

**BIOMASSA, ATIVIDADE MICROBIANA
HETEROTRÓFICA E FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLO
COM POLUENTES DERIVADOS DE
PETRÓLEO**

ALESSANDRA MONTEIRO DE PAULA

2005

ALESSANDRA MONTEIRO DE PAULA

**BIOMASSA, ATIVIDADE MICROBIANA HETEROTRÓFICA E
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLO COM
POLUENTES DERIVADOS DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Paula, Alessandra Monteiro de

Biomassa, atividade microbiana heterotrófica e fungos micorrizicos
arbusculares em solo com poluentes derivados de petróleo / Alessandra Monteiro
de Paula. -- Lavras: UFLA, 2005.

94 p. : il.

Orientador: José Oswaldo Siqueira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Micorriza. 2. Contaminação. 3. Solo. 4. Petróleo. 5. Biomassa. 6.
Microorganismo. 7. Espécie Vegetal. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD- 631.46

ALESSANDRA MONTEIRO DE PAULA

**BIOMASSA, ATIVIDADE MICROBIANA HETEROTRÓFICA E
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLO COM
POLUENTES DERIVADOS DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre".

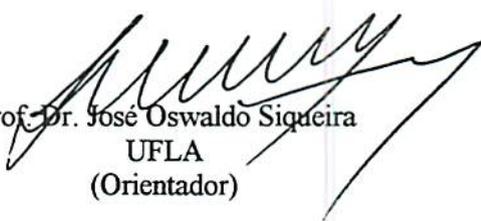
APROVADA em 04 de fevereiro de 2005.

Prof. Dr. Romildo da Silva

UFLA

Prof. Dr. Arnaldo Collozi-Filho

IAPAR-PR



Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Ao Divino Menino Jesus, Nossa Senhora e todos seus
Anjos e Santos,

OFEREÇO.

À minha família, em especial,
Vera Lúcia Monteiro de Paula e Antônio Gonzaga de Paula,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, bondoso e misericordioso, que permitiu a realização de mais essa etapa de minha vida.

À meus pais e minha querida avó, meu irmão e meu sobrinho, que me ensinaram que com perseverança e fé é possível conquistar o objetivo desejado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência do Solo pela oportunidade e apoio na realização desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor José Oswaldo Siqueira, pela confiança, disponibilidade e orientação durante o curso e na realização deste trabalho.

Aos professores Arnaldo Colozzi-Filho e Romildo da Silva, pela disponibilidade, colaboração e sugestões apresentadas, que muito enriqueceram o trabalho.

Aos orientadores de iniciação científica, em especial, José Ricardo Peixoto (UnB/FAV), pela amizade, incentivo, colaboração e estímulo para ingressar na carreira acadêmica.

Aos laboratoristas do Laboratório de Microbiologia do Solo, Manoel e Marlene, pela constante ajuda e amizade durante o trabalho realizado.

Aos colegas do Departamento de Ciência do Solo e do Laboratório de Microbiologia do Solo, pela convivência, amizade e cooperação durante o curso.

Aos amigos de agora e sempre, de perto e de longe: Kelma Christina, Kbça, Stefânia, Léa, Mônica, Débora, Bruno, Idelma, Emanuelle, Regilene, Daniela Miranda, Welson, Bruno Dias, Paulo e família, Lutércia, Walfrido, Lucas e Gislene (Gigi), pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos, amo vocês.

Ao amigo para a vida inteira, Sandro M.C. Hurtado, presente a todo o momento.

Ao colega Cláudio Soares, pela participação fundamental na realização deste trabalho, paciência e ajuda constante nos momentos decisivos da dissertação.

A todos que ajudaram, de mil formas e maneiras, meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

Página

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Geração e tratamento de resíduos da indústria de petróleo e derivados.....	3
2.2 “Landfarming”	8
2.3 Condições biológicas de solos contaminados com poluentes orgânicos.....	10
2.4 Fitorremediação de poluentes orgânicos.....	13
2.5 FMAs e poluentes orgânicos no solo.....	16
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO 2.....	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	29
1 INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 Características da área e do solo em “landfarming”	33
2.1.1 Análises químicas e biológicas do solo.....	34
2.2 Determinação da biomassa microbiana e indicadores de atividade heterotrófica.....	35
2.3 Ocorrência de FMAs	37

2.4 Efeito de FMAs no crescimento de plantas.....	38
2.5 Análise estatística.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 Determinação da biomassa microbiana e indicadores de atividade heterotrófica.....	41
3.2 Ocorrência de FMAs	45
3.3 Efeito de FMAs no crescimento de plantas.....	48
4 CONCLUSÕES.....	60
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CAPÍTULO 3.....	66
RESUMO.....	66
ABSTRACT.....	67
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAL E MÉTODOS	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4 CONCLUSÕES.....	80
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	84

RESUMO GERAL

PAULA, Alessandra Monteiro de. Biomassa, atividade microbiana heterotrófica e fungos micorrízicos arbusculares em solo com poluentes derivados de petróleo. 2005. 94 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)*

A presença de poluentes orgânicos no solo é um problema crescente e relacionado com o desenvolvimento industrial e tecnológico da sociedade. O tratamento de resíduos petroquímicos pela técnica de "landfarming" já é bastante utilizado, mas existe a tendência de ser substituído por técnicas mais eficientes para o destino mais apropriado desses resíduos. A aplicação desses resíduos no solo pode afetar a comunidade microbiana e os processos que esta realiza no solo, os quais são responsáveis pela dissipação dos componentes poluentes desses resíduos. A contribuição de fungos micorrízicos arbusculares tem sido objeto de grande interesse atual, por favorecerem o crescimento das plantas em condições de estresse e possivelmente a melhor capacidade remediadora destas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a biomassa, sua atividade microbiana heterotrófica em um solo de área de "landfarming" de resíduo petroquímico, verificando também a ocorrência e o efeito da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no crescimento de plantas. Também se avaliou o efeito de dois poluentes orgânicos: creosoto e antraceno, no crescimento e na colonização micorrízica de *Bracchiaria brizantha* cv. Marandú e *Pueraria phaseoloides* Benth.. Foram encontrados elevadas densidade de microrganismos e valores de biomassa e atividade microbiana semelhantes aos encontrados em solos submetidos a esse tipo de tratamento em várias partes do mundo. Entretanto, parâmetros bioquímicos indicam a existência de algum fator inibitório que poderá comprometer a eficiência do tratamento. Constatou-se também a ocorrência de FMAs, capazes de garantir elevada colonização em plantas espontâneas e introduzidas, apesar do constante revolvimento mecânico e reduzida vegetação no solo da área de "landfarming". A inoculação da alfafa, sorgo, kudzu, braquiária e mucuna-preta com FMAs aumentou o crescimento das plantas estudadas, excetuando-se o capim-elefante e todas as plantas apresentaram elevado grau de colonização, mesmo as não inoculadas. Esses resultados indicam a existência de populações microbianas tolerantes aos componentes tóxicos dos resíduos petroquímicos. Em ensaios com solo não poluído, verificou-se que a aplicação de creosoto reduziu o crescimento da braquiária e não teve efeito no kudzu, em que a colonização foi fortemente reduzida pelo composto que causou completa inibição em concentrações superiores a 2 g kg⁻¹ solo de creosoto. O kudzu mostrou-se insensível à

* Comitê de Orientação: José Oswaldo Siqueira – UFLA (Orientador).

contaminação do solo com esses poluentes, enquanto a braquiária foi estimulada na presença de baixas concentrações de antraceno e teve seu crescimento limitado com doses crescentes de creosoto. O kudzu apresenta potencial para estudos de revegetação de áreas impactadas com estes poluentes. Esses resultados indicam que a comunidade microbiana heterotrófica do solo e os FMAs são capazes de adaptarem-se a condições de estresse induzidas pela presença de compostos químicos. Como consequência, o solo de área de "landfarming" de resíduos petroquímicos mantém uma comunidade de heterotróficos e propágulos de FMAs ativos. FMAs introduzidos foram também capazes de favorecer a colonização radicular e o crescimento de plantas neste solo. FMAs indígenas e introduzidos podem ser componentes biológicos importantes em solos de área de "landfarming" de resíduos petroquímicos.

GENERAL ABSTRACT

Paula, Alessandra Monteiro de. **Biomass, microbial heterotrophic activity and arbuscular mycorrhizal fungi in a landfarming soil used for treating petrochemical wastes.** 2005. Cap. 1. 29 p. Dissertation (Master degree in Soils and Plant Nutrition)*

The presence of organic pollutants in soil is an expanding problem related to industrial and technological development of the society. The petrochemical waste treatment by landfarming's technology is already widely used, but there is a possibility of being a more efficient technology for the appropriate disposal of these residues. Successive application of these residues may affect microbial communities and the processes they accomplish in the soil. The contribution of the arbuscular mycorrhizal fungi has been being object of great current interest, because they enhance plant growth under stressed conditions and may improve their remediation capacity. In the present study microbial biomass and its heterotrophic activity in soil sample collected in a landfarming area of petrochemical waste treatment and the occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and their effect on plant growth in such soil were evaluated. It was also evaluated the effect of two organic pollutants: creosote and anthracene, on growth and on mycorrhizal colonization of *Brachiaria brizantha* and *Pueraria phaseoloides*. Microbial biomass and therefore abundant density and active were at similar range of what is found in not polluted soils, and therefore indicating that abundant and active microbial community exist in landfarming soil. However, some biochemical parameters indicate the existence of some inhibitory factor for biochemical activities and this may compromise decomposition of residual wastes deposited in the soil. It was also found viable propagules of AMF and high mycorrhizal colonization rate in spontaneous and introduced plants, in spite of the constant mechanical soil revolviment and reduced vegetation in the Landfarming soil. The AMFs inoculation increases the plant growth in these soil, except for capim-elefante. All plants present high colonization, even the inoculated ones, confirming the high natural infectivity of this soil. These results indicate the existence of adaptade microbial populations to toxic components of the petrochemical wastes. Creosote reduced the growth of *B. brizantha* but had no effect on *P. phaseoloides*. AMF colonization was strongly reduced by this pollutant in *P. phaseoloides* and no colonization was found in *B. brizantha*. A complete inhibition of root colonization in *P. phaseoloides* was found at concentrations of 2 g kg⁻¹ soil. *B. brizantha* exhibited a slight benefit by anthracene, but showed inhibition even by low creosote concentration. Because of its insensitivity to these pollutants, *P. phaseoloides* presents potential for revegetation studies on areas impacted by these pollutants. Those data indicate that soil microbial community is able to adapt itself to

chemical induced-stressed in the soil. As a consequence, petrochemical waste landfarming soil maintain an abundant and active community of heterotrophs and propagules of AMF. Introduced AMFs were also capable of enhancing root colonization and plant growth in this soil. Indigeneous of introduced AMF may be important biological components in landfarming soils.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do solo é um problema crescente que acompanha o desenvolvimento da sociedade, a qual tem como principal fonte para a geração de energia os combustíveis fósseis, sendo a produção de petróleo uma questão chave na economia mundial. Esse processo de desenvolvimento está diretamente ligado com a geração de resíduos potencialmente nocivos ao meio ambiente e ao equilíbrio dos ecossistemas.

Dentre os diversos poluentes que atingem o solo, os de matriz orgânica destacam-se por apresentarem relativa facilidade de tratamento e remediação, contando atualmente com técnicas físicas, químicas e biológicas. O "landfarming" é uma técnica biológica de biorremediação empregada com relativo sucesso na disposição de resíduos, como hidrocarbonetos de petróleo. Esta tem como princípio a biodegradação dos poluentes pela microbiota do solo que pode ser estimulada com a adição de nutrientes e adequada manutenção de umidade do solo.

Entretanto, esta técnica não é eficiente na remoção de certos compostos recalcitrantes, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). A acumulação de compostos recalcitrantes e produtos da decomposição de petróleo e derivados, como metais, pode impactar negativamente a microbiota e os processos do solo, e reduzir o potencial biorremediador do solo. Estes compostos estão presentes em resíduos derivados de petróleo de coque, como o creosoto, utilizado no tratamento de madeira, tornando-se necessário estudos para aprimorar estas ou desenvolver novas técnicas de remediação.

Estratégias complementares podem ser aplicadas na remoção desses compostos mais recalcitrantes, como o uso de plantas associadas à

biorremediação, visando aumentar a eficácia do tratamento, por meio da chamada fitorremediação. A fitorremediação de poluentes orgânicos é baseada no efeito da rizosfera que modifica as características, químicas, físicas e biológicas do solo, estimulando a atividade microbiana. Trata-se de uma estratégia natural de baixo custo relativo e apresenta a vantagem de revegetar áreas contaminadas, antes expostas à ação erosiva da água e do vento. Apesar de sua aplicação no tratamento de áreas contaminadas com poluentes orgânicos ser bem documentada, esta técnica ainda apresenta limitações, como a seleção de espécies vegetais com potencial para acentuar a degradação de compostos e capacidade de adaptar-se à condição do solo contaminado. A contribuição dos microrganismos rizosféricos e fitossimbiontes tem sido objetivo de grande interesse atual e dentre estes se destacam os fungos micorrízicos arbusculares que favorecem o crescimento das plantas em condições de estresse e possivelmente a capacidade remediadora destas.

Em vista desses aspectos, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a biomassa, indicadores de atividade microbiana heterotrófica e a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em solo de área de “landfarming” de resíduos petroquímicos, bem como avaliar o efeito de compostos poluentes derivados de petróleo no crescimento de plantas e na colonização micorrízica destas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Geração e tratamento de resíduos da indústria de petróleo e derivados

A exploração de petróleo gera uma série de resíduos, durante todas as etapas, requerendo uma destinação e tratamento adequado de forma a minimizar os impactos ambientais dessa atividade industrial. Inovações tecnológicas vêm permitindo a reutilização de efluentes líquidos, resultantes das operações de produção, e os resíduos sólidos não-recicláveis são depositados em aterros industriais constantemente controlados e monitorados (Ambiente Brasil, 2004).

As tecnologias para o tratamento de resíduos petroquímicos são atualmente as mais diversas, abrangendo processos químicos, físicos e microbiológicos. As principais técnicas de tratamento são: reciclagem, incineração, lavagem de solo a vapor, lavagem de solo com produtos químicos, co-processamento em cimenteiras, fabricação de combustíveis alternativos, incorporação em artefatos de cerâmica, incorporação em artefatos de cimento, disposição em aterros industriais, encapsulamento, biotratamento em "landfarming", biotratamento pelo processo de biopilha, dessorção térmica e o plasma (Sauerbronn, 2002). O co-processamento em cimenteiras (aproveitamento do conteúdo energético e mineral do resíduo na produção de cimento), a incineração e o "landfarming" destacam-se entre as técnicas mais empregadas no tratamento de resíduos. Entretanto, novas técnicas vêm sendo implantadas, como a tecnologia de biopilhas; a dessorção térmica e o plasma (Sauerbronn, 2002). Segundo este autor, estas apresentam a vantagem de recuperar o óleo presente nos resíduos sólidos, possibilitando a reciclagem do produto, sendo o tratamento com plasma mais vantajoso, por evitar a emissão de gases poluentes (dioxinas e furanos), como ocorre nos processos de incineração, co-processamento em cimenteiras e dessorção térmica.

Grandes áreas estão poluídas com substâncias orgânicas recalcitrantes, que causam problemas ambientais devido à sua toxicidade e tendência a acumular-se no solo, embora estejam presentes em todos compartimentos do ambiente. A ação de processos erosivos ocasionados pela chuva e vento pode agravar os danos, com a dispersão desses poluentes (Joner et al., 2001). Os processos que promovem a introdução desses poluentes orgânicos no solo podem variar desde a deposição atmosférica até aplicações intencionais, pela disposição de resíduos oleosos no solo, em áreas de um “landfarming” desativado. As concentrações desses químicos no solo são afetadas pelo tempo de contato com o solo, o que influencia a toxicidade e a biodisponibilidade.

Os poluentes orgânicos apresentam características marcantes que variam entre os compostos, notavelmente a carga eletroquímica e a solubilidade, o que influencia uma maior ou menor biodegradabilidade, afetando seu tempo de permanência no solo. Compostos não-polares, como hidrocarbonetos de petróleo, óleos pesados e piche, são pouco solúveis ou completamente insolúveis em água e prontamente sorvidos aos constituintes hidrofóbicos do solo, ou seja, na matéria orgânica. Já compostos polares, como os orgânicos halogenados (poliaromáticos bifenis clorados - PCBs, diclorobenzenos, alguns pesticidas e explosivos como o trinitrotolueno - TNT), são mais solúveis. Entretanto, podem ter sua mobilidade limitada pela interação com as cargas superficiais do solo (Joner & Leyval, 2003a).

Existem muitas fontes de contaminação com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) no solo, incluindo o creosoto, óleo utilizado para preservação de madeiras, produtos derivados do petróleo e do coque (Huang et al., 2004a). Em 1999 nos EUA, existiam mais de 2.000 áreas contaminadas com HAPs nas proximidades de refinarias (Environmental BioTechnologies, Inc., 1999). Dentre os principais poluentes orgânicos do solo, destaca-se o creosoto derivado do alcatrão de hulha, uma mistura de compostos individuais,

abrangendo diversas estruturas químicas. Consiste de numerosos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e monocíclicos líquidos e sólidos (85%), compostos fenólicos (10%) e compostos S-, N- e O-heterocíclicos (5%).

Dos 150 a 200 constituintes individuais, apenas 40 a 45% dos compostos representam tipicamente uma dada mistura de creosoto; essa complexa composição representa um desafio para as tecnologias que empregam tratamentos biológicos em locais contaminados (Mueller et al., 1989). É um composto altamente tóxico a organismos via contato, inalação e ingestão; mesmo uma pequena dose ingerida pode ocasionar náusea, vômitos, colapso circulatório, taquicardia, paralisia, convulsões, coma, necrose na boca e trato gastro-intestinal, morte por falência respiratória e em alguns casos por parada cardíaca (Anon, 1993; citado por Richter et al., 2003). De acordo com os mesmos autores, a contaminação por creosoto está geralmente associada a solos superficiais, águas em lagoas de tratamento ou áreas de evaporação e lençóis freáticos contaminados pela lixívia de áreas contaminadas.

Além do creosoto aplicado no tratamento da madeira, o processo de produção da madeira tratada produz um resíduo altamente perigoso para a saúde humana, na forma de lodo. Outras potenciais fontes de contaminação são o vazamento de tanques, derramamentos e gotejamento de madeiras já tratadas nas áreas de tratamento de madeira que utilizam creosoto.

No Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Preservadores de Madeira (ABPM), existem 33 empresas produtoras de madeira preservada e 10 empresas cadastradas produtoras de preservantes de madeira. Atualmente, não se dispõem de dados a respeito da quantidade de creosoto consumida no país. De acordo com o inventário dos resíduos sólidos gerados no estado de Goiás, realizado pela Agência Ambiental de Goiás, são produzidas 780 t.ano⁻¹ de lodo de sedimento de bacias de água residuárias, provenientes de processos de

2.2 “Landfarming”

O “landfarming” é uma das tecnologias de remediação sobre a superfície do solo que reduz as concentrações de constituintes de petróleo por meio da biodegradação, envolvendo o espalhamento do resíduo ou solo contaminado sobre a superfície do solo e incorporado à camada arável, também denominada camada reativa (US EPA, 2000). As condições físico-químicas do solo podem ser modificadas de forma a maximizar a ação dos microrganismos, pela aplicação de fertilizantes, a aeração e manutenção da umidade do solo. Aplicado com eficiência no tratamento de locais contaminados com petróleo e derivados (US EPA, 2004), o “landfarming” tem sido utilizado em solos contaminados com outros poluentes orgânicos, como o creosoto (Atagana, 2003).

A eficiência da remediação com a prática do “landfarming” está associada com as características do solo (textura, teor de matéria orgânica e nutrientes), os constituintes do resíduo (relação C/N, composição química) e as condições climáticas (umidade, aeração). Além das condições adequadas a área selecionada para a instalação do processo deve atender a critérios técnicos para minimizar os riscos ambientais (Accioly & Siqueira, 2000). Não há uma estimativa nacional da área de tratamento de resíduos em “landfarming” no Brasil. Dados fornecidos pela REPLAN – PETROBRAS (Refinaria de Paulínia – SP), indicam uma área aproximada de 40 ha, nessa refinaria. As áreas são previamente preparadas, removendo-se a camada superficial de 20 cm, para a colocação de uma camada espessa de argila expandida, onde é recolocada a camada de solo superficial, após a compactação da camada de argila. As áreas preparadas para esta finalidade geralmente permanecem em uso por 25 a 30 anos, quando são removidas a camada superficial e a camada de argila, e submetida à reabilitação do terreno e posterior revegetação (Mercanti, 2004).

Apesar de sua larga utilização, o “landfarming” tem apresentado baixa eficiência na remoção de contaminantes recalcitrantes presentes nos resíduos oleosos (Huang et al., 2004a). Conforme o teor de óleo do solo diminui com o tratamento por “landfarming”, há um aumento dos compostos aromáticos pesados e asfaltenos, em relação aos hidrocarbonetos saturados e aromáticos leves, que apresentam uma taxa mais lenta de decomposição (Doelman & Breedveld, 1999). A acumulação dos compostos recalcitrantes e de produtos da decomposição tais como metais, pode impactar negativamente a microbiota e os processos microbiológicos que ocorrem no solo. Esses compostos tendem a se ligar à matéria orgânica do solo, devido a sua natureza hidrofóbica, tornando-se indisponíveis aos microrganismos e poucos destes são capazes de metabolizar compostos de alto peso molecular (Alexander, 1995; Feng et al., 2000). Esse fenômeno acentua-se como tempo de exposição do solo ao contaminante (Hatzinger & Alexander, 1995), constituindo-se uma barreira para a transferência de massa, ou seja a biodisponibilidade desses compostos para os microrganismos do solo (Ghosh et al., 2000).

Outras limitações também devem ser consideradas, já que áreas de “landfarming” típicas estão sujeitas a fatores climáticos como chuva, vento e variações de temperatura, ocasionando problemas de erosão hídrica e eólica, que podem contribuir para a contaminação de áreas vizinhas (US EPA, 2004). Essas limitações associadas ao desenvolvimento de técnicas de tratamento de resíduos orgânicos poluentes mais eficientes, econômicas e menos impactantes, colocam o “landfarming” em uma posição crítica, apontando para a necessidade de estudos visando otimizar a exploração dessa técnica ou buscando reabilitar e revegetar áreas que já foram ou estão em processo de desativação.

2.3 Condições biológicas de solos contaminados com poluentes orgânicos

A base de sustentação dos ecossistemas terrestres em equilíbrio é mantida por processos bioquímicos diversos controlados pelos organismos que habitam o solo. Esses organismos encontram-se em maior atividade na camada de 0 a 20 cm de profundidade, onde geralmente ocorre acúmulo de matéria orgânica e as condições ambientais de umidade e aeração são adequadas (Moreira & Siqueira, 2002). O estudo de algumas propriedades microbiológicas do solo tem sido proposto por diversos autores, devido à sensibilidade a mudanças quando os solos são submetidos a diferentes tipos de manejo, sendo portanto possíveis indicadores da qualidade do solo (Tótola & Chaer, 2002). Entretanto, Stenberg (1999) enfatiza que nenhum indicador individualmente conseguirá descrever e quantificar todos os aspectos da qualidade do solo, sendo coerente a avaliação de um conjunto de parâmetros. Diversos estudos enfocam o impacto de alterações ambientais nas populações microbianas e suas atividades (Rathbone et al., 1998; Cury, 2002; Machulla, 2003; Carneiro et al., 2003; Martin et al., 2004).

A densidade da população de microrganismos do solo é afetada por vários fatores como o tipo de solo, a cobertura vegetal e as condições climáticas, sendo grandes as variações encontradas entre ecossistemas distintos na mesma região, conforme observado por Moreira et al. (1999) em cinco sistemas de uso da terra na Amazônia. De acordo com Siqueira & Franco (1988) as populações de bactérias e actinomicetos em solos, encontrados por diferentes autores, variaram entre 10^5 e 10^9 células g^{-1} solo para bactérias e 10^4 e 10^8 células g^{-1} solo para actinomicetos. A porcentagem de microrganismos degradadores de petróleo em comparação ao total de microrganismos heterotróficos presentes no solo foi um dos parâmetros utilizados por Trindade et al. (2005), durante a avaliação do tratamento de um solo contaminado com petróleo por biorremediação. No solo

contaminado em épocas distintas (quatro anos de contaminação e contaminação recente), foram quantificadas $2,38 \times 10^6$ UFC g^{-1} solo e $1,13 \times 10^5$ UFC g^{-1} solo de microrganismos heterotróficos totais, respectivamente, enquanto o valor verificado no solo não-contaminado foi de $2,7 \times 10^5$ UFC g^{-1} solo.

A porcentagem de microrganismos degradadores de petróleo foi de 89,9% para o solo com quatro anos de contaminação, 72,3% no solo recentemente contaminado e 64,6% no solo não-contaminado. Os autores atribuem esses resultados a adaptação da comunidade microbiana às condições ambientais do solo contaminado pelo maior período. Segundo Salanitro (2001), a contagem microbiana pode não refletir uma parte significativa da população do solo em crescimento sob o impacto dos hidrocarbonetos, em consequência da baixa recuperação e crescimento em meio padronizado com substrato específico.

A biomassa microbiana do solo (BM), que é o componente vivo da matéria orgânica do solo, composto por bactérias, fungos, actinomicetos, microfauna e organismos menores que 5×10^{-3} μm (Moreira & Siqueira, 2002), é outro parâmetro freqüentemente avaliado em estudos de impactos no ambiente edáfico e corresponde a porção ou parte viva da matéria orgânica do solo, contendo em média 2 a 5 % do carbono orgânico (Jenkinson & Ladd, 1981). Os microrganismos que compõem a BM são responsáveis pela decomposição e acúmulo de matéria orgânica, ou transformações envolvendo os nutrientes minerais, sendo a principal fonte de enzimas no solo. Mudanças na biomassa microbiana podem ser detectadas muito antes que alterações na matéria orgânica do solo possam ser observadas (Powlson et al.; 1987).

Informações mais significativas são obtidas quando os dados de BM são relacionados com outros, como o carbono orgânico total, denominado quociente microbiano ($qMIC$) e à respiração basal do solo ou quociente metabólico (qCO_2). O quociente microbiano informa qual é a representação da BM no carbono orgânico do solo, fornecendo uma medida de qualidade da matéria

orgânica (Tótola & Chaer, 2002). O quociente metabólico corresponde à liberação de CO₂ por unidade de biomassa, por determinado tempo, representando um índice de atividade heterotrófica específica da biomassa (Moreira & Siqueira, 2002), que possibilita avaliar a eficiência da biomassa em utilizar os recursos do ecossistema, de forma que maiores valores de q_{CO_2} indicam algum fator de estresse sobre a biomassa. Em estudo do efeito da contaminação com óleo cru em diferentes tipos de solos, sobre a BM, sua atividade e capacidade para degradação de hidrocarbonetos, foi constatada uma marcada redução na BM em Inceptisols (Cambissolos) de 25% em relação ao controle não-contaminado, após 60 dias de incubação. Nesse mesmo estudo verificaram-se também acréscimos nos valores de BM, sendo de 5% para Entisols (Neossolos) e 53% em Mollisols (solos com alto teor de matéria orgânica). O q_{CO_2} variou de 1,24 a 4,78 mg C-CO₂ g⁻¹ C-BM h⁻¹, entre os diferentes tipos de solo contaminados com óleo cru, possibilitando a constatação da grande variabilidade de resposta dos parâmetros biológicos que pode ser encontrada em solos contaminados (Franco et al., 2004).

Martin et al. (2004) constataram que após 11 meses de tratamento de um solo em “landfarming” após a adição de lodo de refinaria de petróleo, houve uma redução de 80% dos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) e as frações lábeis de carbono do solo e carbono da BM apresentaram um acréscimo no valor nos primeiros meses de tratamento, embora esses valores tenham diminuído nos últimos meses do estudo, próximo ao encontrado no solo do tratamento controle, indicando que a adição do lodo e o tratamento do solo em “landfarming” promoveram uma alteração mínima nesses parâmetros.

Parâmetros bioquímicos que medem a capacidade transformadora do solo, como as enzimas do solo também são consideradas potenciais indicadores do impacto da contaminação do solo, pois catalisam as reações bioquímicas e são partes integrais da ciclagem de nutrientes, sofrendo grande influência das

mudanças ocorridas no manejo do solo. A escolha das enzimas a serem analisadas baseia-se na sua sensibilidade ao manejo do solo, sua importância na ciclagem de nutrientes e a simplicidade de análise, sendo as mais comumente avaliadas aquelas ligadas aos ciclos do C, N, S e P, destacando-se β -glucosidase, fosfatases e urease (Tótola & Chaer, 2002).

Aumento na atividade de várias enzimas (desidrogenase, β -glucosidase, urease e protease) foi observado no solo logo após a adição de lodo de refinaria de petróleo, em relação ao tratamento controle e, ao final do período de onze meses, reduziu a valores próximos ao solo do tratamento controle (Martin et al., 2004). No entanto, a redução da atividade enzimática em solos contaminados por um longo período principalmente com HAPs, foi observada por Andreoni et al. (2004) em solos da Alemanha, Itália e Bélgica. Estes autores constataram a ausência de atividade de urease e fosfatase nos solos da Bélgica, relacionando com a presença dos HAPs no solo, recobrando a superfície das células e reduzindo a interação entre os sítios de atividade enzimática e os substratos solúveis, com efeito adverso na expressão da atividade enzimática. Segundo os mesmos autores, a exposição do solo a esses compostos por longos períodos tende a afetar a atividade enzimática, reduzindo ou até inibindo a atividade das enzimas ligadas à ciclagem de nutrientes e decomposição de resíduos orgânicos presentes no solo.

2.4 Fitorremediação de poluentes orgânicos

A utilização de plantas na remoção de poluentes orgânicos presentes no solo, estratégia denominada fitorremediação, é reconhecida por apresentar baixo custo econômico e estudos recentes têm demonstrado sua eficiência (Gunther et al., 1996; Thompson et al., 1998; Siciliano et al., 2003; Huang et al., 2004b). A sua aplicação é fundamentada no chamado efeito rizosférico, ocasionado pela

efeito benéfico da inoculação de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos em espécies vegetais já adaptadas à condição de contaminação.

A escolha de espécies vegetais para a revegetação de solos contaminados tem como princípio a avaliação quanto à tolerância da mesma ao ambiente adverso. Destacam-se aquelas que apresentam rápido crescimento e boa produção de biomassa vegetal, tendo em vista também a capacidade de acentuar a biodegradação do poluente. A investigação de culturas de ciclo curto e boa produção de biomassa vegetal é de relevante interesse, por desencadear um aumento na atividade microbiológica do solo, além de fornecer nutrientes para o solo, durante a sua decomposição. Esse condicionamento do solo pode facilitar o estabelecimento de culturas perenes nessas áreas contaminadas, a fim de restabelecer a vegetação e reabilitar a área.

2.5 Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e poluentes orgânicos no solo

A contribuição dos FMAs, microrganismos do solo mundialmente distribuídos que formam associação simbiótica com a maioria dos vegetais superiores, associada à revegetação de ambientes contaminados com poluentes orgânicos tem sido pouco estudada. A influência de FMAs no crescimento e estabelecimento de plantas em solos poluídos está relacionada com a biodegradação de compostos orgânicos poluentes na micorrizosfera (Tabela 1).

Em áreas contaminadas com poluentes orgânicos, a presença de FMAs é essencial para a sobrevivência de plantas endêmicas em situação de competição natural, por promover respostas positivas no crescimento da hospedeira, além de indicar a existência de pelo menos alguma tolerância aos poluentes em questão, como verificado por Cabello (1997), em solos poluídos com hidrocarbonetos derivados de petróleo na província de Buenos Aires, na Argentina e em Rositz, na Alemanha. Em ambos locais foi verificado a presença de colonização

micorrizica em *Cynodon dactylon* (L.) Press. e em *Dactylis glomerata* (L.). A autora observou que as raízes colonizadas apresentavam uma proporção maior de vesículas e menor de arbúsculos, quando comparado com as plantas coletadas de local não-contaminado. As vesículas, consideradas principalmente como estruturas de reserva aumentam em número nas raízes mais velhas e mortas ou em plantas crescendo em condições estressantes (Cooper, citado por Cabello, 1997). Entretanto, verificou-se neste mesmo trabalho que não houve diferença entre a densidade de propágulos infectivos de FMAs nos solos poluídos e não-poluídos. A limitada diversidade de espécies de FMAs em solos poluídos com hidrocarbonetos de petróleo também foi constatado por Cabello (1997). Apenas duas espécies foram identificadas na Argentina e duas espécies na Alemanha: *Glomus deserticola* Trappe, Blossio and Menge e *Glomus mosseae* (Nicol. And Gerd.); *Glomus aggregatum* Schenk and Smith e *Gigaspora* sp., respectivamente.

TABELA 1 Efeito dos FMAs no crescimento de plantas e na dissipação de poluentes orgânicos no solo.

Planta	FMA	Efeito	Referência
<i>Cynodon dactylon</i> <i>Bromus brevis</i> <i>Dactylis glomerata</i> <i>Melilotus</i> sp. <i>Medicago sativa</i>	<i>Glomus aggregatum</i> (solo poluído) e <i>glomus mosseae</i> (coleção)	Colonização presente em espécies endêmicas de áreas contaminadas; presença de propágulos infectivos (2,6 g ⁻¹ solo) em menor densidade que em áreas não poluídas (7,1 g ⁻¹ solo).	Cabello (1997)
Azevém (<i>Lolium perenne</i>)	<i>Glomus mosseae</i>	Associação micorrizica proporcionou maior sobrevivência das plantas em solo contaminado com HAPs	Binet et al. (2001)
Trevo (<i>trifolium repens</i>) Azevém (<i>lolium perenne</i>)	<i>Glomus mosseae</i>	Redução da colonização (50%) no solo contaminado; a absorção de P para o trevo não foi alterada no tratamento micorrizado,	Joner & Leyval (2001)
<i>Atriplex canescens</i>	FMAs isolados de área contaminada	Plantas micorrizadas apresentaram maior biomassa e maior concentração de P na parte aérea em relação às plantas não-micorrizadas	Call & McKell (1984), citado por Cabello (2002)
Alfafa (<i>medicago sativa</i>)	<i>Glomus deseticola</i> , <i>G. Geosporum</i> e <i>G. intraradices</i> (solo poluído); <i>G. Mosseae</i> e <i>G. fasciculatum</i> (coleção)	A produção de biomassa foi maior em todos os tratamentos inoculados, com resposta máxima para <i>Glomus geosporum</i> . <i>G. Deseticola</i> e <i>G. Geosporum</i> aumentaram a concentração de P e Zn na planta.	Cabello (1999)
Trevo (<i>trifolium repens</i>) Azevém (<i>lolium perenne</i>)	<i>Glomus mosseae</i>	A presença de FMA acentuou o crescimento das plantas, favorecendo mais ao trevo do que o azevém, acentuando também a dissipação dos HAPs.	Joner & Leyval (2003b)

Em estudo avaliando o efeito de estresse residual do herbicida Imazaquin, Siqueira et al. (1991) verificaram que a aplicação de estimulantes de micorrização (isoflavonóides) em solos com excesso desse poluente aumentou a colonização das raízes pelos fungos micorrizicos indígenas do solo e tendo uma ação protetora sobre as culturas avaliadas. Em experimento conduzido em condições controladas, Binet et al. (2001) verificaram a dissipação de HAPs na presença de azevém (*Lolium perenne* L.) colonizado com *Glomus mosseae*. Nas plantas micorrizadas, HAPs foram menos adsorvidos na superfície radicular e menores concentrações foram verificadas no tecido foliar, em comparação a plantas não micorrizadas, o que de acordo com os autores pode contribuir para explicar o efeito benéfico dos FMAs na sobrevivência das plantas. Da mesma forma, os benefícios da simbiose foram observados no crescimento de trevo (*Trifolium repens*) e azevém (*Lolium perenne*) cultivados juntos em solo artificialmente contaminado com HAPs (Joner & Leyval, 2001). As plantas micorrizadas mantiveram a absorção de fósforo na presença do contaminante, melhorando o estatus nutricional das plantas cultivadas no solo poluído.

A degradação de poluentes recalcitrantes, como os HAPs é uma das principais vantagens proporcionadas pela fitorremediação. A possível contribuição dos FMAs nesse processo foi comprovada em estudo realizado por Joner & Leyval (2003), em solos industrialmente poluídos com compostos orgânicos. Constatou-se que a maior dissipação ocorre na rizosfera mais interna (< 0,2 mm a partir da superfície radicular), com pouco ou nenhum efeito observado a distâncias maiores que 1 mm. Efeitos de sorção irreversível em raízes senescentes e restos culturais mostraram-se tão importantes quanto a dissipação (termo utilizado quando o mecanismo responsável pela redução da concentração do contaminante é desconhecido) de HAPs na redução desses compostos no solo. As prováveis explicações para a influência das micorrizas arbusculares na degradação de poluentes orgânicos envolvem os efeitos indiretos

dessa simbiose sobre a atividade de outros microrganismos presentes na rizosfera e da influência da simbiose sobre a atividade de enzimas oxidativas nas raízes e no solo rizosférico. Os efeitos diretos são desconsiderados, já que esses fungos apresentam simbiotrofismo obrigatório, característica que limita sua ação direta sobre a degradação dos compostos (Joner & Leyval, 2003). Modificações na estrutura da comunidade microbiana do solo micorrizosférico foram observadas em experimentos com solos contaminados artificialmente, porém existem poucos trabalhos sobre o impacto das micorrizas em solos poluídos com compostos orgânicos, utilizando solo contaminado por indústrias, e sua influência na degradação desses compostos (Heinosalo et al., 2000; Joner et al., 2001).

A eficiência da simbiose é outro fator fundamental para que os FMAs nativos de solos poluídos possam colaborar para o estabelecimento e crescimento de espécies vegetais. Cabello (1999) constatou que um isolado de área poluída com hidrocarbonetos de petróleo (*Glomus geosporum*) proporcionou a melhor resposta de crescimento para alfafa. Dessa forma, o emprego de plantas em estratégias de fitorremediação, associadas a isolados de FMAs eficientes que toleram ambientes poluídos com contaminantes orgânicos poderá possibilitar o desenvolvimento de programas de remediação e revegetação bem sucedidos.

No Brasil não existem estudos publicados enfocando o efeito da contaminação com poluentes orgânicos sobre os FMAs e sua possível contribuição para o crescimento das plantas nesses ambientes.

3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUIERA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F. de.; ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. (Ed.). *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa: SBCS, 2000. v. 1, p. 299-351.

ALEXANDER, M. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environmental Science & Technology*, Washington, v. 29, n. 11, p. 2713-2717, Nov. 1995.

AMBIENTE BRASIL. *Petróleo – resíduos e meio ambiente, 2004*. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.org.br>>. Acesso em: 17 out. 2004.

ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M. A.; NOCERINO, G.; BERNASCORRI, S.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAH polluted soils. *Chemosphere*, Dordrecht, v. 57, n. 5, p. 401-412, Nov. 2004.

APRILL, W.; SIMS, R. C. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*, Dordrecht, v. 20, n. 1-2, p. 253-265, 1990.

ATAGANA, H. I. Bioremediation of creosote-contaminated soil: a pilot-scale landfarming evaluation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Dordrecht, v. 19, n. 6, p. 571-581, Aug. 2003.

BAUND-GRASSET, F.; BAUND-GRASSET, S.; SAFFERMAN, S. I. Evaluation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere*, Dordrecht, v. 26, n. 7, p. 1365-1374, Apr. 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 dez. 2004.

BINET, P.; PORTAL, J. M.; LEYVAL, C. Application of GC-MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass. *Organic Geochemistry*, Oxford, v. 32, n. 2, 217-222, Feb. 2001.

CABELLO, M. N. Effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated from hydrocarbon polluted soils. *Journal of Basic Microbiology*, Berlin, v. 39, n. 2, p. 89-95, 1999.

CABELLO, M. N. Hydrocarbon pollution: its effects on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 233-236, Mar. 1997.

CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Atividade enzimática e biomassa microbiana em solo contaminado com metais pesados. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29. , 2003, Ribeirão Preto – SP. Anais... Ribeirão Preto, 2003. CD-ROM.**

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy, San Diego, v. 56, p. 55-114, 1996.**

CURY, J. C. Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. 2002. 84 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

DOELMAN, P.; BREEDVELD, G. In situ versus on site practices. In: **KRAL, D. M. (Ed.). Bioremediation of Contaminated Soils. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1999. n. 37.**

ESCALANTE-ESPINOSA, E. et al. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. Inoculated with a microbial consortium in a model system. **Chemosphere, Dordrecht, Article in press, 2004.** Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 20 dez. 2004.

FENG, Y.; PARK, J. H.; VOICE, T. C.; BOYD, S. A. Bioavailability of soil-sorbed biphenyl to bacteria. **Environmental Science & Technology, Washington, v. 34, n. 10, p. 1977-1984, May 2000.**

FRANCO, I. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. **Geoderma, Netherlands, v. 121, n. 1/2, p. 17-30, July 2004.** Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 dez. 2004.

GHOSH, U.; WEBER S. A.; JENSEN, J. N.; SMITH, J. R. Relationship between PCB desorption equilibrium, kinetics and availability during land biotreatment. **Environmental Science & Technology, Washington, v. 34, n. 12, p. 2542-2548, June 2000.**

GUNTER, T.; DORNBERGER, U.; FRITSCH, W. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. **Chemosphere, Dordrecht, v. 33, n. 2, p. 203-215, July 1996.**

HATZINGER P. B.; ALEXANDER, M. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. **Environmental Science & Technology, Washington, v. 29, n. 2, p. 537-545, Feb. 1995.**

HEINONSALO, J.; JOGERSEN, K. S.; HAAHTELA, K.; SEN, R. Effects of *Pinus sylvestris* and mycorrhizosphere development on bacterial carbon source utilization and hydrocarbon oxidation in forest and petroleum-contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 46, n. 5, p. 451-464, May 2000.

HUANG, X. D.; EL-ALWI, Y.; PENROSE, D. M.; GEICK, B. R.; GREENBERG, B. M. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*, Oxford, v. 130, n. 3, p. 465-476, Aug. 2004a.

HUANG, X. D.; EL-ALWI, Y.; PENROSE, D. M.; GEICK, B. R.; GREENBERG, B. M. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution*, Oxford, v. 130, n. 3, p. 453-464, Aug. 2004b.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. M. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. (Ed.) *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1981. v. 5, p. 415-571.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, Oxford, v. 133, n. 1, p. 71-84, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 dez. 2004.

JOHNSON, D. L.; MAGUIRE, K. L.; ANDERSON, D. R.; McGRATH, S. P. Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 36, n. 1, p. 33-38, Jan. 2004.

JONER, E. J.; JOHASEN, A.; LOIBNER, A. P.; DELA CRUZ, M. A.; SZOLAR, O. H. J. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental Science & Technology*, Washington, v. 35, n. 13, p. 2773-2777, July 2001.

JONER, E. J.; LEYVAL, C. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza*, New York, v. 10, n. 4, p. 155-159, Jan. 2001.

JONER, E. J.; LEYVAL, C. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomie, Paris*, v. 23, p. 495-502, 2003a.

JONER, E. J.; LEYVAL, C. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science & Technology, Washington*, v. 37, n. 11, p. 2371-2375, June, 2003b.

KIRK, J. L.; KLEROMONOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. The effects of perennial ryegrass and alfafa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution, Washington*, v. 133, n. 3, p. 455-465, Feb. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 dez. 2004.

MACHULLA, G. Soil microbial interactions and their environmental significance. In: *Global soils-Germany. Journal of Soils & Sediments, Heidelberg*, v. 3, n. 4, p. 229, 2003.

MALISZEWSKA-KORDYBACH, B.; SMRECZAK, B. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) – Effect on plants. *Environmental Technology, London*, v. 21, n. 10, p. 1099-1110, Oct. 2000.

MARTIN, J. A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Biorremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environmental Research*, 2004. Article in press. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 20 dez. 2004.

MERCANTI, J. Landfarming no Brasil. Informação pessoal. Mensagem recebida por: <ampaula21@yahoo.com.br>. Recebida em: 11 nov. 2004.

MOREIRA, F. M. S. et al. Indicators of change in bellow-ground ecosystems in Brazil. In: *ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF AGRONOMY, 1999, Salt Lake City: Utah. Abstracts...* Salt Lake City, Utah: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p. 49.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.

MUELLER, J. G.; CHAPMAN, P. J.; PRITCHARD, P. H. Creosote-contaminated sites: Their potential for bioremediation. *Environmental Science & Technology*, Washington, v. 23, n. 10, p. 1197-1201, Oct. 1989.

MUNCNEROVA, D.; AUGUSTIN, J. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic-hidrocarbons – A review. *Bioresource Technology*, Oxford, v. 48, n. 2, p. 97-106, 1994.

POWLSON, D. S.; JENKINSON, D. S. A comparison of the organic matter, biomass adenosine triphosphate and mineralizable nitrogen contents of ploughed and direct-drilled soils. *Journal of Agricultural Sciences, Cambridge*, v. 97, n. 3, p. 713-721, Dec. 1981.

PRADHAN, S. P.; CONRAD, J. R.; PATEREK, J. R.; SRIVASTAVA, V. J. Potential of phytoremediation for treatment of PAH's in soil at MGP sites. *Journal of Soil Contamination*, Boca Raton, v. 7, n. 4, p. 467-480, 1998.

PRINCE, R. C.; DRAKE, E. N. Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: ADRIANO, D. C. et al. (Eds.). *Bioremediation of Contaminated Soils*. *Agronomy*, n. 37, p. 89-110, 1999.

RATHBONE, K. Effects of PAHs on microbial activity and diversity in freshly contaminated and weathered soils. In: *CONFERENCE OF HAZARDOUS WASTE RESEARCH, 1998, Local. Proceedings...* 1998.

REILLEY, K. A.; BANKS, M. K.; SCHWAB, A. P. Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality*, Madison, v. 25, n. 2, p. 212-219, Mar./Apr. 1996.

RICHTER, D. L.; WARNER, J. I.; STEPHENS, A. L. A comparison of mycorrhizal and saprotrophic fungus tolerance to creosote in vitro. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 51, n. 3, p. 195-202, Apr. 2003.

SALANITRO, J. P. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soils. *Advances in Agronomy*, San Diego, v. 72, p. 53-105, 2001.

SAUERBRONN, J. L. B. Gestão de Resíduos Sólidos na Petrobras. In: *Seminário de Resíduos Sólidos: Gestão, Tendências e Novas Tecnologias - ADVB/SP*, abril de 2002. Disponível em: <http://www2.ciesp.org.br/bolsa/index2.htm>. Acessado em: 24 set. 2004.

SCHWAB, P.; BANKS, K. Phytoremediation of petroleum contaminated soils. In: ADRIANO, D. C. et al. (Eds.). *Bioremediation of contaminated soils*. 1999. n. 37, p. 783-795.

SICILIANO, S. D.; GERMIDA, J. J.; BANKS, K.; GREER, C. W. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 69, n. 1, p. 483-489, Jan. 2003.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. *Biotecnologia do solo e perspectivas*. Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 24 p.

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. VA-mycorrhizae and mycorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 233-242, July 1991.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. *Acta Agriculturae Scandinavica, section B - Soil and Plant Science*, Oslo, v. 49, n. 1, p. 1-24, Mar. 1999.

THOMPSON, P. L.; RAMER, L. A.; SCHNOOR, J. L. Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. *Environmental Science & Technology*, Washington, v. 32, n. 7, p. 975-980, Apr. 1998.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: V. ALVAREZ, V. H.; SCHAEFEER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V. *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v. 2, p. 195-276.

TRINDADE, P. V. O. et al. Biorremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere*, v. 58, p. 515-522, 2005. <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 dez. 2004.

US EPA, 2000. *Introduction to Phytoremediation*. EPA/600/R-99/107. Washington DC.

US EPA. *Landfarming*. Disponível em: <<http://www.epa.gov>>. Acesso em: 14 dez. 2004.

WILTSE, C. C. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *Journal of Environmental Quality*, Madison, v. 27, n. 1, p. 169-173, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 dez. 2004.

CAPÍTULO 2

BIOMASSA, ATIVIDADE MICROBIANA HETEROTRÓFICA E FMAs EM SOLO SOB "LANDFARMING" DE RESÍDUOS PETROQUÍMICOS

RESUMO

PAULA, Alessandra Monteiro de. Biomassa, atividade microbiana heterotrófica e FMAs em solo tratado com resíduos petroquímicos em "Landfarming". 2005. Cap. 2. 39 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)*

O tratamento de resíduos petroquímicos em "landfarming" já é bastante utilizado no país, como uma das técnicas apropriadas para esses resíduos. Embora a comunidade microbiana seja capaz de promover a dissipação dos compostos poluentes, a aplicação continuada de resíduos oleosos no solo pode afetar os processos microbianos no solo, comprometendo a qualidade do mesmo. No presente trabalho avaliou-se a biomassa microbiana e sua atividade heterotrófica de um solo de área de "landfarming" de resíduo petroquímico, verificando também a ocorrência e o efeito da inoculação com fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) no crescimento de plantas neste solo. Sete ensaios em casa de vegetação foram realizados para avaliar o efeito da inoculação com FMAs no crescimento das plantas. Foram testadas 6 espécies vegetais nos seis primeiros ensaios, e no último ensaio utilizou-se uma espécie, na qual foi comparado o efeito dos FMAs nativos da área com os isolados de FMA utilizados nos ensaios anteriores. As análises microbiológicas e bioquímicas do solo mostraram elevada densidade microbiana e os valores de biomassa e de atividade microbiana foram semelhantes aos encontrados em solos não poluídos, indicando que a comunidade microbiana apresenta-se ativa. Entretanto, parâmetros bioquímicos indicam a existência de algum fator inibitório que poderá comprometer a decomposição dos resíduos depositados no solo, bem como a sua funcionalidade bioquímica. Constatou-se também a ocorrência de FMAs, os quais apresentaram elevada infectividade, capazes de garantir elevada colonização em plantas espontâneas e introduzidas, apesar do constante revolvimento mecânico e reduzida vegetação no solo da área de "landfarming". Todas as espécies vegetais introduzidas no solo apresentaram sintomas de estresse, crescendo e respondendo a inoculação com FMAs de modo diferenciado, favorecendo o crescimento da alfafa, sorgo, kudzu, braquiária e mucuna-preta, não influenciando o crescimento de capim-elefante. Todas as plantas apresentaram elevado grau de colonização, mesmo as não inoculadas.

* Comitê de Orientação: José Oswaldo Siqueira – UFLA (Orientador).

Esses resultados indicam a existência de populações microbianas tolerantes aos componentes tóxicos dos resíduos petroquímicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Características da área e do solo em “landfarming”

O estudo constou da determinação da biomassa microbiana do solo, da atividade microbiana heterotrófica e da avaliação da ocorrência de FMAs em um solo coletado em área de “landfarming” da CETREL S.A. - Empresa de Proteção Ambiental, localizada em Camaçari, BA, e de um experimento em casa de vegetação com o referido solo, conduzido no Departamento de Ciência do Solo, na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

Os resíduos gerados pelo pólo petroquímico de Camaçari são tratados em “landfarming”, em uso a mais de 15 anos, onde são aplicadas principalmente borras oleosas. O solo da área de “landfarming” é um Espodossolo*, que recebeu a aplicação de 152,455t de resíduo oleoso, no período de 07/01/04 a 30/02/04, com média anual em torno de 1800t de resíduo. A amostragem foi realizada em uma área de 3000 m², na qual foram coletadas a uma profundidade de 20 cm, 8 amostras simples para compor uma amostra composta.

* Classificado por Prof. Dr. Nilton Curi, DCS – UFLA.

2.1.1 Análises químicas e biológicas do solo

A análise química do solo revelou altos valores de fósforo (P) e saturação por bases (V), destacando-se também o valor elevado do sódio (Na) e conseqüentemente da condutividade elétrica (CE_e) (Tabela 1). A relação C/N do solo é de 9,7. Contagens microbianas de bactérias em meio agar-nutriente e de actinomicetos em meio agar-amido indicaram $9,5 \cdot 10^7$ UFC g⁻¹ bactérias heterotróficas e $1,8 \cdot 10^4$ UFC g⁻¹ actinomicetos. Todas as análises foram realizadas de acordo com o manual da Embrapa (1997), descritos sucintamente: o pH determinado em água, solo:solução 1:2,5; cálcio, magnésio e alumínio trocáveis foram extraídos com KCl 1,0 mol L⁻¹. O Alumínio trocável foi titulado com NaOH 0,025 mol L⁻¹ e o cálcio e magnésio trocáveis foram quantificados por espectroscopia de absorção atômica de chama. O potássio trocável foi extraído com Mehlich-1 (HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹) e determinado por fotometria de chama. O sódio trocável foi extraído com solução diluída de ácido clorídrico e determinado com espectrofotometria de chama. A acidez potencial (H+Al) foi extraída com solução tampão SMP (pH 7,5). O fósforo foi extraído pela solução Mehlich-1, adicionando-se após a extração, ácido ascórbico e molibdato de amônio para desenvolvimento da cor para medida de intensidade em um colorímetro. O Nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal. Os micronutrientes Zn, Cu, Fe e Mn foram extraídos pela solução de Mehlich-1 e quantificados por espectrometria de absorção atômica de chama. O carbono orgânico total foi determinado pelo método descrito por Yeomans & Bremner (1988). A matéria orgânica do solo foi calculada multiplicando-se o resultado do carbono orgânico por 1,724. O teor de óleos e graxas, que foi fornecido pela CETREL.

2.3 Ocorrência de FMAs

A ocorrência de FMAs foi verificada em 50 g de cada repetição da amostra de solo, por contagem de esporos, conforme método descrito por Gerdemann & Nicolson (1963) e pela observação de raízes colonizadas de plantas cultivadas por 14 semanas, sendo a coloração realizada segundo Phillipis & Haymann (1970) e avaliação quanto à porcentagem de colonização micorrízica, de acordo com Giovannetti & Mosse (1980).

A densidade de FMAs também foi avaliada através da técnica denominada “número mais provável” (NMP), que estima o número de propágulos infectivos (Souza & Guerra, 1998). A técnica do NMP consistiu no preparo de 5 séries de diluições do solo estudado, da diluição 0 a diluição 10^{-5} , em um solo diluente. O solo teste, avaliado quanto ao número de propágulos infectivos, foi mantido com umidade em torno de 2 a 5%, para facilitar a manipulação. O solo diluente foi preparado com a proporção 1:1 de areia grossa e uma amostra de Latossolo Vermelho-Amarelo, esterilizados em autoclave, na temperatura de 121° C e pressão de 1,5 atm, em dois períodos de duas horas cada, em dias seguidos. Após a autoclavagem, o material foi seco em estufa de circulação forçada, a 60° C, até atingir peso constante, para facilitar a homogeneização e manipulação da mistura. A planta teste empregada no ensaio foi a braquiária brizanta (*Brachiaria brizantha* cv. Marandú), selecionada no segundo ensaio, por ter apresentado elevada (52%). O ensaio foi conduzido em tubetes de polietileno de 50 cm³ com uma planta por tubete durante o período de 6 semanas (29/11/04 a 10/01/05). No final do período, as raízes foram lavadas em água corrente e procedendo-se a clarificação e posterior coloração como descrito para observação de raízes colonizadas. Após a coloração, foi avaliado em microscópio estereoscópico quanto à presença (+) ou ausência (-) de estruturas típicas (hifas, vesículas e arbúsculos) de FMAs nas raízes. Com o

2.1.1 Análises químicas e biológicas do solo

A análise química do solo revelou altos valores de fósforo (P) e saturação por bases (V), destacando-se também o valor elevado do sódio (Na) e conseqüentemente da condutividade elétrica (CE_e) (Tabela 1). A relação C/N do solo é de 9,7. Contagens microbianas de bactérias em meio agar-nutriente e de actinomicetos em meio agar-amido indicaram $9,5 \cdot 10^7$ UFC g^{-1} bactérias heterotróficas e $1,8 \cdot 10^4$ UFC g^{-1} actinomicetos. Todas as análises foram realizadas de acordo com o manual da Embrapa (1997), descritos sucintamente: o pH determinado em água, solo:solução 1:2,5; cálcio, magnésio e alumínio trocáveis foram extraídos com KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. O Alumínio trocável foi titulado com NaOH $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ e o cálcio e magnésio trocáveis foram quantificados por espectroscopia de absorção atômica de chama. O potássio trocável foi extraído com Mehlich-1 (HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ + H_2SO_4 $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$) e determinado por fotometria de chama. O sódio trocável foi extraído com solução diluída de ácido clorídrico e determinado com espectrofotometria de chama. A acidez potencial (H+Al) foi extraída com solução tampão SMP (pH 7,5). O fósforo foi extraído pela solução Mehlich-1, adicionando-se após a extração, ácido ascórbico e molibdato de amônio para desenvolvimento da cor para medida de intensidade em um colorímetro. O Nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal. Os micronutrientes Zn, Cu, Fe e Mn foram extraídos pela solução de Mehlich-1 e quantificados por espectrometria de absorção atômica de chama. O carbono orgânico total foi determinado pelo método descrito por Yeomans & Bremner (1988). A matéria orgânica do solo foi calculada multiplicando-se o resultado do carbono orgânico por 1,724. O teor de óleos e graxas, que foi fornecido pela CETREL.

TABELA 1. Características químicas do solo da área de "landfarming" da empresa CETREL, localizada em Camaçari, BA.

Atributo	Unidade	Valor
pH	(água)	6,8
MO*	dag kg ⁻¹	13,36
N total	g kg ⁻¹	8,0
CO* total	g kg ⁻¹	77,7
CE _e (a 25°C)*	DS/m	9,4
O&G*	(%)	4,41
P	mg dm ⁻³	80,1
K ⁺	mg dm ⁻³	53
Na ⁺	cmolc dm ⁻³	217,1
Ca ⁺	cmolc dm ⁻³	7,5
Mg ⁺²	cmolc dm ⁻³	0,8
Al ⁺³	cmolc dm ⁻³	0
H+Al	cmolc dm ⁻³	1
SB	cmolc dm ⁻³	9,4
(t)	cmolc dm ⁻³	9,4
(T)	cmolc dm ⁻³	10,4
V	%	90,4
M	%	0
ISNa*	%	10,06
P-rem	mg L ⁻¹	41,0
Zn	mg dm ⁻³	52,5
Fe	mg dm ⁻³	237,6
Mn	mg dm ⁻³	22,9
Cu	mg dm ⁻³	40,0
B	mg dm ⁻³	0,8
S	mg dm ⁻³	42,5

* MO= massa orgânica do solo; CO= carbono orgânico do solo; CE_e= condutividade elétrica a 25°C; O&G= teor de óleos e graxas; ISNa= índice de saturação por sódio.

2.2 Determinação da biomassa microbiana do solo e indicadores de atividade microbiana heterotrófica

As amostras de solo foram enviadas ao laboratório para determinação dos seguintes parâmetros: carbono da biomassa microbiana (BM-C), e quociente microbiano (q_{MIC}), respiração basal, respiração induzida por substrato e quociente metabólico (q_{CO_2}). Também foram determinadas as atividades das seguintes enzimas: β -glucosidade, fosfatase ácida e urease, conforme metodologia apresentada a seguir. Para todos os parâmetros avaliados foram realizadas 6 repetições analíticas.

O carbono da biomassa microbiana foi estimado pelo método da fumigação-extração (Vance et al., 1987), que apresenta o princípio básico a extração do C microbiano após a morte dos microrganismos e lise celular pelo ataque do clorofórmio e liberação dos constituintes celulares, os quais são degradados por autólise enzimática e transformados em componentes orgânicos extraíveis (Joergensen, 1995). O quociente microbiano (q_{MIC}) foi determinado pela relação entre o carbono microbiano e o carbono orgânico total do solo. Já o quociente metabólico (q_{CO_2}) foi obtido pela relação entre a quantidade de carbono liberada na respiração basal e a quantidade de carbono quantificada na biomassa microbiana. A respiração basal foi determinada pela estimativa do CO_2 evoluído durante incubação do solo durante 72 horas (Alef, 1995), determinando-se a taxa de respiração em $mg\ CO_2.g^{-1}.h^{-1}$. A respiração induzida por substrato (RIS) foi determinada de modo semelhante à respiração basal, sendo adicionado ao solo uma fonte de carbono prontamente disponível (sacarose 0,05%) a 50 g de solo, incubada juntamente com frascos contendo NaOH em recipiente hermeticamente fechado por 3 horas (Sparling, 1995). A determinação da atividade da β -glucosidase foi realizada de acordo com o método descrito por Tabatabai (1994). Este método é baseado na determinação colorimétrica do *p*-nitrofenol liberado pela β -glucosidase quando o solo é incubado com tampão (pH 6) *p*-nitrofenil- β -glucosídeo. A atividade da fosfatase foi determinada conforme descrito por Dick et al. (1996). Para ambas enzimas, o *p*-nitrofenol liberado é determinado por espectrofotômetro. A quantificação da atividade da urease baseou-se na determinação da amônia liberada após a incubação do solo com solução de uréia (Tabatabai & Bremner, 1972). Para todos esses parâmetros, a umidade do solo foi corrigida para 60% do VTP.

2.3 Ocorrência de FMAs

A ocorrência de FMAs foi verificada em 50 g de cada repetição da amostra de solo, por contagem de esporos, conforme método descrito por Gerdemann & Nicolson (1963) e pela observação de raízes colonizadas de plantas cultivadas por 14 semanas, sendo a coloração realizada segundo Phillipis & Haymann (1970) e avaliação quanto à porcentagem de colonização micorrízica, de acordo com Giovannetti & Mosse (1980).

A densidade de FMAs também foi avaliada através da técnica denominada “número mais provável” (NMP), que estima o número de propágulos infectivos (Souza & Guerra, 1998). A técnica do NMP consistiu no preparo de 5 séries de diluições do solo estudado, da diluição 0 a diluição 10^{-5} , em um solo diluente. O solo teste, avaliado quanto ao número de propágulos infectivos, foi mantido com umidade em torno de 2 a 5%, para facilitar a manipulação. O solo diluente foi preparado com a proporção 1:1 de areia grossa e uma amostra de Latossolo Vermelho-Amarelo, esterilizados em autoclave, na temperatura de 121° C e pressão de 1,5 atm, em dois períodos de duas horas cada, em dias seguidos. Após a autoclavagem, o material foi seco em estufa de circulação forçada, a 60° C, até atingir peso constante, para facilitar a homogeneização e manipulação da mistura. A planta teste empregada no ensaio foi a braquiária brizanta (*Brachiaria brizantha* cv. Marandú), selecionada no segundo ensaio, por ter apresentado elevada (52%). O ensaio foi conduzido em tubetes de polietileno de 50 cm³ com uma planta por tubete durante o período de 6 semanas (29/11/04 a 10/01/05). No final do período, as raízes foram lavadas em água corrente e procedendo-se a clarificação e posterior coloração como descrito para observação de raízes colonizadas. Após a coloração, foi avaliado em microscópio estereoscópico quanto à presença (+) ou ausência (-) de estruturas típicas (hifas, vesículas e arbúsculos) de FMAs nas raízes. Com o

resultado obtido para o conjunto de diluições, calculou-se a estimativa de densidade de propágulos infectivos pelo programa MPNES (Bennett, Wooster & Yost, 1990), expressando-se o resultado do NPI por g de solo seco, determinando-se também o limite de confiança a 95% de probabilidade.

2.4 Efeito de FMAs no crescimento de plantas

No experimento em casa de vegetação foram realizados sete ensaios, sendo seis para avaliar os efeitos da inoculação em espécies vegetais cultivadas no solo de “landfarming”, e um sétimo ensaio para confirmar a presença de FMAs no solo estudado e sua possível contribuição para o crescimento das plantas. Para isso amostras de solo coletadas na área do “landfarming” e trazidas para Lavras foram desagregadas e peneiradas em peneira de 2 mm de diâmetro para uniformização. Seis ensaios foram conduzidos simultaneamente por um período de 14 semanas, entre os meses de agosto e dezembro de 2004. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, inoculado ou não com FMAs, com 4 repetições. As espécies utilizadas foram: alfafa (*Medicago sativa* L.), kudzu tropical (*Pueraria phaseoloides* Benth.), braquiária (*Brachiaria brizantha* cv. Marandú), mucuna-preta (*Stylobium aterrimum* Piper et Traev.), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), sendo utilizada uma espécie vegetal por ensaio. O veículo para a inoculação dos FMAs foi um solo-inóculo, contendo aproximadamente 300 esporos mL⁻¹ solo de uma mistura das espécies *Glomus clarum* (± 105 esporos) e *Paraglomus occultum* (± 45 esporos), coletado de vaso de cultura da coleção de fungos micorrízicos arbusculares, do Departamento de Ciência do Solo, da UFLA.

A semeadura foi feita diretamente em vasos de 3 dm³, excetuando-se o capim-elefante, para o qual foi utilizado propágulo vegetativo. As sementes

foram devidamente esterilizadas com hipoclorito de sódio (1%) e as espécies kudzu tropical e braquiária brizanta foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado (10 minutos e 1 minuto, respectivamente). No momento da semeadura, adicionou-se 2 ml de solo-inóculo de FMA no tratamento inoculado e 50 mL vaso⁻¹ de um filtrado do inóculo de propágulo de FMAs no tratamento não-inoculado, visando equilibrar a microbiota entre os tratamentos. As leguminosas foram também inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio; para a alfafa foi inoculado estirpe BR 7407; a estirpe BR 2613 foi inoculada no kudzu tropical e estirpe BR 2811 para mucuna-preta. Todas as estirpes foram cultivadas em meio YMA semi-sólido, cedidas pelo laboratório de Microbiologia do Solo, do DCS da UFLA. A irrigação dos vasos foi realizada de acordo com a necessidade das plantas. Completado o período de 14 semanas, as plantas foram retiradas dos vasos, separando-se a parte aérea e raízes dos tratamentos principais e das plantas espontâneas. Em seguida, procedeu-se a lavagem das raízes com água corrente e, aproximadamente 1 grama de raízes frescas de cada planta foi separada de vários pontos da raiz, para coloração e avaliação da colonização micorrízica, como descrito no item 2.3. A massa seca da parte aérea e das raízes foram determinadas após secagem do material em estufa de circulação a 60°C até peso constante.

O sétimo ensaio foi conduzido entre os meses de dezembro de 2004 e janeiro de 2005, por um período de 6 semanas. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, constando de 4 tratamentos, sendo eles: solo não autoclavado (NA); solo não autoclavado + inoculado com FMA (NA-I); solo autoclavado (A) e solo autoclavado + inoculado com FMA (A-I), com 8 repetições. Foram mantidas duas plantas de braquiária brizanta (*Brachiaria brizantha* cv. Marandú) em tubetes de polietileno de 280 cm³. O inóculo de FMA utilizado foi o mesmo dos ensaios anteriores, sendo adicionado 1 mL de solo-inóculo nos tratamentos com inoculação e 10 mL tubete⁻¹ de um filtrado do

inoculo de propágulo de FMA's nos tratamentos não-inoculados, visando equilibrar a microbiota entre os tratamentos. Ao final do período de seis semanas foram avaliadas: massa seca da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR), relação MSPA/MSR e a porcentagem de raiz colonizada, de acordo com o item 2.3.

2.5 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e teste de média (tukey a 5%) pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), sendo os resultados de colonização micorrízica transformados pelo arco seno $(x/100)^{0.5}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

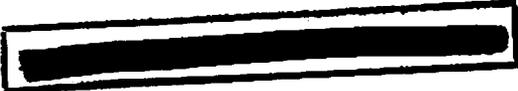
3.1 Determinação da biomassa microbiana do solo e indicadores de atividade microbiana heterotrófica

Os valores de biomassa microbiana do solo e os indicadores de atividade microbiana heterotrófica no solo encontram-se na tabela 2. O valor médio para carbono da biomassa microbiana foi $692,89 \mu\text{g g}^{-1}$ solo, encontrando-se dentro da faixa observada de 300 a $700 \mu\text{g g}^{-1}$ solo, verificada por Martin et al. (2004) em solo de biorremediação de lodo de refinaria de petróleo tratado com “landfarming” em região semi-árida, na Espanha. Valores de biomassa microbiana na faixa de 400 a $800 \mu\text{g g}^{-1}$ solo são relatados em solos sem a aplicação de resíduos orgânicos poluentes (Pfenning et al., 1992; Marchiori-Júnior & Melo, 1999). A proporção do C da biomassa no carbono total do solo, representado pelo quociente microbiano, é de 0,89%. O baixo valor encontrado possivelmente é consequência da adição do resíduo petroquímico rico em carbono ao longo de 15 anos de aplicação. Já para solos contaminados com hidrocarbonetos e tratados com “landfarming”, na região semi-árida da Espanha, foram encontrados valores um pouco mais elevados (1,29%) (Martin et al., 2004). Neste caso houve incremento na biomassa microbiana com a adição do resíduo no solo, porém atinge níveis próximos ao encontrado neste trabalho (0,84%), após 11 meses da aplicação do resíduo. Valores mais elevados do que o observado neste trabalho e em outros estudos em áreas poluídas com contaminantes orgânicos, variando entre 2 a 5 %, são encontrados em solos agrícolas e de vegetação natural (Jenkinson & Ladd, 1981).

TABELA 2 Parâmetros microbiológicos e bioquímicos do solo da área de “landfarming” de resíduos petroquímicos conduzido a 15 anos, no município de Camaçari-BA. Média de 6 repetições.

Parâmetros biológicos	Valor médio
Carbono da biomassa microbiana BM-C ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)	$692,89 \pm 33,54$
BM-C/Carbono orgânico total – q_{MIC} (%)	$0,89 \pm 0,04$
Respiração basal ($\text{mg CO}_2 \text{g}^{-1}$ solo h^{-1})	$4,38 \pm 0,82$
Quociente metabólico – q_{CO_2} ($\mu\text{g C-CO}_2 \mu\text{g BM-C h}^{-1}$)	$6,38 \pm 0,53$
Respiração induzida por substrato – RIS ($\text{mg CO}_2 \text{g}^{-1}$ solo h^{-1})	$17,56 \pm 2,03$
β -glucosidade ($\mu\text{g PNF g}^{-1}$ solo h^{-1})	$37,17 \pm 3,42$
Fosfatase ácida ($\mu\text{g PNF g}^{-1}$ solo h^{-1})	$107,48 \pm 1,07$
Urease ($\mu\text{g N-NH}_4 \text{g}^{-1}$ solo h^{-1})	$17,24 \pm 2,48$

A atividade heterotrófica da biomassa microbiana, avaliada pela respiração basal do solo foi de $4,38 \text{ mg CO}_2 \text{g}^{-1}$ solo h^{-1} , valor bem mais elevado do que os valores verificados em área de floresta ($0,25 \text{ mg CO}_2 \text{g}^{-1}$ solo h^{-1}) e em áreas de pastagem ($0,36 \text{ mg CO}_2 \text{g}^{-1}$ solo h^{-1}) (Tótola & Chaer, 2002). Portanto este solo apresenta elevada atividade heterotrófica, indicando rápida decomposição de resíduos orgânicos o que é coerente com a elevada densidade microbiana de bactérias ($9,5 \cdot 10^7 \text{ UFC g}^{-1}$ solo) e actinomicetos ($1,8 \cdot 10^4 \text{ UFC g}^{-1}$ solo), cujos valores são semelhantes aos encontrados em solos normais (Siqueira & Franco, 1988) e também alta biomassa. Isto pode ser resultado da adaptação da população microbiana à presença do resíduo oleoso aplicado por mais de 15 anos na área. O quociente metabólico (q_{CO_2}) médio foi de $6,38 \mu\text{g C-CO}_2 \mu\text{g BM-C h}^{-1}$, semelhante ao verificado por Franco et al., (2004), que avaliando o impacto da contaminação por óleo cru em diferentes tipos de solo constatou variações de 1,24 a $4,78 \mu\text{g C-CO}_2 \mu\text{g BM-C h}^{-1}$. Já Martin et al. (2004), encontrou valores elevados de q_{CO_2} em área contaminada com hidrocarbonetos e tratada com “landfarming”, em seis amostragens durante 11 meses de avaliações, onde foi verificado valores variando de 6,6 a $11,9 \mu\text{g C-CO}_2 \mu\text{g BM-C h}^{-1}$. O autor atribuiu esse resultado a limitação apresentada pelo sistema em



conseguir alcançar um equilíbrio após o desaparecimento dos hidrocarbonetos facilmente degradáveis durante os primeiros meses. Portanto o valor elevado de $q\text{CO}_2$ indica que a comunidade microbiana heterotrófica deste solo encontra-se sob algum tipo de estresse fisiológico, consumindo muito carbono para se manter. A respiração induzida por substrato (RIS) é resultado da resposta dos microrganismos à adição de carbono prontamente disponível, e foi de $17,56 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$, valor superior à respiração basal, que foi de $4,38 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$, indicando que não há impedimento no consumo de fontes simples de carbono pela microbiota do solo. Cury (2002) encontrou um valor médio mais elevado (38,41) para áreas próximas ao local onde ocorreu um vazamento de petróleo, em comparação a uma área afastada 2 km (26,66), o que poderia estar relacionado com a seleção de microrganismos em função da maior quantidade de hidrocarbonetos do petróleo. Já Carneiro et al. (2003) encontrou valores próximos ao encontrado, de $21 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ em área contaminada com metais pesados e $40 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ em área de mata utilizada como referência, refletindo o impacto da contaminação sobre a microbiota do solo.

A atividade enzimática da β -glucosidase do solo foi de $37,17 \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$, sendo que valores superiores foram encontrados por Carneiro et al. (2003), de $72 \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ em área de deposição de rejeitos de ustulação e desprovida de vegetação, muito abaixo do valor observado na área de referência não contaminada que foi de $651 \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$. A atividade enzimática da β -glucosidase pode estar relacionada com a complexidade dos compostos de carbono presentes no resíduo petroquímico, uma vez que esta enzima apresenta maior atividade em condições de fontes de carbono mais simples (Matsuoka et al., 2003). O valor encontrado para fosfatase ácida foi de $107,48 \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$, isto pode estar relacionado com os altos níveis de fósforo presente no solo ($80,1 \text{ mg dm}^{-3}$), que inibem a atividade dessa enzima. Valores médios de $2421 \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ podem ser observados em regiões do cerrado, onde a

disponibilidade de fósforo é muito baixa (Mendes e Vivaldi, 2001; citados por Matsuoka et al., 2003). A atividade da urease apresentou o valor de $17,24 \mu\text{g N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$, valor este abaixo do observado por Margesin et al. (2000), durante o monitoramento e avaliação de áreas impactadas com contaminantes orgânicos. Neste trabalho os autores obtiveram como resultado $50,61 \mu\text{gN-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ em solos sob atenuação natural e $47,16 \mu\text{g N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ em solos com aplicação de fertilizantes minerais para alcançar a relação C:N 20:1. No período de 88 dias, esses valores aumentaram logo após a adição do contaminante (óleo diesel), diminuindo conforme a concentração de hidrocarbonetos no solo tornava-se baixa em consequência da biodegradação. Reduções da atividade da fosfatase, muito superior ao resultado encontrado nesse trabalho, e inclusive a ausência da atividade da urease foram verificadas por Andreoni et al. (2004), em solos da Alemanha e da Bélgica, contaminados principalmente com HAPs e atribuíram esse resultado às altas concentrações desses poluentes constatadas nas duas áreas, que exercem efeito tóxico sobre os microrganismos e também podem recobrir a superfície das células, reduzindo a interação entre os sítios de atividade enzimática e os substratos solúveis, com efeito adverso na expressão da atividade enzimática (Kiss et al., 1998; citado por Andreoni et al., 2004). O histórico de mais de 15 anos da aplicação de resíduos petroquímicos na área, favorece o acúmulo de compostos poluentes recalcitrantes como os HAPs, podendo este acúmulo ser um dos fatores que contribuem para os baixos valores de atividade enzimática observados

A biomassa microbiana e os indicadores de atividade microbiana heterotrófica evidenciam a presença de uma comunidade microbiana ativa, entretanto a atividade enzimática encontra-se abaixo do que é verificado em solos sem adição de resíduos petroquímicos, indicando a existência de possíveis fatores inibitórios que poderão comprometer a decomposição dos resíduos depositados no solo, bem como a sua funcionalidade bioquímica.

3.2 Ocorrência de FMAs

Apesar do solo ter sofrido grandes alterações e ter permanecido quase desprovido de vegetação por vários anos, ainda foi encontrada uma densidade média de 4 esporos 50 g^{-1} solo, sendo verificado apenas um tipo de esporo, do gênero *Glomus* (Figura 1a).

O ensaio de infectividade pelo método do número mais provável indicou o valor de 0,34 propágulos infectivos g^{-1} solo, com o intervalo de confiança de 0,1-1,11. O resultado encontrado neste trabalho encontra-se abaixo do verificado na única referência encontrada que avaliou de propágulos infectivos de FMAs em solos contaminados com hidrocarbonetos (Cabello, 1997). A autora encontrou nos solos poluídos na Argentina 2,26 propágulos infectivos g^{-1} solo e na Alemanha 3,40 propágulos infectivos g^{-1} solo, sendo que em ambos locais havia presença de espécies espontâneas colonizando a área, que podem contribuir para uma maior densidade de propágulos no solo. Entretanto, a densidade de propágulos observada encontra-se dentro dos valores descritos por Souza & Guerra (1998), variando entre 0,29 a 13 propágulos infectivos g^{-1} solo, como densidades mínima e máxima encontrada em áreas agrícolas no estado do Rio de Janeiro. Densidade bem mais elevada foi verificada por Melloni (2001), de 42,5 propágulos infectivos g^{-1} solo, em campo com espécies gramíneas e arbustivas, sem intervenção antrópica, no sul de Minas Gerais. O constante revolvimento do solo na área de Landfarming impede o estabelecimento de vegetação espontânea, o que tende reduzir a densidade de esporos e de propágulos infectivos.

A presença de colonização micorrízica foi verificada com a observação microscópica de raízes coloridas, das seis espécies vegetais cultivadas por 14 semanas, variando de 35% no sorgo a 62% no kudzu tropical (Tabela 3),

confirmando a presença de propágulos infectivos no solo de "landfarming" eficientes em estabelecer a simbiose micorrízica.

TABELA 3 Colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares em plantas cultivadas em solo de área de "landfarming" de resíduos petroquímicos com 15 anos de atividade, no município de Camaçari-BA. Média de 4 repetições.

Espécies vegetais	Não inoculado
Kudzu tropical	62 ± 0,93 ¹
Alfafa	55 ± 4,28
Braquiária	52 ± 3,05
Mucuna-preta	38 ± 0,93
Capim-elefante	38 ± 2,18
Sorgo	35 ± 1,64

¹erro-padrão da média.

A colonização micorrízica em solos contaminados com hidrocarbonetos também foi verificada por Cabello (1997), destacando-se também presença abundante de vesículas nas raízes colonizadas das plantas introduzidas (Figura 1b e c).

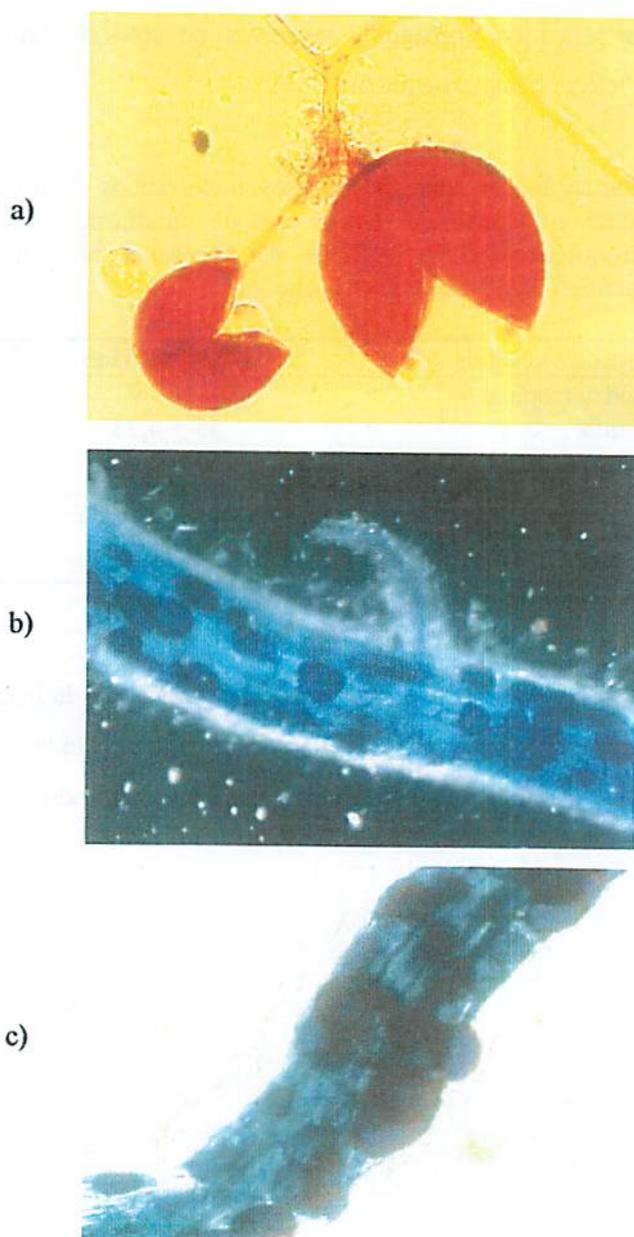


FIGURA 1 Estruturas utilizadas para avaliação de ocorrência de FMAs. (a)= Esporos de *Glomus* sp. extraídos da área de Landfarming; (b)= raiz de braquiária colonizada por *Glomus* sp.; (c)= raiz de capim-elefante colonizada por *Glomus* sp.

3.3 Efeito de FMAs no crescimento de plantas

Nos ensaios com planta, verificou-se que as espécies vegetais responderam de modo diferenciado à inoculação com FMAs (figura 2). A inoculação com a mistura de dois isolados de FMAs da UFLA proporcionou efeito significativo na produção de massa seca da parte aérea da alfafa, kudzu tropical e sorgo (Figura 3a, 3b e 3e), destacando-se um aumento na produção de massa vegetal da alfafa em torno de 78% com a inoculação. Para mucuna-preta, braquiária e capim-elfante não foram observados efeitos significativos com a inoculação, entretanto esta proporcionou um aumento na massa seca da parte aérea de 37 e 33%, para mucuna-preta e braquiária (Figura 3c, 3d e 3f).

Dê modo semelhante à massa seca da parte aérea, a massa seca das raízes aumentou de forma significativa com a inoculação para a alfafa (Figura 4a). Já para mucuna-preta e braquiária, diferente do que foi observado para a parte aérea, a inoculação proporcionou um aumento significativo nas raízes (Figura 4c e 4d). Não foi verificado efeito para o kudzu tropical, sorgo e capim-elfante (Figura 4b, 4e e 4f), sendo que o sorgo e o capim-elfante apresentaram o seu crescimento limitado a partir da 8ª semana, provavelmente devido ao tamanho do vaso (3 dm³).

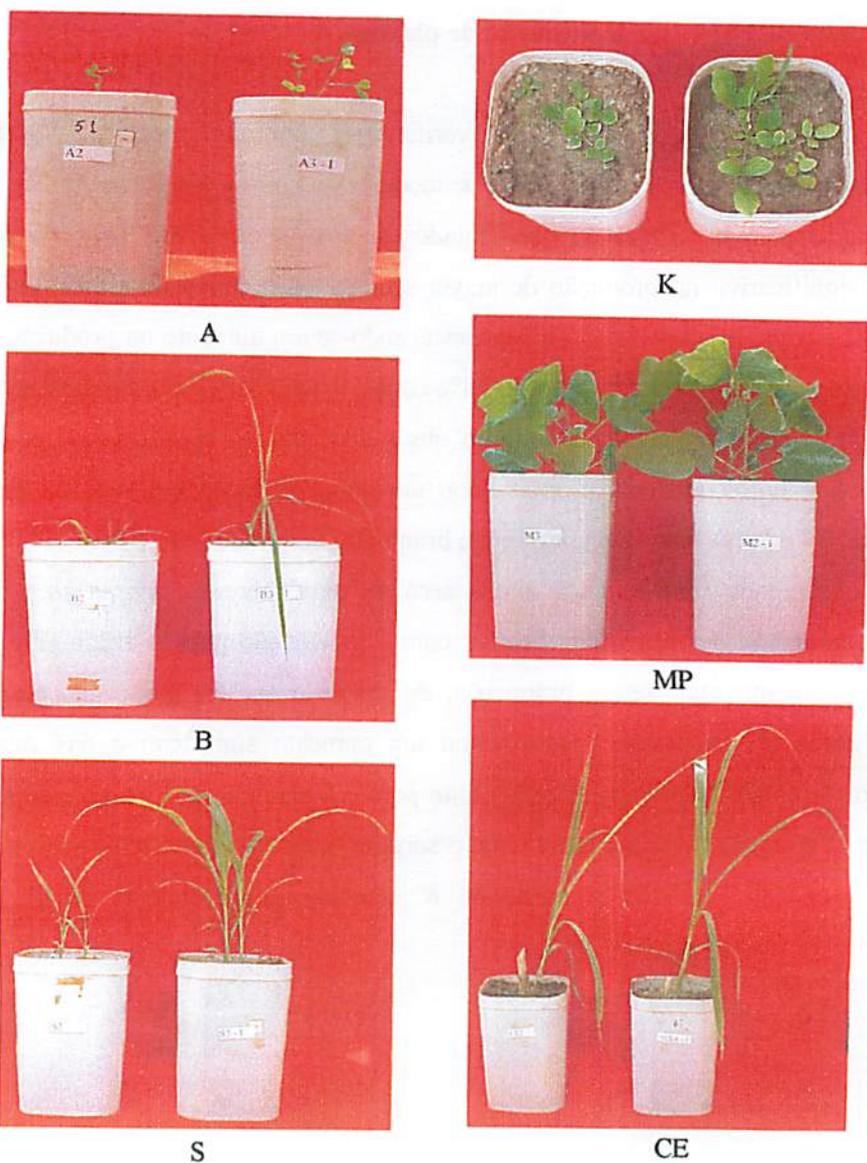


FIGURA 2 Efeito da inoculação de FMAs no crescimento de espécies vegetais cultivadas em solo tratado com "landfarming" aos 35 dias; CE= capim-elefante; B= braquiária; S=sorgo; A= alfafa; MP= mucuna-preta; K= kudzu tropical; vasos da esquerda= não-inoculados; vasos da direita= inoculado.

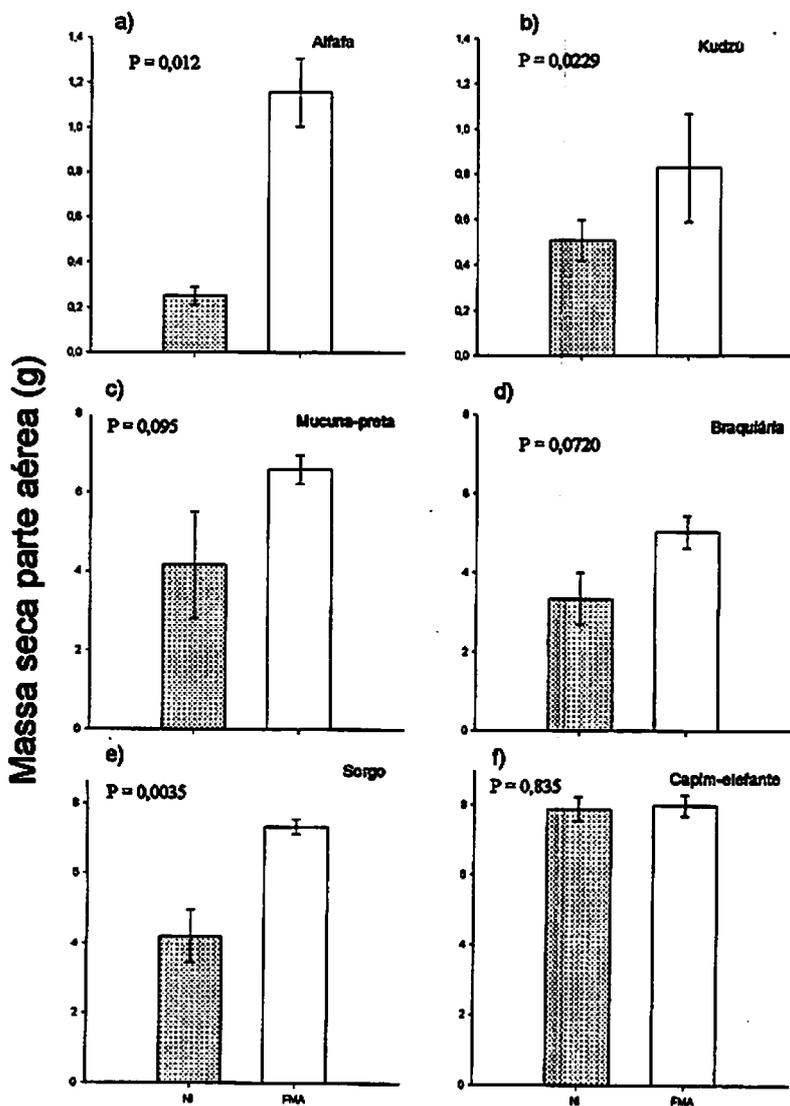


FIGURA 3 Massa seca da parte aérea de espécies vegetais cultivadas em solo de "landfarming" de resíduos petroquímicos, inoculadas (FMA) ou não (Ni) com FMAs. a) ensaio 1; b) ensaio 2; c) ensaio 3; d) ensaio 4; e) ensaio 5 e f) ensaio 6. Barra de erro é o erro-padrão. P é a probabilidade de $F_c > F$. Média de 4 repetições.

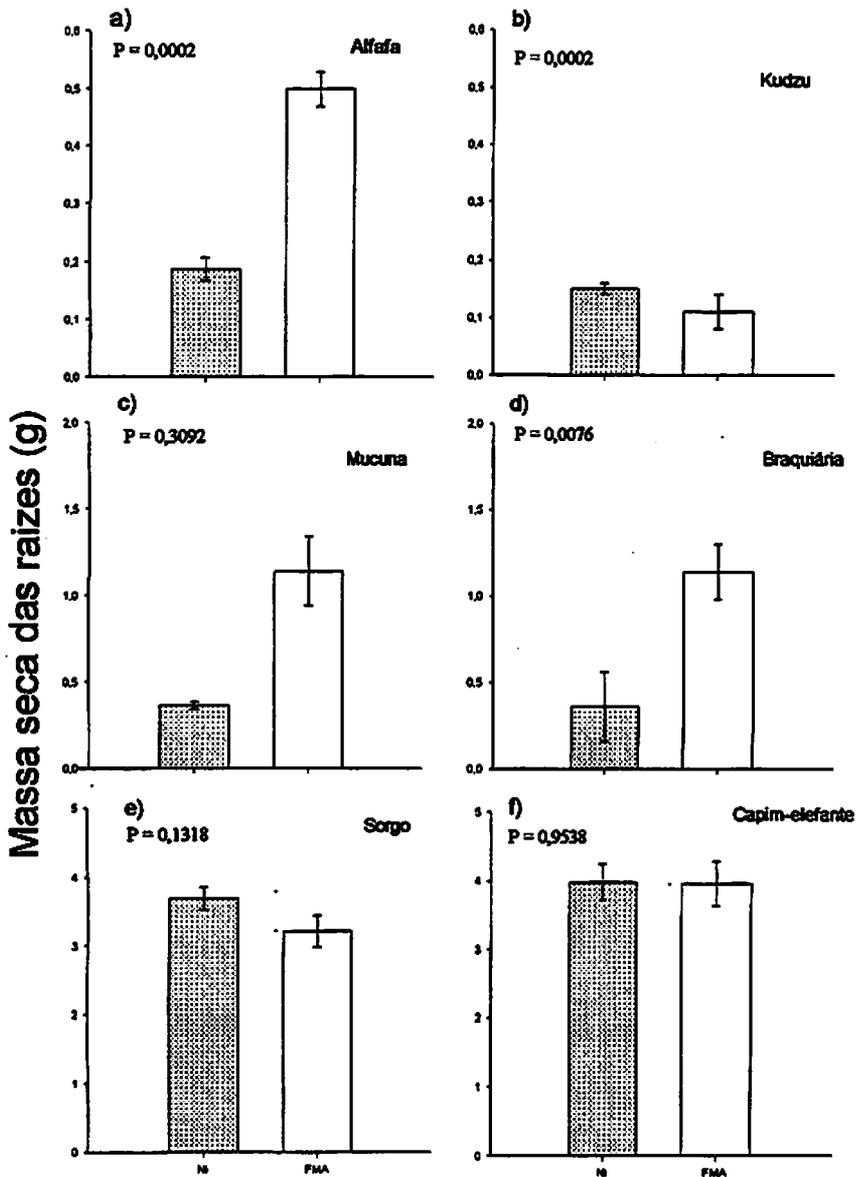


FIGURA 4 Massa seca das raízes das espécies vegetais cultivadas em solo de "landfarming" de resíduos petroquímicos, inoculadas (FMA) ou não (Ni) com FMAs. a) ensaio 1; b) ensaio 2; c) ensaio 3; d) ensaio 4; e) ensaio 5 e f) ensaio 6. Barra de erro é o erro-padrão. P é a probabilidade de $F_c > F$. Média de 4 repetições.

Na relação entre massa seca parte aérea e raízes (MSPA/MSR), não foram observadas diferenças significativas para alfafa, kudzu tropical, braquiária e capim-elefante (Figuras 5a, 5b, 5d e 5f). Mucuna-preta e sorgo tiveram seu crescimento radicular favorecido pela inoculação (Figura 5c e 5e).

Apesar da baixa densidade de esporos recuperados no solo, a porcentagem de raiz colonizada por FMAs não diferiu entre os tratamentos inoculado e não inoculado para alfafa, kudzu tropical, mucuna-preta e braquiária, constatando-se altos valores médios de colonização de 60% na alfafa e 65% no kudzu tropical (Figura 6a, 6b, 6c e 6d). No entanto, efeito significativo da inoculação foi observado para sorgo e capim-elefante, com a inoculação de FMAs. Destacam-se os altos valores de colonização nos tratamentos não inoculados em todos os ensaios, com colonização superior a 50% nas espécies alfafa, kudzu e braquiária. Esses altos valores de colonização micorrízica foram inesperados para o tratamento não inoculado em todos os ensaios, uma vez que a área de "landfarming" encontra-se quase que permanentemente sem vegetação, devido ao constante revolvimento do solo.

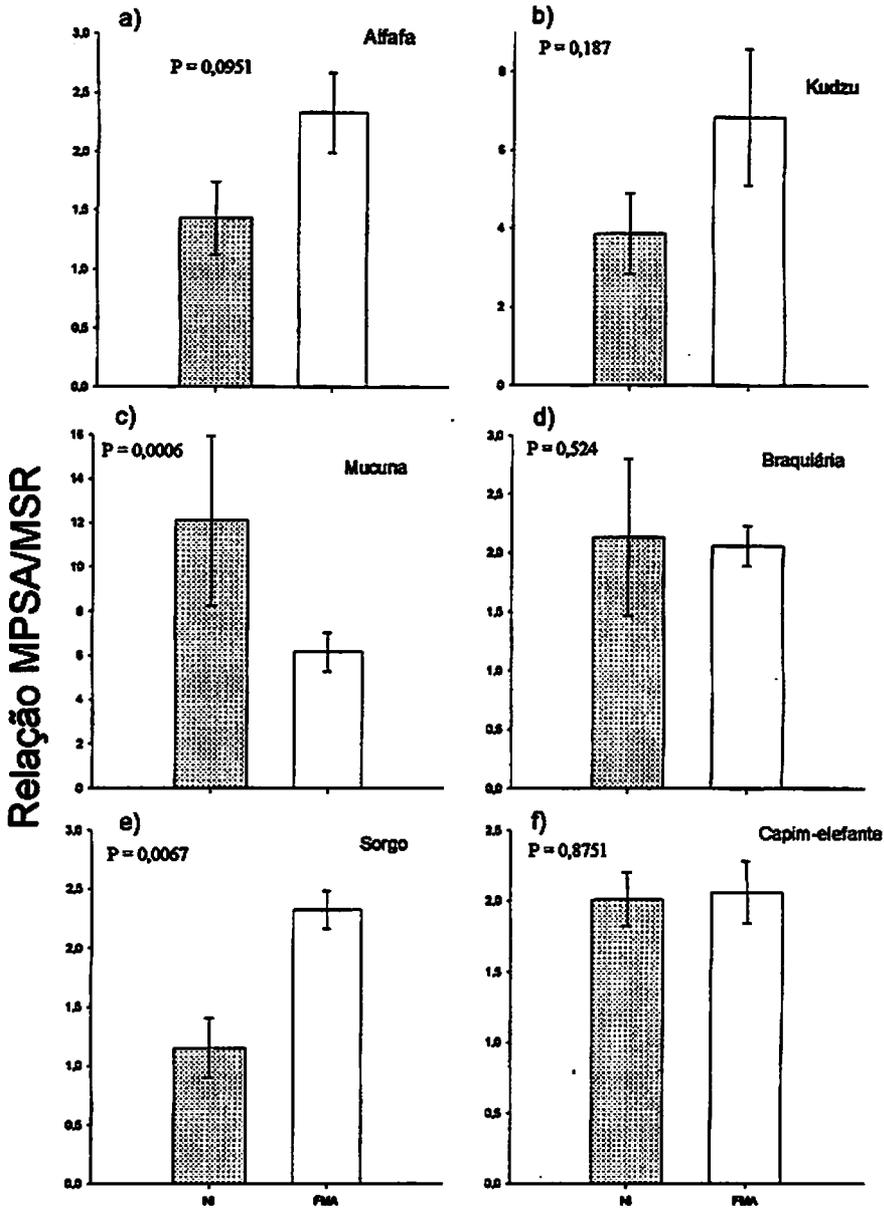


FIGURA 5 Relação MPA/MSR das espécies vegetais cultivadas em solo de "landfarming" de resíduos petroquímicos, inoculadas (FMA) ou não (Ni) com FMAs. a) ensaio 1; b) ensaio 2; c) ensaio 3; d) ensaio 4; e) ensaio 5 e f) ensaio 6. Barra de erro é o erro-padrão. P é a probabilidade de $F_c > F$. Média de 4 repetições.

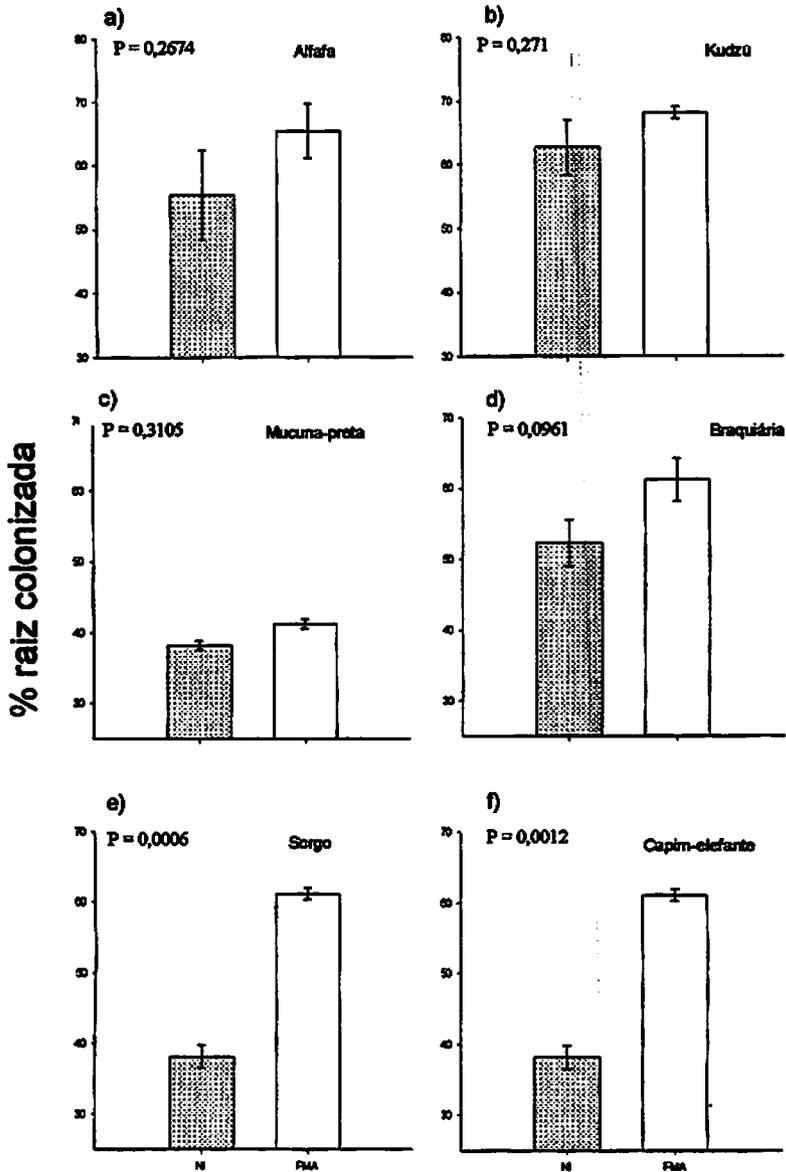


FIGURA 6 Colonização micorrizica das espécies vegetais cultivadas em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos, inoculadas (FMA) ou não (Ni) com FMAs. a) ensaio 1; b) ensaio 2; c) ensaio 3; d) ensaio 4; e) ensaio 5 e f) ensaio 6. Barra de erro é o erro-padrão. P é a probabilidade de $F_c > F$. Média de 4 repetições.

Estudos recentes confirmam o efeito benéfico da inoculação com FMAs no crescimento de plantas em solos contaminados com poluentes orgânicos (Joner & Leyval, 2003). Estes autores observaram que a presença de micorrizas acentuou o crescimento das plantas cultivadas em solos industrialmente poluídos com compostos orgânicos. O efeito da inoculação no crescimento da alfafa também foi constatado por Cabello (1999), que observou uma notável dependência micorrízica de plantas de alfafa cultivadas em substrato contaminado com hidrocarbonetos. Como constatado, a associação micorrízica aliada ao potencial tolerante e fitorremediador confirmado por Reilley et al. (1996) e Pradhan et al. (1998), indica que a alfafa e sorgo apresentam grande potencial em áreas de “landfarming” nas condições tropicais. As espécies vegetais kudzu tropical, mucuna-preta e braquiária, que responderam a inoculação com FMAs, e o capim-elefante, que não respondeu a inoculação mas apresentou um bom crescimento vegetativo, são promissoras para serem utilizadas em programas de revegetação de áreas contaminadas com poluentes orgânicos e em estudos adicionais quanto ao potencial fitorremediador dessas espécies.

A presença de plantas espontâneas também foi avaliada. As plantas espontâneas ocorreram de modo generalizado entre os tratamentos, excetuando-se os tratamentos com capim-elefante e mucuna-preta. Na figura 7, são apresentados os valores de frequência de ocorrência de espécies espontâneas. Por meio de avaliação visual das plantas foram identificadas 6 espécies: *Digitaria* sp. (capim-colchão), *Cyperus difformis* L. (tiririca), *Eleusine indica* (L.) Gaertn. (capim pé-de-galinha), *Portulaca oleracea* L. (beldroega), *Setaria geniculata* P. Beauv. (capim rabo-de-raposa) e uma espécie da família *Compositae*. Destaca-se a elevada incidência das espécies *Digitaria* sp e *Cyperus difformis* L. A ocorrência destas espécies, além de confirmar a possibilidade de crescimento vegetal neste solo, é de grande interesse pois pode

orientar estudos posteriores para a seleção de plantas espontâneas nativas dessa condição de contaminação, com capacidade para sustentar massa verde suficiente para proporcionar uma cobertura do solo adequada.

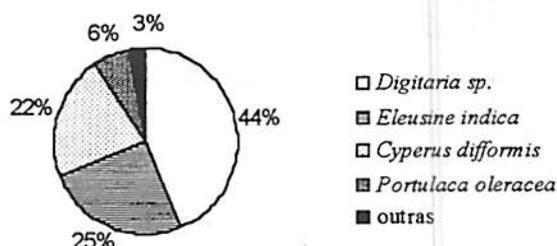


FIGURA 7 Frequência de ocorrência de plantas espontâneas provenientes de solo de "landfarming", em vaso cultivado com diferentes espécies vegetais.

Estas espécies também apresentaram diferentes graus de colonização micorrízica (Tabela 4). *Digitaria sp.* e *Eleusine indica* apresentaram os maiores valores de colonização micorrízica e foram às espécies dominantes, destacando-se de mesmo modo o efeito da inoculação com FMAs, que favoreceu a colonização destas plantas. A presença de colonização em plantas espontâneas indica também a possibilidade de aumentar o número de propágulos infectivos de fungos nesse solo, através da manutenção dessas espécies a fim de manejar a população nativa de fungos e dessa forma utilizar os benefícios dessa simbiose na dissipação de poluentes e revegetação da área. A seleção de plantas espontâneas tolerantes à contaminação com poluentes orgânicos pode auxiliar na redução desses contaminantes, como verificado por Escalante-Espinosa et al.

(2004). Em seu estudo, os autores avaliaram o potencial de uma espécie nativa de área contaminada com hidrocarbonetos e constataram uma grande redução dos compostos poluentes presentes no solo, resultado que foi acentuado com a inoculação de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, selecionados do local contaminado.

TABELA 4 Colonização micorrízica das espécies espontâneas observadas em solo de "landfarming" não-inoculado e inoculado com FMAs.

Espécies espontâneas	Não inoculado	Inoculado
	— % —	
<i>Digitaria</i> sp.	39	65
<i>Eleusine indica</i>	26	51
<i>Cyperus difformis</i> .	7	18
<i>Portulaca oleracea</i>	6	0

No quarto ensaio, verificou-se que o crescimento da braquiária, avaliado pela produção de massa seca da parte aérea e raízes, diferiu significativamente entre os tratamentos (Figura 8). A maior produção de massa seca da parte aérea e das raízes foi observada no tratamento NA-I (solo não autoclavado e inoculado com FMAs), e a menor produção ocorreu no tratamento NA (solo não autoclavado e não inoculado com FMAs), sendo esta semelhante ao tratamento A (solo autoclavado e não inoculado com FMAs), sem a presença de colonização micorrízica (Figura 8a e b). Esses resultados mostram que a população de FMAs indígenas do solo não exerceu efeito sobre o crescimento da braquiária, em relação aos FMAs introduzidos. Para a relação MSPA/MSR foi verificada diferença apenas entre os tratamentos A e NA-I, sendo que no solo não autoclavado, as plantas produziram uma maior massa de raízes, o que acarretou em uma menor relação MSPA/MSR (Figura 8c). A menor produção de raízes no tratamento A pode ter sido ocasionada pelo efeito da autoclavagem sobre os poluentes residuais presentes no solo, que possivelmente podem ter

afetado o desenvolvimento das raízes, resultando em uma maior relação MSPA/MSR. Quanto à colonização micorrizica, foi observado o mesmo comportamento apresentado pela massa seca de parte aérea, sendo a maior taxa de colonização constatada no tratamento NA-I, de 56% (Figura 8d).

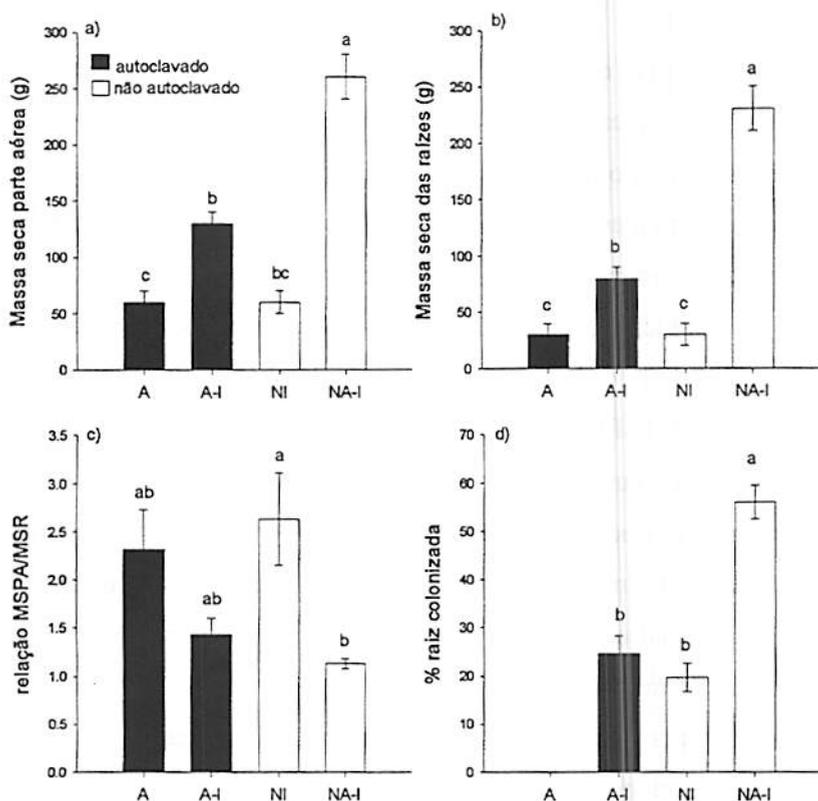


FIGURA 8 Produção de massa seca parte aérea (MSPA) (a), raízes (MSR) (b), relação MSPA/MSR (c) e porcentagem de raiz colonizada (d) de braquiária em solo de área de "landfarming". NI = não inoculado; INOC = inoculado com FMAs. Barra de erro é o erro-padrão, média de 8 repetições.

Já no tratamento NA Ni com o resultado de 20% de raiz colonizada, a população de FMAs indígenas proporcionou uma taxa de colonização semelhante ao tratamento A i (solo autoclavado e inoculado) que foi 24%, embora este tenha sido um pouco maior, indicando que apesar da baixa densidade de propágulos infectivos existentes (item 3.3) e da contínua aplicação de resíduos petroquímicos, a população indígena de FMAs ainda é capaz de estabelecer a simbiose.

A autoclavagem do solo acarretou em uma redução na produção de massa seca da parte aérea e raízes, como também na colonização micorrízica, para o tratamento Ai. Isto pode ter sido ocasionado pela liberação de compostos residuais tóxicos presentes no solo, como verificado na literatura (Dadkhah & Akgerman, 2002), o emprego de alta pressão e temperatura associada a umidade é utilizado na liberação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) presentes no solo.

O efeito de FMAs de áreas contaminadas por hidrocarbonetos no crescimento de plantas também foi avaliado por Cabello (1999), que diferente do observado neste trabalho, verificou que um isolado de área contaminada, *Glomus geosporum*, foi mais eficiente em promover o crescimento de alfafa, em substrato contendo hidrocarbonetos de petróleo, em comparação com outros isolados de áreas contaminadas.

Os resultados encontrados possibilitam a realização de estudos adicionais relacionados ao monitoramento da atividade heterotrófica de solos de “landfarming” de resíduos petroquímicos, visando avaliar a capacidade da comunidade microbiana em tolerar a contínua aplicação de resíduos, bem como estudos quanto a eficiência de FMAs indígenas e o manejo dessa população na colaboração em estratégias de revegetação dessas áreas.

4 CONCLUSÕES

1 - O solo de área de "landfarming" mesmo após a aplicação continuada de resíduos oleosos da indústria petroquímica apresenta uma comunidade microbiana heterotrófica adaptada ao substrato e princípios tóxicos desses resíduos, mantendo-se em atividade degradadora. Entretanto parâmetros bioquímicos indicam a existência de algum fator inibitório que poderá comprometer a decomposição dos resíduos depositados no solo, bem como a sua funcionalidade bioquímica.

2 - Mesmo sendo submetido a constante revolvimento mecânico e reduzida vegetação, o solo da área de "landfarming" apresentou incidência de propágulos infectivos de FMAs capazes de garantir elevada colonização em plantas espontâneas e introduzidas.

3 - Todas as espécies vegetais introduzidas crescem no solo, porém apresentam algum sintoma de estresse e respondem de modo diferenciado a inoculação com FMAs.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEF, K. Estimation of soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Method in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic press, 1995. p. 214-219.

ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M. A.; NOCERINO, G.; BERNASCORRI, S.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzymes activities of PAH polluted soils. **Chemosphere**, Dordrecht, v. 57, p. 401-412, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 jan. 2005.

BENNETT, J. E.; WOOMER, P. L.; YOST, R. S. **User manual for MPNES Most-Pobable-Number Enumeration System**. Ver. 1. 0. nifTAL Project and University of Hawaii, 1990.

CABELLO, M. N. Effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated from hydrocarbon polluted soils. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 89-95, 1999.

CABELLO, M. N. Hydrocarbon pollution: its effects on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 233-236, Mar. 1997.

CABELLO, M. N. Mycorrhizas and hydrocarbons. In: GADD, G. M. **Fungi in Bioremediation**, Cambridge: University Press, 2002. p. 456-471.

CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Atividade enzimática e biomassa microbiana em solo contaminado com metais pesados. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO**, 29., 2003, Ribeirão Preto – SP. Anais... Ribeirão Preto, 2003. CD-ROM.

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 56, p. 55-114, 1996.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo**. 2002. 84 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

DADKHAH, A. A.; AKGERMAN, A. Hot water extraction with in situ wet oxidation: PAHs removal from soil. **Journal of Hazardous Materials, B** Amsterdam, v. 93, p. 307-320, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 jan. 2005.

DICK, R. P.; BREAKWELL, D. P.; TURCO, R. F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J. W.; JONES, A. J. (Ed.). **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996. p. 247-272.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo** / Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 2 ed. ver. atual. Rio de Janeiro, 1997. 212p.

ESCALANTE-ESPINOSA, E. et al. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. Inoculated with a microbial consortium in a model system. **Chemosphere**, Dordrecht, Article in press, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 20 dez. 2004.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45. , 2000, São Carlos. **Anais. . . São Carlos: UFSCar**, 2000. p. 255-258.

FRANCO, I. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 121, n. 1/2, p. 17-30, July 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 dez. 2004.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New phytologist**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

HUANG, X. D.; EL-ALAWI, Y.; PENROSE, D. M.; GLICK, B. R.; GREENBERG, B. M. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 130, n. 3, p. 453-464, Aug. 2004.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. M. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. (Ed.) **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1981. v. 5, p. 415-571.

JOERGENSEN, R. The fumigation extraction method. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p. 382-387.

JONER, E. J.; LEYVAL, C. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science & Technology*, Washington, v. 37, n. 11, p. 2371-2375, June 2003.

KIRK, J. L.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. The effects of perennial ryegrass and alfafa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution*, London, v. 133, n. 3, p. 455-465, Feb. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 dez. 2004.

LOPES, E. S.; OLIVEIRA, E.; DIAS, R.; SCHENICK, N. C. Occurrence and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in coffee (*Coffea arabica* L.) plantations in Central São Paulo State, Brazil. *Turrialba*, San José, v. 33, n. 4, p. 417-422, oct./dic. 1983.

MALISZEWSKA-KORDYBACH, B.; SMRECZAK, B. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) – Effect on plants. *Environmental Technology*, London, v. 21, p. 1099-1110, 2000.

MARCHIORI-JUNIOR, M.; MELO, W. J. Carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 23, n. 2, p. 257-263, abr./jun. 1999.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, Dordrecht, v. 40, n. 4, p. 339-346, Feb. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 16 dez. 2004.

MARTIN, J. A.; HERNANDEZ, T; GARCIA, C. Biorremediation of oil refinery sludge by Landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environmental Research*, 2004. Article in press. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 20 dez. 2004.

MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e

perenes na região de Primavera do Leste (MT). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 435-444, jul./set. 1999.

MELLONI, R. **Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em solos de mineração de bauxita**. 2001. 173 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.

PFENNING, L.; EDUARDO, B. P.; CERRI, C. C. Os métodos da fumigação-incubação e fumigação-extração na estimativa da biomassa microbiana de solos de Amazônia. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 16, n. 1, p. 31-37, jan./abr. 1992.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v. 55, n. 1, p. 158-161, Aug. 1970.

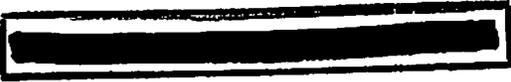
PRADHAN, S. P.; CORRAD, J. R.; PATEREK, J. R.; SRIVASTAVA, V. J. Potential of phytoremediation for treatment of PAH's in soil at MGP sites. *Journal of Soil Contamination*, Boca Raton, v. 7, n. 4, p. 467-480, 1998.

REILLEY, K. A.; BANKS, M. K.; SCHWAB, A. P. Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality*, Madison, v. 25, n. 2, p. 212-219, March-April, 1996.

SAUERBRONN, J. L. B. Gestão de resíduos sólidos na Petrobras. In: SEMINÁRIO DE RESÍDUOS SÓLIDOS: gestão, tendências e novas tecnologias - ADVB/SP, abril de 2002. <<http://www2.ciesp.org.br/bolsa/index2.htm>> acessado em: 24 set. 2004.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo e perspectivas**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 24 p.

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. VA-mycorrhizae and mycorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 233-242, July 1991.



SOUZA, R. F. Micorriza e fósforo no crescimento de espécies forrageiras em solo de baixa fertilidade. 1998. 145 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

SPARLING, G. P. The substrate-induced respiration method. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). Method in applied soil microbiology and biochemistry. London: Academic Press, 1995. p. 397-404.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W. (Ed.). Methods of soil analysis. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 75-883. (SSSA Book Series 5).

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Assay of urease activity in soil. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v. 4, n. 4, p. 479-487, Nov. 1972.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: V. ALVAREZ, V. H.; SCHAEFEER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V. Tópicos em ciência do solo. Viçosa: SBCS, 2002. v. 2, p. 195-276.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 19, n. 6, p. 703-707, June 1987.

YEOMANS, J.C.; BREMMER, J.M.A. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. Communications in soil science and plant analysis, v. 19, n. 13, p. 1467-1476, 1988.

CAPÍTULO 3

CREOSOTO E ANTRACENO NO CRESCIMENTO E NA COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA DE *Brachiaria brizantha* e *Pueraria phaseoloides*.

RESUMO

PAULA, Alessandra Monteiro de. Creosoto e antraceno no crescimento e na colonização micorrízica de *Brachiaria brizantha* e *Pueraria phaseoloides*. 2005. Cap. 3. 18p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, MG*.

A contaminação do solo com poluentes orgânicos, especialmente aqueles derivados de petróleo, é um grave problema para a sociedade moderna que precisa ser resolvido. Tem-se preconizado o uso de plantas para acelerar a dissipação desses composto no solo, mas para isso é necessário conhecer seus efeitos sobre estas e sobre os microrganismos a elas associados. No presente estudo avaliou-se a influência do creosoto e do antraceno no crescimento e na colonização micorrízica de *Braquiária brizantha* (braquiária) e *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical). Para isso os poluentes foram aplicados ao solo em tubetes (290 cm³) em concentrações variadas: antraceno (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 g kg⁻¹ solo) e creosoto (0; 0,5; 1; 2 e 3 g kg⁻¹ solo) e testados na presença de propágulos do fungo micorrízico *Glomus etunicatum* e mantidas para crescimento por seis semanas, quando foram cortadas e avaliadas. Quanto aos efeitos nestas plantas verificou-se que o antraceno não afetou o crescimento da *P. phaseoloides* e estimulou o crescimento de *B. brizantha* em baixa concentração. Este composto reduziu de modo acentuado a colonização micorrízica do kudzu. O creosoto reduziu o crescimento da braquiária e não teve efeito no kudzu, onde a colonização micorrízica foi também fortemente reduzida pelo poluente, havendo completa inibição em concentrações superiores 2 g kg⁻¹ solo de creosoto. O kudzu mostrou-se insensível à contaminação do solo com esses poluentes, enquanto a braquiária apresentou um pequeno estímulo a baixas concentrações de antraceno e redução no crescimento com o creosoto. O kudzu apresenta potencial para estudos de revegetação de áreas impactadas com estes poluentes.

* Comitê de orientação: José Oswaldo Siqueira – DCS-UFLA (Orientador)

ABSTRACT

Paula, Alessandra Monteiro de. Creosote and anthracene on growth and arbuscular mycorrhizal colonization of *Brachiaria brizantha* and *Pueraria phaseoloides*. 2005. Cap. 3. 16p. Dissertation (Master degree in Soils and Plants Nutrition) – Universidade Federal de Lavras, MG*.

Soil contamination by organic pollutants, especially those derived from petroleum, is a serious problem of the modern society that need to be resolved. It has been proposed that plants can be used to accelerate the dissipation of these compounds in the soil. But this requires knowledge of the effects of these pollutants on plants and their associated microorganisms. In the present study it evaluated the influence of creosote and anthracene on growth and mycorrhizal colonization of *Bracchiaria brizantha* and *Pueraria phaseoloides*. Pollutants were applied to soil placed in plastic tubes (290 cm³) at increasing concentrations: anthracene (0; 0,25; 0,5; 0,75 and 1 g kg⁻¹ soil) and creosote (0; 0,5; 1; 2 and 3 g kg⁻¹ soil) in the presence of propagules of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum* and allowed to growth for six weeks when they were cut and assessed. It found that anthracene did not affect the growth of *P. phaseoloides* and had a slight benefit on growth of *B. brizantha* at the lowest concentration. Mycorrhizal colonization of *P. phaseoloides* was drastically reduced by this compounds and no colonization was found in *B. brizantha*. Creosote also reduced the growth of *B. brizantha* had no effect on *P. phaseoloides* growth whereas AM colonization was strongly reduced by this pollutant, being completely inhibited at the highest concentration (2 g kg⁻¹ soil). Because of its insensitivity to creosote and anthracene *P. phaseoloides* presents potential for revegetation studies of impactated areas with these pollutants.

1 INTRODUÇÃO

A intensificação das atividades industriais e agrícolas em consequência do desenvolvimento tecnológico e crescimento populacional observado nas últimas décadas, tem ocasionado aumento dos níveis de contaminantes orgânicos no solo. Os poluentes orgânicos derivados de petróleo e do coque destacam-se dentre os demais contaminantes, devido ao grande volume de produção, industrialização, transporte e usos diversos dos seus derivados (Schwab & Banks, 1999; Prince & Drake, 1999). A contaminação do solo por creosoto, óleo produzido pela destilação do coque amplamente utilizado como preservante de madeira (Richter et al., 2003), é freqüente devido a vazamento de tanques, gotejamento de madeiras já tratadas, derramamentos e pela lixívia de lagos artificiais de contenção (Mueller et al., 1989). Isto contamina os solos, águas em lagoas de tratamento ou áreas de evaporação e o lençol freático. O creosoto derivado do alcatrão de hulha é uma mistura de compostos individuais, abrangendo diversas estruturas químicas, representando numerosos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e monocíclicos líquidos e sólidos (85%), compostos fenólicos (10%) e compostos S-, N- e O- heterocíclicos (5%). Dos 150 a 200 constituintes individuais do creosoto, apenas poucos compostos representam tipicamente 40 a 45% do produto. Essa complexa composição representa um desafio para as tecnologias que empregam tratamentos biológicos para desintoxicar locais contaminados (Mueller et al., 1989).

Dentre os compostos orgânicos encontrados no creosoto e em derivados de petróleo, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são poluentes de grande importância por causa dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos sobre os seres vivos (Muncnerova & Augustin, 1994). Apresentam várias ligações benzeno condensadas, sendo na maioria não-voláteis, representados por mais de 100 diferentes compostos como o antraceno, formado por 3 anéis aromáticos

fundidos (Prince & Drake, 1999). Em função das suas características químicas, os HAPs são relativamente resistentes a biodegradação, podendo se acumular em níveis substanciais no ambiente.

A introdução de plantas em áreas contaminadas pode aumentar a degradação desses poluentes orgânicos (Susarla et al., 2002; Huang et al., 2004a; Huang et al., 2004b), constituindo-se em processo tecnológico em grande expansão mundial, conhecido como fitorremediação. Essa tecnologia explora o efeito estimulante que as raízes têm sobre os processos microbianos e as modificações físico-químicas que estas provocam na rizosfera, as quais facilitam a degradação de HAPs na rizosfera conforme já demonstrado para várias espécies como alfafa, sorgo e capim-elefante (Schwab & Banks, 1994; citado por Cunningham et al., 1996; Reilley et al., 1996; Pradhan et al., 1998). Procurando aprimorar o processo de fitorremediação, Huang et al. (2004b) desenvolveram um sistema combinando “landfarming”, bioaumentação e o cultivo de gramínea (*Festuca arundinacea*) inoculada com rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) e constaram que o uso sinérgico dessas estratégias resultou em uma rápida e alta produção de biomassa vegetal, promovendo um aumento nos processos metabólicos ativos e conseqüentemente conduzindo a uma remoção mais rápida e completa de HAPs presentes em solo contaminado com creosoto. Pradhan et al. (1998) demonstraram que certos componentes carcinogênicos destes poluentes foram dissipados na presença de *Penisectun* sp.

Como a grande maioria das plantas encontra-se em condições naturais invariavelmente associadas a fungos mutualistas em suas raízes, formando as micorrizas, esta simbiose é de grande interesse no contexto da fitorremediação. Esses fungos ampliam o sistema radicular, facilitando a absorção de íons e de água do solo, aumentando a ação filtrante e purificadora do solo no ecossistema. As micorrizas arbusculares exercem efeito protetor sobre as plantas por meio de

melhoria do estado nutricional e redução do efeito de compostos fitotóxicos, como herbicidas (Siqueira et al., 1991).

Os estudos relacionados à contribuição de fungos micorrízicos arbusculares na revegetação e na reabilitação de ambientes contaminados com poluentes orgânicos são muito recentes e ainda em número reduzido (Binet et al., 2000; Joner & Leyval, 2001; Joner et al., 2001; Joner & Leyval, 2003a). Estes são fundamentados na hipótese de que esta simbiose possa contribuir para o estabelecimento e manutenção de plantas em ambientes contaminados com HAPs, bem como acentuar a dissipação desses compostos. Binet et al. (2000), investigando o destino de antraceno na rizosfera e micorrizosfera de azevém (*Lolium perenne*), verificaram que na presença de micorrizas, uma quantidade menor de antraceno foi translocada para a parte aérea, atribuindo à simbiose uma ação protetora que favorece a sobrevivência de plantas em ambientes contaminados com HAPs. A colonização micorrízica do trevo (*Trifolium repens*) e azevém (*Lolium perenne*) cultivadas juntas em solo contaminado com HAPs possibilitou um ganho no crescimento e melhorou as condições de degradação desses poluentes, constituindo-se em um fator biológico que deve ser considerado para a biorremediação de solos poluídos com substâncias orgânicas (Joner & Leyval, 2001). Em experimento com as mesmas espécies vegetais em solo artificialmente contaminados com antraceno, criseno e dibenz(a,h)antraceno, Joner et al. (2001) constataram a contribuição da associação micorrízica na dissipação desses compostos, onde foram verificadas no tratamento com micorrizas as maiores reduções dos poluentes presentes no solo, 66% de criseno e 42% dibenz(a,h)antraceno, enquanto que no tratamento sem micorriza as reduções foram de 56 e 20%, respectivamente. Segundo Joner & Leyval (2003a e b), os fungos micorrízicos podem contribuir na degradação de HAPs e no estabelecimento das espécies vegetais por meio de dois possíveis mecanismos. Primeiramente, a associação micorrízica pode alterar a fisiologia

radicular de modo a estimular a degradação de HAPs através de enzimas liberadas pelas plantas ou pelos organismos rizosféricos. Neste caso, plantas micorrizadas podem aumentar a atividade de enzimas oxidativas e peroxidases que são capazes de degradar HAPs. Por último, estes autores afirmam que associações micorrizicas podem afetar as propriedades de superfície das raízes (pouco estudado) ou propriedades do solo rizosférico que influenciam a disponibilidade de HAPs, como o aumento da adsorção destes compostos a fragmentos de raízes e outros tipos de material orgânico na rizosfera que são estimulados pela micorrização.

Não foi encontrada nenhuma publicação de estudos desta natureza realizado no Brasil que atualmente é um grande produtor e consumidor de petróleo e derivados, portanto gerando uma grande quantidade de resíduos poluentes. Desse modo, no presente trabalho avaliou-se o efeito da contaminação do solo com creosoto e antraceno, dois derivados de petróleo, no crescimento e na colonização de *Bracchiaria brizantha* (braquiária brizanta) e *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Um estudo composto de dois ensaios foi conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo (DCS), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG, para avaliar o efeito de antraceno (ensaio 1) e creosoto (ensaio 2) no crescimento e na colonização micorrizica de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú (braquiária brizanta) e *Pueraria phaseoloides* Benth. (kudzu tropical), durante o período de 6 semanas, entre setembro e novembro de 2004. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente causalizado, em esquema fatorial 5x2, compreendendo 5 doses de contaminante e as duas espécies vegetais, todas inoculadas com FMAs, totalizando 10 tratamentos, com 5 repetições. Empregou-se amostra de um Latossolo Vermelho-Amarelo coletado em área de mata no campus da UFLA, foi seca, peneirada em peneira de malha de 4 mm e submetida a análise química (Tabela 1). Para a correção do solo foi aplicado calcário calcítico, para elevar o índice de saturação por bases para 60%, encubando-se por 20 dias com o teor de umidade em torno de 60% do volume total de poros (VTP). Posteriormente, o solo foi fumigado com a aplicação de Brometo de metila 98% (Brometo de metila 98% + Cloropicrina 2%) na dosagem de $393 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-3}$, a fim de eliminar propágulos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) indígenas. Antes da semeadura foi realizada uma abubação com NPK (4-14-8), sendo aplicados 4 mg kg^{-1} solo de N, 7 mg kg^{-1} solo de P e 13 mg kg^{-1} solo de K. Em seguida, o solo foi transferido para tubetes de 290 cm^3 .

Para a inoculação empregaram-se propágulos de vasos de cultivo da coleção de FMAs do Laboratório de Microbiologia do Solo, do DCS-UFLA. A micorrização foi realizada através da inoculação, no momento da semeadura, com solo-inóculo contendo fragmentos de raízes colonizadas, hifas do solo e aproximadamente $100 \text{ esporos mL}^{-1}$ solo de *Glomus etunicatum*, sendo aplicados

3 ml de solo-inóculo por tubete. As sementes de braquiária brizanta e kudzu tropical foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado (10 minutos e 1 minuto, respectivamente). As sementes de kudzu foram também inoculadas com a estirpe de rizóbio SEMIA 6175 (BR 2613). Foram semeadas de 3 a 5 sementes, procedendo-se o desbaste para uma planta por tubete, 15 dias após a semeadura.

TABELA 1 Características químicas do Latossolo Vermelho-Amarelo coletado em área de mata do Campus da UFLA, utilizada no experimento.

pH	P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)
(água)	— mg dm ⁻³ —			— cmol _c dm ⁻³ —						
4,4	2,5	30	7,4	0,8	0,2	1,1	9,8	1,1	2,2	10,9
MO	V	m	ISNa	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
dag kg ⁻¹	— % —		mg L ⁻¹			— mg dm ⁻³ —				
2,9	10,2	50	1,46	8,8	0,7	68,9	3,7	1,4	0,6	8,4

No primeiro ensaio foram aplicadas 5 doses de antraceno, nas seguintes concentrações: 0, 250, 500, 750 e 1000 mg kg⁻¹ de solo, sendo estas concentrações definidas com base nos resultados de Joner & Leyval (2001). Para a aplicação do produto no solo, foram preparadas soluções de antraceno em álcool absoluto, sendo o solo constantemente movimentado durante um período de 15 dias, para a eliminação do solvente. Após a adição do antraceno, foram reintroduzidos os microrganismos nativos (exceto FMA) adicionando-se 50 mL kg⁻¹ solo de uma suspensão de solo. No segundo ensaio foram aplicadas 5 doses de Palum[®] (óleo a base de creosoto), nas seguintes concentrações: 0; 0,5; 1; 2 e 3 g g⁻¹ de solo, sendo estas concentrações baseadas em estudo realizado por Huang et al. (2004a), aplicando-se o produto diretamente no solo e incubado por um período de 15 dias. Os microrganismos nativos do solo (exeto FMA) foram reintroduzidos no solo conforme procedimento descrito para o primeiro ensaio.

Nos dois ensaios, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por seis semanas quando foram retiradas dos tubetes, separando-as em raízes e parte aérea, as quais foram secas em estufa com circulação de ar a 65 °C (até peso constante) para determinação da massa seca. Para avaliação da colonização micorrízica, aproximadamente 1 g de raízes frescas foram separadas para coloração, conforme Phillipis & Haymann (1970) e avaliadas quanto a porcentagem de raiz colonizada, segundo Giovannetti & Mosse (1980).

Os resultados foram submetidos à análise de variância através do uso do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000). Curvas de regressão foram ajustadas pelo programa TableCurve 2D for Windows v. 3.01 (Jandel Corp.).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se interação significativa entre as doses de antraceno e as plantas estudadas, sendo que a aplicação de antraceno no solo afetou a produção de massa seca da parte aérea de braquiária brizanta, não sendo observado efeito nas plantas de kudzu tropical (Figura 1-a). Embora as doses de antraceno tenham influenciado significativamente a produção de massa seca de braquiária brizanta, não foi obtido um ajuste polinomial para os dados. A dose inicial de $0,25 \text{ g kg}^{-1}$ solo estimulou o crescimento de braquiária brizanta. Esse resultado mostra que a contaminação com até 1 g kg^{-1} solo, no solo estudado, teve efeito negligível na braquiária brizanta e não restringiu o crescimento da kudzu tropical. O efeito estimulante de HAPs presentes no solo no crescimento de plantas também foi observado por (Maliszewska-Kordybach & Smreczak, 2000), embora em concentrações menores (0 a 100 mg kg^{-1} solo) que as utilizadas neste trabalho. Esses autores verificaram que concentrações de até 20 mg kg^{-1} solo de 4 HAPs (fluoreno, antraceno, pireno e criseno) não inibiram o crescimento de tomate, feijão, trigo e milho, e ao contrário estimularam o crescimento de aveia e girassol. O efeito dos HAPs sobre as plantas depende de sua disponibilidade no solo que é influenciado pelo teor de matéria orgânica do solo. O solo utilizado apresentou 3 dag kg^{-1} de solo, teor de matéria orgânica considerado médio (Tomé Jr, 1997), que pode contribuir para uma menor disponibilidade dos contaminantes no solo, uma vez que estes compostos são hidrofóbicos e tendem a se ligar aos componentes orgânicos do solo.

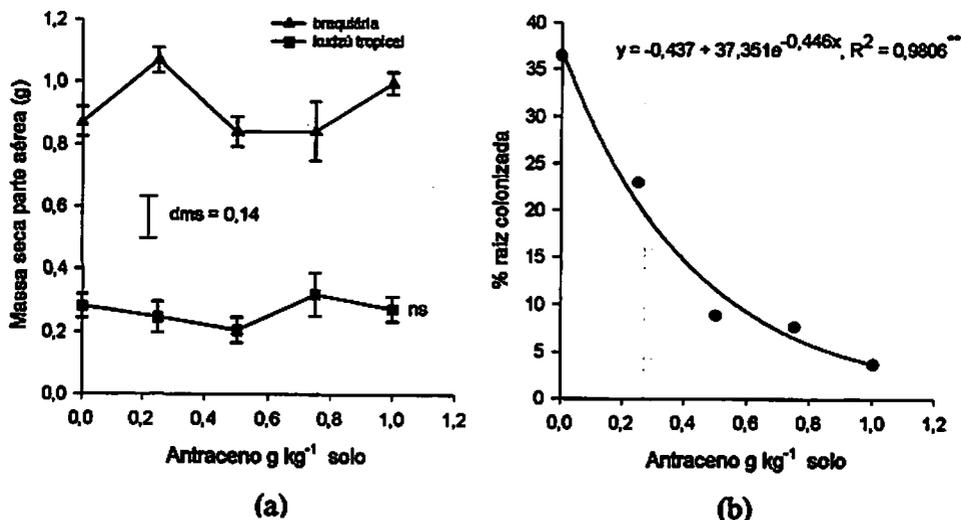


FIGURA 1 Massa seca da parte aérea de braquiária brizanta e kudzu tropical (a) e colonização micorrízica de kudzu tropical (b), em função de doses crescentes de antraceno. * diferença significativa (Tukey a 5%); ns – diferença não-significativa entre as doses.

Binet et al. (2000), avaliando o efeito da contaminação do solo com antraceno, verificou também que a adição do contaminante não afetou o peso seco da parte aérea e raízes do azevém (*Lolium perenne*) inoculado ou não com *Glomus mosseae*, sendo observado na plantas micorrizadas uma quantidade menor de antraceno transportada para a parte aérea, conferindo uma ação protetora e possibilitando uma maior chance de sobrevivência em ambientes com elevadas concentrações desse poluente.

A colonização micorrízica ocorreu apenas na kudzu tropical, reduzindo-se com a elevação das doses (Figura 1-b). A ausência de colonização na braquiária brizanta não pode ser explicada pelo efeito das doses do antraceno, uma vez que na ausência desse composto não houve colonização micorrízica. Isto possivelmente está relacionado com a espécie fúngica utilizada, uma vez que foi constatada a colonização micorrízica em braquiária brizanta inoculada

com *Glomus clarum* + *Paraglomus occultum*, no estudo anterior. Em experimento avaliando o efeito da inoculação com *Glomus etunicatum* e de doses de fósforo no crescimento de braquiária brizanta conduzida por 150 dias, Souza (1998) constatou uma taxa de colonização de apenas 5% em Latossolo Vermelho distrófico sem adição de fósforo, sendo a simbiose estimulada com a adição de 50 mg kg⁻¹ de fósforo, atingindo 44% de colonização. Em função do que foi verificado por Souza (1998), a colonização micorrízica da braquiária brizanta foi provavelmente afetada pelo curto período de condução do experimento (42 dias) e pelo baixo nível de fósforo do solo empregado no presente estudo (tabela 1).

No kudzu tropical, a redução mais acentuada ocorreu até 0,5 g kg⁻¹ de solo de antraceno, sendo verificado uma variação negativa de 75% em relação à colonização na ausência do contaminante, o que evidencia a forte ação inibitória desse produto sobre a colonização micorrízica nessa espécie vegetal. Joner & Leyval (2001) também verificaram o efeito negativo da contaminação com 500+500+50 mg kg⁻¹ solo de antraceno, criseno e dibenz(a,h)antraceno, com uma redução de 50% na colonização micorrízica do trevo (*Trifolium repens*) e azevém (*Lolium perenne*) cultivados juntos.

No ensaio com creosoto também foi observada a interação significativa entre as doses e as plantas estudadas (Figura 2-a).

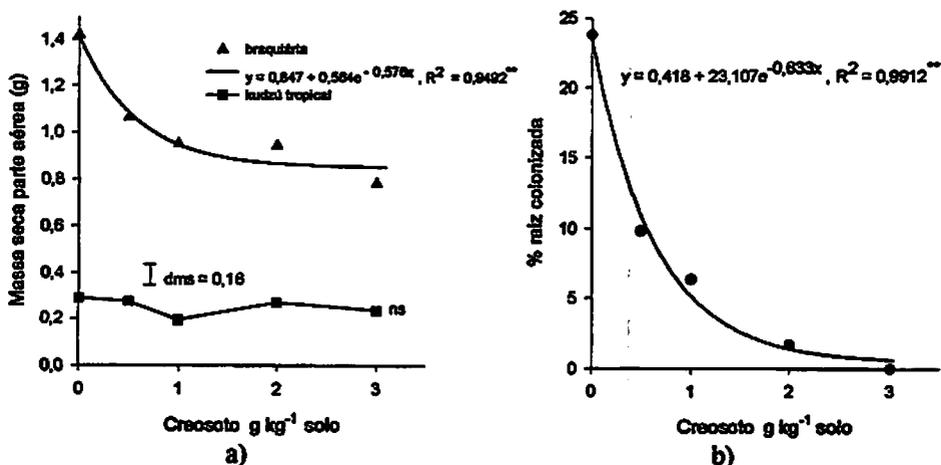


FIGURA 2 Massa seca da parte aérea de braquiária brizanta e kudzu tropical (a) e colonização micorrízica de kudzu tropical (b), em função de doses crescentes de creosoto. * diferença significativa (Tukey a 5%); ns. - diferença não-significativa entre as doses.

Para kudzu o comportamento foi semelhante ao observado no ensaio com antraceno, ou seja, não foi observado efeito. Para a braquiária brizanta foi verificado efeito negativo, com uma redução de 30% na massa seca de parte aérea na dose de 1 g kg⁻¹ de solo em relação a ausência de poluente. Nenhum efeito foi observado para kudzu tropical. As crescentes doses de creosoto reduziram de modo acentuado colonização de kudzu tropical, destacando-se a queda acentuada na taxa de colonização até a dose de 1 g kg⁻¹ solo de creosoto, que acarretou em uma redução de 74% em relação à ausência do contaminante (Figura 2-b). A ausência de efeito tanto do antraceno quanto do creosoto no crescimento do kudzu tropical pode estar relacionado com alguma tolerância da espécie à presença desses poluentes, nas concentrações estudadas. A contaminação do solo com antraceno mostrou-se mais inibitória à colonização

micorrízica no kudzu tropical em relação ao creosoto, de forma que a presença de 0,5 g kg⁻¹ de solo reduziu em 75% a colonização, sendo necessário 1 g kg⁻¹ de creosoto para promover o mesmo efeito. Como ocorrido no ensaio com antraceno, não foi observado colonização micorrízica nas raízes de braquiária. Huang et al. (2004b) avaliou o potencial de 3 gramíneas (*Festuca arundinacea*, *Poa pratensis* e *Elymus canadensis*) na fitorremediação de creosoto, como observado neste trabalho, as plantas apresentaram redução de massa seca da parte aérea, a partir da dose de 1 g kg⁻¹ de creosoto, sendo que a espécie mais tolerante, *F. arundinacea*, foi a que sofreu menor redução de massa seca da parte aérea e a que possibilitou a maior dissipação do contaminante. Os autores consideram que a produção de biomassa vegetal é crítica para a dissipação do contaminante.

Dessa forma, com os resultados obtidos, tem-se a possibilidade de realizar estudos adicionais visando avaliar a contribuição da inoculação com FMAs para o crescimento de plantas em solos contaminados com estes poluentes.

4 CONCLUSÕES

- 1- *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical) foi insensível aos dois poluentes enquanto a *Brachiaria brizantha* (braquiária brizanta) apresentou um pequeno estímulo a baixas concentrações de antraceno e redução no crescimento com o creosoto.
- 2- Ao contrário do efeito no crescimento das plantas, esses poluentes exerceram efeito inibitório na colonização micorrízica da *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical) por *Glomus etunicatum*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BINET, P.; PORTAL, J. M.; LEYVAL, C. Application of GC-MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass. **Organic Geochemistry**, v. 32, n. 2, 217-222, february, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em 11 dez. 2004.

CUNNINGHAM, S. D. et al. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 56, p. 55-114, 1996.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4.0. In: **REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA**, 45, 2000, São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GIOVANNETTI, M; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, n.3, p. 489-500, 1980.

HUANG, X. et al. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 130, n. 3, p.465-476, August, 2004a. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em 15 out. 2004.

HUANG, X. et al. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. **Environmental Pollution**, v. 130, n. 3, p. 453-464, august, 2004b. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em 15 out. 2004.

JONER, E. J. et al. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 13, p. 2773-2777, July, 2001.

JONER, E. J.; LEYVAL, C. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mycorrhiza**, v. 10, p. 155-159, 2001.

JONER, E. J.; LEYVAL, C. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 11, p. 2371-2375, June, 2003b.

JONER, E. J.; LEYVAL, C. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomie*, v. 23, p. 495-502, 2003a.

MALISZEWSKA-KORDYBACH, B.; SMRECZAK, B. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) – Effect on plants. *Environmental Technology*, v. 21, n. 10, p. 1099-1110, 2000.

MUELLER, J. G.; CHAPMAN, P. J.; PRITCHARD, P. H. Creosote-contaminated sites: Their potential for bioremediation. *Environmental Science & Technology*, v. 23, n. 10, p. 1197-1201, October, 1989.

MUNCNEROVA, D.; AUGUSTIN, J. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic-hydrocarbons – A review. *Bioresource Technology*, v. 48, n. 2, p. 97-106, 1994.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v. 55, n. 1, p. 158-161, Aug. 1970.

PRADHAN, S. P. et al. Potential of phytoremediation for treatment of PAH's in soil at MGP sites. *Journal of Soil Contamination*, v. 7, n. 4, p. 467-480, 1998.

PRINCE, R. C.; DRAKE, E. N. Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: ADRIANO, D. C. et al. (Eds.). *Bioremediation of Contaminated Soils*. *Agronomy*, n. 37, p. 89-110, 1999.

REILLEY, K. A.; BANKS, M. K.; SCHWAB, A. P. Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality*, v. 25, n. 2, p. 212-219, March-April, 1996.

RICHTER, D. L.; WARNER, J. I.; STEPHENS, A. L. A comparison of mycorrhizal and saprotrophic fungus tolerance to creosote in vitro. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 51, n. 3, p.195-202. April, 2003.

SCHWAB, P.; BANKS, K. Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soils. In: ADRIANO, D. C. et al. (Eds.). *Bioremediation of Contaminated Soils*. 1999. n.37, p.783-795.

SIQUEIRA, J.O. et al. The relationship between vesicular-arbuscular mycorrhiza and lime: Associated effects on the growth and nutrition of brachiaria grass (*Brachiaria decumbens*). *Biology & Fertility of Soils*, v. 10, p. 65-71, 1990.

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. VA-mycorrhizae and mycorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. *Plant and Soil*, Netherlands, v. 134, n. 2, p. 233-242, July, 1991.

SOUZA, R.F. Micorriza e fósforo no crescimento de espécies forrageiras em solo de baixa fertilidade. 1998. 145p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

SUSARLA, S.; MEDINA, V. F.; Mc CUTCHEON, S. C. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*, v. 18, n. 5, p. 647-658, June, 2002.

TOME JR., J.B. Manual para interpretação de análise de solo, Livraria Editora agropecuária, Guaíba, 1997, 247p.

ANEXOS

	páginas
- TABELA 1A Composição do meio de cultura seletivo para bactérias totais.....	86
- TABELA 2A Composição do meio de cultura seletivo para actinomicetos totais.....	86
-TABELA 3A Resumo do quadro de ANAVA para produção de massa fresca da parte aérea e colonização micorrízica do ensaio 7, com braquiária brizanta, inoculadas ou não com FMAs.....	93
-TABELA 4A Características químicas do Latossolo Vermelho- Amarelo coletado em área de mata do Campus da UFLA, utilizado como solo diluente no ensaio do número mais provável de propágulos infectivos de FMAs.....	93
-TABELA 5A Resumo do quadro de ANAVA para produção de massa seca da parte aérea e colonização micorrízica do ensaio com doses de antraceno em braquiária e kudzu tropical inoculadas com <i>Glomus etunicatum</i>	94
-TABELA 6A Resumo do quadro de ANAVA para produção de massa seca da parte aérea e colonização micorrízica do ensaio com doses de creosoto em braquiária e kudzu tropical inoculadas com <i>Glomus etunicatum</i>	94

TABELA 1A Composição do meio de cultura seletivo para bactérias totais.

Bactéria Total (Agar – Nutriente) (Wollum, 1982)	
Componentes:	Quantidade:
Peptona	5,0g
Extrato de carne	3,0g
Extrato de levedura	1,0g
Glicose	5,0g
Agar	15,0g
Água destilada	1000mL
pH = 6,8	
Solução de actidione (ciclohexamida 300 µg/L)	1mL*

TABELA 2A Composição do meio de cultura seletivo para actinomicetos totais

Actinomicetos totais (Agar – amido)	
Componentes:	Quantidade:
Amido solúvel	10,0 g
NaNO ₃	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
NaCl	0,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada para completar	1000 mL
pH = 7,0	

TABELA 3A Resumo do quadro de ANAVA para produção de massa fresca da parte aérea e colonização micorrizica do ensaio 7, com braquiária brizanta, inoculadas ou não com FMAs.

Variáveis	G.L.	Valor F	P ≤
Massa fresca (parte aérea)			
Tratamentos	3	63,43	0,01
Resíduo	28		
C.V. = 13,19 %			
Colonização micorrizica			
Tratamentos	3	33,00	0,01
Resíduo	28		
C.V. = 38,2 %			

TABELA 4A. Características químicas do Latossolo Vermelho-Amarelo coletado em área de mata do Campus da UFLA, utilizado como solo diluente no ensaio do número mais provável de propágulos infectivos de FMAs.

PH	P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	SB	(t)	(T)
(água)	— mg dm ⁻³ —					— cmol _c dm ⁻³ —				
6,6	1,4	20	7,4	3,4	1,9	0,0	2,3	5,4	5,4	7,7
MO	V	m	ISNa	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
dag kg ⁻¹	— % —			mg L ⁻¹		— mg dm ⁻³ —				
3,4	69	0	1,46	16,4	0,7	68,9	3,7	1,4	0,6	8,4

TABELA 5A Resumo do quadro de ANAVA para produção de massa seca da parte aérea e colonização micorrízica do ensaio com doses de antraceno em braquiária e kudzu tropical inoculadas com *Glomus etunicatum*.

Variáveis	G.L.	Valor F	P ≤
Massa seca (parte aérea)			
Doses	4	2,23	ns
Plantas	1	430,91	0,01
D x P	4	2,68	0,05
Resíduo	40		
C.V. = 18,82 %			
Colonização micorrízica (kudzu tropical)			
Doses	4	23,9	0,01
Resíduo	20		
C.V. = 23,82 %			

TABELA 6A Resumo do quadro de ANAVA para produção de massa seca da parte aérea e colonização micorrízica do ensaio com doses de creosoto em braquiária e kudzu tropical inoculadas com *Glomus etunicatum*.

Variáveis	G.L.	Valor F	P ≤
Massa seca (parte aérea)			
Doses	4	533,4	0,01
Plantas	1	15,86	0,01
D x P	4	4,25	0,01
Resíduo	40		
C.V. = 20,76 %			
Colonização micorrízica (kudzu tropical)			
Doses	4	9,05	0,01
Resíduo	20		
C.V. = 45,82 %			