



Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos¹

Alessandra M. de Paula², Cláudio R. F. S. Soares³ & José O. Siqueira³

RESUMO

Avaliaram-se, no presente trabalho, a biomassa microbiana, atividade heterotrófica e a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) de um solo de área de “landfarming” de resíduo petroquímico durante 15 anos. Realizaram-se análises laboratoriais e ensaios em casa de vegetação para avaliar as condições biológicas do solo e o efeito da inoculação com FMAs (*Glomus clarum* e *Paraglomus occultum*) no crescimento de seis espécies vegetais com potencial para estabelecimento nesses solos. A biomassa microbiana e os indicadores de atividade bioquímica (respiração basal, respiração induzida por substrato e qCO_2) apresentaram-se em valores típicos de solos não contaminados, exceto para o qCO_2 , que foram bem elevados. Esses resultados indicam a presença de comunidades microbianas ativas mas se verificou baixa atividade das enzimas β -glicosidase, fosfatase ácida e urease, indicando interferências nos processos bioquímicos do solo o que poderá comprometer sua capacidade de transformar os resíduos. Verificou-se também a ocorrência abundante de FMAs em plantas espontâneas ou introduzidas. Foi notória a resposta positiva da inoculação com FMAs sobre o crescimento da alfafa, braquiária e sorgo, porém sem influência no crescimento do capim-elefante. Esses resultados apontam a existência de populações microbianas tolerantes aos componentes tóxicos dos resíduos petroquímicos aplicados continuamente ao solo estudado.

Palavras-chave: biorremediação, enzimas, heterotróficos, micorrizas

Biomass, microbial activity and mycorrhizal fungi in landfarming soil of petrochemical wastes

ABSTRACT

In the present study the microbial biomass, heterotrophic activity and the occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were evaluated in soil samples from a landfarming area that has been used for petrochemical waste treatment for the last fifteen years. Laboratory analysis and greenhouse assays were conducted in order to evaluate soil biological conditions and the effects of inoculation with AMF (*Glomus clarum* and *Paraglomus occultum*) on growth of six plant species with potential to establish in soil affected by oil pollutants. Values for soil microbial biomass and biochemical indicators (basal and induced soil respiration) were in the typical range found in non-contaminated soils, but the values for qCO_2 were in the high range. In spite of the indication of microbial stress, the results suggest the presence of metabolically active microbial communities in the soil. However, the relatively low activities of β -glucosidase, acid phosphatase and urease, indicate interferences on biochemical processes that may affect the degradation of residues transformation by the soil community. Abundant occurrence of AMF in either spontaneous or introduced plants was also observed. Inoculation with AMF had significant effects on alfalfa, brachiaria grass and sorghum, but no effects on elephant grass. The results of the present study indicate the existence of microbial populations tolerant to the toxic components of petrochemical wastes that were continuously applied to this soil.

Keywords: bioremediation, enzymes, heterotrophic, mycorrhiza

¹ Projeto Financiada pelo CNPq. Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, UFLA.

² Doutoranda ESALQ/USP. CP 09, CEP 13418-900 Piracicaba, (SP), ampaula@esalq.usp.br

³ DCS/ UFLA. CP 3037, 37200-000 Lavras, MG. Fone: (35) 3829-1225, ampaula@esalq.usp.br; crfsoares@gmail.com; siqueira@ufla.br

INTRODUÇÃO

A geração de resíduos tóxicos pelas indústrias ligadas ao setor petrolífero, representa uma fonte poluidora de grande impacto ambiental nos ecossistemas, tornando-se questão chave para as empresas do setor que têm realizado grandes esforços para aprimorar os processos de extração, beneficiamento, refino e distribuição, visando reduzir os impactos e promover a disposição adequada dos rejeitos tóxicos. Dentre os diversos tipos de tratamento dos resíduos gerados pela indústria petroquímica, destacam-se o biotratamento em “landfarming” e o biopilha, que são os mais empregados devido à relativa eficiência na remoção de óleos e graxas presentes no solo (Sims & Sims, 1999); entretanto, este tipo de tratamento não é eficiente na remoção de compostos mais recalcitrantes e tóxicos presentes nesses resíduos (Huang et al., 2004) e novas técnicas de tratamento e destinação ambiental correta, como o co-processamento em cimenteiras, desorção térmica e plasma, vêm sendo empregadas em substituição à técnica de “landfarming” (Furtado, 2003).

O “landfarming” é uma das tecnologias de remediação que consistem na aplicação do resíduo na superfície do solo, de modo a reduzir as concentrações dos constituintes de petróleo por meio da biodegradação microbiana. O espalhamento do material oleoso contaminante sobre o solo e a incorporação na camada arável, também denominada camada reativa (US EPA, 2000), pode afetar diretamente e de modo diferenciado, os microrganismos responsáveis pela biodegradação (Franco, 2004). A biodegradação microbiana, que é o mecanismo primário de eliminação dos poluentes orgânicos do ambiente, compõe a base deste tratamento, sendo de grande importância a manutenção de uma comunidade microbiana heterotrófica ativa, mas são escassos os estudos relacionados à atividade dos microrganismos em área de tratamento de resíduo petroquímico por “landfarming”. Marin et al. (2004) verificaram que a aplicação de lodo de refinaria de petróleo para tratamento pode, inicialmente, favorecer a biomassa microbiana, respiração basal e atividade enzimática (β -glicosidase, urease e desidrogenase) porém com o tempo e uso prolongado pode haver diminuição desses indicadores, retornando a níveis próximos do solo, sem aplicação do resíduo.

Apesar do “landfarming” ser um processo bastante utilizado, tem sido preconizada a necessidade de aumentar a eficiência de dissipação dos compostos tóxicos no solo, de modo que pode haver redução da carga contaminante total; entretanto, alguns componentes muito tóxicos ou carcinogênicos não se dissipam. Pradhan et al. (1998) demonstraram que o tratamento de um solo contaminado com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) em concentração de 185 mg kg⁻¹ de HAPs total e 50 mg kg⁻¹ de HAPs carcinogênicos, sofreu redução de 26% após 180 dias de tratamento sem planta e de 57% quando o solo foi semeado com *Panicum virgatum*. Constatou-se, neste estudo, que a fração carcinogênica sofreu redução apenas no solo com plantas, com redução da ordem de 30%; portanto, o emprego de plantas e a microbiota associada para agregar capacidade transformadora ao sistema aumentam a eficiência

de descontaminação do processo (Pradhan et al., 1998). De fato, a fitorremediação se tem mostrado eficiente no tratamento de hidrocarbonetos de petróleo, solventes clorinados, pesticidas e explosivos (Cunningham et al., 1996) cujo efeito se deve principalmente às raízes que modificam as condições químicas, físicas e biológicas do solo, estimulando a comunidade microbiana e os processos bioquímicos responsáveis pelo aumento da degradação e dissipação dos poluentes (Kirk et al., 2004). Além da possibilidade de estimular e contribuir para a biodegradação de poluentes orgânicos, a cobertura vegetal do solo reduz consideravelmente problemas de erosão hídrica e eólica, evitando a contaminação de áreas próximas.

Em se tratando de raízes, destaca-se um grupo de fungos que, invariavelmente, se associam a estas, formando uma relação simbiótica denominada micorrizas, muito importante do ponto de vista ecológico e funcional para as plantas, conferindo-lhes inúmeras vantagens, especialmente em condições de estresses causados por compostos orgânicos fitotóxicos (Siqueira et al., 1991) e podem estimular a dissipação dos poluentes na rizosfera (Joner & Leyval, 2003); no entanto, esta simbiose é ainda muito pouco estudada em áreas de “landfarming”. Cabello (1999) verificou que os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) ocorrem em solos afetados por contaminantes derivados de petróleo e há indicações de que fungos isolados de áreas poluídas podem estimular o crescimento de plantas em solos contendo compostos orgânicos tóxicos, como os hidrocarbonetos derivados de petróleo (Joner & Leyval, 2003). Portanto, a presença de propágulos de FMAs em solos de área de “landfarming” pode contribuir para o estabelecimento de vegetação nesses solos. Como não há relatos na literatura, sobre estudos com este enfoque em condições tropicais, esse tema se reveste de grande importância para um país que é produtor e grande consumidor de petróleo e derivados.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a biomassa e a atividade microbiana heterotrófica e a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em amostras de um solo de área de “landfarming” de resíduo petroquímico, além de avaliar o efeito desses fungos no crescimento de plantas neste solo.

MATERIAL E MÉTODOS

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 há mais de 15 anos, no qual são aplicadas principalmente borras oleosas. O solo da área de “landfarming” é um Espodossolo que recebeu a aplicação de 152,5 t de resíduo oleoso em uma área de 3.000 m², no período de 07/01/04 a 30/02/04, com média

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

pH (água)	P mg dm ⁻³	K	Na	Ca	Mg	Al cmol _c dm ⁻³	H+Al	SB	t	T	CE _e dS m ⁻¹	P-rem mg L ⁻¹
6,8	80	53	217	7,5	0,8	0	1	9	9	10	9,4	41
V	M %	ISNA	MO dag kg ⁻¹	N _{total} g kg ⁻¹	CO _{total}	Zn	Fe	Mn	Cu mg dm ⁻³	B	S	
90	0	10	13	8	78	52	238	23	40	0,8	43	

anual em torno de 1.800 t de resíduo. A amostragem foi realizada em uma área de 3.000 m² na qual se coletaram 8 amostras simples, a uma profundidade de 20 cm, para formar uma amostra composta.

Análises químicas e biológicas do solo

Uma amostra do solo foi encaminhada para análise no Laboratório de Análise Química do Solo, da Universidade Federal de Lavras, que 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), que foi de 9,4 dS m⁻¹ (Tabela 1). A relação C/N do solo é de 9,7. Contagens microbianas de bactérias em meio de cultura ágar-nutriente e de actinomicetos em meio de cultura ágar-amido, indicaram 9,5 x 10⁷ e 1,8 x 10⁴ UFC g⁻¹ de bactérias e actinomicetos, respectivamente. O carbono orgânico total foi determinado pelo método descrito por Yeomans & Bremner (1988) e a matéria orgânica do solo foi calculada multiplicando-se o resultado do carbono orgânico por 1,724. O teor de óleos e graxas do solo era de 4,41% (dados fornecidos pela CETREL, obtidos pelo método da EPA 3540C).

Biomassa e indicadores de atividade bioquímica do solo

Determinaram-se, na amostra de 20 g de solo, os seguintes parâmetros: carbono da biomassa microbiana (BM-C), estimado pelo método da fumigação-extração (Vance et al., 1987). O quociente microbiano (qMIC), o foi pela relação entre o carbono microbiano e o carbono orgânico total do solo. Respiração basal, pela estimativa do CO₂ evoluído durante incubação do solo, durante 72 h (Alef, 1995). Respiração induzida por substrato, determinada de modo semelhante à respiração basal, sendo adicionada 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, pelo tempo de 3 h. O quociente metabólico (qCO₂) foi obtido pela relação entre a quantidade de carbono liberada na respiração basal e a quantidade de carbono quantificada na biomassa microbiana. Determinaram-se, também, as atividades das seguintes enzimas: β-glicosidade, urease (Tabatabai, 1994) e fosfatase ácida (Dick et al., 1996). Para todos os parâmetros avaliados foram realizadas 6 repetições analíticas e, para todos esses parâmetros, a umidade do solo foi corrigida para 60% do volume total de poros (VTP).

FMA: ocorrência no solo e efeitos no crescimento de plantas

A ocorrência de FMAs foi verificada em 50 g de cada repetição da amostra de solo, por contagem de esporos, con-

forme método descrito por Gerdemann & Nicolson (1963) e pela observação da taxa de colonização micorrízica das raízes de plantas cultivadas 14 semanas, de acordo com o método proposto por Giovannetti & Mosse (1980). A densidade de FMAs também foi avaliada através da técnica denominada "número mais provável" (NMP), que estima a densidade de propágulos infectivos. O solo diluente foi preparado na proporção 1:1 de areia grossa e uma amostra de Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico típico. A planta teste empregada no ensaio foi a *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. O ensaio foi conduzido em tubetes de polietileno de 50 cm³ com uma planta por tubete durante 6 semanas (29/11/04 a 10/01/05), no final deste período, as raízes foram lavadas em água corrente procedendo-se à clarificação e posterior coloração, como já descrito; em seguida, as raízes foram avaliadas 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 et al., 1990), expressando-se o resultado do número de propágulos infectivos (MPI) por g de solo seco, determinando-se também o limite de confiança a 95% de probabilidade.

Vários ensaios foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da UFLA, para avaliar os efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no crescimento de espécies vegetais cultivadas no solo da área de "landfarming" e para confirmar a ocorrência de propágulos desses no solo e sua possível contribuição para o crescimento das plantas. Amostras de solo coletadas na área de "landfarming" e trazidas para Lavras, foram desagregadas e peneiradas em peneira de 2 mm de diâmetro para uniformização. Seis ensaios foram conduzidos simultaneamente, pelo 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. Marandu), mucuna-preta (*Stylobium aterinum* Piper et Traev.), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), utilizando-se 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 dos isolados *Glomus clarum* (± 105 esporos) e *Paraglomus occultum* (± 45 esporos), coletados de vaso de cultura da coleção de

FMA do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo (DCS) da UFLA.

Fez-se, diretamente em vasos de 3 dm³, a semeadura, excluindo-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, escarificadas com ácido sulfúrico concentrado (10 e 1 min, respectivamente). No momento da semeadura adicionaram-se 2 mL de solo-inóculo de FMAs 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 N₂ (*Bradyrhizobium* sp.); para a alfafa foi inoculada a estirpe BR 7407; a estirpe BR 2613 foi inoculada no kudzu tropical e estirpe BR 2811 para mucuna-preta. Todas as estirpes foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Solo, do DCS da UFLA e cultivadas em meio YMA semi-sólido. A irrigação dos vasos foi realizada a cada 3 dias de modo a manter a umidade do solo em 60% do VTP. 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 à lavagem das raízes com água corrente e aproximadamente 1 g de raízes frescas de cada planta foi separado de vários pontos da raiz, para coloração e avaliação da colonização micorrízica, como descrito anteriormente. A massa seca da parte aérea e das raízes foi determinada após secagem do material em estufa de circulação a 60 °C, até peso constante.

O ensaio sobre os efeitos no crescimento foi conduzido entre os meses de dezembro de 2004 e janeiro de 2005, pelo 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. Mantiveram-se duas plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em tubetes de polietileno de 280 cm³. O inóculo de FMAs utilizado foi o mesmo dos ensaios anteriores, adicionando-se 1 mL de solo-inóculo nos tratamentos com inoculação e 10 mL tubete⁻¹ de um filtrado do inóculo de propágulos de FMAs nos tratamentos não-inoculados, com vistas a equilibrar a microbiota entre os tratamentos. Ao final do período de seis semanas avaliaram-se massa seca total, relação MSPA/MSR e porcentagem de raiz colonizada.

Todos os dados foram submetidos a 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}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biomassa microbiana e atividade bioquímica do solo

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 µg g⁻¹ solo, encontrando-se

dentro da faixa observada de 300 a 700 µg g⁻¹ solo, verificada por Marin et al. (2004) em solo de biorremediação de lodo de refinaria de petróleo tratado com "landfarming" em região semi-árida, na Espanha. A proporção do C da biomassa no carbono total do solo, representado pelo quociente microbiano (qMIC), é de 0,89%. O baixo valor de qMIC indicado é, conseqüência possivelmente, da adição do resíduo petroquímico rico em carbono ao longo de 15 anos de aplicação. Em solos contaminados com hidrocarbonetos e tratados com "landfarming", na região semi-árida da Espanha, encontraram-se valores um pouco mais elevados (1,29%) (Marin et al., 2004). Valores mais elevados que os observados neste trabalho e em outros estudos em áreas poluídas com contaminantes orgânicos, variando entre 2 a 5%, são comuns 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 aplicados durante 15 anos, no município de Camaçari, BA

Parâmetros biológicos	Valor Médio*
Carbono da biomassa microbiana BM-C (µg g ⁻¹ solo)	692,89 ± 33,54
BM-C/Carbono orgânico total qMIC (%)	0,89 ± 0,04
Respiração basal (mg CO ₂ g ⁻¹ solo h ⁻¹)	4,38 ± 0,82
Quociente metabólico qCO ₂ (µg C-CO ₂ µg BM-C h ⁻¹)	6,38 ± 0,53
Respiração induzida por substrato RIS (mg CO ₂ g ⁻¹ solo h ⁻¹)	17,56 ± 2,03
β-glicosidase (µg PNF g ⁻¹ solo h ⁻¹)	37,17 ± 3,42
Fosfatase ácida (µg PNF g ⁻¹ solo h ⁻¹)	107,48 ± 1,07
Urease (µg N-NH ₄ g ⁻¹ solo h ⁻¹)	17,24 ± 2,48

* Média de 6 repetições

A atividade heterotrófica da biomassa microbiana, avaliada pela respiração basal do solo, foi de 4,38 mg CO₂ g⁻¹ solo h⁻¹, valor bem mais elevado que os valores verificados em área de floresta (0,25 mg CO₂ g⁻¹ solo h⁻¹) e em áreas de pastagem (0,36 mg CO₂ g⁻¹ solo h⁻¹) (Islam & Weil, 2000; apud 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 (9,5.10⁷ UFC g⁻¹ solo) e actinomicetos (1,8.10⁴ UFC g⁻¹ solo); este fato pode ser resultado da adaptação da população microbiana à presença do resíduo oleoso aplicado na área por mais de 15 anos. O quociente metabólico (qCO₂) médio foi de 6,38 µg C-CO₂ µg BM-C h⁻¹, acima do constatado por Franco (2004) que, avaliando o impacto da contaminação por óleo cru em diferentes tipos de solo, notaram variações de 1,24 a 4,78 µg C-CO₂ µg BM-C h⁻¹; já Marin et al. (2004), encontraram valores mais elevados de qCO₂ em área contaminada com hidrocarbonetos e tratada com "landfarming" ao longo de 11 meses de avaliação, quando foram verificados valores oscilando de 6,6 a 11,9 µg C-CO₂ µg BM-C h⁻¹. O valor de qCO₂ aqui relatado, encontra-se elevado, indicando que a comunidade microbiana heterotrófica do solo de "landfarming" está 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 mg CO₂ g⁻¹ solo h⁻¹, valor superior à respiração basal, de 4,38 mg CO₂ g⁻¹ solo h⁻¹, indicando não haver impedimento no consumo de fontes simples de carbono pela microbiota do solo.

A atividade da β-glicosidase do solo de área de “landfarming” foi baixa (37 μg PNF g⁻¹ solo h⁻¹) e isto pode estar relacionado com a complexidade dos compostos de carbono presentes no resíduo petroquímico, uma vez que esta enzima aponta maior atividade em condições de fontes de carbono mais simples (Matsuoka et al., 2003). A atividade da fosfatase ácida no solo de área de “landfarming” também foi baixa (107,5 μg PNF g⁻¹ solo h⁻¹) e isto pode estar relacionado aos altos níveis de P presente neste solo (80 mg dm⁻³), que inibem a atividade desta enzima. Valores médios de 2.421 μg PNF g⁻¹ solo h⁻¹ podem ser observados em regiões do cerrado nas quais a disponibilidade de P é muito baixa (Mendes & Vivaldi, 2001, apud Matsuoka et al., 2003). A atividade da urease foi de 17,2 μg N-NH₄ g⁻¹ solo h⁻¹ inferior, portanto, ao valor de 50,6 μg N-NH₄ g⁻¹ solo h⁻¹, constatado em solos sob atenuação natural, encontrados por Margesin et al. (2000) durante o monitoramento e avaliação de áreas impactadas com contaminantes orgânicos. Reduções na atividade da fosfatase e ausência da atividade da urease foram verificadas por Andreoni et al. (2004), em solos da Alemanha e da Bélgica contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), que exercem efeito tóxico sobre os microrganismos e 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, apud Andreoni et al., 2004); este fato pode explicar os baixos valores de atividade enzimática observados no solo de área de “landfarming”, cuja aplicação de resíduos petroquímicos pode, ao longo de 15 anos, estar favorecendo o acúmulo de compostos poluentes recalcitrantes, como os HAPs.

A biomassa microbiana e os indicadores de atividade microbiana heterotrófica evidenciam a presença de comunidades microbianas ativas, porém, a atividade enzimática se encontra 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 e a funcionalidade bioquímica do solo.

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

Apesar do solo de área de “landfarming” apresentar grandes alterações e ser desprovido de vegetação há vários anos, ainda se encontrou uma densidade média de 4 esporos de FMAs 50 g⁻¹ solo, verificando-se apenas um tipo de esporo pertencente ao gênero *Glomus*. 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 0,10-1,11. Este valor se situa abaixo dos 2,26 e 3,40 propágulos infectivos g⁻¹ solo de FMAs encontrados em solos contaminados com hidrocarbonetos da Argentina e Alemanha, respectivamente (Cabello, 1997), sendo que em ambos os locais havia vegetação colonizando a área, contribuindo para uma densidade maior de propágulos no solo; conclui-se, então, que o constante revolvimento do solo

de área de “landfarming” dificulta o estabelecimento de vegetação espontânea, e tende a reduzir a densidade de esporos e de propágulos infectivos de FMAs no solo.

A ocorrência de FMAs no solo de área de “landfarming” também pôde ser constatada por meio da observação da colonização radicular de plantas aí introduzidas, após 14 semanas de cultivo. A porcentagem de colonização micorrízica variou de 35 a 40% para sorgo, capim-elefante e mucuna-preta e de 52 a 62% para braquiária brizanta, alfafa e kudzu tropical, confirmando a existência de propágulos infectivos no solo em estudo, eficientes em estabelecer a micorriza. A colonização micorrízica em solos contaminados com hidrocarbonetos também foi verificada por Cabello (1997), destacando-se também a presença abundante de vesículas nas raízes colonizadas das plantas introduzidas.

As espécies vegetais estudadas responderam, de modo diferenciado, à inoculação com *Glomus clarum* e *Paraglomus occultum* (Figura 1). Foi positiva a resposta da inoculação sobre o crescimento da alfafa, braquiária e sorgo, destacando-se um aumento na produção de massa da alfafa, em torno de 78%, devido à inoculação. O efeito da inoculação no crescimento da alfafa também foi constatado por Cabello (1999), que observou notável dependência micorrízica desta espécie

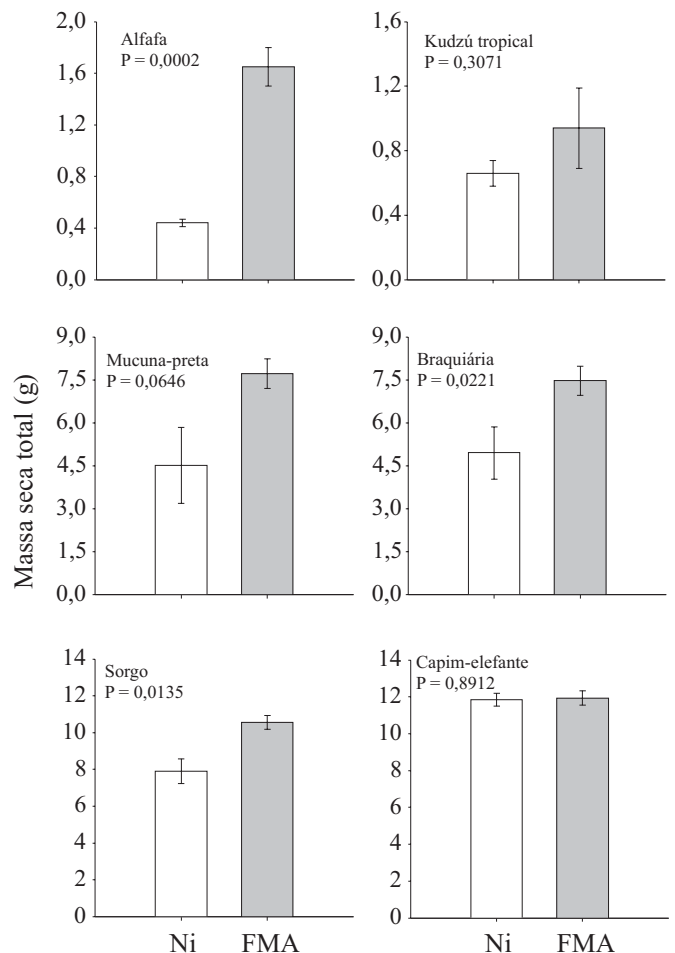


Figura 1. Massa seca total de espécies vegetais cultivadas em solo de área de “landfarming” de resíduos petroquímicos, inoculadas (FMA) ou não (Ni) com FMAs. Barras verticais indicam o erro padrão da média (4 repetições). P é a probabilidade de $F_c > F$

em solo contaminado com hidrocarbonetos. Estudos recentes confirmam o efeito benéfico da inoculação com FMAs no crescimento de plantas em solos poluídos com compostos orgânicos (Joner & Leyval, 2003). Como constatado neste trabalho, 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 o sorgo apresentam grande potencial em áreas de “landfarming” nas condições tropicais; além dessas, as espécies kudzu tropical, mucuna-preta e braquiária responderam à inoculação com FMAs. O capim-elefante não respondeu à inoculação mas apresentou bom crescimento vegetativo, sendo também promissor para ser utilizado em programas de revegetação de áreas contaminadas com poluentes orgânicos e em estudos adicionais, quanto ao potencial fitorremediador dessas espécies.

Apesar da baixa densidade de esporos recuperados no solo de área de “landfarming” (4 esporos de FMAs 50 g^{-1} 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, nessas espécies, altos valores de colonização, variando de 38 a 68% (Tabela 3); enquanto isto, ocorreu efeito significativo da inoculação sobre a colonização micorrízica do sorgo e capim elefante, apresentando também alta taxa de colonização, variando de 35 a 61%.

Tabela 3. Colonização micorrízica das espécies vegetais cultivadas em solo de área de “landfarming” de resíduos petroquímicos, inoculadas (FMAs) ou não (NI) com fungos micorrízicos arbusculares

Espécie vegetal	Condição	
	NI	FMAs
Afafa	55,4 ± 4,3	65,4 ± 6,9
Kudzu-tropical	62,7 ± 0,9	68,1 ± 4,4
Mucuna	38,2 ± 0,7	41,2 ± 2,7
Braquiária	52,3 ± 3,1	61,1 ± 3,3
Sorgo	35,1 ± 1,6	47,0 ± 0,8*
Capim-elefante	38,1 ± 2,2	61,1 ± 3,4*

* Efeito significativo da inoculação

A presença de plantas espontâneas também foi avaliada e ocorreram de modo generalizado nos vasos com solo da área, excetuando-se nos tratamentos com capim-elefante e mucuna-preta. 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, cujas frequências de ocorrência se encontram na Figura 2. Destaca-se a elevada incidência das espécies *Digitaria* sp e *Cyperus difformis* L. que, além de confirmar a possibilidade de crescimento vegetal neste solo, é de grande interesse para a seleção de plantas espontâneas nativas nesta condição de contaminação, capazes de sustentar massa verde suficiente para proporcionar uma cobertura do solo adequada. A inoculação com FMAs também favoreceu a colonização micorrízica das espécies espontâneas, destacando-se *Digitaria* sp e *Cyperus difformis*, que apresentaram taxa de colonização

de 65 e 51%, respectivamente, as quais são muito superiores aos 39 e 26% verificados no solo não inoculado, evidenciando-se o efeito positivo da inoculação sobre a colonização micorrízica dessas espécies. A presença de colonização em plantas espontâneas indica a possibilidade de se aumentar o número de propágulos infectivos de FMAs no solo de área de “landfarming”, de forma a se utilizar os benefícios dessa simbiose na dissipação de poluentes e revegetação da área, como notado por Escalante-Espinosa et al. (2004). Nesse estudo, os autores avaliaram o potencial de uma espécie nativa de área contaminada com hidrocarbonetos e constataram grande redução dos compostos poluentes presentes no solo, resultado acentuado com a inoculação de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos selecionados do local contaminado.

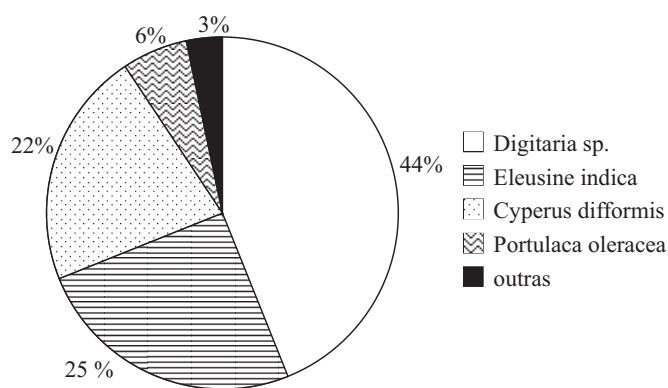


Figura 2. Frequência de ocorrência de plantas espontâneas provenientes de solo de área de “landfarming”, em vasos cultivados com diferentes espécies vegetais

O efeito da inoculação de FMAs no crescimento da *B. brizantha* também foi avaliado no solo de área de “landfarming” (autoclavado ou não), cujos resultados se encontram na Figura 3. Verifica-se, no solo não autoclavado, que a inoculação com FMAs aumentou em mais de 300 e 800% a massa seca da parte aérea e raízes, respectivamente, evidenciando os benefícios da inoculação no crescimento desta espécie. Tal efeito foi constatado também no solo autoclavado, porém nos tratamentos não inoculados, não foi verificada diferença significativa entre os solos autoclavado e não autoclavado (Figura 3), indicando que a população de FMAs indígenas do solo de área de “landfarming” não exerceu efeito sobre o crescimento da *B. brizantha*, em relação aos FMAs introduzidos. O efeito de FMAs no crescimento de plantas em áreas contaminadas por resíduos de petróleo, também foi verificado por Cabello (1999) que, diferente do observado no presente estudo, constatou que o isolado *Glomus geosporum* de área contaminada foi mais eficiente em promover o crescimento da alfafa em comparação com outros isolados de FMAs de áreas não contaminadas. Em relação à colonização micorrízica, notou-se que no solo não autoclavado esta foi de 56% no tratamento inoculado com FMAs e de apenas 20% nas plantas não inoculadas (controle), indicando que a inoculação aumenta a colonização

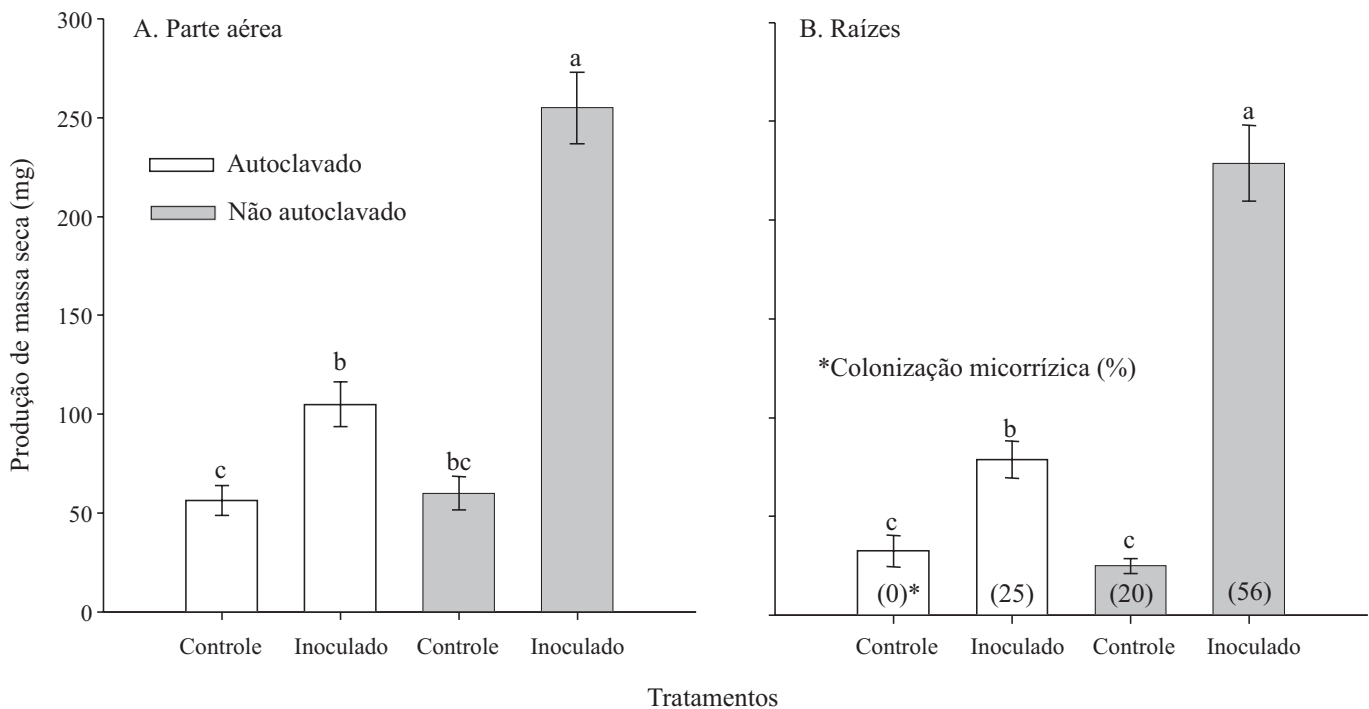


Figura 3. Produção de massa seca da parte aérea e raízes e colonização micorrízica da *Brachiaria brizantha* em solo de área de “landfarming” não inoculadas (controle) e inoculadas com FMAs. Barras verticais representam o erro padrão da média (8 repetições). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

micorrízica da *B. brizantha* e favorece o crescimento desta espécie no solo de área de “landfarming” contendo resíduos petroquímicos na concentração de 4,41% de óleos e graxas.

Os resultados encontrados indicam a possibilidade da realização de estudos adicionais relacionados ao monitoramento da atividade heterotrófica de solos de área de “landfarming” de resíduos petroquímicos, visando avaliar a capacidade da comunidade microbiana quanto a lhes tolerar a contínua aplicação e estudos em relação à eficiência e manejo de FMAs indígenas em estratégias de revegetação dessas áreas.

CONCLUSÕES

1. O solo de área de “landfarming”, mesmo após a aplicação continuada de resíduos oleosos da indústria petroquímica, apresenta microbiota heterotrófica adaptada ao substrato e aos componentes tóxicos presentes nestes resíduos.
2. O solo de área de “landfarming” apresenta baixa atividade enzimática, o que pode comprometer a decomposição dos resíduos petroquímicos depositados no solo.
3. O solo da área de “landfarming” apresentou incidência de propágulos infectivos de fungos micorrízicos arbusculares capazes de garantir elevada colonização em plantas espontâneas ou introduzidas no solo.
4. A inoculação com *Glomus clarum* e *Paraglomus ocultum* aumenta a colonização micorrízica e favorece o crescimento da alfafa, braquiária brizantha e sorgo.

AGRADECIMENTOS

À CETREL S.A. – Empresa de Proteção Ambiental, pela disponibilidade e contribuição para este estudo, e ao CNPq, pelo financiamento do projeto e bolsa de produtividade a J.O.S. e à CAPES pela bolsa de mestrado a A.M.P. e bolsa Prodoc a C.R.F.S.S.

LITERATURA CITADA

- Alef, K. Estimation of soil respiration. In: Alef, K.; Nannipieri, P. (ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p.214-219.
- Andreoni, V.; Cavalca, L.; Rao, M. A.; Nocerino, G.; Bernasconi, S.; Colombo, M.; Gianfreda, L. Bacterial communities and enzymes activities of PAH polluted soils. *Chemosphere*, Dordrecht, v.57, n.5, p.401-412, 2004.
- Bennett, J. E.; Woome, P. L.; Yost, R. S. *User manual for MP-NES Most-Probable-Number Enumeration System*. Version. 1.0. nifTAL Project and University of Hawaii, 1990.
- Cabello, M. N. Hydrocarbon pollution: its effects on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, v.22, n.3, p.233-236, 1997.
- 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.
- Cunningham, S. D.; Anderson, T. A.; Shwab, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, San Diego, v.56, n.56, p.55-114, 1996.

- 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.
- Escalante-Espinosa, E.; Gallegos-Martínez, M. E.; Favela-Torres, E.; Gutiérrez-Rojas, M. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. Inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*, Dordrecht, v.59, n.3, p.405-413, 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, 2004.
- Furtado, M. R. Resíduos industriais: terceirização de serviços e tecnologia melhoram perspectivas do mercado. *Química e derivados*, São Paulo, n. 415, maio de 2003. <http://www.quimica.com.br/indice2003.htm>. 28 Abr. 2005.
- Gerdemann, J. B.; Nicolson, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions British Mycological Society*, London, v.46, n. 2, p.235-246, 1963.
- 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, 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. p.415-571.
- 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, 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, 2004.
- Margesin, R.; Zimmerbauer, A.; Schinner, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, Dordrecht, v.40, n.4, p.339-346, 2000.
- Marin, J. A.; Hernandez, T.; Garcia, C. Biorremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environmental Research*, v.98, n.2, p.185-195, 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, 2003.
- 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, 1996.
- Sims, R.; Sims, J. L. Landfarming of petroleum contaminated soils. In: *Bioremediation of Contaminated Soils*. Adriano, D.C.; Bollag, J.M.; Frankberger Jr., W.T.; Sims, R.C. (ed.), *Agronomy*, n.37, 1999. p.767-781.
- 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, 1991.
- 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).
- Tótolá, M. R.; Chaer, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: V. Alvarez, V. H.; Schaefer, C. E. G. R.; Barros, N. F.; Mello, J. W. V. (ed.), *Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa: SBCS, v.2, p.195-276, 2002.
- US EPA. United States Environmental Protection Agency. *Introduction to Phytoremediation*. EPA/600/R-99/107. Washington DC, 2000. 104p.
- Vance, E. D.; Brookes, P. C.; Jenkinson, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.19, n.6, p.703-707, 1987.
- Yeomans, J. C.; Bremner, J. M. A. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, Philadelphia, v.19, n.13, p.1467-1476, 1988.