

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE - GO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
ENGENHARIA APLICADA E SUSTENTABILIDADE

Brachiaria ruziziensis tem potencial de fitorremediação de solos
contaminados com óleo diesel?

Autora: Larissa Saeki Rehn
Orientador: Prof. Dr. Lucas Peres Angelini

RIO VERDE - GO
Maio - 2021

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE - GO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
ENGENHARIA APLICADA E SUSTENTABILIDADE

Brachiaria ruziziensis tem potencial de fitorremediação de solos
contaminados com óleo diesel?

Autora: Larissa Saeki Rehn
Orientador: Prof. Dr. Lucas Peres Angelini
Coorientador: Dr. Arthur Almeida Rodrigues

Dissertação apresentada como parte das exigências para
obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA
APLICADA E SUSTENTABILIDADE, do Programa
de Pós-Graduação – *Stricto Sensu* em Engenharia
Aplicada e Sustentabilidade do Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio
Verde - Área de concentração (Engenharia Aplicada e
Sustentabilidade).

RIO VERDE - GO
Maio – 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

RR345b Rehn, Larissa Saeki
Brachiaria ruziziensis tem potencial de
fitorremediação de solos contaminados com óleo diesel?
/ Larissa Saeki Rehn; orientador Lucas Peres
Angelini; co-orientador Arthur Almeida Rodrigues. --
Rio Verde, 2021.
45 p.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-graduação
em Engenharia Aplicada e Sustentabilidade) --
Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2021.

1. Poluição do solo; . 2. monitoramento ambiental;
. 3. forrageira. I. Peres Angelini, Lucas , orient.
II. Almeida Rodrigues, Arthur, co-orient. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 57/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

POTENCIAL DA *BRACHIARIA RUZIZIENSES* COMO FITORREMIADORA EM SOLOS CONTAMINADOS
COM ÓLEO DIESEL

Autora: Larissa Saeki Rehn
Orientador: Dr. Lucas Peres Angelini

TITULAÇÃO: Mestre em Engenharia Aplicada e Sustentabilidade - Área de
Concentração Engenharia Aplicada e Sustentabilidade

APROVADO em 21 de maio de 2021.

Prof. Dr. Sebastião Carvalho
Vasconcelos Filho
Avaliador externo - IF Goiano / Rio
Verde

Prof. Dr. Edio Damasio da Silva
Junior
Avaliador interno - IF Goiano / Rio
Verde

Prof. Dr. Lucas Peres Angelini
Presidente da Banca - IF Goiano / Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Sebastiao Carvalho Vasconcelos Filho, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 26/05/2021 10:16:47.
- Edio Damasio da Silva Junior, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 25/05/2021 21:37:45.
- Lucas Peres Angelini, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 25/05/2021 14:32:07.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 19/05/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 270344
Código de Autenticação: 2f36312474



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- Tese Artigo Científico
 Dissertação Capítulo de Livro
 Monografia – Especialização Livro
 TCC - Graduação Trabalho Apresentado em Evento
 Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____

Nome Completo do Autor: Larissa Saeki Rehn

Matrícula: 2019102331440069

Título do Trabalho: *Brachiaria ruzizensis* tem potencial de fitorremediação de solos contaminados com óleo diesel?

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 16/11/21

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Local: Rio Verde, 08/11/2021
Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cláudia e Fredi

Ao meu irmão, Lucas

À minha batian, Luzia Harue (In memoriam)

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço a vida.

Aos meus pais, que são o esteio da nossa família e graças aos esforços dos senhores, podemos crescer em um lar amoroso e ter nossas conquistas individuais.

Ao meu irmão Lucas, Peppa, a vida se torna mais leve quando se tem alguém com quem crescer, brincar, brigar e dividir memórias.

A minha madrinha, por sempre incentivar nos estudos e acreditar no meu potencial.

Aos meus colegas Eduardo, Galileu, Ederson, Bruna, Murilo, Álvaro, Luiz Gustavo e Abner, obrigada pelas risadas em meio as dificuldades que o mestrado apresentou.

A Nivalda, carinhosamente Nini, agradeço a empatia e o tempo que dedicou em me passar seus conhecimentos.

Ao meu orientador, Lucas Angelini, pessoa de bem com a vida, sempre apoiando e acreditando no melhor de seus alunos. Que tenhamos mais exemplos de docentes assim. Agradeço a paciência em me orientar e disposição para fazer com que essa defesa se concretizasse.

Ao meu coorientador, Arthur Almeida, que desde 2016, por meio da Iniciação Científica, vem orientando, agregando e contribuindo com a minha vida acadêmica. Deixo aqui registrado os meus sinceros agradecimentos por todos esses anos.

Ao professor Sebastião Carvalho e Douglas Almeida, ambos somaram com a minha trajetória acadêmica, também desde a Iniciação Científica.

A Priscilla Ferreira e Izadora Andrade que contribuíram imensamente com este trabalho.

Aos docentes do PPGEAS, onde tive apoio e compreensão quando mais precisei.

Ao IF Goiano – Campus Rio Verde, pelos sete anos de graduação e mestrado.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Larissa Saeki Rehn, filha de Fredi Rehn e Cláudia Saeki Rehn, nascida em 19 de julho de 1996 na cidade de Rio Verde, Goiás. Concluiu a graduação em Engenharia Ambiental pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, em 2018. No ano consecutivo, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Aplicada e Sustentabilidade e linha de pesquisa em “Eficiência Energética e Sustentabilidade” na mesma instituição de ensino que cursou a graduação.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	vii
BIOGRAFIA DO AUTOR.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	xiii
RESUMO	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Referências bibliográficas	19
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. CAPÍTULO I.....	24
3.1 Introdução.....	25
3.2 Materiais e Métodos	27
3.2.1 Design experimental e condições de cultivo	27
3.2.2 Sintomas Foliares	28
3.2.3. Avaliação da fluorescência da clorofila a.....	28
3.2.4 Análise com Dualex	29
3.2.5 Comprimento da parte aérea e massa seca da raiz e parte aérea	29
3.2.7 Caracterização morfoanatômica foliar	29
3.2.8 Determinação da degradação do óleo diesel	30
3.2.9 Análise Estatística	30
3.3 Resultados.....	30
3.3.1 Biomassa Vegetal	31
3.3.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	31
3.3.3 Análise com Dualex	32
3.3.4 Caracterização anatômica da folha.....	33
3.3.5 Remoção do óleo	35

3.4 Discussão.....	35
3.5 Conclusão	37
3.6 Referência.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I:	
Tabela 1. Comprimento da parte aérea, massa seca parte aérea e da raiz de plantas de <i>Brachiaria ruzizienses</i> , após 67 dias de cultivo em solo contaminado com óleo diesel nas concentrações de (0, 5, 10, 15 e 20 g kg ⁻¹).....	31
Tabela 2 Índice de nitrogênio (NBI), clorofilas, flavonoides e antocianinas em plantas de <i>Brachiaria ruzizienses</i> , após 67 dias de cultivo em solo contaminado com óleo diesel nas concentrações de (0, 5, 10, 15 e 20 g kg ⁻¹).....	33
Tabela 3 Micromorfometria das folhas de <i>Brachiaria ruzizienses</i> , após 67 dias de cultivo em solo contaminado com óleo diesel nas concentrações de (0, 5, 10, 15 e 20 g kg ⁻¹). Epiderme Adaxial (EpAd), Epiderme Abaxial (EpAb), Células buliformes (BC) e Mesofilo (Me).	34

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I:	Página
<p>Fig. 1. Rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm), taxa de transporte de elétrons ETR, rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ϕII), rendimento quântico da dissipação não regulada de energia não fotoquímica no fotossistema II (ϕNO), rendimento quântico da dissipação regulada de energia não fotoquímica no fotossistema II (ϕNPQ) em folhas <i>Brachiaria ruzizienses</i>, após 67 dias de cultivo em solo contaminado com óleo diesel nas concentrações de (0, 5, 10, 15 e 20 g kg⁻¹). Média \pm EP (n = 4). Asteriscos indicam diferença a 5% (*) de probabilidade, entre tratamentos e controle, pelo teste de Dunnett. (NS) não significativo.</p>	32
<p>Fig. 2. Alterações anatômicas nas folhas de <i>Brachiaria ruzizienses</i>, após 67 dias de cultivo em solo contaminado com óleo diesel nas concentrações de (0, 5, 10, 15 e 20 g kg⁻¹). (A) controle, (B) 5 g kg⁻¹, (C) 10 g kg⁻¹, (D) 15 g kg⁻¹ e (E-F) 20 g kg⁻¹. (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (CP) parênquima clorofiliano. (BC) células buliformes. Setas pretas indicam colapso das células. Barra de escala 200 μm.....</p>	34
<p>Fig. 3. Porcentagem de remoção de óleo diesel dos solos após 67 dias de cultivo de <i>Brachiaria ruzizienses</i>. Barras representam a porcentagem de erro, Média \pm EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre significativas a 5% (*) de probabilidade pelo teste Scott Knott. CV% = 18.42.....</p>	35

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

%)	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
°C	Graus Celsius
AbEp	Epiderme abaxial
ANOVA	Análise de variância
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
CB	Células buliformes
Chl	Clorofila
cm	Centímetro
cm ²	Centímetros Quadrados
CP	Parênquima clorofiliano
ETR	Taxa aparente de transporte de elétrons
F0	fluorescência inicial
Flv	flavonoides
Fm	fluorescência máxima
FSII	Rendimento quântico potencial do fotossistema II
Fv/Fm	Rendimento quântico potencial do fotossistema II
g	Grama
GAPES	Grupo Associado de Pesquisa do Sudoeste Goiano
HAP	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
Kg	Quilograma
m	metro
M	Mol
Me	Mesofilo
NBI	Índice de balanço de nitrogênio
nm	Nanômetro
NS	Não significativo
pH	Potencial Hidrogeniônico
TPH	Total Petroleum Hydrocarbons
US\$	Dólar Americano
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultravioleta
µm	Micrômetro
µmol	Micromol
φNO	Rendimento quântico da dissipação não regulada de energia não fotoquímica no fotossistema II
φNPQ	Rendimento quântico da dissipação regulada de energia não fotoquímica no fotossistema II
φII	Rendimento quântico efetivo do fotossistema II

RESUMO

REHN, LARISSA SAEKI. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, maio de 2021. ***Brachiaria ruziziensis* tem potencial de fitorremediação de solos contaminados com óleo diesel?** Orientador: Lucas Peres Angelini. Coorientador: Arthur Almeida Rodrigues.

A poluição do meio ambiente proveniente de transporte de combustíveis, vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneos e atividades de exploração, produção e tratamento é uma problemática preocupante para os dias atuais. O óleo diesel possui em sua composição os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), e quando disponíveis no solo são de grande preocupação por serem persistentes neste meio. Existem técnicas químicas e biológicas que recuperam e auxiliam na remediação dos locais contaminados, como a fitorremediação que por meio de plantas pode ocorrer a degradação, transformação ou estabilização dos contaminantes. A *Brachiaria ruzizienses* é uma forrageira originária da África e já foi utilizada em trabalhos de monitoramento ambiental. O experimento ocorreu em casa de vegetação, *B. ruzizienses* foi semeada em vasos individuais contendo solos contaminados com óleo diesel em quatro doses, 5, 10, 15 e 20 g Kg⁻¹ juntamente com o controle. A exposição da espécie ao poluente foi de 67 dias e após esse período foram feitas análises visuais, anatômicas, fisiológicas e quantificação de diesel no solo. Entretanto, a forrageira apresentou baixo desempenho na remediação do contaminante, e o seu melhor resultado se deu na menor concentração testada.

PALAVRAS-CHAVE: Poluição do solo; monitoramento ambiental; forrageira.

ABSTRACT

REHN, LARISSA SAEKI. Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde - GO, May, 2021. **Does *Brachiaria ruziziensis* have phytoremediation potential for soils contaminated with diesel oil?** Advisor: Lucas Peres Angelini. Co-supervisor: Arthur Almeida Rodrigues

Environment pollution from fuel transportation, leaks from underground storage tanks and exploration, production and treatment activities is a worrying issue for today. Diesel oil has polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in its composition and, when available in the soil, are of great concern because they are persistent in this environment. There are chemical and biological techniques that recover and assist in the remediation of contaminated sites, such as phytoremediation, which, through plants, can cause degradation, transformation or stabilization of contaminants. *Brachiaria ruziziensis* is a forage originally from Africa and has already been used in environmental monitoring work. The experiment took place in a greenhouse, where *B. ruziziensis* was sown in individual pots containing soils contaminated with diesel oil in four doses, 5, 10, 15 and 20 g Kg⁻¹ together with the control. The exposure of the species to the pollutant was 67 days and after that period, visual, anatomical, physiological analyses and quantification of diesel in soil were made. However, the forage showed low performance in the contaminant remediation, where its best result was in the lowest concentration tested.

KEY WORDS: Ground pollution; environmental monitoring; forage.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas por vazamento ou derramamento de combustíveis foi intensificada, isto porque as indústrias de petróleo estão diretamente relacionadas com acidentes ambientais como os de transporte de combustíveis por navios, caminhões e dutos, vazamentos provenientes de tanques de armazenamento subterrâneos, além dos acidentes que ocorrem nas atividades de exploração, produção e refino (Admon et al., 2001; Wang et al., 2008).

Dentre esses contaminantes, o óleo diesel se destaca por ser uma mistura complexa de hidrocarbonetos de petróleo que contém alcanos voláteis de baixo peso molecular sendo potencialmente fitotóxicos, e naftalenos que podem interferir no desenvolvimento normal das plantas. Além disso, possui elevada concentração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e em casos de derramamentos de diesel, são de grande preocupação, pois os HAPs são relativamente persistentes no solo (Adam et al, 1999).

Os hidrocarbonetos mais relevantes e nocivos para a saúde humana são o benzeno, tolueno e xileno, pois são carcinogênicos e podem levar a morte (Nanni, 2003). E, entre os óleos combustíveis destilados que são mais empregados para as atividades antropogênicas terrestres, como veículos e máquinas, o diesel se destaca por possuir maior quantidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aromáticos totais (Wang et al., 1990), tornando-se problemática ambiental morosa de se corrigir quando disposta no solo.

Segundo Nanni (2003) o TPH, sigla na Língua Inglesa que em tradução literal significa “*Total Petroleum Hydrocarbons*”, é um parâmetro analisado segundo o método 418.1 da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), ou por derivações deste. Trazendo para um contexto prático são testes laboratoriais, frequentemente utilizado na determinação de áreas com contaminação de hidrocarbonetos, que oferecem dados sobre a concentração dos hidrocarbonetos totais presentes na amostra em questão (Potter et al., 1998).

Ao se confirmar a contaminação do solo e da água, técnicas que buscam a recuperação do meio ambiente são importantes e necessárias para o equilíbrio do meio em questão. Essas ações são conhecidas como remediação que agem de modo direto, contendo, isolando, removendo ou diminuindo a quantidade do contaminantes da área (De Lima et al, 2017).

Observa-se os fatores do local contaminado e a partir disso, adota-se técnicas de remediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados, sendo as mais utilizadas as técnicas químicas (oxidação química *in-situ*), biológica (atenuação natural e biorremediação) e física (extração de vapores no solo) (Andrade et al., 2010).

O autor Eugris (2008) descreve as categorias de tratamentos como biológico, físico-químico e térmicos. No primeiro tratamento ocorrem processos de baixo custo e sem necessidade de tratamento residual, em contrapartida é necessário ter disponibilidade de tempo, pois os contaminantes são transformados em substâncias como dióxido de carbono, água, biomassa em função de microrganismos.

Já o tratamento físico-químico usa propriedades físicas/químicas/elétricas do contaminante ou do meio contaminado de modo o poluente seja separado ou contido. Nos processos químicos utiliza o comportamento das substâncias de modo que sejam alterados por meio de reações químicas, buscando produzir compostos menos tóxicos. Enquanto os tratamentos térmicos, empregam o calor para aumentar a volatilidade, queimar, decompor, destruir e até mesmo dissolver os contaminantes do meio. Tende a ser um dos processos mais rápidos, entretanto de alto custo.

No Brasil, os registros de incidentes com os derramamentos de petróleo e seus derivados tornaram incentivos para desenvolver técnicas físicas, químicas e biológicas que visam a descontaminação destes locais, seja removendo ou degradando estes contaminantes (Andrade et al., 2010). Embora as técnicas físico-químicas sejam mais eficazes, quando comparadas às biológicas, elas apresentam também custos maiores, alta demanda de reagentes químicos e grandes consumos de energia (Mrozik et al., 2010). Estudos apontam os métodos biológicos de biorremediação (Adams et al., 2015), bioaugmentação (Mrozik et al., 2010), bioestimulação (Semrany et al., 2012) e fitorremediação (Yavari et al., 2015) como estratégias bem-sucedidas para contaminantes derivados do petróleo.

A biorremediação utiliza microrganismos, podendo ser de ocorrência natural (nativos ou cultivados), como fungos filamentosos, bactérias e leveduras para degradar ou imobilizar os contaminantes do solo ou da água (Andrade et al., 2010). Enquanto a bioaugmentação é a introdução de microrganismos com alto potencial de degradação dos contaminantes em áreas contaminadas. A técnica é uma prática recomendada para locais em que o solo esteja carente de população microbiana com potencial de degradação do composto em questão (Jacques et al., 2007). A bioestimulação, como o próprio nome

exemplifica, é a técnica de estimular o aumento dos microrganismos já existentes do meio, de modo que a ação microbiana tenha sucesso na degradação do contaminante.

A fitorremediação vem sendo empregada para remediar contaminantes como metais pesados (El-Khatib et al., 2014), radionuclídeos (Hegazy et al., 2013) e hidrocarbonetos de petróleo (Hegazy, 1995). Este método degrada, transforma ou estabiliza os contaminantes, de forma que as plantas utilizem seus mecanismos para transformar as substâncias químicas em metabólitos não fitotóxicos, desintoxicando assim, o solo ou meio aquático (Kamath et al., 2004). Dentre os mecanismos que são responsáveis pelo processo de desintoxicação, estão a reparação de danos, quelação, compartimentalização, os quais são fundamentais para que a planta reaja à fitotoxicidade exposta (Rodrigues et al., 2016).

Esse modelo de extração dos poluentes apresenta custos semelhantes ao cultivo agrícola, e são muito menores do que os custos para técnicas de remediação convencionais. Além disso, a utilização de vegetação melhora as condições hidrológicas do local, aumenta a matéria orgânica e a atividade microbiológica no solo, estabilizando-o por reduzir a erosão, além de minimizar os efeitos severos da radiação solar direta (Camaselle et al., 2013). Nesse sentido, estudos com algumas espécies fitorremediadoras de óleo e seus derivados apresentaram real potencial para esta aplicação, como *Festuca arundinacea* (Liu et al., 2014), *Bassia scoparia* (Moubasher et al., 2015), *Glycine max* (Sanderson et al., 2018). No entanto, o conhecimento sobre as respostas e o limite de tolerância das espécies de plantas a esse contaminante é essencial para o sucesso desta técnica.

As espécies do gênero *Brachiaria* são forrageiras de interesse para regiões da África, Ásia, Austrália e América do Sul, (Nepomuceno et al., 2012). O Brasil cultiva a cerca de 95 milhões de hectares desse gênero (Ferraz, 2003) como cobertura do solo, visando aumentar a sustentabilidade dos sistemas produtores agrícolas, de modo a restituir os nutrientes para as culturas (Duda et al., 2003).

A *Brachiaria ruziziensis* é nativa da África, mais precisamente das savanas africanas e, atualmente é cultivada como cultura forrageira em países de clima tropical e subtropical (Kumble, 1996), e se desenvolve em variados tipos de solo, como arenosos e argilosos, mas é necessário solos com drenagem boa e condições média de fertilidade (Rossi et al., 2012). A espécie é relevante por ter fácil adaptação em solos de baixa fertilidade e boa produção de biomassa durante o ano, tornando-a promissora em

cobertura vegetal (Timossi et al., 2007). Além disso, é geralmente usado como fitorremediador de solos contaminados, sendo associada na recuperação de revegetação de áreas degradadas e contaminadas com arsênio (Araújo et al., 2011) picloram (Braga et al., 2016) e hidrocarbonetos (Merkl et al., 2006).

Para *Brachiaria ruziziensis* ainda não existe estudos avaliando o crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas em solos contaminados com óleo diesel, tornando impossível o uso como fitorremediadora, apesar de seu potencial de indicação e extração de poluentes em áreas contaminadas com metais pesados (Santos, 2006). Para isso, torna-se necessária a mensuração dos efeitos ocasionados no seu crescimento, já que em estudos com plantas tolerantes é verificado que as plantas o reduzem em resposta a contaminação por óleo diesel, mas pouco se conhece sobre os danos causados na estrutura anatômica e fisiológica da planta.

1.1 Referências bibliográficas

Adam, G., & Duncan, H. J. (1999). Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health*.
<https://doi.org/10.1023/A:1006744603461>

Adams, G., Fufeyin, P., Okoro, S., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*.

Admon, S., Green, M., & Avnimelech, Y. (2001). Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. *Bioremediation Journal*.
<https://doi.org/10.1080/20018891079285>

Andrade, J. de A., Augusto, F., & Jardim, I. C. S. F. (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*.
<https://doi.org/10.1590/s0100-46702010000300002>

Araújo, A. S. A., Guilherme, L. R. G., Lopes, G., & Campos, M. L. (2011). Fitorremediação de solos contaminados com arsênio (AS) utilizando braquiária. *Ciencia e Agrotecnologia*. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000100010>

Cameselle, C., Chirakkara, R. A., & Reddy, K. R. (2013). Electrokinetic-enhanced phytoremediation of soils: Status and opportunities. In *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.029>

de Lima, S. D., de Oliveira, A. F., Golin, R., Caixeta, D. S., de Lima, Z. M., & de Moraes, E. B. (2017). Gerenciamento de áreas contaminadas por postos de combustíveis em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Revista Ambiente e Agua*. <https://doi.org/10.4136/ambiente-agua.1872>

El-Khatib, A. A., Hegazy, A. K., & Abo-El-Kassem, A. M. (2014). Bioaccumulation Potential and Physiological Responses of Aquatic Macrophytes to Pb Pollution. *International Journal of Phytoremediation*. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.751355>

Hegazy, A. K., Afifi, S. Y., Alatar, A. A., Kabiell, H. F., & Emam, M. H. (2013). Response of crop plant growth and radionuclides uptake to organic and chemical fertilization of black sand soil. *Phyton - Annales Rei Botanicae*.

Hegazy, A. K. (1995). Phytomonitoring and management of tar piles on the Qatari coastal marshes, Arabian Gulf. *Environmental Pollution*. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)00001-8](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)00001-8)

Jacques, R. J. S., Bento, F. M., Antonioli, Z. I., & Camargo, F. A. de O. (2007). Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782007000400049>

Kamath, R., Rentz, J. A., Schnoor, J. L., & Alvarez, P. J. J. (2004). Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: Principles and applications. In *Studies in Surface Science and Catalysis*. [https://doi.org/10.1016/s0167-2991\(04\)80157-5](https://doi.org/10.1016/s0167-2991(04)80157-5)

Liu, R., Xiao, N., Wei, S., Zhao, L., & An, J. (2014). Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.027>

Merkl, N., Schultze-Kraft, R., & Arias, M. (2006). Effect of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf on microbial population and activity in petroleum-

contaminated soil. *Microbiological Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.06.005>

Moubasher, H. A., Hegazy, A. K., Mohamed, N. H., Moustafa, Y. M., Kabil, H. F., & Hamad, A. A. (2015). Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using *Bassia scoparia* and its associated rhizosphere microorganisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.11.019>

Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.08.001>

Nanni, A. S. (2003). Contaminação do meio físico por hidrocarbonetos e metais na área da refinaria Alberto Pasqualini, Canoas, RS.

Nepomuceno, M. P., Varela, R. M., Alves, P. L. C. A., & Martins, J. V. F. (2012). Períodos de Dessecação de *Urochloa ruziziensis* e Seu Reflexo na Produtividade da Soja RR. *Planta Daninha*. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582012000300011>

Rossi, C. Q., Pereira, M. G., Giácomo, S. G., Betta, M., & Polidoro, J. C. (2012). Frações lábeis da matéria orgânica em sistema de cultivo com palha de braquiária e sorgo. *Revista Ciencia Agronomica*.

Sanderson, K., Módenes, A. N., Espinoza-Quiñones, F. R., Trigueros, D. E. G., Júnior, L. A. Z., Schuelter, A. R., Neves, C. V., & Kroumov, A. D. (2018). Soybean plant-based toxicity assessment and phytoremediation of soils contaminated by vegetable and mineral oils used in power electrical transformers. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.049>

Semrany, S., Favier, L., Djelal, H., Taha, S., & Amrane, A. (2012). Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs). In *Biochemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.017>

Timossi, P. C., Durigan, J. C., & Leite, G. J. (2007). Formação de palhada por braquiárias para adoção do sistema plantio direto. *Bragantia*. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052007000400012>

Wang, J., Zhang, Z., Su, Y., He, W., He, F., & Song, H. (2008). Phytoremediation of petroleum polluted soil. *Petroleum Science*. <https://doi.org/10.1007/s12182-008-0026-0>

Wang, X., Yu, X., & Bartha, R. (1990). Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil. *Environmental science & technology*, 24(7), 1086-1089.

Potter, D. L., & Simmons, K. E. (1998). Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media. In *Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group (TPHCWG) Series*.

Yavari, S., Malakahmad, A., & Sapari, N. B. (2015). A Review on Phytoremediation of Crude Oil Spills. In *Water, Air, and Soil Pollution*. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2550-z>

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial fitorremediador de *Brachiaria ruziziensis* em solos contaminados com óleo diesel e determinar possíveis marcadores morfológicos e fisiológicos na planta.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Investigar as alterações morfoanatômicas e da fluorescência da clorofila *a* nas folhas de *B. ruziziensis*;
- II. Avaliar as alterações na clorofila, índice de nitrogênio, flavonoides e antocianina nas folhas de *B. ruziziensis*;
- III. Determinar a remoção de TPH no solo;
- IV. Avaliar o potencial fitorremediador de *B. ruziziensis*.

3. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a Revista Ecotoxicology)

Brachiaria ruziziensis tem potencial de fitorremediação de solos contaminados com óleo diesel?

RESUMO

A contaminação do solo, devido ao vazamento de petróleo ou seus subprodutos é motivo de preocupação em todo o mundo, causando danos à saúde humana e outras formas de vida do ecossistema. Alguns hidrocarbonetos de petróleo são considerados carcinogênicos e mutagênicos para os seres vivos. Para minimizar os impactos desses compostos no meio ambiente, as plantas apresentam ser uma opção biotecnológica na remoção dos contaminantes dos solos através da fitorremediação. Objetivou-se estudar o potencial fitorremediador de *Brachiaria ruziziensis* cultivada em solos contaminados com óleo diesel, e determinar os possíveis efeitos visuais, morfoanatômicos e fisiológicos. As sementes de *Brachiaria ruziziensis* foram semeadas em vasos individuais contendo solo previamente contaminado com óleo diesel nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 g Kg⁻¹. Após 67 dias de exposição aos tratamentos foram realizadas as avaliações visuais e morfoanatômicas, fisiológicas e remoção do óleo. *B. ruziziensis* obteve melhor desempenho de remoção do contaminante na menor dose testada, apresentou clorose e necrose em suas folhas, redução de crescimento da parte aérea e radicular e, com as análises morfológicas foi identificado redução no mesofilo e desarranjo celular. A partir desses resultados, a espécie possui baixo potencial como fitorremediadora de solos contaminados com óleo diesel, mas pode ser empregada em programas de monitoramento ambiental.

Palavras-chave: poluição, hidrocarbonetos, plantas, remediação, toxicidade.

ABSTRACT

The soil contamination, by the leakage of oil or its by-products, is a cause for concern worldwide, causing damage to human health and other forms of ecosystem life. Some petroleum hydrocarbons are considered carcinogenic and mutagenic for living beings. To minimize the impacts of these compounds on the environment, plants are a biotechnological option for removing contaminants from soil through phytoremediation. The objective was to study the phytoremediation potential of *Brachiaria ruziziensis* cultivated in soils contaminated with diesel oil, and to determine the possible visual, morpho-anatomical and physiological effects. The seeds of *Brachiaria ruziziensis* were sown in individual pots containing soil previously contaminated with diesel oil at concentrations of 5, 10, 15 and 20 g Kg⁻¹. After 67 days of exposure to treatments, visual and morpho-anatomical, physiological and oil removal assessments were performed. *B. ruzizienses* had a better performance in removing the contaminant in the lowest tested dose, also presented chlorosis and necrosis in its leaves, reduced growth of the aerial and root parts and, with the morphological analyzes, a reduction in mesophyll and cellular breakdown was identified. From these results, the species has a low potential as phytoremediation of soils contaminated with diesel oil but can be used in environmental monitoring programs.

Key words: massif, hydrocarbons, plants, remediation, toxicity.

3.1 Introdução

A contaminação do solo por hidrocarbonetos está em destaque nos últimos anos, devido sua alta fitotoxicidade, pela presença de compostos tóxicos que afetam adversamente o meio ambiente e ameaçam a saúde humana (Naidu, 2015; Al Sbani et al., 2021). Considerando o alto impacto desse contaminante a saúde humana e ao ecossistema, as nações de todo o mundo investem anualmente mais de US\$33 bilhões em remediação de áreas contaminadas (Singh et al., 2009; LDD Advanced Technologies LTD, 2014). Entretanto episódios de contaminação dos solos com óleo diesel ocorrem com frequência, como resultado da exploração, desenvolvimento, manutenção, distribuição, armazenamento e liberação não intencional pela enorme demanda como

fornecimento de energia, contribuindo para os principais impactos ecológicos (Hung et al., 2020; Haider et al., 2021).

O Brasil possui aproximadamente 41.984 postos que fazem a revenda de combustíveis automotivos que são sujeitos a monitoramento, de acordo com a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2017). Estima-se a média de quatro tanques por postos, aproximadamente 168.000 tanques subterrâneos espalhados por todo o país, sem incluir os que estão na zona rural e que não foram contabilizados. Adota-se que instalações e sistemas de armazenamento dos derivados de petróleo são responsáveis por mais da metade dos casos de contaminação de solos e aquíferos no Brasil, em grande parte pela falta de monitoramento efetivo e a alta vida útil média dos contêineres subterrâneos de aproximadamente 25 anos (Brito et al., 2010 De acordo com a *International Tanker Owners Pollution Federation* (ITOFP, 2018), foram registrados mais de 10.000 acidentes envolvendo derramamentos de óleo. Somente entre 2010 e 2013, estima-se que 22.000 toneladas de óleo foram lançadas no meio marinho (Dong et al., 2014)

A remediação desses locais contaminados é quase sempre um procedimento caro e de acordo com os dados disponíveis, o processo utilizado é de descontaminação física (tecnologias mecânicas baseadas em barreiras e skimmers) e química (como dispersantes, solidificadores, agentes biorredutivos e até mesmo queima *in situ*), esses processos podem acarretar em outros impactos negativos ao meio ambiente, como geração de poluentes secundários (Naidu, 2015; Doshi et al., 2018). Nesse cenário, A fitorremediação representa solução ecológica para o tratamento de solos contaminados, desde que as espécies de plantas e estratégias apropriadas sejam escolhidas (Vocciante et al., 2019). Assim, a fitorremediação se refere ao uso de plantas para descontaminar os solos. As plantas absorvem substâncias tóxicas ou fornecem a base para o desenvolvimento de um microbioma da rizosfera (rizodegradação) (Shabir et al., 2016; Arslan et al., 2017). Com finalidade de selecionar espécies de plantas que possuem potencial de fitorremediação de hidrocarbonetos em diferentes condições climáticas de cultivo, estudos avaliando a interação das plantas ao poluente são de extrema importância ambiental (Rehn et al., 2020).

O potencial de fitorremediação da planta ao poluente vai depender da tolerância e capacidade de remoção dos hidrocarbonetos do solo. Em estudo com *Trifolium repens* cultivado em solo contaminado com óleo diesel a 12 g kg⁻¹ Barrutia et al. (2011) relataram

que os hidrocarbonetos causaram redução da biomassa e estresse oxidativo nas plantas. Conforme a fitotoxicidade do poluente é possível observar alterações fisiológicas e anatômicas, incluindo redução de clorofila, colapso das células mesófilas, danos aos aparatos fotossintéticos com redução da eficiência do transporte de elétrons e da taxa fotossintética (Somtrakoon e Chouychai, 2012). Essa ampla gama de respostas ao óleo torna a quantificação dos níveis de estresse na vegetação e potencial de fitorremediação um desafio. Em resposta a esse desafio e para fornecer novos dados, este estudo quer descobrir a relação do potencial de tolerância e possíveis biomarcadores da ação do óleo diesel em plantas de *Brachiaria ruziziensis*.

A espécie *Brachiaria ruziziensis* é uma forrageira originária da África, reconhecida por se desenvolver em condições de clima tropical e ter boa qualidade das forragens. Além disso, o gênero *Brachiaria* possui alto potencial em remediação de solos contaminados com metais, como alumínio, cádmio, zinco e chumbo (Arroyave, 2013; Santos, 2006). No entanto, não localizaram estudos que investigassem a capacidade de desenvolvimento e fitorremediação de *Brachiaria ruziziensis* em solos contaminados com óleo diesel, tornando impossível o uso como fitorremediadora, apesar de seu potencial extração/indicação de contaminantes com poluentes do solo (Santos, 2006). Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial fitorremediador de *Brachiaria ruziziensis* em solos contaminados com óleo diesel, e determinar possíveis alterações visuais, anatômicas, fisiológicas e remoção de óleo na planta.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Design experimental e condições de cultivo

As amostras de solo foram coletadas a profundidade de 10-20 cm em área de mata nativa do município de Rio Verde, Goiás, sem óleo diesel detectável. Posteriormente, o solo foi contaminado com óleo diesel, proveniente de posto de combustível, nas concentrações de 0 (controle), 5, 10, 15 e 20 g Kg⁻¹ com o intuito de simular o solo contaminado por hidrocarbonetos derivados de petróleo. Após a adição de óleo mineral os solos foram homogeneizados em um misturador mecânico por 10 minutos, colocados em vasos de 8 Kg, e permaneceram incubados por 14 dias, sendo irrigado a cada 2 dias para manter (~70%) da capacidade de campo. Durante esse período o solo foi revolvido diariamente para permitir que os componentes do óleo diesel atingissem o equilíbrio com as partículas do solo.

As sementes de *Brachiaria ruziziensis* foram obtidas no Grupo Associado de Pesquisa do Sudoeste Goiano – GAPES, originário da Sementes Globo Rural no município de Goiânia, Goiás, Brasil. A semeadura ocorreu em vasos de 8 kg (24 sementes por vaso) contendo Latossolo Vermelho previamente contaminado com o óleo diesel. O experimento foi conduzido em condições controladas, em casa de vegetação localizada no IF Goiano (latitude 17° 48' 16'' S, longitude 50° 54' 19'' W e altitude de 753 m).

Aproximadamente 5 dias após emergência, as plântulas foram selecionadas a partir da padronização da altura (~5 cm), permanecendo 12 plantas por vaso. O ensaio foi conduzido por 67 dias de exposição aos tratamentos. No final do período experimental foram realizadas as avaliações visuais, morfoanatômicas e fisiológicas.

Foi utilizado delineamento inteiramente ao acaso com 5 tratamentos (0 g/kg; 5 g kg⁻¹; 10 g kg⁻¹; 15 g kg⁻¹; 20 g kg⁻¹;) e 4 repetições, cada repetição composta de um vaso contendo 12 plantas (totalizando 48 plantas por tratamento).

3.2.2 Sintomas Foliares

Os efeitos ocasionados pelo óleo diesel na morfologia foliar foram avaliados através dos registros fotográficos de toda a superfície foliar de *Brachiaria ruziziensis*. As imagens foram registradas com câmera digital (Cyber-Shot HX100V, SONY, Japão), monitoradas ao longo de todo período experimental.

Para a confecção da prancha foi utilizado a folha que melhor representasse o efeito do óleo diesel.

3.2.3. Avaliação da fluorescência da clorofila a

As imagens da fluorescência da clorofila *a* foram obtidas com auxílio do fluorômetro modulado Imaging-PAM (versão MAXI-Standard, Heinz Walz, Effeltrich, Alemanha). Inicialmente foram determinadas, em folhas pré-adaptadas ao escuro por 30 minutos, a fluorescência inicial (F₀) e a fluorescência máxima (F_m), em que F₀ é o rendimento da fluorescência mínima, excitado por uma luz vermelha modulada de baixa intensidade (3 μmol m⁻² s⁻¹), e F_m é a fluorescência máxima obtida pela aplicação de um pulso por 0,8s de luz actínica saturante (>6000 μmol m⁻² s⁻¹). A partir dos quais foi possível calcular o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII) (FV/FM = (F_m-F₀)/F_m).

As variáveis da fase lenta de indução da fluorescência foram obtidas sequencialmente com a aplicação de uma iluminação actínica por 30s de e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (Fm'). O rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no FSII, $\Phi_{II}=(Fm'-F)/Fm'$; e os rendimentos quântico da dissipação de energia regulada, $\Phi_{NPQ} = (F/Fm') - (F/Fm)$ e da dissipação de energia não regulada, $\Phi_{NO} = F/Fm$, foram calculados de acordo com Genty et al. (1989) e Hendrickson et al. (2004). O Φ_{II} foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons, $ETR = \Phi_{II}.RFA.LeafABS.0,5$ (Bilger et al., 1995).

3.2.4 Análise com Dualex

O índice de clorofila (Chl), flavonoides (Flv), antocianinas e índice de balanço de nitrogênio (NBI) foram aferidos com auxílio de clorofilômetro (modelo Dualex FORCE-A, Orsay, France), a partir da média das leituras de 2 plantas por vaso em 4 vasos por tratamento, em folhas do terço médio de cada planta. O índice de Flv é deduzido a partir de propriedades de absorção UV de flavonoides. Esta abordagem está relacionada à técnica de fluorescência utilizando dois comprimentos de onda de excitação: no comprimento de onda de UV (375 nm), absorvido por flavonoides localizados, principalmente na epiderme e no comprimento de onda de referência que passa através da epiderme, sem ser absorvido antes de atingir a clorofila no mesofilo. A relação entre Chl/Flv permite a estimativa do índice de NBI (Abdallah, 2012).

3.2.5 Comprimento da parte aérea e massa seca da raiz e parte aérea

A determinação do comprimento da parte aérea foi realizada em todas as plantas de cada repetição com régua graduada ($\pm 0,1$ mm). Após as mensurações, as plantas foram separadas entre parte aérea e raízes, colocadas em sacos de papel kraft e posteriormente secas em estufa a 80°C por 24 horas (Nakagawa, 1994). Decorrido o período foi feita a pesagem e determinado a massa seca.

3.2.7 Caracterização morfoanatômica foliar

Para as análises morfoanatômicas foram coletadas amostras foliares de 1 cm² da região central da folha totalmente expandida de todas as repetições (n=4) de cada

tratamento (n=5) das plantas de *Brachiaria ruziziensis*. Inicialmente, as amostras foram fixadas em solução Karnovsky (1965), por 24 horas. Após o período, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato e desidratado em série etílica crescente, pré-infiltrado e infiltrado em historesina (Leica, Alemanha), conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram seccionadas transversalmente a 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen scientific, China) e os cortes corados com azul de toluidina – coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'Brien et al., 1964). As imagens obtidas foram fotografadas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão), acoplado com câmera DP-72 utilizando opção de campo claro. Foram realizadas observações morfoanatômicas da epiderme adaxial e abaxial, células buliformes, parênquima clorofiliano e mesófilo. As medidas de micromorfometria foram obtidas a partir das imagens capturadas usando o software ImageJ (Processamento e Análise de Imagem em Java, v. 1.47, EUA).

3.2.8 Determinação da degradação do óleo diesel

O solo foi coletado dos recipientes após 67 dias de cultivo de *Brachiaria ruziziensis* e misturado individualmente em misturador mecânico por 10 min, com posterior homogeneização do solo. Em seguida, a quantificação de óleo diesel no solo foi determinada a partir da determinação de TPH (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) por cromatografia a gás com detector de ionização por chama (FID) seguindo os métodos, da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), 3550C, 8015D e 3630C. A taxa de remoção foi determinada pela fórmula: $\text{Remoção (\%)} = [(\text{óleo diesel}) \text{ Tratamento} - (\text{óleo diesel concentração}) \text{ experimental}] / (\text{óleo diesel concentração}) \text{ Tratamento} * 100$ (Liu et al., 2013; Zhang et al., 2013).

3.2.9 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos as análises prévias de homogeneidade (teste de Levene) e normalidade (teste de Shapiro-Wilk) dos erros. Posteriormente, foi utilizado a análise de variância (ANOVA), seguida de comparação do teste de médias (teste de Scott Knott) utilizando o software Assistat versão 7.7 Beta.

3.3 Resultados

3.3.1 Biomassa Vegetal

O crescimento das plantas está diretamente relacionado a concentração de óleo diesel no solo, quanto maior a dose menor o comprimento da parte aérea, massa seca da parte aérea e da raiz (Tabela 1). Esse efeito é encontrado quando comparado o controle com os tratamentos de óleo diesel. É necessário destacar que no cultivo com 20 g kg⁻¹ de óleo diesel, o comprimento da parte aérea reduziu em 89% em relação ao controle. A massa seca da raiz e da parte aérea, decaíram em 91% e 86% respectivamente em comparação ao cultivo em solo sem óleo diesel (Tabela 1).

Tabela 1. Comprimento da parte aérea, massa seca parte aérea e da raiz de plantas de *Brachiaria ruzizienses* após 67 dias de cultivo em solo contaminado com óleo diesel nas concentrações de (0, 5, 10, 15 e 20 g kg⁻¹).

Óleo Diesel (g kg⁻¹)	Comprimento da Parte Aérea (g)	Massa seca Parte Aérea (g)	Massa seca Raiz (g)
0	31.96±0.32a	23.14±1.17a	66.94±9.80a
5	10.53±0.97 b	3.02±1.11 b	5.54±1.85 b
10	4.8±0.65 c	0.69±0.17 b	0.82±0.24 b
15	3.7±0.37 c	0.59±0.14 b	0.64±0.10 b
20	3.35±0.80 c	0.37±0.20 b	0.41±0.14 b
One-Way ANOVA			
F (t-test)	327.56**	180.73**	42.54**
p	<.0001	<.0001	<.0001

Média ± EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre significativas a 1% (**) de probabilidade pelo teste Scott Knott.

3.3.2 Fluorescência da clorofila *a*

Os efeitos do cultivo de braquiária em solos contaminados com óleo diesel, resultou em tendência de redução nas maiores dosagens em comparação pelo controle. Para as variáveis rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v / F_m), taxa de transportes de elétrons (ETR) e o rendimento quântico efetivo (ϕ_{II}) somente a dosagem de 5g kg⁻¹ ficou similar as plantas controle, as demais dosagens diminuíram drasticamente esses parâmetros. Não houve diferença significativas para o parâmetro rendimento quântico da dissipação não regulada de energia não fotoquímica no fotossistema II (ϕ_{NO}). Por fim, o rendimento quântico da dissipação regulada de energia não fotoquímica no fotossistema II (ϕ_{NPQ}) aumentou em 123% com 15 g kg⁻¹ em relação ao controle, sendo

que esse aumento também foi observado para as doses 10 e 20 g kg⁻¹. Somente a dose 5 g kg⁻¹ manteve similar as plantas controle.

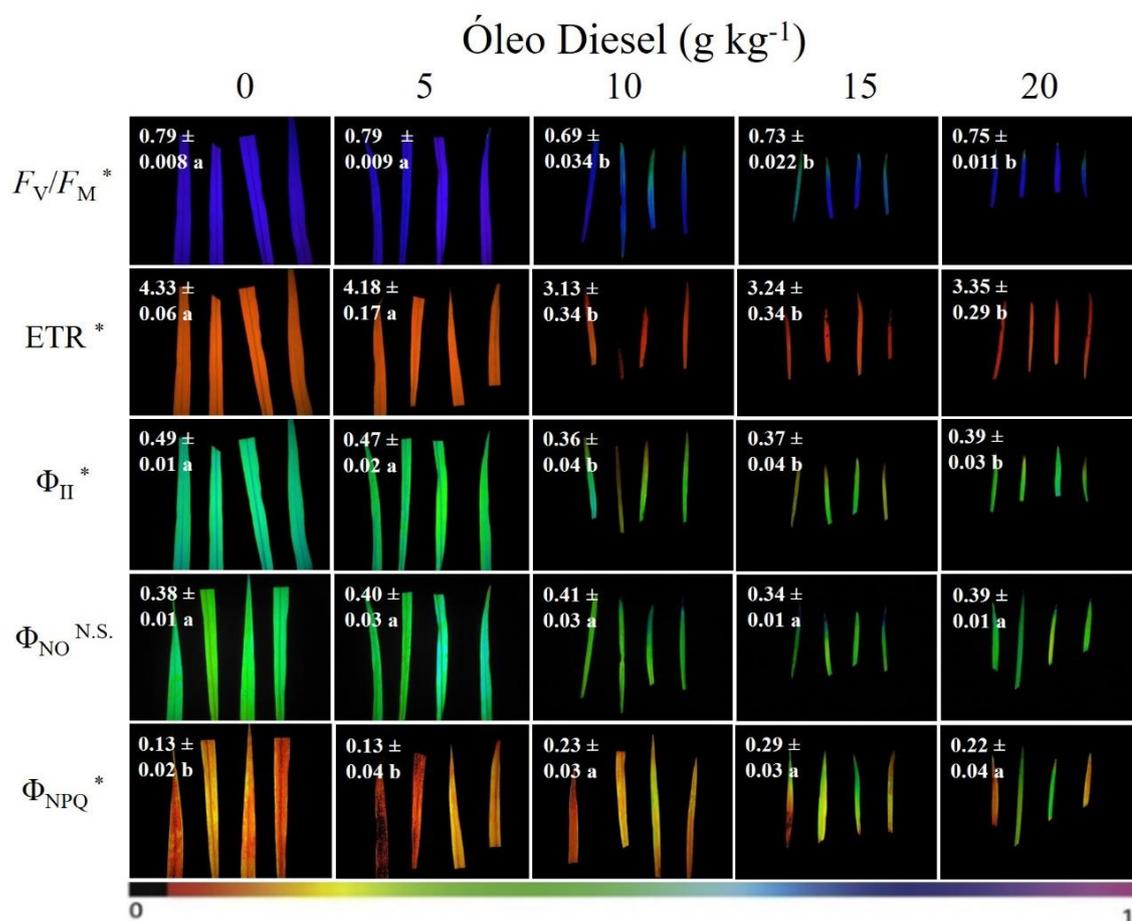


Fig. 1. Rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_V/F_M), taxa de transporte de elétrons ETR, rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{II}), rendimento quântico da dissipação não regulada de energia não fotoquímica no fotossistema II (Φ_{NO}), rendimento quântico da dissipação regulada de energia não fotoquímica no fotossistema II (Φ_{NPQ}) em folhas *Brachiaria ruzizienses* após 67 dias de cultivo em solo contaminado com óleo diesel nas concentrações de (0, 5, 10, 15 e 20 g kg⁻¹). Média ± EP (n = 4). Asteriscos indicam diferença a 5% (*) de probabilidade, entre tratamentos e controle, pelo teste de Scott Knott. (N.S.) não significativo. O código de cores falsas representado na parte inferior das imagens varia de 0,0 (preto) a 1,0 (rosa).

3.3.3 Análise com Dualex

O índice de nitrogênio (NBI) e flavonoides foram reduzidos conforme o aumento das dosagens de óleo diesel no solo (Tabela 2). O NBI obteve a redução em 88% na dose de 20 g kg⁻¹ quando comparado ao controle, enquanto a clorofila, sofreu decréscimo significativo de 69% no tratamento de 15 g kg⁻¹. As antocianinas apresentaram aumento de 19% em plantas cultivadas em 15 e 20 g kg⁻¹ de óleo diesel. Já os flavonoides, não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 2 Índice de nitrogênio (NBI), clorofilas, flavonoides e antocianinas em plantas de *Brachiaria ruzizienses* após 67 dias de cultivo em solo contaminado com óleo diesel nas concentrações de (0, 5, 10, 15 e 20 g kg⁻¹).

Óleo Diesel (g kg ⁻¹)	NBI	Clorofila	Flavonoides	Antocianinas
0	37.25±0.67a	30.55±1.35a	0.80±0.01	0.62±0.004 b
5	36.85±3.36a	26.60±2.07a	0.86±0.10	0.64±0.005 b
10	17.93±3.66 b	16.58±2.78 b	0.97±0.16	0.73±0.018a
15	8.48±0.68 b	9.20±0.87 c	0.96±0.06	0.74±0.009a
20	7.00±0.25 b	10.33±1.23 c	1.00±0.09	0.74±0.014a
One-Way ANOVA				
F (t-test)	17.85**	28.57**	0.77^{NS}	29.20**
p	<.0001	<.0001	0.5643	<.0001

Média ± EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre significativas à 1% (**) de probabilidade pelo teste Scott Knott. (NS) não significativo.

3.3.4 Caracterização anatômica da folha

A epiderme foliar de *Brachiaria ruzizienses* apresenta, na epiderme face adaxial células buliformes dispostas nas regiões intercostais. Estas células são maiores que as epidérmicas ordinárias e apresentam paredes delgadas, principalmente as anticlinais. Em ambas as superfícies da epiderme é possível visualizar complexos estomáticos, classificando como hipoestomática (Fig. 2). O mesofilo é composto de parênquima clorofiliano, com poucos espaços intercelulares, não havendo diferenciação entre os parênquimas clorofilianos paliçádico e lacunoso, constituindo assim, o mesofilo homogêneo. As plantas de *Brachiaria ruzizienses* cultivadas em solos contaminados com 15 e 20 g kg⁻¹ de óleo diesel apresentaram alterações na estrutura celular do mesofilo, promovendo a compactação do mesofilo e desestruturação das células buliformes e parênquima clorofiliano (Fig. 2 E-F).

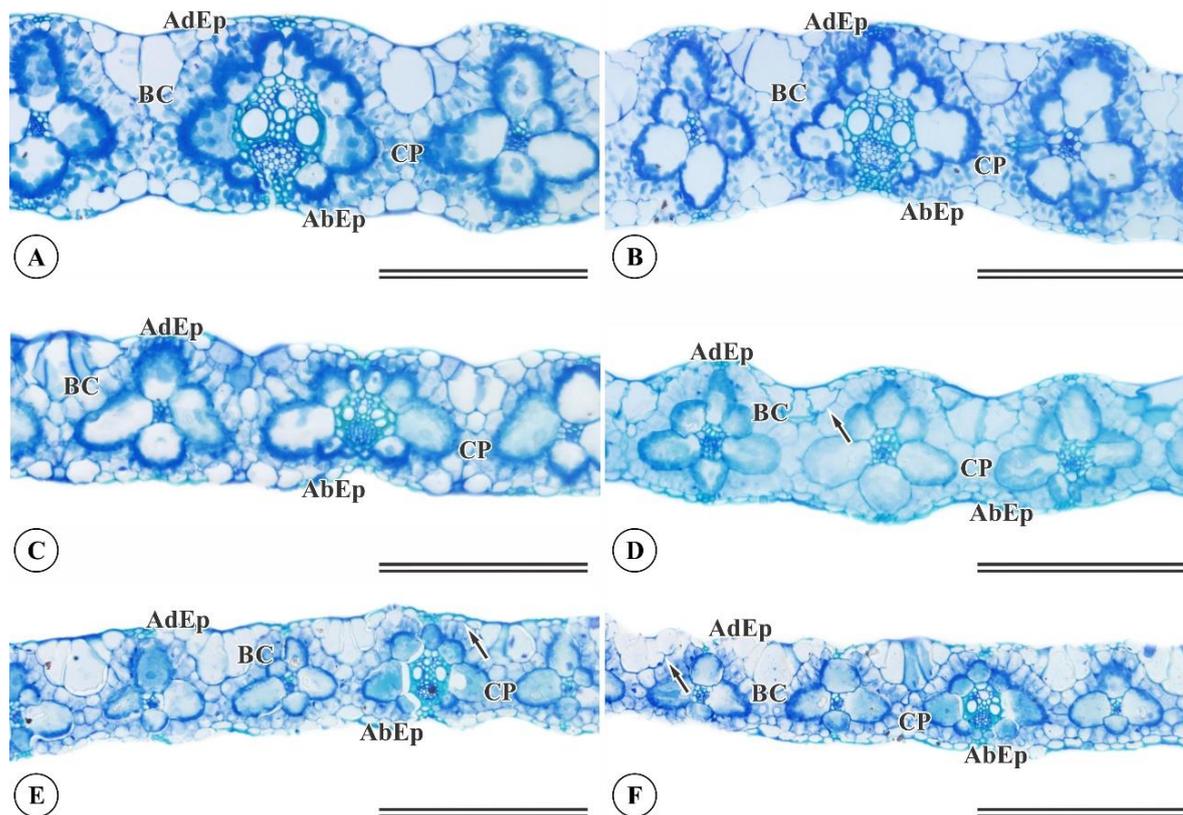


Fig. 2. Alterações anatômicas nas folhas de *Brachiaria ruzizienses* após 67 dias de cultivo em solo contaminado com óleo diesel nas concentrações de (0, 5, 10, 15 e 20 g kg⁻¹). (A) controle, (B) 5 g kg⁻¹, (C) 10 g kg⁻¹, (D) 15 g kg⁻¹ e (E-F) 20 g kg⁻¹. (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (CP) parênquima clorofiliano. (BC) células buliformes. Setas pretas indicam colapso das células. Barra de escala 200 μm.

Os tecidos vegetais de *B. ruzizienses* não apresentaram divergências significativas conforme indicado na tabela 03 para a epiderme adaxial, adaxial e mesofilo. Já as células buliformes, tenderam a redução de 41% do controle comparado a maior dosagem, 20 g kg⁻¹ de óleo diesel.

Tabela 3 Micromorfometria das folhas de *Brachiaria ruzizienses* após 67 dias de cultivo em solo contaminado com óleo diesel nas concentrações de (0, 5, 10, 15 e 20 g kg⁻¹). Epiderme Adaxial (EpAd), Epiderme Abaxial (EpAb), Células buliformes (BC) e Mesofilo (Me).

Óleo Diesel (g kg ⁻¹)	EpAd (μm)	EpAb (μm)	BC (μm)	Me (μm)
0	6.62 ± 1.87a	6.90 ± 1.79a	56.73 ± 5.40a	135.50 ± 34.12a
5	8.59 ± 0.41a	8.72 ± 0.44a	51.24 ± 5.01a	169.56 ± 10.77a
10	7.44 ± 0.58a	7.93 ± 0.93a	36.98 ± 1.47 b	142.09 ± 3.92a

15	8.35± 0.61a	7.42± 0.65a	42.68± 2.58 b	132.94 ±7.36a
20	6.73± 0.41a	6.96± 0.20a	33.04±4.05 b	104.57 ±8.45a
One-Way ANOVA				
F (t-test)	0.9460^{NS}	0.6468^{NS}	6.9428^{**}	1.9679^{NS}
p	0.458	0.6356	0.0011	0.1384

Média ± EP (n = 5). Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre significativas a 5% (*) e 1% (**) de probabilidade pelo teste Scott Knott. (NS) não significativo.

3.3.5 Remoção do óleo

A fitorremediação de *B. ruzizienses* ao óleo diesel reduziu conforme o aumento das doses. A porcentagem de remoção dos TPHs variou entre 15 e 24%, com melhor desempenho de remoção na menor dosagem 5 g kg⁻¹.

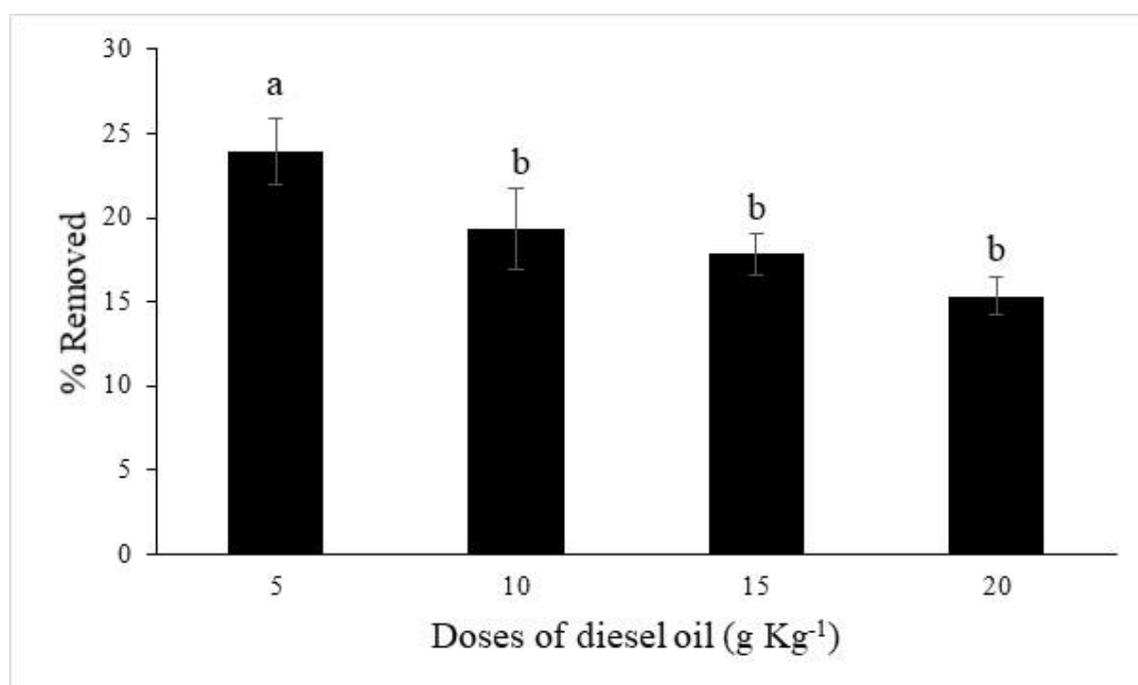


Fig. 3. Porcentagem de remoção de óleo diesel dos solos após 67 dias de cultivo de *Brachiaria ruzizienses*. Barras representam a porcentagem de erro, Média ± EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre significativas a 5% (*) de probabilidade pelo teste Scott Knott. CV% = 18.42.

3.4 Discussão

Os processos de fitorremediação empregados, atualmente pelo mundo, visam diminuir problemas no solo, como a erosão e desertificação e também a transferência de elementos tóxicos para os reservatórios de água (Jaskulak et al, 2020). Esse procedimento

já se provou eficaz e barato para restabelecer solos contaminados com derivados de petróleo (Lopez-Echartea, et al. 2020). Nesse estudo a espécie *Brachiaria ruzizienses* demonstrou melhor potencial como fitorremediadora em solos contaminados até 5 g k⁻¹ de óleo diesel. No entanto, esse percentual de remoção é relativamente baixo se comparado com outras espécies de plantas. Em solos contaminados com diferentes doses de óleo diesel (0 a 640 g kg⁻¹), Lin e Mendelssohn (2009) observaram que *Juncus roemerianus* tem capacidade de remoção de 84% a 100%.

A baixa capacidade de tolerância aos hidrocarbonetos comprometeu diretamente o crescimento e desenvolvimento de *B. ruzizienses*, como observado em todas as doses testadas (Tabela 1). Os hidrocarbonetos são inibidores do crescimento vegetal, vários componentes presentes no óleo diesel, tem capacidade de reduzir a absorção de água e minerais do solo para as plantas (Lin et al., 2008; Afzal et al., 2013). A redução da biomassa vegetal é um efeito comum do diesel e é mais pronunciado em níveis elevados 15 a 25 g kg⁻¹ (Xi et al., 2018). Outro fator importante na fitorremediação é o desenvolvimento das plantas, Huang et al (2005) relataram que plantas com redução no crescimento apresentam produção de biomassa insuficiente para remediação. Em *B. ruzizienses*, observou-se redução da biomassa vegetal em comparação ao controle.

A fluorescência da clorofila *a* é um importante indicador das reações primárias da fotossíntese das plantas sob diferentes estresses ambientais (Osório et al., 2014; De Lima et al., 2017; Dong et al., 2019;). A redução de Fv/Fm, Φ_{II} e ETR em *B. ruzizienses* sugere inibição no transporte de elétrons do PSII. Esta inibição da transferência de elétrons pode ser do acceptor primário da plastoquinona (QA) para o acceptor secundário plastoquinona (QB) no lado aceitador de PSII (Shu et al., 2013). Se a transferência de elétrons do centro de reação para o reservatório de quinonas for bloqueada, a área sobre a curva de indução de fluorescência entre Fo e Fm será drasticamente reduzida (Mehta et al., 2010). Além disso, *B. ruzizienses* demonstrou aumento de Φ_{NPQ} nas doses de 10, 15 e 20 g kg⁻¹ de óleo diesel, esse aumento é indicativo de alta capacidade fotoprotetora da planta para se proteger contra danos por excesso de energia. Dessa forma, a planta atua sob ação fitotóxica dos hidrocarbonetos e ativa mecanismos fotoprotetores do PSII contra sua superexcitação, em compensação pode causar danos na perda de integridade das membranas dos tilacoides. O índice de clorofila na folha é frequentemente utilizado como indicador confiável do estado fisiológico da planta (Gitelson et al., 2003; Hamann et al., 2018). A degradação da clorofila e a redução no índice de nitrogênio nas folhas de *B.*

ruziziensis foi evidente nas plantas cultivadas em solo contaminados com óleo diesel. O baixo conteúdo de clorofila em plantas está relacionado com a baixa disponibilidade de nitrogênio (N) decorrente do estresse (Goffart et al., 2013). A hipótese do trabalho é que a ação fitotóxica do óleo diesel na planta, impede a absorção de água e nutrientes, e conseqüentemente reduz o teor de clorofila e de nitrogênio.

Em respostas a ação fitotóxica do óleo diesel, acredita-se que *B. ruzizienses* desenvolveu sistemas de defesa antioxidante. Dentre eles, os flavonoides e as antocianinas, que são metabólitos secundários capazes de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reduzir os níveis de ROS, uma vez formados (Agati et al., 2012; Agnello et al., 2016). As respostas do presente estudo sugerem que a espécie de estudo apresentou síntese de flavonoides, indicando que essas moléculas têm capacidade de auxiliar na neutralização dos efeitos oxidativos, apesar de que provavelmente muitos outros processos antioxidantes também pudessem ter contribuído.

Em resposta ao solo contaminado de diesel, *B. ruzizienses* teve desestruturação em suas células buliformes, responsáveis pela função motora de enrolamento e desenrolamento das folhas (Apezzato da Glória et al., 2006). Essas células tendem a se expandir visando a redução da perda de água por transpiração (Melo et al., 2007), sendo que curiosamente ocorreu a situação reversa com *B. ruzizienses* pois em 10, 15 e 20 g kg⁻¹ de diesel no solo, houve diminuição de tamanho quando comparado ao controle.

O tecido foliar pode apresentar desarranjo celular e estrutural dependendo da concentração disponível do contaminante para a planta. Asemoloye, et al. (2017) utilizou *Megathyrus maximus* Jacq em solos contaminados com hidrocarbonetos e em resposta, a espécie apresentou variações nos tecidos epidérmicos e alterações nos tamanhos das células buliformes e o mesmo ocorreu com *B. ruzizienses*. A literatura informa que plantas em contato com metais pesados, hidrocarbonetos e outros contaminantes do solo, podem apresentar a diminuição no mesofilo e colapso celular (Potter et al, 2009, Zhao et al, 2000). Essas alterações celulares levam a inibição fotossintética, como relata Rehn et al. (2019). Desse modo, relacionando a redução das células de *B. ruzizienses* e identificando a sensibilidade da espécie com o estresse proposto.

3.5 Conclusão

A forrageira, *B. ruzizienses* apresentou baixo potencial de fitorremediação de solos contaminados com óleo diesel, com o máximo 24% de remoção. No entanto, a

espécie demonstrou alto potencial de bioindicação ao poluente, com sintomas visuais, como o aparecimento clorose e necrose, até alterações da fluorescência da clorofila *a* e, que podem ser analisadas de forma não destrutiva, permitindo a utilização da espécie em programas de biomonitoramento. *B.ruzizienses* foi capaz de ativar mecanismos antioxidantes em resposta ao óleo diesel, alterando seus processos fisiológicos, bem como acúmulo de flavonoides e antocianinas que contribuem para a integridade dos tecidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Federal Goiano de Educação, Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro.

3.6 Referência

Affholder, M. C., Laffont-Schwob, I., Coulomb, B., Rabier, J., Borla, A., Boudenne, J. L., Demelas, C., & Prudent, P. (2020). Implication of phytometabolites on metal tolerance of the pseudo-metallophyte -*Rosmarinus officinalis*- in a Mediterranean brownfield. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126159>

Afzal, M., Yousaf, S., Reichenauer, T. G., & Sessitsch, A. (2013). Ecology of Alkane-Degrading Bacteria and Their Interaction with the Plant. In *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch92>

Agati, G., Foschi, L., Grossi, N., Guglielminetti, L., Cerovic, Z. G., & Volterrani, M. (2013). Fluorescence-based versus reflectance proximal sensing of nitrogen content in *Paspalum vaginatum* and *Zoysia matrella* turfgrasses. *European Journal of Agronomy*. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2012.10.011>

Agnello, A.C., Bagard, M., Hullebusch, E.D.V., Esposito, G., Huguenot, D., 2016. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the environmental*, 563, 693-703. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061>.

Al Sbani, N.H., Abdullah, S.R.S., Idris, M., Hasan, H.A., Halmi, M.I.E., Jehawi, O.H., Ismail, N.I., 2021. PAH-degrading rhizobacteria of *Lepironia articulata* for

phytoremediation enhancement. *Journal of Water Process Engineering*. 39, 101688. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101688>.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, Beatriz; CARMELLO-GUERREIRO, Sandra Maria. *Anatomia vegetal*. Ed. UFV, 2006.

Arroyave, C., Tolrà, R., Thuy, T., Barceló, J., & Poschenrieder, C. (2013). Differential aluminum resistance in *Brachiaria* species. *Environmental and Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.01.001>

Asemoloye, M. D., Jonathan, S. G., Jayeola, A. A., & Ahmad, R. (2017). Mediatonal influence of spent mushroom compost on phytoremediation of black-oil hydrocarbon polluted soil and response of *Megathyrsus maximus* Jacq. *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.090>

Ben Abdallah, F., & Goffart, J. P. (2012). Potential indicators based on leaf flavonoids content for the evaluation of potato crop nitrogen status. 11th International Conference on Precision Agriculture.

Bilger, W., Schreiber, U., & Bock, M. (1995). Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia*. <https://doi.org/10.1007/BF00341354>

Bourotte, C., Bertolo, R., Almodovar, M., & Hirata, R. (2009). Natural occurrence of hexavalent chromium in a sedimentary aquifer in Urânia, State of São Paulo, Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652009000200009>

Brito, G. C. B., Souza, D. B. S., Vasconcelos, F. C. W., & Braga, L. C. (2010). The importance of microorganism bioprospection in areas contaminated by products derived from oil. *Revista em Agronegocios e Meio Ambiente*, 3(3), 291-310.

Chalker-Scott, L. (1999). Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology*. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(1999\)070<0001:esoaip>2.3.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(1999)070<0001:esoaip>2.3.co;2)

Dong, T., Wang, F., Xu, G., 2014. Theoretical and experimental study on the oil sorption behavior of silk-cotton assemblies. *Ind. Crop. Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.020>.

Dong, Z., Men, Y., Li, Z., Zou, Q., & Ji, J. (2019). Chlorophyll fluorescence imaging as a tool for analyzing the effects of chilling injury on tomato seedlings. *Scientia Horticulturae*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.019>

Doshi, B., Repo, E., Heiskanen, J.P., Sirvico, J.A., Sillanpaa, M., 2018a. Sodium salt of oleoyl carboxymethyl chitosan: a sustainable adsorbent in the oil spill treatment. *J. Clean. Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.163>.

Duan, L., Naidu, R., Thavamani, P., Meaklim, J., & Megharaj, M. (2015). Managing long-term polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils: a risk-based approach. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2270-0>

ESTATÍSTICO, ANP Anuário. Quantidade de postos revendedores de combustíveis automotivos, por bandeira, segundo Grandes Regiões e Unidades da Federação—2017.

Gebara, S. S., Ré-Poppi, N., Do Nascimento, A. L. C. S., & Raposo, J. L. (2013). Métodos para análises de hpa e btex em águas subterrâneas de postos de revenda de combustíveis: Um estudo de caso em Campo Grande, MS, Brasil. *Quimica Nova*. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000700018>

Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)

Gitelson, A.A., Gritz, Y., Merzlyak, M.N., 2003. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *J. Plant Physiol.* 160 (3), 271–282. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00887>.

Goffart, J.P., Abras, M., Ben Abdallah, F., 2013. Gestion de la fertilisation azotée des cultures de plein champ. Perspectives d'amélioration de l'efficience d'utilisation de l'azote sur base du suivi du statut azotée de la biomasse aérienne. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 17, 221–230. <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=9703&format=print>.

Hamann, F.A., Czaja, S., Hunsche, M., Noga, G., Fiebig, A., 2018. Monitoring physiological and biochemical responses of two apple cultivars to water supply regimes with non-destructive fluorescence sensors. *Scientia Horticulturae.* 242, 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.008>.

Hendrickson, L., Furbank, R. T., & Chow, W. S. (2004). A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research.* <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000040446.87305.f4>

<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.028>.

Huang, X. D., El-Alawi, Y., Gurska, J., Glick, B. R., & Greenberg, B. M. (2005). A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal.* <https://doi.org/10.1016/j.microc.2005.01.009>

ITOFP, 2018. Oil Tanker Spill Statistics 2018. The International Tanker Owners Pollution Federation Limited.

Jagtap, S. S., Woo, S. M., Kim, T. S., Dhiman, S. S., Kim, D., & Lee, J. K. (2014). Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass. *Fuel.* <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.017>

Jaskulak, M., Grobelak, A., & Vandenbulcke, F. (2020). Modelling assisted phytoremediation of soils contaminated with heavy metals – Main opportunities, limitations, decision making and future prospects. In *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126196>

LDD Advanced Technologies. Cost estimation for surveying and treating contaminated soil country-wide. Disponível em: <http://lddtech.com/en> (2014., Accessed 15th Apr 2017 (report in Hebrew).

Lima, D. A. de, Müller, C., Costa, A. C., Batista, P. F., Dalvi, V. C., & Domingos, M. (2017). Morphoanatomical and physiological changes in *Bauhinia variegata* L. as indicators of herbicide diuron action. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.038>

Lin, Q., & Mendelssohn, I. A. (2009). Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands. *Ecological Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.09.010>

Lin, X., Li, X., Li, P., Li, F., Zhang, L., & Zhou, Q. (2008). Evaluation of plant-microorganism synergy for the remediation of diesel fuel contaminated soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9438-1>

Liu, S.L., Cao, Z.H., Liu, H.E., 2013a. Effect of ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) growth on degradation of phenanthrene and enzyme activity in soil. *J. Food Agric. Environ.* 11 (1), 1006–1011.

Lopez-Echartea, E., Strejcek, M., Mukherjee, S., Uhlik, O., & Yrjälä, K. (2020). Bacterial succession in oil-contaminated soil under phytoremediation with poplars. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125242>

Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S., Bharti, S., 2010. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 16-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.10.006>.

Melo, H. C. de, Castro, E. M. de, Soares, Â. M., Melo, L. A. de, & Alves, J. D. (2007). Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. *Hoehnea*. <https://doi.org/10.1590/s2236-89062007000200003>

Moradi, B., Kissen, R., Maivan, H.Z., Hashtroudi, M.S., Sorahinobar, M., Sparstad, T., Bones, A.M., 2020. Assessment of oxidative stress response genes in *Avicennia marina* exposed to oil contamination – polyphenol oxidase (PPOA) as a biomarker. *Biotechnol. Rep.* 28, e00565 <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00565>.

Nakagawa, J. (1994). Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, 1, 49-85.

O'Brien, T. P., Feder, N., & McCully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>

Osório, J., Osório, M. L., Correia, P. J., de Varennes, A., & Pestana, M. (2014). Chlorophyll fluorescence imaging as a tool to understand the impact of iron deficiency and resupply on photosynthetic performance of strawberry plants. *Scientia Horticulturae*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.042>

Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., & Jansen, M. A. K. (2009). Different stresses, similar morphogenic responses: Integrating a plethora of pathways. In *Plant, Cell and Environment*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01908.x>

Rehn, L. S., Rodrigues, A. A., Vasconcelos-Filho, S. C., Rodrigues, D. A., de Freitas Moura, L. M., Costa, A. C., Carlos, L., de Fátima Sales, J., Zuchi, J., Angelini, L. P., de Lima Silva, F. H., & Müller, C. (2020). *Ricinus communis* as a phytoremediator of soil mineral oil: morphoanatomical and physiological traits. *Ecotoxicology*, 29(2). <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02147-6>

Rodrigues, A. C. D., Dos Santos, A. M., Dos Santos, F. S., Pereira, A. C. C., & Sobrinho, N. M. B. A. (2016). Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. *Revista Virtual de Química*.

Santos, F. S., Hernández-Allica, J., Becerril, J. M., Amaral-Sobrinho, N., Mazur, N., & Garbisu, C. (2006). Chelate-induced phytoextraction of metal polluted soils with *Brachiaria decumbens*. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.012>

Shu, S., Yuan, L.Y., Guo, S.R., Sun, J., Yuan, Y.H., 2013. Effects of exogenous spermine on chlorophyll fluorescence, antioxidant system and ultrastructure of chloroplasts in *Cucumis sativus* L. under salt stress. *Plant physiology and biochemistry*. 63, 209-216. .

Singh, A., Kuhad, R. C., & Ward, O. P. (2009). *Biological Remediation of Soil: An Overview of Global Market and Available Technologies*. https://doi.org/10.1007/978-3-540-89621-0_1

Somtrakoon, K., Chouychai, W., 2012. Phytotoxicity of single and combined polycyclic aromatic hydrocarbons toward economic crops. *Russ. J. Plant Physiol.* 60, 139–148. <https://doi.org/10.1134/s1021443712060155>.

US EPA. (2007). Method 8015C Nonhalogenated organics by gas chromatography. SW-846 OnLine Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods.

USEPA. (2007). Method 3550C: Ultrasonic extraction. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods.

Vocciante, M., Caretta, A., Bua, L., Bagatin, R., Franchi, E., Petruzzelli, G., & Ferro, S. (2019). Enhancements in phytoremediation technology: Environmental assessment including different options of biomass disposal and comparison with a consolidated approach. *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.104>

Wei, T., Simko, V., Levy, M., Xie, Y., Jin, Y., & Zemla, J. (2017). Visualization of a Correlation Matrix. *Statistician*.

Xi, Y., Song, Y., Johnson, D.M., Li, M., Liu, H., Huang, Y., 2018. Se enhanced phytoremediation of diesel in soil by *Trifolium repens*. *Ecotoxicology and environmental safety* 154, 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.061>.

Zhang X, Wang Z, Liu X, Hu X, Liang X, Hu Y (2013) Degradation of diesel pollutants in Huangpu-Yangtze River estuary wetland using plant-microbe systems. *Int Biodeter Biodegr* 76:71–75. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.017>.

Zhao, F. J., Lombi, E., Breedon, T., & McGrath, S. P. (2000). Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell and Environment*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00569.x>