a-par usando o teste de Log-Rank para duas amostras, a um nível de significância de 0,01 (Kleinbaum, 1996).

Crescimento

Diferenças nas biomassas de folhas vivas, folhas mortas, raízes e brotos, entre os tratamentos, foram testadas por Análise de Variância e o teste *a posteriori* de Fisher - LSD foi utilizado quando encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, ao nível de significância de 0,05 (Sokal & Rohlf, 1981). As normalidades e homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente (Zar, 1984), considerando, para ambas, um nível de significância de 0,05. Para atingir a normalidade todos os valores de biomassa sofreram transformação logarítmica na base 10.

Resultados

Sobrevivência

A sobrevivência de *S. alterniflora* (Fig. 1) foi afetada de maneira significativa pelas concentrações de AP (Chi-quadrado = 12,2; $p < 0,05$). Após 30 dias, a curva de sobrevivência das plantas cultivadas em 100% AP, que apresentavam 50% de sobrevivência, era marcadamente diferente das demais, que apresentavam mortalidade inferior a 20%. Após sete semanas de experimento, comparações par-a-par pelo teste de Log-Rank apontaram diferenças significativas entre a baixa percentagem de sobrevivência das plantas no tratamento com 100% AP (35% de sobrevivência) e as percentagens de sobrevivência das plantas cultivadas em 30% AP e 10% AP; ambas alcançando 75% de sobrevivência.

A sobrevivência das plantas no controle (55%) não foi significativamente diferente das sobrevivências das plantas cultivadas nas diferentes concentrações da AP. Apesar da ausência de diferenças significativas, as plantas em 30% AP e 10% AP alcançaram sobrevivências 36% maiores do que as plantas no controle, enquanto para as plantas cultivadas em 100% AP a sobrevivência foi 63% menor do que as plantas do controle.

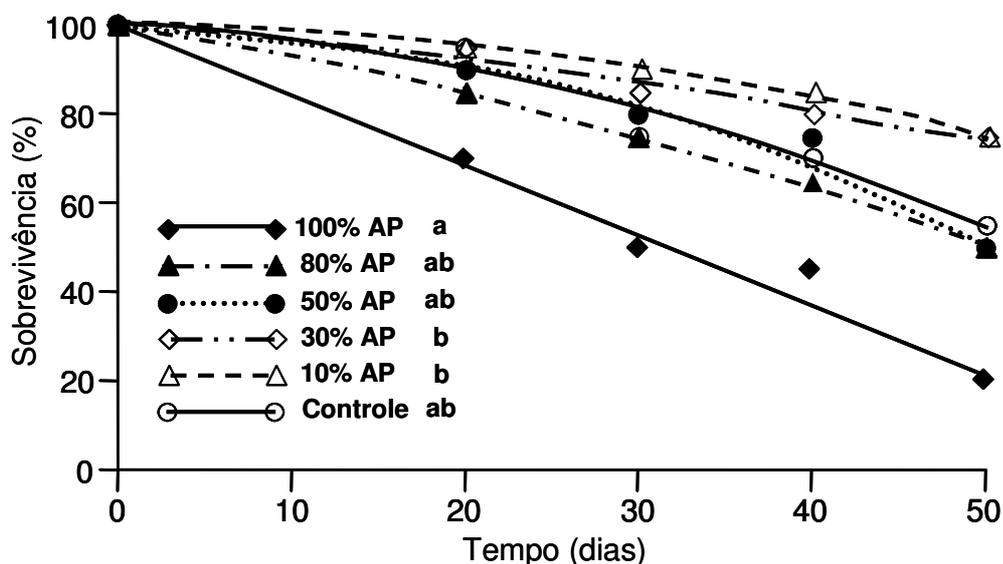


Figura 1. Curvas de sobrevivência comparando o desempenho de *S. alterniflora* em seis concentrações de água de produção (AP). As sobrevivências nas concentrações de AP com as mesmas letras minúsculas não apresentaram diferenças significativas após sete semanas de cultivo.

Crescimento

Os valores médios de todos os componentes da biomassa das plantas no tratamento 100% AP foram similares aos do tratamento 80% AP. O reduzido tamanho amostral em 100% AP (devido à baixa sobrevivência), resultou em um maior erro-padrão das médias de biomassa e conseqüente ausência de diferenças significativas entre plantas cultivadas em 100% AP e nas concentrações médias/baixas de AP (50% AP, 30% AP e 10% AP).

Após sete semanas de cultivo, as biomassas médias de folhas vivas e folhas mortas não apresentaram diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$) entre os tratamentos (Fig. 2A, 2B). Contudo, as plantas cultivadas em concentrações médias/baixas de AP (50% a 10% AP) apresentaram biomassas médias de raízes e brotos significativamente maiores (ANOVA, LSD, $p < 0,05$) do que as cultivadas no controle e nos tratamentos 80% AP e 100% AP (Fig. 2C, 2D). As biomassas médias de raízes em 50% AP e 30% AP foram, nesta ordem, 160% e 180% maiores que em 80% AP, assim como 70% e 290% maiores que no controle. Com exceção do controle, a biomassa de brotos aumentou com a redução na concentração de AP. A biomassa média de brotos em 30% AP e 10% AP foram, respectivamente, 300% e 280% superiores a das plantas em 80% AP, assim como foram 270% e 260% superiores a do controle.

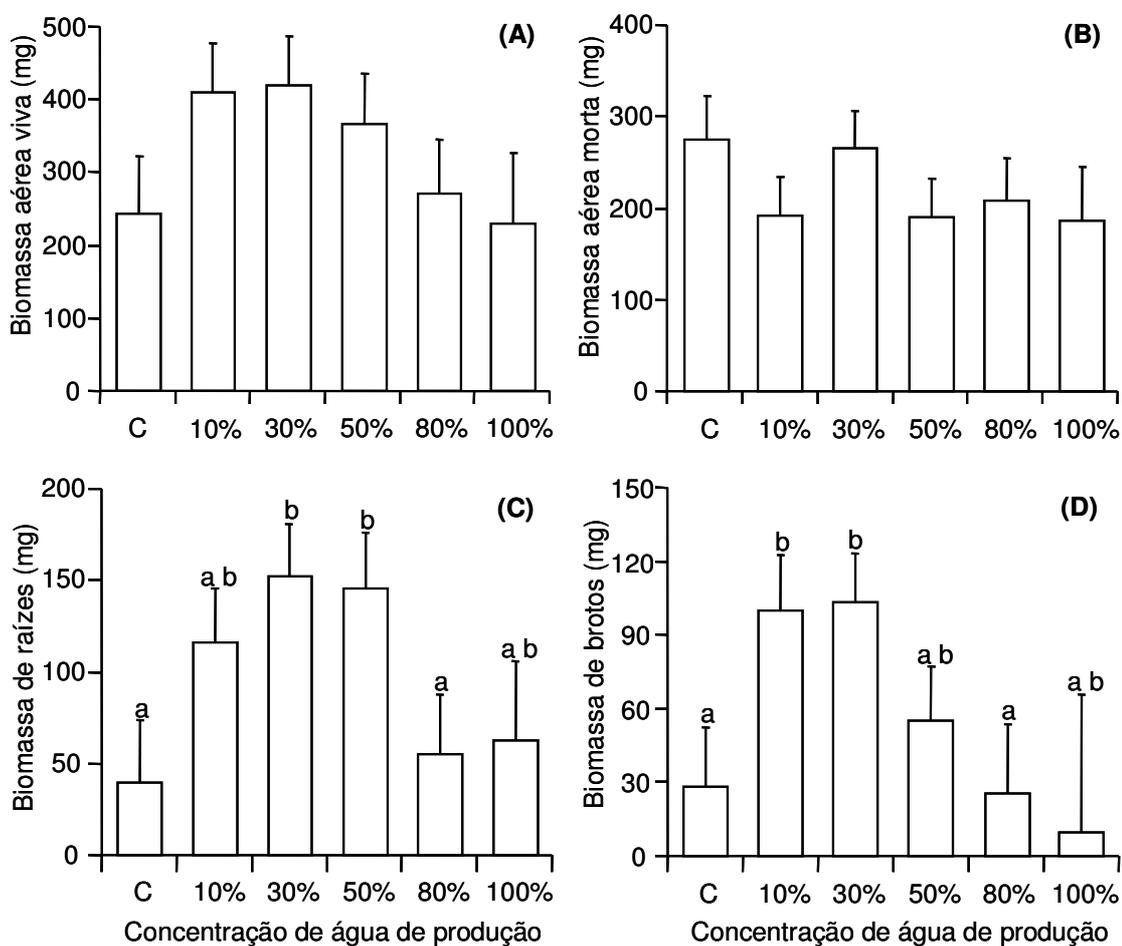


Figura 2. Efeito da concentração de água de produção nas biomassas aérea de folhas vivas (A) e mortas (B), de raízes (C) e de brotos (D) de *S. alterniflora*, após sete semanas em cultivo hidropônico. São apresentadas as médias com as barras verticais mostrando o erro-padrão. Não foram observadas diferenças significativas nas biomassas de folhas vivas (A) e mortas (B). Médias com as mesmas letras minúsculas são estatisticamente iguais.

Discussão

A grama de marisma *S. alterniflora* apresentou uma alta tolerância à AP salina, visto que sua sobrevivência e crescimento não foram inibidos em concentrações de AP menores do que 80%, quando comparados com uma solução controle sem AP.

No entanto, quando cultivadas em AP bruta (100% AP), contendo 120 mg L⁻¹ de O&G, metade das plantas morreu em um intervalo de 30 dias. Esta sobrevivência pode ser utilizada como uma estimativa do TL50 (tempo letal mediano) da AP para *S. alterniflora*. Durante a revisão bibliográfica não foram encontrados estudos apresentando a toxicidade letal de AP sobre vegetais superiores. No entanto, comparando este TL50 com concentrações letais (CL50) e de efeito (CE50 - concentrações que afetam o crescimento), em uma revisão feita por Neff (2002), *S. alterniflora* apresenta maior resistência à AP que a grande maioria dos organismos marinhos revisados. Parte desta resistência pode ser explicada pelo fato das hastes e folhas das plantas utilizadas no experimento não terem ficado em contato direto com a AP. Lin & Mendelssohn (1998) demonstraram que tanto *S. alterniflora* quanto *S. patens* possuem alta sensibilidade ao contato do petróleo com suas partes aéreas, o que impossibilita a troca gasosa.

Diversos autores (Freire *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2001; Neff, 2002) enfatizam que a composição química da AP é bastante variável e, portanto, é necessário cautela ao fazer comparações entre os testes de toxicidade. A

concentração de O&G no presente estudo (120 mg L^{-1}), por exemplo, apresentou um valor intermediário entre as concentrações encontradas na literatura, que variaram de 11 a 283 mg L^{-1} (Tab. 3).

Tabela 3. Variação na concentração de óleos e graxas (O&G) na água de produção proveniente de diferentes locais.

Local	O&G (mg L^{-1})	Referência
Campo de petróleo de Placerita (Santa Clarita, Califórnia, EUA).	11 a 59	Doran <i>et al.</i> (1998)
Quatro plataformas de petróleo no Mar do Norte (Mar do Norte).	33 a 58	Utivk (1999)
Planta de tratamento de água de produção no campo de petróleo de Shengli (leste da China).	32 a 130	Lu <i>et al.</i> (2006)
Reserva de petróleo N ^o 3 do Depto. de Energia Naval dos EUA (Wyoming, EUA).	49 a 216	Myers <i>et al.</i> (2001)
Bacia de Campos (Brasil)	32 a 283	Freire <i>et al.</i> (2001)
Bacia de Campos (Brasil)	200 a 240	Campos <i>et al.</i> (2002)

Embora a AP seja um produto distinto do petróleo cru, proveniente do processo de extração deste, ambos apresentam potencial tóxico, sendo o óleo o constituinte mais marcante da AP (Neff, 2002). Lin & Mendelsssohn (1996)

reportaram que *S. alterniflora* apresentou menor mortalidade e seu crescimento foi menos afetado do que o de *S. patens* quando ambas foram expostas à variedade de petróleo 'South Louisiana Crude'. Em um experimento em casa de vegetação realizado por DeLaune *et al.* (2003), *S. alterniflora* não apresentou mortalidade quando plantada em solos contaminados por 2 L de óleo m⁻² das variedades 'South Louisiana Crude' e 'Arabian Medium Crude', entretanto, *S. patens* apresentou alta mortalidade quando exposta pelo mesmo período (um mês) às mesmas variedades e concentração de óleo. Esta concentração de petróleo utilizada por DeLaune *et al.* (2003) seria equivalente à 6,7 mg L⁻¹, mais baixa do que a concentração de O&G em 10% AP utilizada, onde *S. alterniflora* também apresentou baixa mortalidade, reforçando a afirmação de que esta espécie é resistente à contaminação por petróleo.

Além dos O&G, outros compostos reconhecidamente tóxicos estão presentes na AP. Chumbo, cromo e níquel estão entre os metais mais comumente encontrados, mas suas concentrações variam dependendo do local de extração (Henderson *et al.*, 1999; Holdway, 2002). Estudos prévios, contudo, demonstram a alta tolerância de *S. alterniflora* a metais pesados, explicada parcialmente por sua habilidade em imobilizar estes elementos pela oxidação na rizosfera, promovida pelo transporte de ar rico em oxigênio pelo tecido aerenquimático (Lacerda *et al.*, 1997) e também por sua capacidade de absorver metais, como revisado por Weis & Weis (2004).

A tolerância de *S. alterniflora* à salinidade, poluição por petróleo e metais pesados pode ser muito útil para o tratamento de áreas contaminadas por

derrames de óleo, assim como para o tratamento de efluentes contaminados por óleo, como a AP. Tais sistemas de tratamento, além de apresentar custo reduzido quando comparados aos tradicionais, podem ainda gerar retorno econômico a partir da utilização da biomassa de *S. alterniflora* produzida (Qin *et al.*, 1998).

A AP diluída estimula o crescimento de *S. alterniflora*. Um incremento de uma a três vezes no desenvolvimento de brotos e raízes foi observado em baixas concentrações de AP (10% AP e 30% AP) quando comparadas ao controle (sem AP) e às altas concentrações (80% AP e 100% AP). Lin *et al.* (2002a) também encontraram estímulo de crescimento em *S. alterniflora* na presença de baixas concentrações de óleo, entretanto, o experimento destes autores foi realizado em solo. Estes observaram que em solo contaminado com 7 mg de óleo diesel nº 2 por grama de solo, após três meses de experimento em casa de vegetação, a biomassa subterrânea de *S. alterniflora* foi 42% mais alta do que no controle sem óleo. Ji *et al.* (2007), avaliando a eficiência de um banhado construído de fluxo superficial com *Phragmites* ('reed', nome específico não mencionado) para o tratamento de AP, concluíram que nos banhados irrigados com AP a biomassa total de plantas foi de 5 a 20% maior do que nos banhados irrigados com água de um rio. Estes autores também concluíram que a irrigação com AP teve impactos positivos na produção de biomassa (g de peso seco m⁻²), mas não ocorreram diferenças significativas em relação ao controle.

A concentração de nitrogênio amoniacal dissolvido da AP utilizada neste experimento é a provável responsável pelo estímulo no crescimento de *S. alterniflora*, uma vez que o nitrogênio é um nutriente em alta demanda por esta

espécie. Em outros estudos foi observado que a fertilização de *S. alterniflora* com compostos nitrogenados ocasiona marcados incrementos na taxa de crescimento da planta (Mendelssohn, 1979; Howes *et al.*, 1986; Dai & Wiegert, 1997).

O fato de *S. alterniflora* desenvolver mais brotos e raízes nos tratamentos 10% AP e 30% AP que no controle pode estar diretamente ligado à concentração de N total presente AP quando comparada à concentração total deste elemento que foi adicionada semanalmente a cada réplica de cada tratamento. A cada semana foram adicionados apenas 1,2 mg N em cada vaso com 2,5 L efluente e no controle, resultando em uma dose acumulada de cerca de 0,5 mg N L⁻¹, valor bastante inferior ao encontrado na menor concentração de AP (10% AP) utilizada, contendo 38 mg N L⁻¹.

Os resultados deste trabalho demonstram que propágulos vegetativos de *S. alterniflora* são capazes de crescer em água de produção de petróleo salina, pois, uma vez diluídos os componentes tóxicos, os nutrientes contidos neste efluente podem sustentar um crescimento vigoroso da planta. Estudos adicionais são necessários para avaliar o potencial uso desta espécie para a fitorremediação de AP.

Capítulo 3

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DA GRAMA
HALÓFITA *Spartina alterniflora* LOISEL. PARA A
FITORREMEDIÇÃO DE ÁGUA DE PRODUÇÃO DE
PETRÓLEO SALINA.**

Introdução

A água de produção (AP) é um efluente da extração de petróleo que consiste de água de formação (água naturalmente presente no reservatório) e fluidos utilizados durante o processo de extração, principalmente anticorrosivos, além de água do mar injetada no poço para manutenção da pressão (Neff, 2002). A maior parte da água de produção extraída *offshore* é lançada em oceano aberto (Clark, 2001), porém uma fração significativa é trazida ao litoral misturada ao óleo (Neff, 2002). Em locais de extração em terra este efluente também é produzido (Veil *et al.*, 2004). Nos poços de extração continentais, assim como nos terminais que recebem o óleo produzido no oceano, a AP deve ser tratada quanto a concentrações variadas de óleo e outros componentes tóxicos antes de lançada ao meio.

O tratamento da AP é feito tradicionalmente por meios físico-químicos (Neff, 2002) e é extremamente oneroso para as indústrias (Curtice & Dalrymple, 2004). Avanços recentes na tecnologia de tratamento de AP sugerem o uso de tanques com macrófitas emergentes como um método de baixo custo/benefício para a redução do seu potencial tóxico (Myers *et al.*, 2001).

Banhados construídos colonizados por macrófitas removem poluentes por uma variedade de processos físicos, químicos e biológicos, com as macrófitas agindo diretamente pela assimilação/seqüestro dos poluentes nos seus tecidos e/ou disponibilizando superfície e um ambiente favorável para que microorganismos reduzam a concentração destes poluentes (Brix, 1993).

Recentemente, Ji *et al.* (2007) encontraram alta eficiência na redução da DQO, da DBO e na remoção de nitrogênio de água de produção de petróleo utilizando um sistema de banhado contruído colonizado com macrófitas, no entanto a salinidade do efluente, assim como a espécie utilizada, não são mencionadas.

A usual alta salinidade deste efluente representa um desafio para seu tratamento biológico (Freire *et al.*, 2001), levando à necessidade da utilização de macrófitas tolerantes ao sal.

Entre as espécies de macrófitas com potencial para utilização em banhados construídos e sujeitas à salinização de seus solos, encontra-se a grama *Spartina alterniflora*, halófito nativo de marismas e manguezais ao longo de grande parte do continente americano (Costa & Davy, 1992). Esta planta, além de tolerante ao sal, habita áreas naturalmente alagáveis, resistindo a longos períodos de inundação por água salgada (Mendelssohn & Morris, 2000)

S. alterniflora é capaz de crescer em áreas entremarés contaminadas por óleo (Lin & Mendelssohn, 1998; Bergen *et al.*, 2000; Vitaliano *et al.*, 2002). Lin *et al.* (2003) demonstraram em mesocosmo que essa planta é capaz de fitorremediar sedimentos contaminados por petróleo cru nº 2. Recentemente, também foi demonstrado que *S. alterniflora* apresenta tolerância à AP (Capítulo 2).

O crescimento de *S. alterniflora* em marismas e manguezais é frequentemente limitado pela disponibilidade de nitrogênio (Smart & Barko, 1980), sendo esta espécie capaz de translocar quantidades significativas de N de partes senescentes para partes mais jovens (Morris, 1980), diminuindo assim a devolução deste elemento para o meio no qual cresce. Quando maiores

concentrações de nitrogênio são observadas, particularmente nitrogênio amoniacal, *S. alterniflora* tanto acumula ativamente este elemento em seus tecidos como também cresce vigorosamente (Valiela *et al.*, 1973).

Conseqüentemente, a habilidade que *S. alterniflora* possui de utilizar compostos nitrogenados (Mendelsohn, 1979; Dai & Wiegert, 1997), aliada à sua tolerância a salinidade e a hidrocarbonetos (Pezeshki *et al.*, 2000), sugerem a possibilidade de sua utilização em banhados construídos para o tratamento de efluentes salinos ricos em nitrogenados, oriundos da indústria do petróleo, como, por exemplo, água de produção.

A fitorremediação da AP com *S. alterniflora* é promissora (Capítulo 2) e a utilização da biomassa vegetal gerada pode acarretar oportunidades de retorno econômico (Licht & Isenbrands, 2005). Fujita (1981) demonstrou que após 48 dias de digestão cada grama de biomassa de *S. alterniflora* pode gerar 0,26 L de biogás com uma composição de 72% de metano. Qin *et al.* (1998) enumeram várias outras possibilidades de utilização da biomassa de *S. alterniflora*, como para a produção de fármacos (flavonóides, imunoestimulantes, etc.) e dos resíduos vegetais para o cultivo de cogumelos sobre um substrato composto por detritos desta espécie.

Neste trabalho o potencial da grama de marisma *S. alterniflora* em reduzir a concentração de nitrogênio (nitrogênio amoniacal dissolvido, nitrato e nitrito) e de óleos e graxas (O&G) da água de produção de petróleo salina foi avaliado através de um experimento hidropônico em mesocosmo.

Materiais e Métodos

Montagem do experimento

Propágulos vegetativos de *S. alterniflora* foram coletados em uma marisma natural na Ilha do Terraplano (32°02'37" S, 52°04'15" W), localizada no município de Rio Grande (RS). As plantas foram levadas para uma estufa não climatizada, individualizadas (hastes com fragmentos de rizoma e raízes) e transplantadas para bandejas contendo composto orgânico comercial e areia de praia (1:1). Estas plantas permaneceram nas bandejas durante um mês, sendo regadas periodicamente com água de torneira. Após este período as folhas mortas e brotos foram retirados e 150 hastes saudáveis, medindo entre 20 - 50 cm ($34,3 \pm 0,9$ cm; média \pm erro padrão) foram selecionadas para a montagem do experimento.

Utilizou-se 10 recipientes plásticos com volume individual de 60 L. Em todos os recipientes foram adicionados 35 L de água destilada. Em cinco destes, foram colocadas bandejas de isopor tipo 'semeadeiras', cada qual contendo 30 plantas de *S. alterniflora*. Nos outros cinco tanques foram colocadas apenas as bandejas, sem as plantas, como controle de artefato. Foram utilizadas bandejas 'semeadeiras' de 200 'células', que foram cortadas para que ficassem com 99 'células' (9 x 11), e uma área de 0,3 x 0,37 m ($0,111 \text{ m}^2$). As hastes de *S. alterniflora* foram encaixadas nos orifícios das 'células' de forma alternada, com uma 'célula' de espaço entre as mesmas, para minimizar a competição por luz.

As bandejas flutuavam na superfície da água dos tanques. As plantas foram acomodadas nas bandejas de forma que suas raízes ficassem dentro da água e

suas folhas acima da superfície. Após 10 dias de aclimação das plantas em hidroponia, o volume de água destilada evaporada foi repostado e foram adicionados 15 L de AP salina (32 g NaCl L^{-1}) em cada um dos recipientes, totalizando volumes individuais de 50 L. Esta proporção de 30% de água de produção foi utilizada devido ao crescimento ótimo de *S. alterniflora* nesta concentração observada em um experimento prévio de tolerância a AP (Capítulo 2).

A AP utilizada no experimento foi obtida no Terminal Almirante Soares Dutra (TEDUT – Osório, RS). Esta água foi drenada de um tanque onde fica armazenada toda a água misturada ao petróleo bruto que chega a este terminal. Foram coletados 200 L deste efluente em um tonel plástico hermeticamente fechado.

O meio hidropônico contendo 30% AP e 70% de água destilada, com salinidade em torno de 10 g NaCl L^{-1} , apresentou as concentrações médias iniciais (média \pm erro padrão; $n = 10$) de O&G e nitrogenados de, respectivamente, $52,1 \pm 7,8 \text{ mg L}^{-1}$ e $103 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$, bem como média do pH de $7,2 \pm 0,02$.

O experimento teve duração de 21 dias, ao longo dos quais as características do efluente e o desenvolvimento das plantas foram monitorados.

Parâmetros abióticos e bióticos monitorados

As temperaturas máximas e mínimas dentro da casa de vegetação foram medidas diariamente com um termômetro de mercúrio e o pH da AP diluída dos tanques monitorado nos dias '0', '4', '7', '14' e '21', com um pHmetro digital Cole-Parmer®.

Ao longo do mesmo período do experimento, foram avaliadas na AP dos tanques as concentrações de nitrogênio amoniacal dissolvido ($\text{N-NH}_3 + \text{N-NH}_4^+$), Nitrato (NO_3^-), Nitrito (NO_2^-) e óleo e graxas (O&G) na AP diluída. Também foram estimadas as concentração de oxigênio dissolvido (OD) e de clorofila-*a* (cl-*a*) na AP dos tanques, visando avaliar a abundância de microorganismos fotossintetizantes. O desenvolvimento das plantas também foi avaliado no início e no fim do experimento, assim como o acúmulo de nitrogênio em seus tecidos. As metodologias utilizadas para análise destes parâmetros são descritas a seguir.

As concentrações de nitrogênio amoniacal dissolvido foram estimadas em amostras de 150 ml obtidas nos dias '0', '1', '4', '7', '14' e '21', em cada tanque. As amostras de AP foram filtradas imediatamente após as coletas em filtros Millipore de 0,45 micra e as análises químicas efetuadas logo em seguida. O nitrogênio amoniacal dissolvido foi estimado através do método adaptado de Solorzano (1969 *apud* Baumgarten *et al.* 1996).

Para estimar as concentrações de nitrato, nitrito, O&G e cl-*a* foram coletadas amostras nos dias '0', '7', '14' e '21', em cada recipiente. O filtrado utilizado para o cálculo da concentração de nitrogênio amoniacal dissolvido foi também utilizado para estimar as concentrações de nitrato e nitrito. Para cálculo das concentrações de O&G foram retirados 1,1 L por galão, a cada dia amostral e para obter a concentração de cl-*a* foram coletadas amostras de 10 ml.

Com exceção das amostras para determinar a concentração de cl-*a*, que foram coletadas com uma seringa, todas as amostras de água foram retiradas dos galões em sub-superfície (~ 6 – 7 cm de profundidade), adjacentes às bandejas de

isopor, por sifonamento. Diariamente e no momento exatamente anterior a cada coleta, o efluente era lentamente homogeneizado para reduzir uma possível estratificação entre a água destilada e a água de produção.

As concentrações de nitrato e nitrito foram determinadas por cromatografia líquida, utilizando um cromatógrafo iônico da marca Metrohn®, pertencente ao Laboratório de Oceanografia Geológica da FURG. Foi utilizada coluna simples Metrosep A Supp 5-100 (4,0x100 mm) de álcool polivinil com supressão química. Como fase móvel foi utilizada solução eluente de 1,7 mM de NaHCO₃ e de 18 mM de Na₂CO₃. O volume injetado foi de 100 µL, com fluxo médio de 0,68 mL min⁻¹. As concentrações obtidas foram expressas como nitrogênio nas formas de nitrato (N-NO₃⁻) e nitrito (N-NO₂⁻).

Os O&G foram estimados pelo método gravimétrico seguindo a metodologia proposta por Baptista (1987), utilizando éter de petróleo como solvente. A quantidade de OD no efluente foi avaliada pelo método de Strickland & Parsons (1972 *apud* Baumgarten, 1996).

O teor de *chl-a* dos organismos fitoplanctônicos que se desenvolveram no efluente foi estimado pela filtragem de 10 mL do mesmo, usando filtros de fibra de vidro Whatman GF/F (porosidade ~ 0,7 µm). Os filtros foram imediatamente acondicionados no escuro e guardados em freezer a fim de evitar a degradação do pigmento. Posteriormente, a *chl-a* foi extraída dos filtros com acetona 90% em -18 °C no escuro por 24 horas. O teor deste pigmento foi estimado através do método de fluorescência (Welshmeyer, 1994), com o fluorímetro Turner Designs,

modelo TD-700, previamente calibrado com cl-a pura (Sigma®). A partir das relações C:cl-a (37 – 79) e C:N (15) encontrada por Parsons *et al.* (1984) em um 'bloom' de organismos fitoplanctônicos foi calculada a faixa de concentração de N possivelmente contida no tecido destes organismos, ao final do experimento, baseada nas concentrações médias de cl-a dos tratamentos.

Para avaliar o desenvolvimento de *S. alterniflora*, assim como a incorporação de N pelas plantas, alguns espécimes foram coletados no início e no fim do experimento. No início do experimento, cinco propágulos do mesmo lote utilizado na montagem do experimento foram selecionados aleatoriamente e tiveram suas partes aéreas vivas (hastes + folhas vivas, que, a partir deste momento serão tratados apenas como 'folhas vivas') e raízes separadas, secas em estufa a 60°C por 72 horas. Após a pesagem, as folhas vivas e raízes secas foram armazenadas para posterior análise da concentração de nitrogênio (N) inicial nos tecidos. Ao final do experimento, foram coletadas 15 plantas de cada tanque – réplica – do tratamento com *S. alterniflora*. As plantas foram separadas em folhas vivas, folhas mortas, raízes e brotos, sendo estes componentes secos em estufa nas mesmas condições descritas acima e pesados. Esses componentes da planta também foram armazenados para análise da concentração de N nos tecidos ao final do experimento.

A determinação da concentração de N nos tecidos dos diferentes componentes da biomassa, coletados no início e no final do experimento, foi realizada através do método de Kjeldahl. As análises foram efetuadas no

Departamento de Solos da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), em Pelotas (RS), com exceção do N dos brotos (final) que, devido à pequena biomassa foi analisado no Laboratório de Hidroquímica da FURG, em um Analisador Elementar CHNS modelo Perkin Elmer 2400, calibrado com material de referência Acetanilida.

No início e final do experimento, foram medidos o comprimento da haste (base até o final da maior folha) e número de folhas vivas de 15 plantas selecionadas aleatoriamente e marcadas em cada tanque. Ao final do experimento, nas mesmas 15 plantas, foi quantificado o número de folhas mortas (mortalidade foliar) e estimada a produção foliar a partir da diferença entre o número total de folhas no dia 21 (vivas e mortas) e o número de folhas vivas no início do experimento (dia '0'). O número e comprimento total de brotos formados nas 15 plantas monitoradas de cada tanque também foram quantificados. Para estimar a mortalidade das plantas e o número de plantas que produziram brotos foram consideradas todas as plantas de cada tanque (30).

Análise de dados

As possíveis diferenças no pH e nas concentrações médias de OD, cl-a, nitrogênio amoniacal dissolvido, $N-NO_3^-$, $N-NO_2^-$ e O&G, entre os tanques com e sem *S. alterniflora*, ao longo do tempo, foram testadas por Análise de Variância para medidas repetidas. Quando constatadas diferenças significativas nas ANOVAS foram realizadas análises *a posteriori* de Fisher – LSD – a um nível de significância de 0,05 (Zar, 1984). Todos os dados ambientais apresentaram

normalidade (Kolmogorov-Smirnov; $p > 0,20$) e homocedasticidade (Levene's; $p > 0,05$), com exceção da concentração de cl-a no dia '7', no qual o teste de Levene's (homocedasticidade) apontou $p < 0,05$. Todas as análises foram efetuadas sem transformações dos dados.

Diferenças no desenvolvimento das plantas entre as réplicas do tratamento com *S. alterniflora* foram testadas por Análises de Variância de uma via para cada um dos parâmetros de crescimento descritos anteriormente. A normalidade e homocedasticidade foram testadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene's, respectivamente, considerando um nível de significância de 0,05. Os valores de biomassa de brotos foram transformados ($\text{Log}_{10}x+1$) para obtenção de normalidade e homocedasticidade dos dados. Para as variáveis onde não foi possível atingir a normalidade (número de folhas vivas inicial e final, número de folhas mortas e número de brotos), foram efetuadas Análises de Variância não-paramétricas de Kruskal-Wallis (Siegel, 1975), todas considerando um nível de significância de 0,05.

As diferenças entre as biomassas inicial e final de folhas vivas e raízes foram comparadas através do teste 't' para amostras independentes, enquanto para o comprimento das 15 plantas monitoradas em cada tanque foi utilizado o teste 't' para amostras dependentes (Zar, 1984), após a validação do pré-requisito de normalidade (Kolmogorov-Smirnov; $p > 0,05$) dos dados. Os números de folhas vivas final e inicial das plantas monitoradas, uma vez que não apresentaram normalidade, foram comparados pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon (Siegel,

1975). Tanto para os testes paramétricos quanto para os não-paramétricos foi considerado um nível de significância de 0,05.

As possíveis diferenças nas concentrações iniciais e finais de N no tecido foliar vivo e das raízes das plantas foram analisadas calculando o intervalo de confiança de 99% (IC-99%) bidimensional para as médias finais, e observado se a concentração inicial se encontrava dentro deste intervalo. Para avaliar uma possível diferença entre as concentrações de N nas folhas vivas e folhas mortas ao final do experimento foi utilizado o teste 't' para amostras independentes considerando um nível de significância de 0,05, após a validação do pré-requisito de normalidade dos dados (Kolmogorov-Smirnov; $p > 0,05$) (Zar, 1984).

Resultados

Condições do ambiente experimental

A média das temperaturas mínimas (noturnas) durante o período experimental foi de $11,3 \pm 0,9$ °C (média \pm erro-padrão) enquanto a média das máximas (diurnas) foi de $24,0 \pm 1,0$ °C (média \pm erro-padrão) (Fig. 3A).

O pH oscilou de maneira semelhante entre os tratamentos, sempre entre 7 e 8 (Fig. 3B). A Análise de Variância para medidas repetidas apresentou diferenças significativas no pH entre os tratamentos ($F = 9,9$; $p = 0,02$), sempre maior no controle, e o teste *a posteriori* de LSD demonstrou que esta diferença ocorreu ao longo de todo experimento ($p < 0,05$ para todos os dias amostrados).

No início do experimento a AP diluída dos tanques possuía uma concentração média de OD de $5,2 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (média \pm erro padrão; tratamento com e sem *S. alterniflora* em conjunto). Como para o pH, em ambos os tratamentos as concentrações de OD foram crescentes ao longo do tempo (Fig. 3C). A análise de contraste *a posteriori* de LSD, para cada dia amostrado, apontou diferenças significativas entre os tratamentos a partir do dia '7'.

A Análise de Variância para medidas repetidas apontou diferença significativa na concentração de cl-*a* entre os tratamentos ($F = 11,3$; $p = 0,01$). A análise *a posteriori* de LSD apontou diferenças nos dias '7' e '21'. No dia '7', a concentração de cl-*a* observada nos recipientes controle foi maior que nos recipientes contendo *S. alterniflora*. A concentração de cl-*a* no dia '21' foi quase 30 vezes maior que no dia '7' no tratamento com *S. alterniflora* e 300% mais alta que no controle (Fig. 3D).

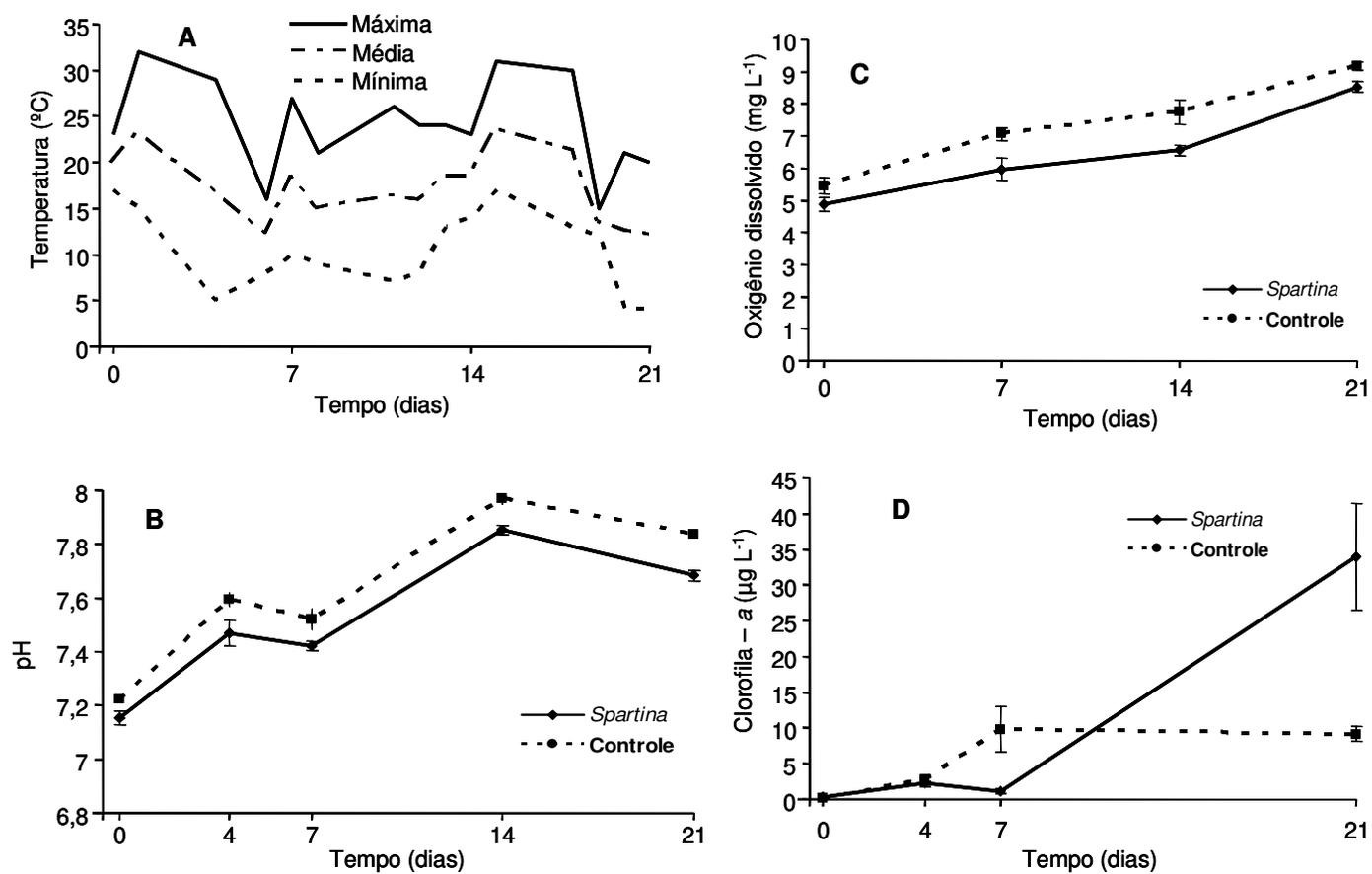


Figura 3. Variações nas temperaturas máximas, médias e mínimas diárias do ar dentro da casa de vegetação (A), pH (B), oxigênio dissolvido (C) e concentração de clorofila-a (D) da água de produção diluída dos tanques contendo *S. alterniflora* e sem plantas (controle) ao longo do período experimental.

Nitrogênio Amoniacal, Nitrato e Nitrito

As concentrações médias de nitrogênio amoniacal dissolvido variaram ao redor de 100 mg L^{-1} durante os 21 dias de experimento. Tanques com e sem plantas de *S. alterniflora* demonstraram uma oscilação temporal sincronizada na concentração de nitrogênio amoniacal (~ 50 a $\sim 140 \text{ mg N-NH}_3 + \text{N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$), com magnitude muito maior do que as diferenças entre eles (Fig. 4A). Estes valores foram cerca de 1000 vezes superiores as quantificadas de nitrogênio na forma de nitrato, que oscilaram entre 0 e $200 \mu\text{g L}^{-1}$. A concentração de nitrito ficou sempre abaixo do limite de detecção ($> 1 \mu\text{g L}^{-1}$).

A Análise de Variância para medidas repetidas demonstrou que a concentração média de nitrogênio amoniacal dissolvido foi significativamente menor nos tanques com *S. alterniflora* do que nos tanques controle sem plantas ($F = 9,5; p < 0,05$).

A diferença percentual na concentração média entre os tratamentos aumentou ao longo do experimento. A análise de contraste (LSD) mostrou que apenas após 21 dias pôde ser constatada uma diferença significativa entre os tratamentos. Neste dia (21), a concentração de nitrogênio amoniacal foi 19,3% menor nos tanques contendo *S. alterniflora* (Tab. 4). Entretanto, no dia '14' já podia ser observada diferença marginal ao nível de significância ($p = 0,06$) entre os tratamentos; nesta data a diferença na concentração de nitrogênio amoniacal dissolvido entre os tratamentos já era maior do que o dobro da semana anterior.

Tabela 4. Diferença percentual entre as concentrações médias de nitrogênio amoniacal dissolvido (N-NH₃ + N-NH₄⁺) dos tratamentos controle e com *S. alterniflora*. Valores negativos indicam redução do nitrogênio amoniacal na presença de *S. alterniflora*.

Dias	0	1	4	7	14	21
Diferença N-NH ₃ + N-NH ₄ ⁺ entre tratamentos.	- 5,0%	- 5,2%	- 6,9%	- 7,6%	- 15,7%	- 19,3% *

* Indica que houve diferença significativa na concentração do composto entre os tratamentos ($p < 0,05$; Teste de LSD).

Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de NO₃⁻ ao longo do tempo, entre os tratamentos ($F = 0,95$; $p = 0,50$) e a reduzida concentração do composto não apresentou um padrão definido (Fig. 4B).

Óleos e Graxas

A concentração de O&G na AP diluída caiu marcadamente ao longo do experimento, mas não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($F = 1,2$; $p = 0,56$). Entretanto, estes compostos estiveram sempre em menor concentração no tratamento com *S. alterniflora*. A Tabela 5 apresenta a diferença na concentração de O&G entre os tratamentos controle e com *S. alterniflora*, para cada dia amostrado.

Tabela 5. Diferença percentual entre as concentrações médias de óleos e graxas (O&G) entre os tratamentos controle e com *S. alterniflora*. Valores negativos indicam redução na presença de *S. alterniflora*.

Dias	0	7	14	21
Diferença na concentração de O&G entre tratamentos.	- 13%	- 41%	- 68%	*

*Não foi possível estimar, visto que no tratamento com plantas a concentração era igual a zero.

A concentração de O&G diminuiu de $48,2 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$ (média \pm erro padrão) a zero no tratamento com *Spartina* e de $55,3 \pm 11,3 \text{ mg L}^{-1}$ (média \pm erro padrão) a $2,4 \pm 2,3 \text{ mg L}^{-1}$ (média \pm erro padrão) no controle sem plantas, ao longo dos 21 dias do experimento. Apesar da ausência de diferença significativa entre os tratamentos, enquanto na primeira semana a redução na concentração de O&G no tratamento com *S. alterniflora* foi de 44,5%, no tratamento controle esta foi de apenas 17,8 %. Nas duas semanas subseqüentes, para ambos os tratamentos, a redução de O&G foi sempre maior que 65% (Fig. 4C).

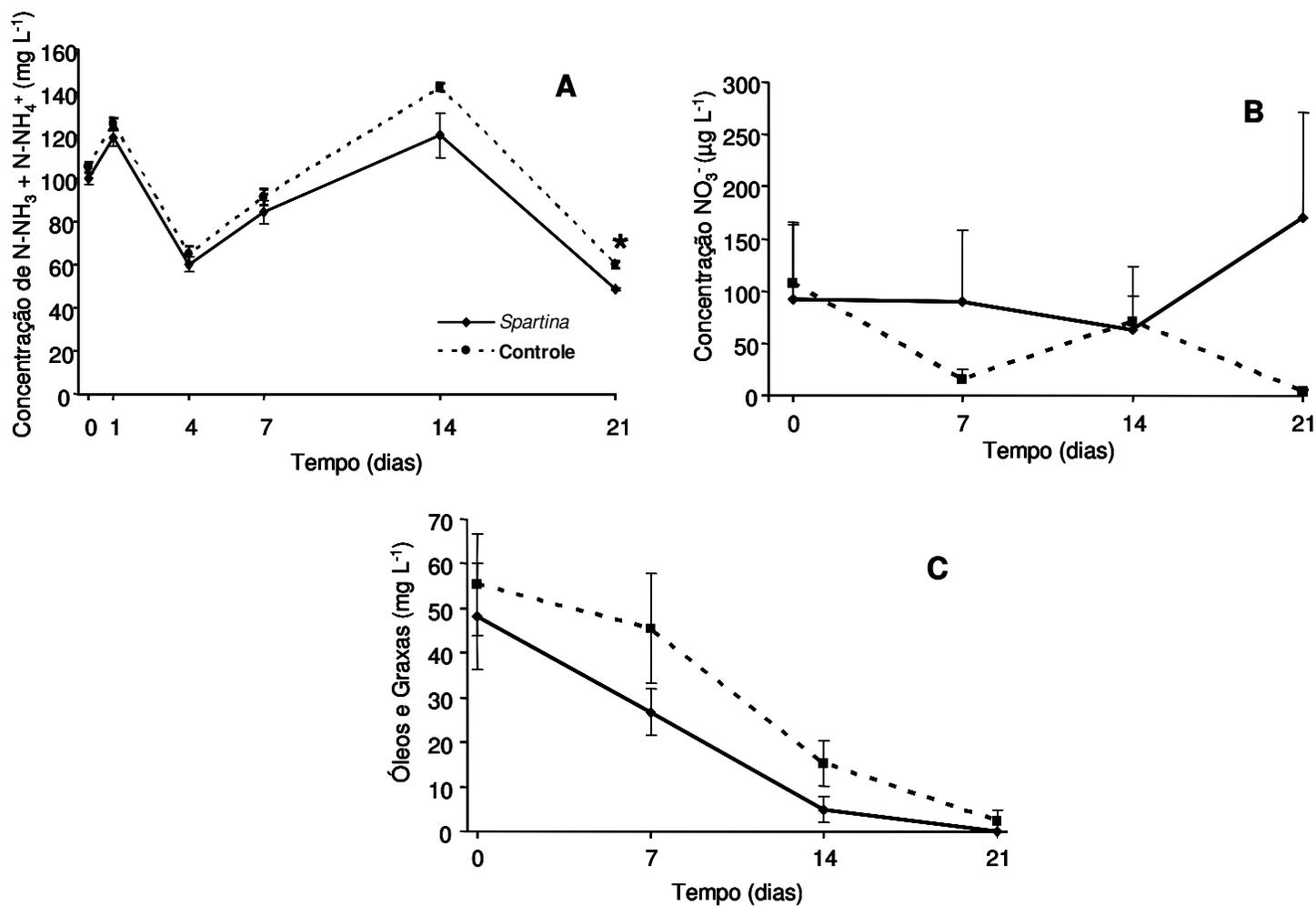


Figura 4. Concentração de nitrogênio amoniaco dissolvido, nitrato e óleos e graxas (média \pm erro-padrão) ao longo do tempo, em tanques de água de produção contendo *S. alterniflora* e sem plantas (controle). * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos no dia amostral.

Desenvolvimento de *Spartina alterniflora*

Do total de plantas utilizadas no experimento (150), 6,7% (10) morreram. Entre as plantas sobreviventes (140), 27% (38) produziram brotos.

No início e no final do experimento não foram observadas diferenças significativas quando comparadas as biomassas e as medidas de crescimento não-destrutivas entre os tanques (réplicas) do tratamento contendo *S. alterniflora* (Tab. 6).

Tabela 6. Testes de diferenças entre réplicas (tanques) das variáveis de crescimento das plantas de *S. alterniflora* cultivada em água de produção de petróleo salina. Número de réplicas (n), F e H (ANOVA e Kruskal-Wallis, respectivamente) calculados e nível de significância 'p' são apresentados. * = utilizada Análise de Variância não paramétrica de Kruskal-Wallis.

Parâmetro	n	Dia '0'		n	Dia '21'	
		F / H	p		F / H	p
Comprimento da haste	15	0,354	0,84	15	0,493	0,74
Número de folhas vivas*	15	2,41	0,66	15	1,68	0,79
Número de folhas mortas*	-	-	-	15	0,67	0,96
Número de brotos*	-	-	-	30	1,56	0,82
Comprimento total de brotos*	-	-	-	15	3,56	0,47
Biomassa de folhas vivas	-	-	-	15	1,49	0,21
Biomassa de folhas mortas	-	-	-	15	0,93	0,45
Biomassa de brotos*	-	-	-	15	3,94	0,41
Biomassa de raízes	-	-	-	15	1,29	0,28

Biomassa

A biomassa de folhas vivas e de raízes (Fig. 5A e 5B, respectivamente) não diferiram significativamente ($t = 0,91$, $p = 0,35$; $t = 0,30$, $p = 0,77$; respectivamente) entre o início e o final do experimento. Após três semanas em hidroponia na AP diluída, as biomassas médias finais de folhas mortas e de brotos produzidos por tanque foram, nesta ordem, de $180,8 \pm 12,5$ mg e $7,0 \pm 2,6$ mg (média \pm erro padrão).

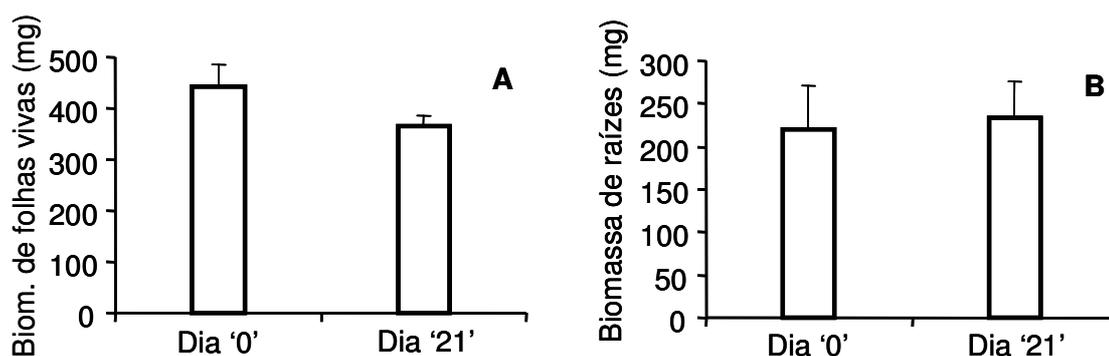


Figura 5. Biomassa aérea viva (A) e de raízes (B) (média + erro padrão) de *S. alterniflora* no início (Dia '0') e no final (Dia '21') do experimento.

Medidas não-destrutivas

Não ocorreram diferenças significativas entre o início e o final do experimento para o comprimento das hastes (teste 't' para amostras dependentes; $t = 0,50$; $p = 0,60$) e o número de folhas vivas (teste de Wilcoxon; $T = 322$; $p = 0,66$) (Fig. 6A e 6B). Entretanto, ocorreu a produção média de $1,00 \pm 0,09$ novas folhas por planta (média \pm erro padrão), número bastante semelhante a

mortalidade foliar no período que foi de $1,05 \pm 0,05$ (média \pm erro padrão) folhas por planta.

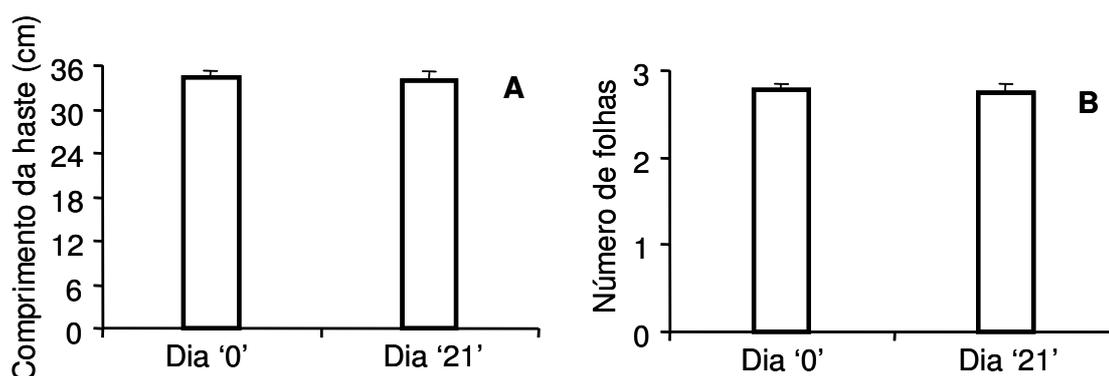


Figura 6. Comprimento da haste (A) e número de folhas (B) (média + erro padrão) de *S. alterniflora* no início (Dia '0') e no final (Dia '21') do experimento.

Concentração de N no tecido

A concentração de N no tecido das folhas vivas de *S. alterniflora* subiu de 1,22% no início do experimento para $1,75 \pm 0,06\%$ (média \pm erro padrão) ao final de 21 dias na AP. O IC-99% da concentração final de N nas folhas vivas ficou entre 1,29% e 2,01% (média \pm erro padrão), possibilitando afirmar que a concentração foliar final de N foi significativamente maior do que a inicial, tendo aumentado 39%.

Nas raízes, a concentração inicial de N saltou de 0,88% para $1,66 \pm 0,05\%$ (média \pm erro padrão), com o IC-99% final ficando entre 1,42% e 1,90%,

permitindo a afirmação de que a concentração de N final nas raízes foi também significativamente superior que a inicial, com um incremento de 88%.

A concentração de N nas folhas mortas, ao final do experimento, foi de $0,52 \pm 0,02$ % (média \pm erro padrão) e significativamente menor (teste 't'; $p < 0,01$) do que das folhas vivas; cerca de 30% da concentração das folhas vivas.

Os maiores teores de N nos tecidos foram encontrados nos brotos produzidos ao longo do experimento. Da biomassa total de brotos, $3,6 \pm 0,5$ % (média \pm erro-padrão) era composta por N, o dobro do teor encontrado nas folhas vivas e raízes. Entretanto, como a biomassa de brotos produzidos foi baixa, o N contido nos brotos não contribui muito quando considerada a quantidade total de N acumulado na planta.

Os valores em miligramas da quantidade de N total em cada componente da biomassa de *S. alterniflora* (teor de N multiplicado pela biomassa média do componente), no início e no fim do experimento, são apresentados na Tabela 7, assim como a contribuição percentual de cada componente para o somatório do N total na planta.

Tabela 7. Quantidade total de N (mg) no tecido de cada componente da biomassa das plantas de *S. alterniflora*.

		Compartimento				Total
		Folhas vivas	Folhas mortas	Raízes	Brotos	
Início (dia '0')	N (mg)	671,4	-	290,8	-	962,3
Fim (dia '21')	N (mg)	936,1	126,6	547,1	9,5	1619,3

A Figura 7 apresenta as concentrações totais de N dos diferentes componentes da biomassa no início e após os 21 dias de cultivo das plantas na AP, em ambos os tratamentos. Enquanto no tratamento com *S. alterniflora* a redução na concentração total de N nos 50 L de AP diluída foi de 51,4% (de 4,99 g para 2,43 g de N), no tratamento controle (sem plantas) a redução na concentração deste elemento na AP foi de 42,9% (de 5,26 g para 3,0 g de N).

Do total de redução na concentração de N da AP no tratamento com *S. alterniflora* (2,57 g), 25% (0,65 g de N) pode ser explicado pela incorporação pela planta. Os tecidos foliares em conjunto (folhas vivas + folhas mortas + brotos) tiveram sua concentração de N incrementada em 58,3% (0,39 g de N), o que representa em torno de 15% da diferença entre as concentrações inicial e final na AP neste tratamento. O incremento de N no tecido das raízes foi de 88,3% (0,26 g

de N), representando cerca de 10% da redução entre as concentrações inicial e final de N na AP.

A partir da conversão de cl-*a* em N, foi observado que, no tratamento com *S. alterniflora*, o nitrogênio contido na biomassa fitoplanctônica seria de no máximo 10,7 mg N, representando 0,44 % da redução observada na concentração de N da AP. No tratamento controle, a concentração máxima de N estimada na biomassa fitoplanctônica ficou em 2,88 mg N, o que representou 0,13 % da redução na concentração de N observada na AP.

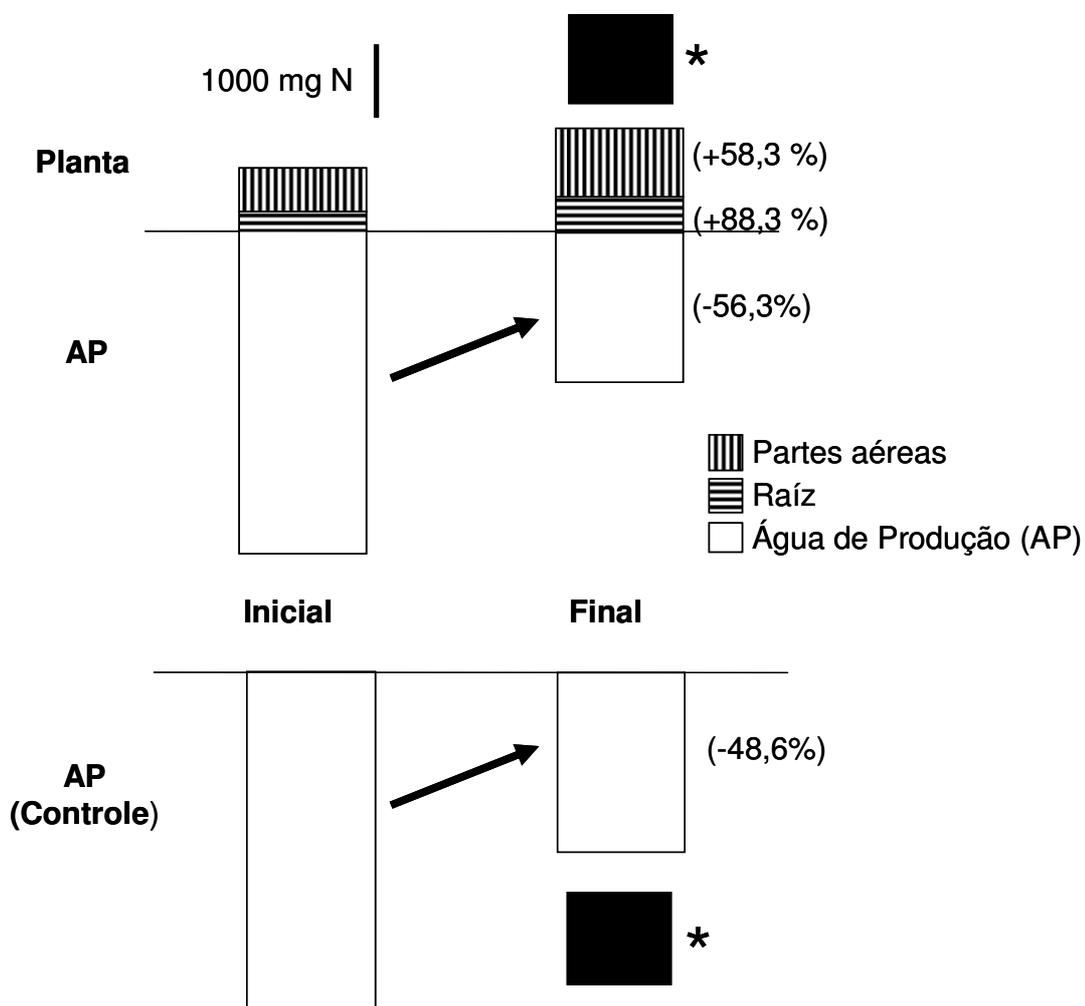


Figura 7. Concentrações inicial e final de N nos tratamentos de AP com e sem a presença de *S. alterniflora*, tanto na água quanto nos tecidos da planta. Os valores entre parênteses indicam o percentual de aumento (+) ou redução (-) na concentração de N. * As caixas pretas simbolizam o N contido na biomassa dos microorganismos presentes na água adicionado ao que foi perdido por volatilização; estas se encontram fora de escala (valor não determinado no experimento).

Discussão

A grama de marisma *Spartina alterniflora* reduziu significativamente a concentração de N e acelerou a redução dos O&G da água de produção de petróleo salina ao longo dos 21 dias de experimento. Apesar do pequeno desenvolvimento, possivelmente devido ao curto período e época do ano do experimento (outono-inverno), a redução na concentração de N na AP pode ser relacionada a um aumento significativo da concentração de N em seus tecidos. A redução na concentração de O&G, apesar de não-significativa, caiu de forma mais abrupta nos tanques com *S. alterniflora* que nos tanques controle. O pH e o OD da água onde a planta foi cultivada foram significativamente menores do que no controle durante a maior parte do experimento.

As altas concentrações de N-NH_4^+ e baixas concentrações de NO_3^- encontradas no presente trabalho corroboram os valores encontrados por outros autores. Segundo Neff (2002), a concentração de amônia na AP pode variar de 0,1 a 650 mg L^{-1} , enquanto a de nitrato geralmente é menor que 1,0 mg L^{-1} (Myers *et al.*, 2001; Sirivedhin & Dallbauman, 2004; OGP, 2005). Dentre os trabalhos revisados, nenhum apresenta concentração de nitrito em AP.

O acúmulo de N no tecido de *S. alterniflora* observado no experimento era esperado frente às quantidades de N elevadas na AP. *S. alterniflora* absorve mais rapidamente N na forma de amônia do que na forma de nitrato (Mendelssohn, 1979; Morris, 1980) e, visto que a principal forma de N em AP é na forma de N-NH_4^+ , a capacidade de *S. alterniflora* reduzir o N neste efluente é maximizada.

Woodhouse (1976 *apud* Mendelssohn, 1979) também observou que a taxa de assimilação de NO_3^- é mais lenta do que a do N-NH_4^+ em *S. alterniflora*.

Segundo Hopkinson & Schubauer (1984), macrófitas emergentes, como *S. alterniflora*, absorvem nutrientes do solo/água intersticial e os translocam para todas as partes da planta. Uma vez que *S. alterniflora* é uma espécie que apresenta grande demanda por N (Smart & Barko, 1980), limitações de crescimento pelo N foram observadas no ambiente natural (Valiela & Teal, 1974; Valiela *et al.*, 1975; Chalmers, 1979; Mendelssohn, 1979; Smart & Barko, 1980; Dai & Wiegert, 1997).

O acúmulo de N em tecidos de *S. alterniflora*, quando da adição deste nutriente, já havia sido demonstrado por alguns autores (Valiela *et al.*, 1973; Valiela & Teal, 1974; Smart & Barko, 1980; Dai & Wiegert, 1997), bem como esta capacidade relacionada a um mecanismo fisiológico da planta que permite a estocagem de nutrientes para utilização em condições de crescimento mais favoráveis. Morris (1982) e Biudes & Camargo (2006) mostraram que em áreas de marismas banhadas por água com maior concentração de N as concentrações deste elemento nos tecidos das plantas também são mais altas.

O fato da concentração de N nos tecidos vivos, ao final do experimento, ser bastante superior à dos tecidos mortos demonstra a capacidade desta planta de translocar N das partes senescentes para as porções mais jovens, reduzindo assim sua dependência ao N externo, que pode ser limitante no ambiente natural (Chalmers, 1979; Morris, 1980; Hopkinson & Schubauer, 1984). Entre as partes vivas, observou-se que os brotos apresentavam concentração de N duas vezes

maior do que a dos outros componentes da biomassa, corroborando a observação de Hopkinson & Schubauer (1984), de maiores concentrações de N nos tecidos mais jovens.

Apesar de ter acumulado N, a diferença na concentração de N-NH_4^+ entre os tratamentos com *S. alterniflora* e sem a presença de plantas (controle) ao final do experimento, mesmo que significativa, foi relativamente pequena (19,3%), em relação à concentração total deste composto. A flutuação na concentração média do nitrogênio amoniacal na ordem de 100 mg N L^{-1} ao longo do experimento leva a concluir que outros fatores biótico e/ou abióticos exerceram maior influência sobre os compostos nitrogenados do que a presença da planta. A quantidade de N acumulada na biomassa fitoplanctônica, em ambos os tratamentos, foi ínfima (menor que 0,5%) quando comparada à redução total na concentração deste elemento. Este resultado sugere que o N reduzido da AP, mas não acumulado pelas plantas de *S. alterniflora*, pode ter sido estocado como biomassa bacteriana ou, o mais provável, ter volatilizado para a atmosfera na forma de amônia (NH_3). O pH levemente básico do efluente estimula a conversão do íon amônio (NH_4^+), solúvel, em amônia gasosa (Esteves, 1988), que tende a volatilizar. A conversão do nitrogênio amoniacal dissolvido em nitrogênio livre por bactérias desnitrificantes não parece ter ocorrido de forma expressiva, visto que esta via ocorre em condições anaeróbicas, o que não foi o caso do presente experimento, e passa pela formação de nitrato (Esteves, 1988) e este composto foi encontrado em baixíssimas concentrações ao longo de todo período experimental.

Processos de fixação de nitrogênio e desnitrificação são empreendidos majoritariamente por microorganismos (Begon *et al.*, 2006) e, provavelmente, bactérias, fungos e microalgas livres e aderidos contribuíram para as oscilações observadas na concentração de nitrogênio amoniacal dissolvido ao longo do experimento, fixando nitrogênio atmosférico na forma de nitrogênio amoniacal. As menores concentrações de nitrogênio amoniacal no tratamento com *S. alterniflora* podem estar relacionadas a uma combinação de absorção pelas plantas e oxidação da rizosfera pelo aerênquima destas, com conseqüente estímulo da atividade microbiana (Olson *et al.*, 2003). O aumento do substrato para desenvolvimento de biofilme pela presença de raízes e absorção/conversão do nitrogênio amoniacal dissolvido por este também são fatores a considerar. Olson *et al.* (2003) enfatizam que, independente do contaminante, a vegetação e os microorganismos associados à rizosfera agem conjuntamente para determinar seu destino final em sistemas de fitorremediação. Sabe-se ainda que o papel dos microorganismos na biodegradação de compostos orgânicos presentes na água de produção é variável, porém geralmente expressivo (OGP, 2005) e que a degradação microbiana do petróleo em ambientes aquáticos é limitada primariamente por nutrientes, como o N (Leahy & Colwell, 1990).

A redução na concentração de N em AP tratada por banhados construídos já havia sido observada por Ji *et al.* (2007), que encontraram reduções maiores do que 80% na concentração total de nitrogênio da AP. Anteriormente, Knight *et al.* (1999) também encontraram redução de nitrogênio amoniacal, entre 40%-98%,

revisando a utilização de banhados para tratar outros efluentes da indústria do petróleo.

A baixa mortalidade de *S. alterniflora* (6,7%) sugere que a concentração inicial de O&G no tratamento com a planta ($48,2 \pm 12,0 \text{ mg L}^{-1}$; média \pm erro-padrão; 30% da AP bruta) não foi tóxica para a mesma. O valor médio de O&G na AP bruta utilizada no experimento, em torno de 190 mg L^{-1} , encontra-se entre as concentrações de O&G encontradas em outras AP, variando de 14 mg L^{-1} (Doran *et al.*, 1998) a 283 mg L^{-1} (Freire *et al.*, 2001). Em um trabalho utilizando AP proveniente da Bacia de Campos, as concentrações de O&G foi estimada entre $58,8\text{-}85,0 \text{ mg L}^{-1}$, com média de $71,9 \text{ mg L}^{-1}$ (Badaró-Pedroso, 1999).

Quanto às reduções na concentração de O&G, *S. alterniflora* parece ter exercido uma influência maior durante a primeira semana do experimento, embora diferenças significativas não tenham sido encontradas. Já na segunda semana a queda na concentração de O&G foi expressiva em ambos os tratamentos. No tratamento com *S. alterniflora*, durante a primeira semana do experimento, provavelmente ocorreu por estímulo da ação microbiana, podendo também estar relacionado à aderência dos O&G às raízes das plantas. A redução mais expressiva na concentração de O&G na segunda semana, em ambos os tratamentos, pode estar relacionada a um atraso na resposta da microbiota, que precisou de algum tempo para se adaptar no tratamento controle, enquanto a presença de *S. alterniflora* estimulou a ação dos microorganismos desde o início.

Segundo Olson *et al.* (2003), a rizosfera (zona sobre influência direta das raízes de uma planta), em solos, cria um micro-habitat para microorganismos com

potencial para a biodegradação de contaminantes orgânicos, não apenas fornecendo substrato, mas também liberando compostos, como exudatos (liberação passiva) e secreções (liberação ativa) que sustentam o crescimento destes. A provável liberação destas substâncias por *S. alterniflora*, em conjunto com a oxigenação da rizosfera pelo aerênquima, ao longo dos dez dias de aclimação da planta antes da adição da AP, pode ter estimulado a microbiota desde a montagem do experimento, permitindo que os microorganismos, na presença da planta, apresentassem uma resposta mais imediata à AP após sua posterior adição.

Hutchinson *et al.* (2003) afirmam que, em solos, o fator de maior influência na fitorremediação de hidrocarbonetos de petróleo é a atividade microbiana, estimulada pela presença das plantas. Lin *et al.* (2003), testando o efeito fitorremediador de *S. alterniflora* em mesocosmo contaminado com petróleo cru variedade 'South Louisiana', provaram que a planta, ao aumentar significativamente o potencial redox do solo onde foi cultivada, pode aumentar a degradação aeróbica do óleo, principalmente quando os nutrientes fósforo e nitrogênio não são limitantes para seu crescimento. Os autores supracitados também afirmam que processos de adsorção deste contaminante orgânico à superfície das raízes, com sua subsequente absorção e/ou degradação possivelmente também contribuíram para a redução de sua concentração no solo.

Nas duas últimas semanas do experimento, a concentração de O&G caiu marcadamente em ambos os tratamentos o que pode ser explicado tanto pelo intemperismo, uma vez que o efluente nos tanques encontrava-se em contato

direto com a atmosfera e recebendo luz solar (foto degradação), quanto também por ação microbiana.

Segundo Knight *et al.* (1999) vários processos contribuem na remoção, conversão ou acúmulo de hidrocarbonetos e outros compostos químicos em banhados construídos; estes processos incluem a volatilização, acúmulo no sedimento ou biofilme, biodegradação, foto degradação ou assimilação por plantas e animais. Pode-se ainda ressaltar que algas e protozoários são membros importantes da comunidade microbiana em ambientes aquáticos e terrestres, porém o papel destes organismos na biodegradação de hidrocarbonetos é amplamente desconhecido (Leahy & Colwell, 1990).

Como, no presente experimento, as temperaturas foram as mesmas para ambos os tratamentos, o metabolismo microbiano foi afetado de forma semelhante, resultando na ausência de diferença significativa para a concentração de O&G entre os tratamentos, reforçando o proposto de que o papel dos microorganismos foi mais expressivo que o de *S. alterniflora* nas alterações químicas ocorridas na AP. A temperatura é um fator que influencia a biodegradação do petróleo (Leahy & Colwell, 1990) e, por conseguinte, dos O&G constantes na AP. A temperatura afeta a condição físico-química do petróleo, a taxa de metabolização de hidrocarbonetos por microorganismos e a composição da comunidade microbiana. Baixas temperaturas tendem a reduzir as taxas de degradação, enquanto altas temperaturas, até um máximo de 30-40 °C, aumentam estas taxas. O pH da AP diluída deste experimento, próximo do neutro, também pode ter favorecido a ação microbiana (Leahy & Colwell, 1990).

A concentração de OD na água de produção quando de sua chegada da refinaria foi igual à zero. Segundo Stephenson (1992), a ausência de OD é inerente da AP, pois, uma vez que o oxigênio pode causar corrosão às tubulações do sistema de produção, a entrada deste elemento é evitada. Após a diluição inicial da AP nos tanques a concentração média de OD já era $5,2 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e o aumento ao longo do tempo na concentração de OD pode ser associado ao crescimento da biomassa fitoplanctônica nos dois tratamentos (mais expressiva no controle ao longo da segunda semana). O aumento acoplado do fitoplâncton e do OD é uma explicação plausível para a queda mais acentuada na concentração de O&G no controle durante este intervalo. O catabolismo de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos por bactérias e fungos envolve a oxidação do substrato por oxigenases, que requerem a presença de oxigênio molecular (Leahy & Colwell, 1990).

As baixas temperaturas certamente foram grandes responsáveis pelo pequeno desempenho de crescimento das plantas de *S. alterniflora* no presente experimento. Cunha (1994) enfatiza que a produção primária de *S. alterniflora* apresenta uma relação linear com a temperatura até 35 °C, valor bastante superior à média das máximas ao longo do experimento (24 °C). Morris (1980; 1982) também enfatizou que variações temporais na taxa de crescimento de *S. alterniflora* são, em grande parte, dependentes deste e outros fatores climáticos.

Por outro lado, a concentração de sal da água na qual a planta foi cultivada (10 g NaCl L^{-1}) certamente não foi o fator responsável pelo baixo desempenho de crescimento da planta, uma vez que já foi comprovado que esta salinidade é ótima

para o desenvolvimento de *S. alterniflora* (Bradley & Morris, 1992; Cunha *et al.*, 2005; Capítulo 2). Smart & Barko (1980), inclusive, encontraram que a absorção de N por *S. alterniflora* é maior em salinidades em torno de 9 - 10 g NaCl L⁻¹ do que em salinidades de 3 ou entre 26-31 g NaCl L⁻¹. Mendelssohn & Morris (2000) também observaram que o aumento da salinidade reduz a absorção de NH₄⁺ por *S. alterniflora*. Uma vez que a tolerância ao sal por esta espécie é em parte relacionada à produção celular de compostos osmo-regulatórios baseados em N (prolina e glicinabetaína), o aumento da salinidade pode aumentar a concentração crítica de N na planta (concentração mínima no tecido para sustentar o crescimento), aumentando assim sua demanda por este elemento (Mendelssohn & Morris, 2000).

Testes futuros da eficiência na redução de nitrogênio amoniacal da AP por sistemas de fitorremediação com *S. alterniflora* devem considerar o impacto da concentração salina sobre o metabolismo do nitrogênio nesta espécie.

Capítulo 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No primeiro experimento, que determinou o potencial tóxico da água de produção de petróleo salina sobre *Spartina alterniflora*, esta planta sobreviveu e cresceu no efluente em questão diluído, demonstrando sua capacidade de utilização em banhados construídos para o tratamento secundário/terciário deste e outros efluentes oriundos da indústria petrolífera.

O segundo experimento, um teste piloto para avaliar o potencial de fitorremediação da água de produção de petróleo salina por *S. alterniflora*, a redução na concentração de nitrogênio (amoniaco) da água de produção foi maior na presença de *S. alterniflora*; entretanto, a volatilização, estimulada pelo pH levemente alcalino, e a microbiota parecem ter exercido uma maior influência que as plantas neste processo. *S. alterniflora* ainda absorveu e acumulou N em seus tecidos.

Já a concentração de óleos e graxas não foi influenciada pela presença de *S. alterniflora* ao final de 21 dias, porém a redução da concentração destes componentes foi mais rápida onde havia plantas na primeira semana de experimento. Processos microbiológicos, físicos e químicos, e não apenas os mediados pela planta, controlaram também a degradação destes compostos.

Um experimento de fitorremediação de água de produção com maior concentração de plantas, aumentando assim a área de ação direta da rizosfera, e utilizando um substrato sólido, como areia grossa, para fornecer mais superfície

de colonização para a microbiota, provavelmente possibilitaria uma maior eficiência na redução do nitrogênio do efluente pelo sistema.

Por fim, enfatiza-se que os resultados deste trabalho não mensuram todo o potencial de fitorremediação da água de produção salina do petróleo por banhados construídos contendo plantas de *S. alterniflora*, entretanto comprovam a capacidade de uso desta halófito de marismas na construção deste tipo de sistema de tratamento. Experimentos pilotos com banhados construídos deverão ser realizados para uma avaliação adequada dos custos/benefícios destes sistemas para a indústria do petróleo.

LITERATURA CITADA

- AL-MASRI, MS. 2006. Spatial and monthly variations of radium isotopes in produced water during oil production. *Appl. Rad. Isot.*, 64: 615–623.
- ANONYMOUS, 1997. Biochemical degradation treats produced water. *Oil & Gas J.*, 95(3): 72-72.
- BADARÓ-PEDROSO, C. 1999. Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo sobre algumas espécies marinhas. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 243p.
- BANNISTER, P. 1976. Physiological ecology and plant nutrition. In: CHAPMAN, SB (ed.). *Methods in Plant Ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Chap. 5: 229-296.
- BAPTISTA, JR. 1987. *Caderno de Química Analítica Quantitativa: Teoria e Prática*. Rio Grande, Editora FURG. 84p.
- BAUMGARTEN, MGZ, JMB ROCHA & LPH NIENCHESKI. 1996. *Manual de Análises em Oceanografia Química*. Rio Grande, Editora FURG. 132p.
- BEGON, M, CR TOWNSEND & JL HARPER. 2006. *Ecology: from individuals to ecosystems*. 4th ed. EUA, Blackwell Publishing. 738p.
- BERGEN, A, C ALDERSON, R BERGFORS, C AQUILA & MA MATSIL. 2000. Restoration of a *Spartina alterniflora* salt marsh following a fuel oil spill, New York City, NY. *Wetlands Ecol. Manag.*, 8: 185-195.

- BIUDES, JFV & AFM CAMARGO. 2006. Changes in biomass, chemical composition and nutritive value of *Spartina alterniflora* due to organic pollution in the Itanhaém River basin (SP, Brazil). *Braz. J. Biol.*, 66(3):781-789.
- BRADLEY, PM & JT MORRIS. 1992. Effect of salinity on the critical nitrogen concentration of *Spartina alterniflora* Loisel. *Aquat. Bot.*, 43: 149-161.
- BRASIL. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005.
- BRIX, H. 1993. Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance. In: MOSHIRI, GA. *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*. CRC press, Florida: 9-21.
- CAMPOS, JC, RMH BORGES, AM OLIVEIRA FILHO, R NÓBREGA & GL SANT'ANNA JR. 2002. Oilfield wastewater treatment by combined microfiltration and biological processes. *Water res.*, 36: 95-104.
- CANNING, K. 1998. Process uses plants to treat produced water. *Pollut. Eng.*, 30(13): 12-14.

- CAPP (Canadian Association of Petroleum Producers). 2001. Offshore Produced Water Waste Management. Canadá, Technical Report 2001-0030. 79p.
- CHALMERS, AG. 1979. The effects of fertilization on nitrogen distribution in a *Spartina alterniflora* salt marsh. *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 8: 327-337.
- CHENG, S, W GROSSE, F KARRENBROCK & M THOENNESSEN. 2002. Efficiency of constructed wetlands in decontamination of water polluted by heavy metals. *Ecol. Eng.*, 18: 317-325.
- CLARK, RB. 2001. Marine Pollution. 5th edition. UK, Oxford University Press. 237p.
- COSTA, CSB & AJ DAVY. 1992. Coastal saltmarsh communities of Latin America. In: SEELIGER, U (ed.). Coastal Plant Communities of Latin America. Academic Press, Nova Iorque: 157-177.
- CUNHA, SR. 1994. Modelo Ecológico das Marismas de *Spartina alterniflora* Loisel. (Poaceae) do Estuário da Lagoa dos Patos, RS. Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 105 p.
- CUNHA, SR, M ASMUS & CSB COSTA. 2005. Production dynamics of *Spartina alterniflora* salt marshes in the estuary of Patos Lagoon (RS, Brazil): a simulation model approach. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*, 9(2): 75-85.
- CURTICE, RJ & ED DALRYMPLE. 2004. Just the cost of doing business? *World Oil*, 225(10): 77-78.

- DAI, T & RG WIEGERT. 1997. A Field Study of Photosynthetic Capacity and its Response to Nitrogen Fertilization in *Spartina alterniflora*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 45: 273–283.
- DELAUNE, RD, CJ SMITH, WH PATRICK, JW FLEEGER & MD TOLLEY. 1984. Effect of oil on salt marsh biota: methods for restoration. *Environ. Pollut.*, 36: 207-227.
- DELAUNE, RD, SR PEZESHKI, A JUGSUJINDA & CW LINDAU. 2003. Sensitivity of US Gulf of Mexico coastal marsh vegetation to crude oil: Comparison of greenhouse and field responses. *Aquat. Ecol.*, 37: 351-360.
- DORAN, GF, KL WILLIAMS, JA DRAGO, SS HUANG & LYC LEONG. 1998. Pilot study results to convert oil field produced water to drinking water or reuse quality. Society of Petroleum Engineers, SPE paper no. 49124. 18p.
- DÓREA, H, JRL BISPO, KAS ARAGÃO, BB CUNHA, S NAVICKIENE, JPH ALVES, LPC ROMÃO & CAB GARCIA. 2007. Analysis of BTEX, PAHs and metals in the oilfield produced water in the State of Sergipe, *Brazil*. *Microchem. J.*, 85: 234–238.
- DURELL, G, TR UTVIK, S JOHNSEN, T FROST & JM NEFF. 2006. Oil well produced water discharges to the North Sea. Part I: Comparison of deployed mussels (*Mytilus edulis*), semi-permeable membrane devices, and the DREAM model predictions to estimate the dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.*, 62: 194–223.

- EKINS, P, R VANNER & J FIREBRACE. 2007. Zero emissions of oil in water from offshore oil and gas installations: economic and environmental implications. *J. Cleaner Prod.*, 15: 1302-1315.
- ELIAS-SAMLALSINGH, N & JBR, AGARD. 2004. Application of toxicity identification evaluation procedures for characterizing produced water using the tropical mysid, *Metamysidopsis insularis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 (5): 1194-1203.
- ESTEVEES, FA. 1988. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro, Editora Interciência/FINEP. 575p.
- FREIRE, DDC, MC CAMMAROTA & GL SANT'ANNA JR. 2001. Biological treatment of oilfield wastewater in a sequencing batch reactor. *Environ. Tech.*, 22: 1125-1135.
- FUJITA, RM. 1981. Natural gas from salt marsh biomass. *Biol. Bull.*, 161: 326.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution). 1993. Impact of Oil and Related Chemicals and wastes on the Marine Environment. Report Studies GESAMP nº 50. 180 p.
- GIRLING, AE. 1989. Acute and chronic toxicity of produced water from a North Sea oil production platform to the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 43: 280-286.

- GRATÃO, PL, MNV PRASAD, PF CARDOSO, PJ LEA & RA AZEVEDO. 2005. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17(1): 53-64.
- GRAY, JS. 2002. Perceived and real risks: produced water from oil extraction. *Mar. Poll. Bull.*, 44: 1171–1172.
- HENDERSON, SB, SJW GRIGSON, P JOHNSON & BD RODDIE. 1999. Potential impact of production chemicals on the toxicity of produced water discharges from North Sea oil platforms. *Mar. Poll. Bull.*, 38(12): 1141-1151.
- HOLDWAY, DA. 2002. The acute and chronic effects of wastes associated with offshore oil and gas production on temperate and tropical marine ecological processes. *Mar. Poll. Bull.*, 44: 185-203.
- HOPKINSON, CS & JP SCHUBAUER. 1984. Static and dynamic aspects of nitrogen cycling in the salt marsh graminoid *Spartina alterniflora*. *Ecology*, 65(3): 961-969.
- HOWES, BL, JWH DACEY & DD GOEHRINGER. 1986. Factors controlling the growth form of *Spartina* production, sediment oxidation, nitrogen and salinity. *J. Ecol.*, 74: 881-898.
- HUTCHINSON, SL, AP SCHWAB & MK BANKS. 2003. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in the rhizosphere. In: MCCUTCHEON, SC & JL SCHNOOR (eds.). Phytoremediation: transformation and control of contaminants. John Wiley & Sons, Nova Jersey (EUA), Chap. 11: 355-386.

- JERREZ VEGUEIRA, SF, JM GODOY & N MIEKELY. 2002. Environmental impact studies of barium and radium discharges by produced waters from the “Bacia de Campos” oil-field offshore platforms. *Brazil. J. Environ. Radioac.*, 62: 29–38.
- JI, GD, TH SUN & JR NI. 2007. Surface flow constructed wetland for heavy oil-produced water treatment. *Bioresource Tech.*, 98: 436–441.
- KLEINBAUN, DG. 1996. Survival Analysis. Nova Iorque, Springer Verlag. 590p.
- KNIGHT, RL, RH KADLEC & HM OHLENDORF. 1999. The use of treatment wetlands for petroleum industry effluents. *Environ. Sci. Tech.*, 33(7): 973–980.
- LACERDA, LD, JL FREIXO & SM COELHO. 1997. The effect of *Spartina alterniflora* Loisel. on trace metals accumulation in inter-tidal sediments. *Mang. and Salt Mars.*, 1(4): 201-209.
- LEAHY, JG & RR COLWELL. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, 54(3): 305-315.
- LICHT, LA & JG ISEBRANDS. 2005. Linking phytoremediated pollutant removal to biomass economic opportunities. *Biomass Bioener.*, 28: 203–218.
- LIN, Q & IA MENDELSSOHN. 1996. A comparative investigation of the effects of South Louisiana Crude Oil on the vegetation of fresh, brackish and salt marshes. *Mar. Poll. Bull.*, 32 (2): 202-209.

- LIN, Q & IA MENDELSSOHN. 1998. The combined effects of phytoremediation and biostimulation in enhancing habitat restoration and oil degradation of petroleum contaminated wetlands. *Ecol. Eng.*, 10: 263-274.
- LIN, D. 1999. Water treatment complicates heavy oil production. *Oil & Gas J.*, 97 (38): 76-78.
- LIN, Q, IA MENDELSSOHN, MT SUIDAN, K LEE & AD VENOSA. 2002a. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Mar. Poll. Bull.*, 44: 897-902.
- LIN, Q, IA MENDELSSOHN, K CARNEY, NP BRYNER & WD WALTON. 2002b. Salt marsh recovery and oil spill remediation after in-situ burning: effects of water depth and burn duration. *Environ. Sci. Tech.*, 36 (4): 576-581.
- LIN, Q, IA MENDELSSOHN, CB HENRY, S MILES, EB OVERTON, RJ PORTIER & MM WALSH. 2003. A comparison of biostimulation and phytoremediation of crude oil in wetland mesocosms. In: MENDELSSOHN, IA & Q LIN (eds.). *Development of Bioremediation for Oil Spill Cleanup in Coastal Wetlands*. U.S. Department of Interior, Minerals Management Office, Gulf of Mexico OCS Region, OCS Study, MMS 2002-048, Chap. 4:59-74.
- LINDAU, CW, RD DELAUNE, A JUGSUJINDA & E SAJO. 1999. Response of *Spartina alterniflora* vegetation to oiling and burning of applied oil. *Mar. Poll. Bull.*, 38 (12): 1216-1220.

- LINDAU, CW, RD DELAUNE & A JUGSUJINDA. 2003. Marsh sensitivity to burning of applied crude oil. *Spill Sci. Tech. Bull.*, 8 (4): 401-404.
- LU, J, X WANG, B SHAN, X LI & W WANG. 2006. Analysis of chemical compositions contributable to chemical oxygen demand (COD) of oilfield produced water. *Chemosphere*, 62: 322–331.
- MENDELSSOHN, IA. 1979. The influence of nitrogen level, form, and application method on the growth response of *Spartina alterniflora*, North Carolina. *Estuaries*, 2(2): 106-112.
- MENDELSSOHN, IA & JT MORRIS. 2000. Eco-physiological controls on the productivity of *Spartina alterniflora* Loisel. In: WEINSTEIN, MP & DA KREEGER (eds.). Concepts and Controversies in Tidal Marsh Ecology. Kluwer. Dordrecht: 59-80.
- MORRIS, JT. 1980. The nitrogen uptake kinetics of *Spartina alterniflora* in culture. *Ecology*, 61(5) 1114-1121.
- MORRIS, JT. 1982. A model of growth responses by *Spartina alterniflora* to nitrogen limitation. *J. Ecol.*, 70: 25-42.
- MYERS, JE, LM JACKSON, RF BERNIER & DA MILES. 2001. An evaluation of the department of energy naval petroleum reserve no.3 produced water bio-treatment facility. Society of Petroleum Engineers, SPE paper no. 66522. 13 p.

- NEFF, JM. 2002. Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water. Amsterdam, Elsevier Science Publishers. 453 p.
- NEFF, JM, S JOHNSEN, TK FROST, TR UTVIK & GS DURELL. 2006. Oil well produced water discharges to the North Sea. Part II: Comparison of deployed mussels (*Mytilus edulis*) and the DREAM model to predict ecological risk. *Mar. Environ. Res.*, 62: 224–246.
- NEGRI, AP & AJ HEYWARD. 2000. Inhibition of fertilization and larval metamorphosis of the coral *Acropora millipora* (Ehrenberg, 1834) by petroleum products. *Mar. Poll. Bull.*, 41: 420–427.
- ODEIGAH, PGC, O NURUDEEN & OO AMUND. 1997. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. *Hereditas*, 126: 161-167.
- OGP (International Association of Oil and Gas Producers). 2002. Aromatics in produced Water: Occurrence, Fate & Effects and Treatment. Report no. 1.20/324. Inglaterra. 30p.
- OGP (International Association of Oil and Gas Producers). 2005. Fate and Effects of Naturally Occurring Substances in Produced Water on the Marine Environment. Report no. 364. Inglaterra. 42p.
- OLIVEIRA, RCG & MCK OLIVEIRA. 2000. Remoção de contaminantes tóxicos dos efluentes líquidos oriundos da atividade de produção de petróleo no mar. *Bol. Téc. PETROBRAS*, 43(2): 129-136.

- OLSON, PE, KF REARDON & EAH PILON-SMITS. 2003. Ecology of rhizosphere bioremediation. In: MCCUTCHEON, SC & JL SCHNOOR (eds.). Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants. John Wiley & Sons, Nova Jersey (EUA), Chap. 10: 317-354.
- PARSONS, TR, M TAKAHASHI, B HARGRAVE. 1984. Biological Oceanographic Processes, 3rd ed. Grã-Bretanha, Wheaton & Co. Ltd. 330p.
- PETERSON, CH, MC KENNICUTT II, RH GREEN, P MONTAGNA, DE HARPER Jr., EN POWELL & PF ROSCIGNO. 1996. Ecological consequences of environmental perturbations associated with offshore hydrocarbon production: a perspective on long-term exposures in the Gulf of Mexico. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 2637–2654.
- PEZESHKI, SR, MW HESTER, Q LIN & JA NYMAN. 2000. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environ. Poll.*, 108: 129-139.
- PEZESHKI, SR, RD DELAUNE & A JUGSUJINDA. 2001. The effects of crude oil and the effectiveness of cleaner application following oiling on US Gulf of Mexico coastal marsh plants. *Environ. Poll.*, 112: 483-489.
- QIN, P, M XIE & Y JIANG. 1998. *Spartina* green food ecological engineering. *Ecol. Eng.*, 11: 147–156
- RAIMONDI, P & A BOXSHALL. 2002. Effects of produced water on complex behaviour traits of invertebrate larvae. Minerals Management Service,

Pacific OCS Region, U.S. Department of the Interior. OCS Study MMS 2002-50. Final Technical Summary, Final Study Report. 45p.

RAMIREZ Jr., P. 2002. Oil Field produced water discharges into wetlands in Wyoming. U.S. Fish and wildlife service, Region 6. Contaminant report number R6/718C/02. Disponível em: [www.r6.fws.gov/contaminants/papers/r6718c02.pdf]; acesso em 25 de outubro de 2005. 19p.

REED, DC & RJ LEWIS. 1994. Effects of an oil and gas-production effluent on the colonization potential of giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) zoospores. *Mar. Biol.*, 119: 277-283.

SIEGEL, S. 1975. Estatística Não-Paramétrica Para as Ciências do Comportamento. São Paulo, McGraw Hill. 350 p.

SIRIVEDHIN, T & L DALLBAUMAN. 2004. Organic matrix in produced water from the Osage-Skiatook Petroleum Environmental Research site, Osage county, Oklahoma. *Chemosphere*, 57: 463–469.

SMART, RM & JW BARKO. 1980. Nitrogen nutrition and salinity tolerance of *Distichlis spicata* and *Spartina alterniflora*. *Ecology*, 61(3): 630-638.

SMITH, DL & CE PROFFITT. 1999. The effects of crude oil and remediation burning on three clones of smooth cordgrass (*Spartina alterniflora* Loisel.). *Estuaries*, 22 (3A): 616-623.

- SOKAL, RS & FS ROHLF. 1981. Biometry. Nova Iorque, W.H. Freeman and Company. 859p.
- STEPHENS, S, SC FRANKLING, RM STAGG & JA BROWN. 2000. Sub-lethal effects of exposure of juvenile turbot to oil produced water. *Mar. Poll. Bull.*, 40 (11): 928-937.
- STEPHENSON, MT. 1992. Components of produced water: a compilation of industry studies. *J. Pet. Tech.*, 5: 548-550; 602-603.
- STRØMGREN, T, SE SØRSTRØM, L SCHOU, I KAASTAD, OG BRAKSTAD & Ø JOHANSEN. 1995. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. *Mar. Environ. Res.*, 40(2): 147-169.
- THOMAS, KV, J BALAAM, MR HURST & JE THAIN. 2004. Identification of in vitro estrogen and androgen receptor agonists in North Sea offshore produced water discharges. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 (5): 1156-1163.
- TOLLEFSEN, KE, EF FINNE, R ROMSTAD & C SANDBERG. 2006. Effluents from oil production activities contain chemicals that interfere with normal function of intra- and extra-cellular estrogen binding proteins. *Mar. Environ. Res.*, 62 (1): 191-194.
- USDA (United States Department of Agriculture), NRCS (National Resources Conservation Service). 2000. *Smooth Cordgrass Spartina alterniflora Loisel.*. The Plants Database. Version: 000504. <<http://plants.usda.gov>>. National Plant Data Center, Baton Rouge, Louisiana. 5p.

- UTVIK, TIR. 1999. Chemical characterisation of produced water from four offshore oil production platforms in the North Sea. *Chemosphere*, 39(15): 2593-2606.
- VALIELA, I, JM TEAL & W SASS. 1973. Nutrient retention in salt marsh plots fertilized with sewage sludge. *Est. Coast. Mar. Sci.*, 1: 261-269.
- VALIELA, I, JM TEAL. 1974. Nutrient limitation in salt marsh vegetation. In: REINOLD, RJ & WH QUEEN (eds.). *Ecology of Halophytes*. Academic Press Inc., Londres, :547-563
- VALIELA, I, JM TEAL & W SASS. 1975. Production and dynamics of salt marsh vegetation and the effects of experimental treatment with sewage sludge. *J. Appl. Ecol.*, 12: 973-981.
- VEIL, JA, MG PUDER, D ELCOCK & RJ REDWEIK. 2004. A white paper describing produced water from production of crude oil, natural gas, and coal bed methane. Prepared for the United States Department of Energy (USDE), Contract W-31-109-Eng-38. 87 p.
- VEIL, JA, TA KIMMELL & AC RECHNER. 2005. Characteristics of produced water discharged to the Gulf of Mexico hypoxic zone. Disponível em: [<http://www.osti.gov/bridge>]; acesso em 1 de novembro de 2005. 76p.
- VITALIANO, JJ, RN RAID, AB FRAME, DB PACKER, L ARLEM & JN SACCO. 2002. Comparison of benthic invertebrate assemblages at *Spartina alterniflora* marshes reestablished after an oil spill and existing marshes in the Arthur Kill (NY/NJ). *Mar. Poll. Bull.*, 44: 1100-1108.

- WASHBURN, L, S STONE & S MACINTYRE. 1999. Dispersion of produced water in a coastal environment and its biological implications. *Cont. Shelf Res.* 19, 57-78.
- WEIS, JS & P WEIS. 2004. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environ. Int.*, 30: 685-700.
- WELSCHMEYER, NA. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll-*a* in the presence of chlorophyll-*c* and phaeopigments. *Limnol. Oceanogr.*, 39(8): 1985-1992.
- ZAR, JH. 1984. Biostatistical Analysis. Nova Iorque, Prentice Hall. 717p.