

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Atributos microbiológicos do solo em área agrícola sob disposição de
lodo de curtume**

André Shigueyoshi Nakatani

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

André Shigueyoshi Nakatani
Biólogo

**Atributos microbiológicos do solo em área agrícola sob disposição de lodo de
curtume**

Orientadora:
Profa. Dra. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Nakatani, André Shigueyoshi

Atributos microbiológicos do solo em área agrícola sob disposição de lodo de curtume /
André Shigueyoshi Nakatani. - - Piracicaba, 2010.
102 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Acidez do solo 2. Análise multivariada 3. Curtume 4. Lodo 5. Microbiologia do solo
6. Nitrogênio I. Título

CDD 631.46
N163a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus, a meus familiares e aos amigos

OFEREÇO.

A meus pais, Shigueo e Yoshie Nakatani,

A meus irmãos, Tony e Sandro Nakatani,

A Isabeli Bruno

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Shiguo e Yoshie Nakatani, pelo amor e que mesmo de muito longe, sempre me deram força, apoiaram e confiaram em mim.

A Isabeli Bruno, pelo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos.

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Ao Curtume Vanzella pelo apoio financeiro e fornecimento dos resíduos. Em especial ao apoio de campo de Claudiomar Pereira de Souza e Edmilson.

À Professora Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, pela amizade, orientação, incentivo, convivência e ensinamentos. Um exemplo de profissionalismo e dedicação à ciência.

Ao Dr. Marco Antonio Nogueira pela amizade, disponibilidade, incentivo, convivência e participação fundamental em todas as etapas da realização deste trabalho.

À Dra. Petra Marschner pela disponibilidade, atenção e orientação durante o período de estágio na Universidade de Adelaide, Austrália.

Aos professores doutores Carlos Eduardo Pellegrini Cerri, Brigitte Josefine Feigl e Marcio Rodrigues Lambais, avaliadores do exame de qualificação, pelas contribuições no refinamento do trabalho.

Ao Luiz Roberto Graça Favoretto e Luciana Verardino, da Empresa Monsanto, pelo fornecimento das sementes, plantio e auxílio na manutenção do experimento de campo.

Ao Dr. Cristiano Andrade e Dra. Aline Coscione, do Instituto Agronômico de Campinas, pelas análises químicas.

Ao Professor Dr. Marcos Kamogawa, pela permissão de utilizar o seu laboratório para análises de nitrogênio.

Ao Professor Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pela permissão de utilizar o seu laboratório de análises moleculares.

Aos técnicos altamente competentes do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo/ESALQ/USP Denise L. C. Mescolotti e Luis Fernando Baldesin, pela amizade e fundamental apoio nas análises laboratoriais.

Ao Professor Dr. Sidney Stürmer pela identificação dos esporos de FMA.

À Dra. Sandra Nogueira pela análise dos gases do solo.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina/PR, pelo indispensável apoio na condução do experimento e análises laboratoriais: Admilton Oliveira, Dáfila Lima, Laura Bernal, Luis Lescano, Kellen do Carmo, Márcio Cruz. Alguns deles atualmente fazem parte do Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ/USP: Cristiane dos Santos, Daniel Bini, Marina Horta.

Aos amigos do laboratório e de pós-graduação: Alexandre Martines, Rafael Vasconcellos, Rafael Valadares, Alessandra de Paula, Dilmar Baretta, Jamil Pereira, Daniel Lammel, Rafaela Neroni, Carlos Ribeiro, Mylenne Pinheiro, Gabriela Gerônimo, Sara Hirata, Adriano Lucheta, Rafael Armas, Lucas Azevedo, Gisele Nunes, Giselle Gomes, Carol Maluche-Baretta, Marcio Morais, Winston Ruiz, Vivian Carvalho, Joice Bonfim, Júlia Segat, Thiago Gumiere, Paulo Roger, Milton Moraes.

Ao Sr. Abrão Martines e Dona Diva, pais do Alexandre, por me acolherem em seu lar, em Rolândia/PR, durante a condução do experimento de campo.

Aos amigos de república: Flávio Macedo e Fabrício Terra

Aos amigos e colegas da Austrália: Sigfredo Fuentes, David Contreras, Enrique Llona, Claire Colebatch, Hasbullah, Raj, Nasrin, Alamgir, Hasnuri, Ying, Luke, Dra. Karen Baumann, Dr. Murray Unkovich, Dra. Ann McNeill.

Aos amigos de Londrina: Andréia Sasaki, Flávia Spago, Kiel Gonçalves, Andrea Scaramal, Letícia Murate.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
Referências.....	19
2 ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA GENÉTICA DE BACTERIA E ATIVIDADE MICROBIANA EM SOLO AGRÍCOLA TRATADO COM LODO DE CURTUME	23
Resumo.....	23
Abstract.....	23
2.1 Introdução.....	24
2.2 Desenvolvimento.....	26
2.2.1 Material e Métodos.....	26
2.2.2 Resultados.....	32
2.2.3 Discussão.....	40
2.3 Conclusões.....	44
Referências.....	45
3 ALTERAÇÕES NA COMUNIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM FUNÇÃO DA DOSE DE LODO DE CURTUME APLICADA AO SOLO	51
Resumo.....	51
Abstract.....	51
3.1 Introdução.....	52
3.2 Desenvolvimento.....	53
3.2.1 Material e Métodos.....	53
3.2.2 Resultados.....	58
3.2.3 Discussão.....	63
3.3 Conclusões.....	67
Referências.....	67
4 ALTERAÇÕES NO PERFIL FISIOLÓGICO E DE ÁCIDOS GRAXOS DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE LODO DE CURTUME	73
Resumo.....	73

Abstract	73
4.1 Introdução	74
4.2 Desenvolvimento	75
4.2.1 Material e Métodos	75
4.2.2 Resultados	80
4.2.3 Discussão	86
4.3 Conclusões	90
Referências	91
5 CONCLUSÕES GERAIS	95
APÊNDICES	99

RESUMO

Atributos microbiológicos do solo em área agrícola sob disposição de lodo de curtume

Os lodos de curtume apresentam elevados teores de nutrientes e potencial de neutralização da acidez do solo, possibilitando sua utilização em áreas agrícolas, como uma alternativa para disposição e reciclagem desses resíduos. Por outro lado, o acúmulo no solo de altas concentrações de alguns elementos, como nitrogênio, sódio e cromo, provenientes dos lodos de curtume, podem proporcionar impactos negativos ao meio ambiente. Como os microrganismos desempenham função importante na sustentabilidade do solo e nutrição vegetal e respondem prontamente a alterações ambientais, torna-se importante estudar o impacto da utilização em conjunto do lodo do caleiro e lodo primário da ETE (com teor reduzido de cromo) sobre os atributos biológicos do solo. No presente trabalho avaliaram-se os atributos microbiológicos do solo em um experimento de campo instalado em Rolândia (PR), com a aplicação de doses de lodo de curtume (0, 3,4, 13,5, 23,6 e 33,7 Mg ha⁻¹ em 2006 e 0, 2,3, 9,0, 15,8 e 22,6 Mg ha⁻¹ em 2007) baseadas no teor de N total do lodo, com doses equivalentes entre 0 e 1200 kg ha⁻¹ de N total. O delineamento experimental foi o de blocos completos casualizados com quatro repetições. A aplicação de lodo de curtume alterou a estrutura genética de bactérias, principalmente logo após cada aplicação do resíduo. Os tratamentos que receberam lodo apresentaram comunidade bacteriana diferenciada daquela do tratamento controle. Verificou-se que o efeito do lodo sobre essas populações é mais prolongado no primeiro ano de aplicação, com efeitos ainda evidentes após 300 dias da aplicação. No segundo ano da aplicação, não houve diferença nas comunidades bacterianas entre as menores doses e o controle após 260 dias da aplicação. O mesmo resultado foi observado para a atividade biológica do solo. Os atributos mais influenciados pela aplicação do resíduo foram as atividades da asparaginase e urease. Os resultados mostram que a alteração da estrutura da comunidade microbiana tem relação direta com as modificações na atividade biológica desse solo. A densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) diminuiu com o aumento das doses de lodo de curtume. A taxa de colonização radicular foi alta (64%), mas sem efeito significativo da aplicação de lodo. Foram encontradas 18 espécies de seis gêneros de FMA (*Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Paraglomus* e *Ambispora*). Houve queda na diversidade e modificação nas frequências relativas dos FMA nas maiores doses de lodo, assim como, o lodo de curtume alterou a composição de espécies de FMA, modificando a condição micorrízica desse solo. Altas doses de lodo de curtume também alteraram a estrutura da comunidade microbiana baseada no perfil de ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA). O consumo de substratos de carbono pela comunidade microbiana foi acelerado e intensificado pela aplicação do resíduo, mostrando que o potencial metabólico dessa comunidade foi diferente do tratamento que não recebeu o resíduo. As alterações observadas nos atributos microbiológicos estão relacionadas às modificações nos atributos químicos do solo, decorrentes da aplicação do lodo de curtume, principalmente ao aumento do teor de N inorgânico e à elevação do pH do solo.

Palavras-chave: Carbono; Nitrogênio; Agricultura; pH; DGGE; Atividade enzimática; Micorriza; Esporos; PLFA; Biolog Ecoplate; Estatística multivariada

ABSTRACT

Soil microbiological attributes of an agricultural area following disposal of tannery sludge

Tannery sludge is a residue with a high content of nutrients and soil acidity neutralization power, which allow its use in agricultural areas and could be an advantageous alternative for its final disposal and recycling. Furthermore, the accumulation in soil of high concentrations of certain elements, such as nitrogen, sodium and chromium, typically present in tannery sludge can provide negative impacts on the environment. Microorganisms play a very important role in soil sustainability and plant nutrition, as well as, respond quickly to environmental changes. Thus, it becomes important to study the impact of a material resulting of the mixture of sludge from the liming process and the primary sludge from the wastewater treatment plant, with a low level of chromium, on soil biological attributes. This study aimed to evaluate the microbial soil attributes after application of tannery sludge doses (0, 3,4, 13,5, 23,6, and 33,7 Mg ha⁻¹ in 2006 and 0, 2,3, 9,0, 15,8, and 22,6 Mg ha⁻¹ in 2007) based on total N content of sludge, with doses equivalent to 0 up to 1200 kg ha⁻¹ total N. Tannery sludge application modified the genetic structure of the bacterial community mainly right after each sludge application. There was a clear separation between the bacterial communities in different treatments, being that each dose of sludge imposed a specific community different from the control. It was verified that the effect of sludge on these bacterial populations is more extended in the first year of application, when the effect remained until after 300 days of application. In the second year of sludge application, there was no difference in the bacterial community among the smallest doses and the control after 260 days of the application. The same result was observed regarding soil biological activity. The most influenced properties by the application of tannery sludge were asparaginase and urease activities (both are related to the N cycle). Changes in the structure of the bacterial community were directly related to changes of biological activity in this soil. The AMF spore density decreased with increasing doses of tannery sludge. The rate of AMF root colonization was high (64%) and stayed unaffected by the sludge. Eighteen AMF species belonging to six genera (*Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Paraglomus* and *Archaeospora*) were recorded. At the highest doses of sludge we observed decreased AMF species diversity and changes in their relative frequencies. Furthermore, the tannery sludge altered AMF species composition, modifying the mycorrhizal status of this soil. High doses of tannery sludge modified the microbial community structure based on the phospholipids fatty acids (PLFA) profile. The carbon substrate consumption by the microbial community was accelerated and intensified by sludge application, showing that the metabolic potential of this community was different from that of the control. The changes observed in the microbial attributes are related to modifications in the soil chemical attributes, mainly to the increases of inorganic N and soil pH.

Keywords: Tannery sludge application; Agriculture; Carbon; Nitrogen; pH; DGGE; Enzymatic activity; Mycorrhiza; Spores; Multivariate statistics; PLFA; Biolog Ecoplate

1 INTRODUÇÃO

A crescente avalanche de resíduos orgânicos das mais variadas naturezas, produzidos pelas atividades humanas, está a ponto de soterrar os avanços tecnológicos de nossa civilização. Estamos diante de um grave impasse, com crescente acumulação de resíduos que geralmente são dispostos em áreas destinadas a receber milhões de toneladas desse material sem, contudo, apresentar a devida infra-estrutura para suportar tal atividade. O resultado disso é a crescente degradação e poluição do solo, das águas e do ar, principalmente em áreas próximas aos grandes centros urbanos e industriais, com reflexos negativos na saúde pública. O público em geral enxerga o solo como um grande depósito para o descarte de todos os resíduos (urbanos, industriais ou agrícolas). O solo, tal como os cursos d'água, tem uma grande capacidade autodepuradora, mas a carga orgânica depositada costuma ultrapassar em muito o seu potencial de reciclagem.

Os resíduos orgânicos são fontes de nutrientes para as plantas. Se bem utilizados, podem ser aplicados na agricultura como fertilizantes orgânicos, organominerais ou condicionadores do solo. A maior carência para uma agricultura sustentável é a preservação e o enriquecimento da matéria orgânica do solo. O uso dos resíduos, por exemplo, das indústrias curtumeiras, consideradas potencialmente poluidoras, poderia diminuir a exigência de fertilizantes minerais, o que, além de contribuir para a diminuição de custos, também poderia aumentar a vida útil das fontes de minerais não renováveis e dos aterros sanitários.

O Brasil ocupa lugar de destaque na produção mundial de couros, com 44,4 milhões de peles processadas anualmente, com exportações de 2,19 bilhões de dólares em 2007. Durante o processamento das peles são gerados grandes volumes de resíduos líquidos e sólidos, sendo o lodo do caleiro e o lodo primário da estação de tratamento de efluentes (ETE) os gerados em maior quantidade. Cada tonelada de pele processada gera 150-200 kg de lodos (base seca) (PACHECO, 2005), que precisam ser tratados e descartados de forma adequada, por isso é alvo de grande preocupação ambiental.

As características desses lodos variam muito em função do tipo de pele a ser processada, tecnologia empregada no processamento das peles e sistema de tratamento de efluentes adotado pela indústria. De maneira geral, esses resíduos se tornam altamente poluidores à medida que concentram uma elevada carga orgânica e inorgânica. O lodo do caleiro apresenta em sua composição altos teores de carbonatos, hidróxidos, sódio e sulfetos, já o lodo primário da ETE contém elevado teor de nitrogênio e pode conter alto teor de cromo na forma trivalente, representando potencial de risco biológico em função das condições de oxi-redução do meio (SANTOS et al., 2009). Devido à necessidade da indústria em se adequar às novas exigências ambientais, aliada ao avanço tecnológico no processamento de peles (separação de resíduos com cromo e reciclagem dos efluentes), o teor de cromo no lodo primário da ETE tem sido reduzido.

A disposição de resíduos no solo normalmente é causa de muitas controvérsias. Entretanto, sabe-se que o solo constitui o melhor e mais seguro meio para a disposição de poluentes, em relação à hidrosfera ou à atmosfera. Os solos são capazes de oxidar e/ou precipitar os compostos e removê-los da cadeia alimentar, de modo mais seguro que o ar ou a água. Outro benefício da disposição desses resíduos no solo refere-se à possibilidade de serem utilizados na recuperação de áreas degradadas, ou na agricultura, como fertilizantes e corretivos do solo.

O uso agrícola de resíduos de curtume pode contribuir para a melhoria da fertilidade dos solos e nutrição das plantas (ALCÂNTARA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008, MARTINES; ANDRADE; CARDOSO, 2006, OLIVEIRA, 2007,), conseqüentemente podendo melhorar a produtividade agrícola das culturas (CASTILHOS; TEDESCO; VIDOR, 2002; FERREIRA et al., 2003, SILVA et al., 2010), além de representar uma forma de reciclagem do resíduo no ambiente. Nesse último aspecto, deve-se salientar a necessidade de critérios técnico-científicos para sua aplicação na agricultura, uma vez que tal prática, feita de forma inadequada, pode conduzir a valores muito elevados e inadequados de pH (CAVALLET; SELBACH, 2008; MARTINES, 2005; SELBACH et al., 1991), sais solúveis (AQUINO NETO; CAMARGO, 2000, KONRAD; CASTILHOS, 2002, MARTINES, 2005) e cromo (AQUINO NETO;

CAMARGO, 2000, FIGLIOLIA et al., 1992) nos solos tratados, o que pode comprometer a sustentabilidade agrícola e o uso futuro dessas áreas.

Segundo Martines (2009), até a década de 80, a maioria dos curtumes brasileiros gerava, durante o processamento das peles, no máximo dois lodos denominados de “lodo do caleiro” e “lodo do tratamento primário”. O primeiro não apresenta Cr, já o segundo normalmente apresentava teores de até $36.000 \text{ mg kg}^{-1}$ (KONRAD; CASTILHOS, 2001), geralmente na forma trivalente. A partir da década de 90, os efluentes provenientes das diversas etapas do processamento de peles passaram a ser reciclados ou tratados em separado em estação de tratamento de efluentes (ETE) (MARTINES, 2009). Assim, atualmente, a separação dos efluentes que contêm Cr reduziu significativamente o teor de Cr no lodo primário, que normalmente fica abaixo de 1.000 mg kg^{-1} , teor considerado como máximo para aplicação de lodo de esgoto em área agrícola, segundo a norma CONAMA 375 (BRASIL, 2006).

Vários estudos da literatura avaliaram o poder corretivo, o efeito fertilizante, o efeito sobre a microbiota, assim como a dinâmica de oxi-redução do cromo, pela utilização de lodos de curtume com elevados teores de cromo no solo (ALCÂNTARA et al., 2007; CASTILHOS; VIDOR; CASTILHOS, 2000; JAHNEL; CARDOSO; DIAS, 1999; KRAY et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2008). A maior preocupação destes trabalhos sempre foi o problema do cromo, sendo que raramente eram abordados outros fatores de risco da aplicação desse material. Atualmente com a possibilidade de redução do teor de cromo total no lodo final, outros fatores limitantes surgem como o excesso de nitrogênio e sódio, em detrimento do problema do cromo. Entretanto, são raros estudos envolvendo a aplicação do lodo de caleiro em conjunto com o lodo primário de ETE com teor reduzido de cromo.

Altos teores de nitrogênio inorgânico no solo, decorrentes da mineralização da fração orgânica do lodo de curtume, podem gerar efeitos negativos, principalmente quando a mineralização não é sincronizada com a absorção pelas plantas, possibilitando sua movimentação e conseqüente contaminação das águas superficiais e subterrâneas (DYNIA; SOUZA; BOEIRA, 2006). Ainda há o risco da geração de óxido nitroso a partir da desnitrificação, contribuindo para a poluição atmosférica e o efeito estufa (TRUJILLO-TAPIA et al., 2008). Já o sódio pode causar limitações no

desenvolvimento das plantas, dispersão de argilas e problemas de osmorregulação sobre os microrganismos (RIETZ; HAYNES, 2003).

Para o correto uso agrícola do lodo de curtume são necessárias pesquisas visando esclarecer quais as doses mais apropriadas para cada solo, impacto no ambiente e o efeito residual, auxiliando desse modo na elaboração de normas técnicas sustentáveis. Assim, o estudo integrado e aprofundado desses aspectos contribuirá para o estabelecimento de valores limite para as doses utilizáveis em cenários reais, o que poderá viabilizar uma gestão sustentável destes resíduos.

Segundo Martines (2009), devido ao grande volume de lodo do caleiro e lodo primário, gerados diariamente, vários curtumes delimitam uma área agrícola que passa a receber aplicação diária da mistura desses lodos, até acumular uma determinada dose, em função do critério mais restritivo entre os seguintes: (i) N disponível para a cultura; (ii) poder de neutralização; (iii) quantidade de sódio aplicado e (iv) teor de Cr acumulado no solo. Em curtumes que aplicam lodo em áreas cultivadas com culturas anuais, o período de aplicação é de aproximadamente 90 dias, com posterior incorporação e plantio da cultura. Concomitantemente, uma nova área é demarcada para aplicação do lodo. Esse manejo possibilita a aplicação diária do lodo, pois, enquanto uma área está recebendo lodo, outra está sendo cultivada e vice-versa.

Uma preocupação particular nesse tipo de prática é o componente biológico do solo. A comunidade microbiana do solo é essencial em qualquer ecossistema e está intimamente relacionado ao bom funcionamento do solo, com reflexos diretos na fertilidade do solo e na nutrição vegetal (KENNEDY; SMITH, 1995). Além disso, os microrganismos do solo podem ser importantes bioindicadores da qualidade do solo, pois, são dinâmicos e respondem rapidamente a alterações ambientais, sofrendo grande influência do ambiente, inclusive aquela proveniente do uso e manejo do solo e vegetação, o que causa modificações quantitativas e qualitativas na sua estrutura e atividade (BENDING et al., 2004). A biomassa microbiana pode ser muito mais sensível que o teor de carbono orgânico do solo diante de uma perturbação (POWLSON; BROOKES; CHRISTENSEN, 1987). Assim, mudanças significativas na biomassa microbiana podem ser detectadas muito antes que alterações na matéria orgânica

possam ser percebidas, possibilitando a adoção de medidas de mitigação antes que a perda de qualidade do solo seja mais severa (TÓTOLA; CHAER, 2002).

A cinética da biodegradação dos lodos de curtume no solo está intimamente relacionada com a atividade microbiana, a qual pode ser alterada pelas altas concentrações de sais, elevados valores de pH e toxicidade do cromo. Muitas etapas da ciclagem de nutrientes no solo são realizadas exclusivamente por certos grupos de microrganismos. Os resíduos de curtume apresentam carga considerável de nitrogênio em sua composição e a ciclagem do nitrogênio no solo é essencialmente microbiológica. Alterações ambientais decorrentes de atividades antrópicas podem afetar negativamente grupos microbianos chave e, dependendo da importância do processo de transformação e ciclagem que determinado grupo desempenha no solo, pode comprometer a sua qualidade e sustentabilidade (ALVAREZ-BERNAL et al., 2006).

Estudos dos efeitos da adição de resíduos orgânicos sobre a composição e estrutura da comunidade microbiana são importantes, uma vez que ela é determinante para as taxas de decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes nos solos agrícolas (FREY; ELLIOTT; PAUSTIAN, 1999), assim como tem influência direta na redundância funcional do solo e conseqüentemente sobre a sua resiliência.

Todas as transformações bioquímicas do planeta são dependentes ou relacionadas à atividade das enzimas. No solo, as principais reações de transformação são mediadas principalmente pelas hidrolases e oxirredutases que controlam os processos de decomposição dos materiais orgânicos e transformações inorgânicas. As atividades de enzimas extracelulares no solo, além de serem reguladas indiretamente pelo aumento da produção e secreção pelos microrganismos, podem também ser reguladas diretamente pelas condições físico-químicas do ambiente (SINSABAUGH, 1994). As atividades enzimáticas têm sido usadas como indicadores sensíveis das alterações causadas pelo manejo do solo (PERUCCI, 1992). De acordo com Kandeler (2007), a composição da comunidade microbiana determina seu potencial em sintetizar enzimas, e, portanto, qualquer alteração na comunidade microbiana pode refletir nos níveis de atividade enzimática do solo. Assim sendo, a adição de lodo de curtume em áreas agrícolas pode influenciar diretamente o padrão de atividade enzimática da

mesma. Nesse contexto, as atividades enzimáticas relacionadas ao C, N e P podem ser usadas como indicadoras da atividade biológica ou dos processos bioquímicos no solo e dos efeitos da adição de resíduos ao solo.

O estudo da ecologia de grupos funcionais microbianos específicos, como a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares, também tem potencial para caracterizar o efeito do manejo sobre a sustentabilidade do solo (BENDING et al., 2004). A maioria das plantas forma simbiose com esses fungos e os seus benefícios para o solo e o desenvolvimento vegetal são amplamente conhecidos (SIEVERDING, 1991). Os FMA apresentam relevância ecológica única para o ambiente e, por isso, a sua ocorrência, atividade e eficiência podem ser um valioso indicador de qualidade do solo (STENBERG, 1999).

Uma melhor compreensão do funcionamento da comunidade microbiana pode ser obtida ao se examinar, além da diversidade de espécies, a diversidade funcional que ela representa (TÓTOLA; CHAER, 2002). O potencial metabólico da comunidade microbiana do solo é consequência da diversidade genética, dos efeitos ambientais na expressão gênica e das interações ecológicas entre as diferentes populações (ZAK et al., 1994). Alterações sobre o metabolismo microbiano podem ter efeitos sobre a ciclagem de carbono e nutrientes. Desta forma o potencial fisiológico da comunidade microbiana também pode ser um indicador importante de alterações na qualidade biológica do solo.

A atividade biológica pode ser definida como toda reação bioquímica catalisada pelos organismos do solo e é freqüentemente medida pela quantificação da liberação de CO₂ do solo, pela oxidação de compostos orgânicos pela atividade metabólica de organismos aeróbicos do solo, método denominado de respirometria. A atividade dos organismos no solo é considerada um atributo positivo para a qualidade do solo, sendo a respiração um indicador sensível de decomposição de resíduos, do giro metabólico do carbono orgânico no solo e de distúrbios no ecossistema (PAUL et al., 1999). Segundo Tótola e Chaer (2002), uma alta taxa de respiração pode ser uma característica desejável quando se considera que ela é um sinal de rápida decomposição de resíduos orgânicos em nutrientes disponíveis para as plantas. Entretanto, também pode indicar uma rápida oxidação de matéria orgânica, por exemplo, quando da quebra de

agregados do solo promovida pela aração, a qual expõe material orgânico que outrora se encontrava protegido da ação de populações microbianas com atividade aeróbica.

Existem vários estudos dos efeitos dos resíduos de curtume sobre as propriedades químicas do solo, mas informações do seu impacto sobre as propriedades biológicas ainda são escassas e precisam ser mais bem compreendidos. É provável que alterações nas propriedades físico-químicas do solo possam influenciar direta ou indiretamente as populações microbianas e suas atividades. Sendo assim, torna-se importante estudar o impacto decorrente da utilização em conjunto do lodo do caleiro e de lodo primário da ETE, com teor reduzido de cromo, nos atributos biológicos do solo, como uma forma de monitoramento das alterações promovidas no solo, decorrentes dessa prática.

O presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito da aplicação de lodo de curtume em solo agrícola sobre: (i) a estrutura; (ii) a atividade biológica; (iii) e o perfil fisiológico das comunidades microbianas; (iv) grupos funcionais de microrganismos relacionados ao ciclo do N e (v) a ocorrência de FMA. Tais objetivos fundamentam-se nas seguintes hipóteses: 1) devido às características intrínsecas ao lodo de curtume (elevado teor de nutrientes e caráter alcalino) os atributos microbiológicos respondem rapidamente as aplicações do resíduo ao solo; 2) a aplicação de lodo de curtume modifica a estrutura da comunidade microbiana do solo; 3) as alterações sobre a estrutura de comunidade microbiana têm reflexos diretos sobre a atividade biológica e perfil metabólico dessa comunidade; 4) o elevado teor de nutrientes contido no lodo de curtume inibe a ocorrência dos FMA em solo tratados com esse resíduo.

Referências

ALCÂNTARA, M.A.K.; NETO, V.D.A.; CAMARGO, O.A.; CANTARELLA, H. Nitrogen mineralization in soils treated with tannery sludge. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 547-555, 2007.

ALVAREZ-BERNAL, D. CONTRERAS-RAMOS, S.M; TRUJILLO-TAPIA, N.; OLALDE-PORTUGAL, V.; FRÍAS-HERNÁNDEZ J.T.; DENDOOVEN, L. Effects of tanneries wastewater on chemical and biological soil characteristics. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 269-277, 2006.

AQUINO NETO, V.; CAMARGO, O.A. Crescimento e acúmulo de crômio em alface cultivada em dois latossolos tratados com CrCl_3 e resíduos de curtume. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 225-235, 2000.

ARAÚJO, F.F.; TIRITAN, C.S.; PEREIRA, H.M.; JÚNIOR-CAETANO, O. Desenvolvimento do milho e fertilidade do solo após aplicação de lodo de curtume e fosforita. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.12, n.5, p.507-511, 2008.

BENDING, G.D.; TURNER, M.K.; RAYNS, F.; MARX, M.C.; WOOD, M. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1785-1792, 2004

BRASIL. Ministério do meio ambiente. Resolução CONAMA n. 375, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, 29 ago. 2006.

CASTILHOS, D.D.; TEDESCO, M.J.; VIDOR, C. Rendimento de culturas e alterações químicas do solo tratado com resíduos de curtume e crômio hexavalente. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 1083-1092, 2002

CASTILHOS, D.D.; VIDOR, C.; CASTILHOS, R.M.V. Atividade microbiana em solo suprido com lodo de curtume e cromo hexavalente. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 6, n. 1, p.71-76, 2000.

CAVALLET, L.E.; SELBACH, P.A. Microbial populations affected by the soil disposal of tannery sludge. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2863-2869, 2008.

DYNIA, J.F.; SOUZA, M.D.; BOEIRA, R.C. Nitrate leaching in a Typic Haplustox planted with mayze after successive applications of sewage sludge. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 855-862, 2006.

FERREIRA, A.S.; CAMARGO, F.A.O.; TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A. Alterações de atributos químicos e biológicos de solo e rendimento de milho e soja pela utilização de resíduos de curtume e carbonífero. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 755-763, 2003.

FIGLIOLIA, A.; BENEDETTI, A.; DELL'ABATE, M.T.; IZZA, C.; INDIATI, R. Potential chromium bio-availability by *Lactuca sativa* grown on two soils amended with tannery leather residues. **Fresenius Environmental Bulletin**, Freising, v. 1, p. 406-410, 1992.

FREY, S.D.; ELLIOTT, E.T.; PAUSTIAN, K. Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 573-585, 1999.

- JAHNEL, M.C.; CARDOSO, E.J.B.N.; DIAS, C.T.S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 553-559, 1999.
- KANDELER, E. Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. In: PAUL, E.A. (Ed.). **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. 3rd ed. Oxford: Academic Press, 2007. chap. 3, p.53-84.
- KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, p. 75-86, 1995.
- KONRAD, E.E.; CASTILHOS, D.D. Alterações químicas do solo e crescimento do milho decorrente da adição do lodo de curtume. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 257-265, 2001.
- KRAY, H.K.; TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A.; GIANELLO, C.; SILVA, K.J. Tannery and coal mining waste disposal on soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2877-2882, 2008.
- MARTINES, A.M. **Impacto do lodo de curtume nos atributos biológicos e químicos do solo**. 2005. 62p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- MARTINES, A.M. **Avaliação ambiental e agrônômica do uso de lodo de curtume no solo**. 2009. 89p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- MARTINES, A.M.; ANDRADE, C.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Mineralização do carbono orgânico em solos tratados com lodo de curtume. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1149-1155, 2006.
- OLIVEIRA, D. Q. L. **Tratamento de rejeitos sólidos contendo cromo da indústria de couro: uso em processo de adsorção e como fonte de nitrogênio na agricultura**. 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- OLIVEIRA, D.Q.L.; CARVALHO, K.T.G.; BASTOS, A.R.R.; OLIVEIRA, L.C.A.; MARQUES, J.J.G.S.M.; NASCIMENTO, R.S.M.P. Utilização de resíduos da indústria de couro como fonte nitrogenada para capim-elefante. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 417-424, 2008.
- PACHECO, J.W.F. **Curtumes**. São Paulo: CETESB, 2005. 76 p.
- PAUL, E.A.; HARRIS, D.; COLLINS, H.P.; SCHULTHESS, U.; ROBERTSON, G.P. Evolution of CO₂ and soil carbon dynamics in biologically managed, row-crop agroecosystems. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 11, p. 53-65, 1999.

- PERUCCI, P. Enzyme-activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 14, p. 54-60, 1992.
- POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; CHRISTENSEN, B.T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic-matter due to straw incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 159-164, 1987.
- RIETZ, D.N.; HAYNES, R.J. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 845-854, 2003.
- SANTOS, A.; OLIVEIRA, L.C.; BOTERO, W.G.; MENDONCA, A.G.R.; SANTOS, F.A.; ROCHA, J.C.; RIBEIRO, M.L.; OLIVEIRA, A.S. Distribution and bioavailability of chromium in contaminated soils by tannery residues. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1693-1697, 2009.
- SELBACH, P.A.; TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; CAVALLET, L.E. Descarte e biodegradação de lodos de curtume no solo. **Revista do Couro**, Estância Velha, v. 4, p. 51-62, 1991.
- SIEVERDING, E. **Vesicular–arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Eschborn: Deutsche Gesellschaft Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, 1991. 371 p.
- SILVA, J.D.C.; LEAL, T.T.B.; ARAÚJO, A.S.F.; ARAÚJO, R.M.; GOMES, R.L.F.; MELO, W.J.; SINGH, R.P. Effect of different tannery sludge compost amendment rates on growth, biomass accumulation and yield responses of Capsicum plants. **Waste Management**, Oxford, v. 30, p. 1976-1980, 2010.
- SINSABAUGH, R.L. Enzymatic analysis of microbial pattern and process. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 17, p. 69-74, 1994.
- STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: Microbiological indicators. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science**, Oslo, v. 49, p. 1-24, 1999.
- TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M.. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V.V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo II**. Viçosa: SBCS, 2002, p. 195-276.
- TRUJILLO-TAPIA, N.; CRUZ MONDRAGON, C.; VASQUEZ-MURRIETA, M.S.; VAN CLEEMPUT, O.; DENDOOVEN, L. Inorganic N dynamics and N₂O production from tannery effluents irrigated soil under different water regimes and fertilizer application rates: A laboratory study. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 279-288, 2008.

2 ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA GENÉTICA DE BACTERIA E ATIVIDADE MICROBIANA EM SOLO AGRÍCOLA TRATADO COM LODO DE CURTUME

Resumo

A aplicação de lodo de curtume ao solo é uma forma de reciclagem desse resíduo, contudo, ainda são escassos estudos sobre as alterações que essa prática pode provocar nos atributos microbiológicos do solo. Estudou-se o efeito de duas aplicações anuais (2006 e 2007) de lodo de curtume (com baixo teor de cromo) na estrutura da comunidade e atividade microbiana do solo. Foram aplicadas doses de lodo baseadas no teor de N total, que variaram de 0 a 1200 kg de N ha⁻¹, em área agrícola, em Rolândia, Paraná, Brasil. Durante três meses o lodo permaneceu sobre o solo antes de ser incorporado por gradagem. Ao todo foram realizadas 7 amostragens de solo durante o período experimental. A estrutura da comunidade bacteriana, avaliada por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), foi modificada pelas aplicações de lodo de curtume. Logo após a primeira aplicação verificou-se uma nítida separação entre as comunidades microbianas nos diferentes tratamentos, sendo que cada dose de lodo impôs uma comunidade específica. Essas diferenças continuaram após 300 dias da aplicação e também após a segunda aplicação do resíduo, no entanto, após 666 dias do início do experimento não houve diferença nas comunidades microbianas entre as menores doses e o controle. A análise de curva de resposta principal (PRC) mostrou que houve um grande estímulo da primeira aplicação do lodo sobre a atividade biológica e esse estímulo permaneceu mesmo após 300 dias da aplicação. Na segunda aplicação também houve estímulo da atividade, mas de menor magnitude e menos prolongado, visto que, após 260 dias da segunda aplicação não houve diferença na atividade biológica entre os tratamentos. A PRC também mostrou que os atributos mais influenciados pela aplicação do lodo de curtume no solo foram as atividades enzimáticas relacionadas à ciclagem do N (asparaginase e urease). A análise de redundância (RDA) revelou que o estímulo à atividade microbiana está relacionado principalmente com o aumento do N inorgânico e elevação do pH do solo pelo lodo de curtume. Os resultados do presente estudo mostram que a alteração da estrutura de comunidade microbiana tem relação direta com modificações sobre a atividade biológica desse solo.

Palavras-chave: Aplicação de resíduo; Carbono; Nitrogênio; DGGE; Atividade enzimática; Estatística multivariada

Abstract

The application of tannery sludge to soils is a form of recycling; however, few studies have examined the impacts of this practice on soil microbial properties. We studied effects of two applications (2006 and 2007) of tannery sludge (with low chromium content) on the structure of the bacterial community and on the microbial activity of soils. We fertilized an agricultural area in Rolândia, Parana state, Brazil with

different doses of sludge based on total N content, which ranged from zero to 1200 kg ha⁻¹ total N. Sludge remained on the soil surface for three months before being plowed. Soils were sampled seven times during the experiment. Bacterial community structure, assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), was modified by the application of tannery sludge. Soon after the first application, there was clear separation between the bacterial communities in different treatments, such that each dose of sludge was associated with a specific community. These differences remained until 300 days after application and also after the second sludge application, but 666 days after the beginning of the experiment no differences were found in the bacterial communities of the lowest doses and the control. The principal response curve (PRC) analysis showed that the first sludge application strongly stimulated biological activity even 300 days after application. The second application also stimulated activity, but at a lower magnitude and for a shorter time, given that 260 days after the second application there was no difference in biological activity among treatments. PRC also showed that the properties most influenced by the application of tannery sludge were enzymatic activities related to N cycling (asparaginase and urease). The redundancy analysis (RDA) showed that tannery sludge's influence on microbial activity is mainly related to increases in inorganic N and soil pH. Results showed that changes in the structure of the bacterial community in the studied soils were directly related to changes of their biological activity.

Keywords: Carbon; DGGE; Enzymatic activity; Multivariate statistics; Nitrogen; Waste application

2.1 Introdução

O Brasil é o maior exportador mundial de couro, processando cerca de 44 milhões de peles por ano. Durante as diversas etapas do processamento de couro são gerados em média 100 L de diferentes tipos de lodos contendo cerca de 5% de matéria seca para cada pele processada, que podem ser reciclados ou tratados em separado em estação de tratamento de efluentes (ETE). Os lodos de curtume apresentam elevado teor de nutrientes e potencial de neutralização da acidez do solo, o que possibilita a sua utilização em áreas agrícolas, podendo ser uma alternativa para disposição final desses resíduos. Essa prática pode contribuir para a melhoria da fertilidade dos solos e nutrição das plantas (ALCÂNTARA et al., 2007). No entanto, existe a necessidade de critérios técnico-científicos para sua aplicação na agricultura, uma vez que tal prática, feita de forma inadequada, pode conduzir a valores muito elevados e inadequados de pH (CAVALLET; SELBACH, 2008), sais solúveis (ALVAREZ-BERNAL et al., 2006) e cromo (KAMALUDEEN et al., 2003) nos solos

tratados, o que pode comprometer a sustentabilidade agrícola e o uso futuro dessas áreas.

Apesar das preocupações causadas pelo cromo no ambiente, o principal risco está associado ao Cr hexavalente (VI). Contudo, o cromo atualmente empregado nas indústrias de couro no Brasil tem sido o sulfato de cromo [$\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$], que representa a forma menos tóxica, e também está geralmente complexado pela matéria orgânica do lodo e solo. O Cr(III) é a forma predominante do cromo em lodo de curtume e permanece nessa forma no solo, especialmente em pH acima de 5,5 (BARTLETT; KIMBLE, 1976). Além disso, os curtumes têm melhorado seus métodos de curtimento para reduzir o Cr total no lodo final.

Uma preocupação particular nesse tipo de prática é com relação ao funcionamento biológico do solo, cuja comunidade microbiana desempenha importante função na sustentabilidade e qualidade do solo, atuando em processos chave, como decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, com influência direta na sua fertilidade e na nutrição vegetal (KENNEDY; SMITH, 1995). A comunidade microbiológica é dinâmica e responde prontamente a alterações ambientais, inclusive àquelas provenientes do uso e manejo do solo, que causam modificações quantitativas e qualitativas na sua estrutura (TÓTOLA; CHAER, 2002). Assim, os atributos microbiológicos podem atuar como bioindicadores da saúde do solo ou dos distúrbios que podem ocorrer devido à ação antrópica.

Existem vários estudos dos efeitos dos resíduos de curtume sobre as propriedades químicas do solo, mas informações do seu impacto sobre a estrutura da comunidade microbiana e as conseqüências dessas alterações ainda são escassas. Assim, a prioridade principal é estudar os impactos do lodo de curtume com baixo teor de cromo sobre as propriedades biológicas do solo. Este trabalho avaliou os efeitos de duas aplicações anuais de lodo de curtume em solo agrícola sobre a estrutura e atividade da comunidade microbiana. A hipótese do estudo foi que as aplicações de lodo de curtume provocam alterações sobre a estrutura de comunidade microbiana que refletem sobre a atividade biológica desse solo.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

Área experimental e doses de lodo de curtume

O experimento foi instalado em área agrícola localizada no município de Rolândia, Estado do Paraná, Brasil (latitude: 23°17'S, longitude: 51°29'W, altitude: 650 m). O clima local é classificado, segundo Köppen, como Cfa, com precipitação média anual de 1600 mm, ocorrendo principalmente de setembro a março. A área experimental é manejada há mais de 10 anos em sistema de semeadura direta com rotação das culturas, soja (*Glycine max* L. Merrill) ou milho (*Zea mays* L.) no verão e trigo (*Triticum aestivum* L.) ou aveia (*Avena strigosa* Schreb) no inverno. O solo foi classificado como Rhodic Kandudult (US Taxonomy), de textura muito argilosa. A camada de 0-10 cm apresenta as seguintes características: pH 5,5 em CaCl₂ 0,01 mol l⁻¹ (1: 2,5, solo: solução v/v), C total 24,3 g kg⁻¹, N total 5,7 g kg⁻¹, capacidade de troca catiônica 11,96 cmol_c kg⁻¹, saturação por bases 64,5%, P disponível (resina) 34 mg dm⁻³ (RAIJ et al., 2001), argila 74%, silte 6% e areia 20% (CAMARGO, 1986).

O delineamento experimental foi de blocos completos casualizados, com quatro repetições. As doses de lodo foram calculadas em função do teor total de N contido no lodo de curtume. Os tratamentos foram doses equivalentes a 0, 120, 480, 840 e 1200 kg ha⁻¹ de nitrogênio total adicionados via lodo de curtume, respectivamente, o que correspondeu a 0, 3,4, 13,5, 23,6 e 33,7 Mg ha⁻¹ de lodo de curtume (base seca) na primeira aplicação (Jul. 2006) e 0, 2,3, 9,0, 15,8 e 22,6 Mg ha⁻¹ de lodo de curtume (base seca), na segunda aplicação (Ago. 2007), respectivamente. A dose de 120 kg ha⁻¹ corresponde à exigência de N para a obtenção de altos níveis de produtividade de milho (IAPAR, 2003).

Visando reproduzir o manejo adotado em diversos curtumes brasileiros, o lodo foi aplicado com umidade natural na superfície do solo, em parcelas de 90 m². Aos 89 dias após a primeira aplicação, o lodo de curtume foi incorporado ao solo por meio de grade, na profundidade de 0-20 cm. Na seqüência, foi realizado o cultivo de milho no

verão e aveia preta no inverno. Após o cultivo da aveia foi realizada a segunda aplicação de lodo (393 dias após a primeira aplicação) e mantido na superfície do solo por 87 dias, com posterior incorporação e novo cultivo de milho.

Durante todo o período experimental foram realizadas sete coletas de solo: aos 4, 79, 141, 301, 407, 533 e 666 dias após o início do experimento. Foram coletadas nove subamostras de solo por parcela, da camada de 0-10 cm, para formar uma amostra composta. As amostras foram conservadas a 4 °C por 4-6 dias antes das análises microbiológicas, bioquímicas e químicas. Para as análises moleculares as amostras foram armazenadas a – 80 °C.

Lodo de curtume

O lodo de curtume utilizado no experimento foi obtido do Curtume Vanzella Ltda (Rolândia, PR, Brasil) e era composto de uma mistura na proporção de 1:1 do lodo do caleiro, gerado na etapa de depilação e caleiro, e do lodo primário da ETE, resultante da precipitação dos efluentes gerados no processo, com exceção dos efluentes que contêm cromo. A mistura desses lodos em partes iguais é justificada em função de os mesmos serem gerados em maior quantidade e praticamente na mesma proporção durante o processamento das peles no Curtume Vanzella Ltda. Após a mistura dos lodos, foram coletadas amostras, conservadas a 4 °C e enviadas ao laboratório, onde cada amostra foi dividida em duas subamostras: (A) mantida com umidade natural; (B) seca a 65 °C por 48 h.

Na subamostra (A) foram determinados os teores de N-NH_4^+ e de $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ pelo método da destilação com arraste a vapor (MULVANEY, 1996); o pH e a condutividade elétrica (CE) com leituras diretas nas amostras, além dos sólidos totais e sólidos voláteis por secagem a 65 °C e 500 °C, respectivamente (APHA, 2005). A subamostra (B) foi submetida à determinação das concentrações de carbono orgânico pelo método da oxidação com dicromato sob aquecimento externo (NELSON; SOMMERS, 1996); N-total, pelo método Kjeldahl, usando bloco digestor (BREMNER, 1996); poder de neutralização, por alcalimetria (BRASIL, 2007); Ca, Mg, K, P, S, Na, Mn, Fe, B, Zn, Cu, Mo, Al, As, Cd, Pb, Hg, Ni, Se, Cr total por digestão nítrica em

microondas e leitura em ICP-AES (USEPA, 1986), sendo o K e Na determinados com fotômetro de chama (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Caracterização físico-química do lodo de curtume utilizado no experimento

Variável	1ª aplicação	2ª aplicação	Varição ⁽³⁾
pH ⁽¹⁾	12,7	9,7	7,7 – 11,8
CE (dS m ⁻¹) ⁽¹⁾	29,5	16,6	-
Sólidos totais, a 65 °C (g kg ⁻¹)	53,3	55,4	120,0 – 390,0
Sólidos voláteis (g kg ⁻¹)	442	554	-
Poder de neutralização (g de CaCO ₃ kg ⁻¹)	262	361	160 – 315
C orgânico (g kg ⁻¹)	308	321	65 – 257,8
N total (g kg ⁻¹)	35,7	53,2	9,8 – 53,4
N-NH ₄ ⁺ (g kg ⁻¹)	20,4	21,9	-
N-NO ₃ ⁻ (g kg ⁻¹)	0,2	0,2	-
Relação C/N	8,7	6,0	4,1 – 13,8
Ca (g kg ⁻¹)	78,9	88,0	20,0 – 210,0
Mg (g kg ⁻¹)	0,7	1,0	0,2 – 7,5
K (g kg ⁻¹)	0,1	3,3	0,1 – 1,7
P (g kg ⁻¹)	3,9	3,8	1,1 – 7,5
S (g kg ⁻¹)	36,1	43,0	13,0 – 15,0
Na (g kg ⁻¹)	10,0	66,9	8,1 – 59,9
Mn (mg kg ⁻¹)	2858	3340	128 – 6350
Fe (mg kg ⁻¹)	408	1249	-
B (mg kg ⁻¹)	4,5	5,6	-
Zn (mg kg ⁻¹)	43,3	73,0	48,0 – 176,0
Cu (mg kg ⁻¹)	4,5	16,0	14,0 – 81,0
Mo (mg kg ⁻¹)	3,3	<0,5 ⁽²⁾	-
Al (mg kg ⁻¹)	2257	13440	-
As (mg kg ⁻¹)	<1,0 ⁽²⁾	<0,5 ⁽²⁾	-
Cd (mg kg ⁻¹)	<1,0 ⁽²⁾	<0,5 ⁽²⁾	0,1 – 4,0
Pb (mg kg ⁻¹)	<1,0 ⁽²⁾	9,3	15,0 -35,0
Hg(mg kg ⁻¹)	<1,0 ⁽²⁾	<0,5 ⁽²⁾	-
Ni (mg kg ⁻¹)	3,0	7,8	1,3 – 20,0
Se (mg kg ⁻¹)	<1,0 ⁽²⁾	<0,5 ⁽²⁾	-
Cr total (mg kg ⁻¹)	1613	580	798 – 22200

Resultados expressos em base seca a 65 °C por 48 h; ⁽¹⁾ Medidos na amostra *in natura*; ⁽²⁾ Concentrações menores que o limite de detecção; ⁽³⁾ Valores obtidos de Alcântara et al. (2007), Barajas-Aceves e Dendooven (2001), Barajas-Aceves, Velásquez-Ocampo e Vázquez-Rodríguez, (2007), Kray et al. (2008), Martines, Andrade e Cardoso (2006).

Extração de DNA e DGGE

A estrutura genética da comunidade bacteriana do solo foi avaliada por meio da separação de fragmentos do gene codificando o rRNA 16S, amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e DGGE (MUYZER, DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993). Foram avaliadas as amostras de solo coletadas aos 4, 301, 407 e 666 dias. O DNA metagenômico de cada tratamento foi extraído de 0,5 g de solo,

utilizando-se o Fast DNA SPIN KIT para solo (Q-Biogene, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A região V3 do gene codificando o rRNA 16S foi amplificada por PCR, utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os oligonucleotídeos iniciadores BA338fGC e UN518r (ØVREÅS et al., 1997). A reação foi realizada em um volume de 25 μ l com 1X Taq Platinum DNA polimerase buffer, 0,1 mmol l⁻¹ dNTPs, 1,5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0,625 U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 1 pmol de cada primer e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação foram de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 92 °C; 1 min a 55 °C, e de 1 min a 72 °C. A extensão final foi de 10 min a 72 °C.

O DNA do produto de PCR foi quantificado por densitometria após eletroforese em gel de agarose 1% e comparação com o padrão de massa (Low DNA Mass Ladder – Invitrogen, Brasil) e foi analisado por meio de géis de acrilamida (8%) com um gradiente desnaturante de 15 a 55%, preparado com mistura de solução desnaturante (7 mol l⁻¹ uréia e 40 cl l⁻¹ de formamida) e solução a 0% (sem uréia e formamida) (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 200 V constantes e 60 °C por 4 h, utilizando-se o sistema “DCode” (BioRad, EUA), em tampão 0,5X TAE. O DNA foi corado com “SYBR Green” (GE Healthcare, Brasil). Os géis foram analisados por densitometria usando um densitômetro laser “FluorImager” (GE Healthcare, Brasil) e o programa “Diversity Database” (BioRad, EUA), para a geração da matriz binária dos perfis de amplicons de cada amostra.

Avaliação de atributos microbiológicos do solo

Para as análises baseadas em número mais provável (NMP) e unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos, foram preparadas diluições seriadas de solo em solução salina NaCl (0,145 mol l⁻¹). A partir dos resultados obtidos em cada meio de cultura, procedeu-se à estimativa do NMP por grama de solo com base em uma tabela de probabilidades (COCHRAN, 1950). Para a determinação de UFC procedeu-se a contagem de colônias na diluição que apresentou entre 30 e 300 colônias. A umidade do solo foi determinada após secagem a 105 °C por 24 h para expressão dos resultados em massa de solo seco.

A estimativa do NMP de microrganismos amonificadores e desnitrificantes foi realizada de acordo com o método sugerido por Tiedje (1996) e Sarathchandra (1978), respectivamente. A estimativa do NMP de bactérias e fungos foi realizada segundo método de plaqueamento por gotas, descrito por Jahnel, Cardoso e Dias (1999). A estimativa de UFC de microrganismos proteolíticos foi realizada de acordo com o método de plaqueamento descrito por Wood (1980), sendo a caseína pura substituída por leite em pó desnatado.

As atividades da asparaginase, glutaminase e urease foram determinadas segundo Tabatabai (1996) e o N-NH_4^+ foi determinado pelo método da destilação com arraste a vapor (MULVANEY, 1996). A determinação da atividade da fosfatase ácida também foi de acordo com Tabatabai (1996) baseado na hidrólise do *p*-nitrofenil e determinação colorimétrica do *p*-nitrofenol resultante. A atividade da celulase segundo Schinner e Von Mersi (1990) na qual a carboximetil celulose é usada como substrato e os açúcares redutores resultantes da atividade enzimática são quantificados colorimetricamente pelo método do Azul da Prússia. A respiração basal foi determinada de acordo com Alef e Nannipieri (1995). O carbono da biomassa microbiana foi determinado pelo método da fumigação-extração de acordo com Vance, Brookes e Jenkinson (1987).

Avaliação de atributos químicos do solo

O pH (acidez atual) foi determinado por potenciometria, em solução de CaCl_2 ($0,01 \text{ mol l}^{-1}$), a condutividade elétrica (CE) por condutivimetria, em solução aquosa. O carbono orgânico total (Corg) foi determinado por oxidação com dicromato em meio ácido e mensurado colorimetricamente. Ca, Mg, K, Na e P foram determinados em extratos de solo obtidos com resina trocadora de íons. As concentrações de Ca e Mg foram obtidas por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama, as concentrações de Na e K foram determinadas por espectrometria de emissão de chama e o P por espectrofotometria de absorção molecular.

O nitrogênio inorgânico ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$) foi extraído com KCl (2 mol l^{-1}) na relação 1:10 (m:v). O N-NH_4^+ foi determinado mediante o emprego de um sistema de

análise de injeção em fluxo contínuo (FIA) com leitura em espectrofotômetro a 605 nm (KAMOGAWA; TEIXEIRA, 2009) e o N-NO_3^- foi determinado por espectrofotometria em ultravioleta, com leitura em 220 nm e 275 nm (APHA, 2005).

Análise estatística dos dados

A avaliação dos perfis de amplicons de Bacteria obtidos pelo DGGE foi realizada pela análise em escala multidimensional não-métrica (NMDS), utilizando o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis. Subseqüentemente uma análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para determinar diferenças estatísticas entre os tratamentos através do programa PRIMER 5 (PRIMER-E, 2001).

Os dados microbiológicos foram submetidos à análise estatística univariada, via ANOVA, considerando como fontes de variação as doses de lodo de curtume e as épocas de coleta de solo, pelo programa STATISTICA (STATSOFT, INC., 2001). Para essa análise os dados de NMP e UFC foram transformados para Log (X).

Utilizou-se a análise multivariada de curva de resposta principal (PRC) (VAN DEN BRINK; TER BRAAK, 1999) para testar as alterações temporais nos atributos microbiológicos originadas pelas doses de lodo de curtume quando comparadas com o controle (solo sem aplicação de lodo) e também para obter a contribuição de cada atributo para a separação dos tratamentos em relação ao controle. Em cada tempo de amostragem, as diferenças entre os tratamentos e o controle foram analisadas via uma ANOVA (seguido de um teste de Dunnet) com base nas coordenadas das amostras ("sample scores") no eixo 1 da PRC. Realizou-se análise de PRC também para os dados químicos.

A análise de redundância (RDA) foi utilizada para testar a existência de relações significativas entre os atributos microbiológicos e químicos do solo, em função das duas aplicações de doses de lodo de curtume. Para essa análise os dados de NMP e UFC foram transformados para Log (X) e foi empregado o método de seleção das variáveis químicas ("Forward selection"). Para tais análises utilizou-se o software CANOCO 4.5 (TER BRAAK, 1988). Também foram calculados os coeficientes de correlação de Spearman entre os dados microbianos e químicos do solo.

2.2.2 Resultados

Estrutura genética da comunidade de Bacteria do solo

Houve uma tendência de maior número de bandas nos tratamentos que receberam a aplicação do lodo (Apêndice A). Um total de 70 amplicons foi detectado, variando de 27 a 53, dependendo da dose de lodo e da época (dados não apresentados) (Apêndice B).

A análise em escala multidimensional não-métrica (NMDS), baseada nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria, das 4 épocas avaliadas, revelou que a estrutura da comunidade bacteriana do solo foi alterada pela aplicação de lodo de curtume (Figura 2.1). Aos 4 e 407 dias (Figura 2.1 A e C, respectivamente), coletas realizadas logo após cada aplicação de lodo de curtume, a representação bidimensional dos perfis de bandas mostrou clara separação entre todos os tratamentos, ou seja, cada tratamento apresenta sua comunidade bacteriana específica. No entanto, aos 301 e 666 dias (Figura 2.1 B e D, respectivamente), coletas realizadas aproximadamente após 9 meses de cada aplicação de lodo de curtume, essa separação não ficou tão clara, apresentando sobreposição de tratamentos, principalmente entre as menores doses e o tratamento controle, o que demonstra certa semelhança entre suas estruturas de comunidades bacterianas.

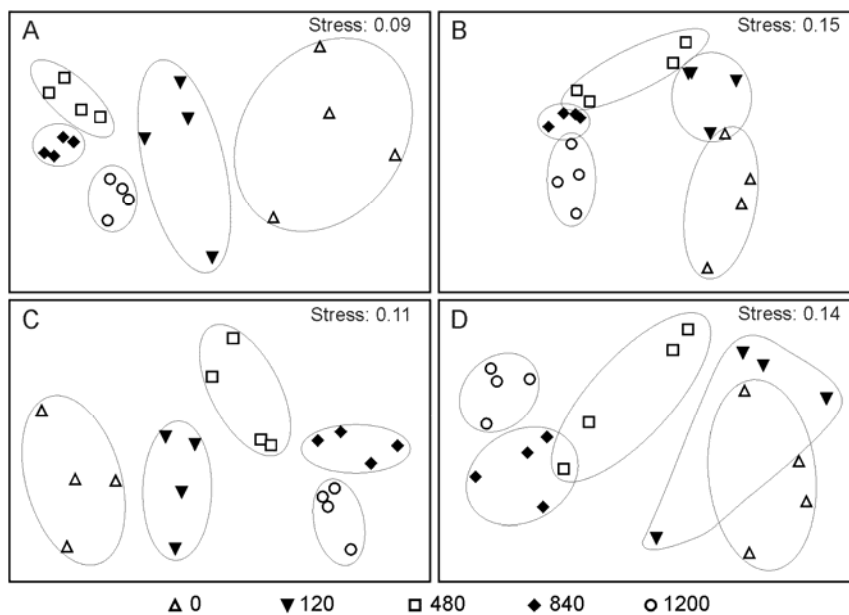


Figura 2.1 – Análise em escala multidimensional (NMDS) dos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria após DGGE, em solo sob aplicação de doses de lodo de curtume no município de Rolândia, PR, Brasil. A, B, C, D; correspondem a 4, 301, 407 e 666 dias após o início do experimento, respectivamente; 0, 120, 480, 840 e 1200, correspondem às doses de lodo de curtume baseadas em kg N ha^{-1} , respectivamente

Para o presente trabalho, os níveis de estresse aplicados para as épocas avaliadas pela NMDS variaram entre 0,09 e 0,15 (Figura 2.1); o que indica que a representação bidimensional é válida. Complementando os resultados da NMDS, a análise de similaridade (ANOSIM) dos perfis de DGGE aos 4, 301 e 407 dias revelou diferenças significativas ($R_{\text{global}} < 0,05$) e o resultado do teste de pareamento mostrou que todos os tratamentos são significativamente diferentes entre si (Tabela 2.1), sugerindo que cada dose de lodo impôs uma comunidade bacteriana específica. A disposição gráfica da NMDS aos 301 dias indica que o efeito do lodo sobre a comunidade bacteriana do solo ainda foi detectável 10 meses após a primeira aplicação do lodo. Aos 666 dias, aproximadamente 9 meses após a segunda aplicação de lodo, esse efeito ainda foi evidente apenas no solo tratado com a maior dose de lodo ($1200 \text{ kg N ha}^{-1}$). Portanto, o efeito do lodo de curtume sobre a estrutura genética da comunidade bacteriana do solo é mais marcante e prolongado no primeiro ano de aplicação.

Tabela 2.2 – Resultado do teste de pareamento (valores de R) baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria após DGGE das 4 épocas avaliadas, de área sob aplicação de doses de lodo de curtume, no município de Rolândia, PR, Brasil

Dose de lodo (N total, kg ha ⁻¹)	Teste de pareamento			
	4 dias	301 dias	407 dias	666 dias
0, 120	0,91*	0,53*	0,95*	0,13
0, 480	1,00*	0,80*	1,00*	0,69*
0, 840	1,00*	0,97*	1,00*	0,98*
0, 1200	0,95*	0,98*	1,00*	1,00*
120, 480	0,72*	0,40*	0,73*	0,22
120, 840	0,87*	1,00*	1,00*	0,90*
120, 1200	0,74*	1,00*	1,00*	0,91*
480, 840	0,81*	0,32*	0,92*	0,21
480, 1200	1,00*	0,73*	0,81*	0,52*
840, 1200	0,97*	0,74*	0,72*	0,67*
R global	0,73*	0,70*	0,87*	0,63*

* $P < 0,05$

Atividade microbiológica do solo

Houve diferenças significativas nas propriedades microbiológicas do solo nas diferentes épocas de coleta. Além disso, as doses de lodo também afetaram a maioria dos atributos avaliados, com exceção dos fungos totais, a atividade da glutaminase e o carbono da biomassa microbiana (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Análise de variância dos dados microbiológicos de 7 épocas de amostragem de solo sob aplicação de doses de lodo de curtume em área agrícola no município de Rolândia, PR, Brasil

Atributos microbianos	Dose de lodo	Época de coleta	Dose de lodo X Época de coleta
			Valor de F
Bactéria	17,49*	27,42*	1,01
Fungos	0,50	47,33*	0,92
Amonificantes	15,12*	5,17*	5,28*
Denitrificantes	18,20*	9,01*	2,31*
Proteolíticos	20,7*	25,5*	4,1*
Respiração do solo	65,83*	239,87*	10,76*
Asparaginase	37,58*	142,78*	32,06*
Glutaminase	1,92	201,45*	8,32*
Urease	23,36*	311,17*	37,19*
Celulase	4,06*	40,02*	0,88
Fosfatase ácida	7,80*	97,13*	1,3
C – Biomassa microbiana	0,98	21,95*	0,70

* $P < 0,05$

Em geral, o NMP de bactérias, amonificadores e denitrificadores e a UFC de microrganismos proteolíticos foram maiores nos solos que receberam lodo de curtume. As outras variáveis apresentaram padrões similares ao observado para os amonificantes, mostrados na Fig. 2.2 A. Os impactos mais acentuados sobre as quantificações microbianas foram observados principalmente após cada aplicação de lodo de curtume. Aos 4 dias, os valores de NMP de amonificadores (Fig 2.2 A), denitrificadores e UFC de proteolíticos nos tratamentos que receberam lodo foram até 2,5, 2,0 e 1,2 log unidades superiores que no tratamento controle, respectivamente. Aos 407 dias, nos tratamentos com lodo, as bactérias apresentaram valores até 2,0 log unidades superiores ao tratamento controle (dados não apresentados).

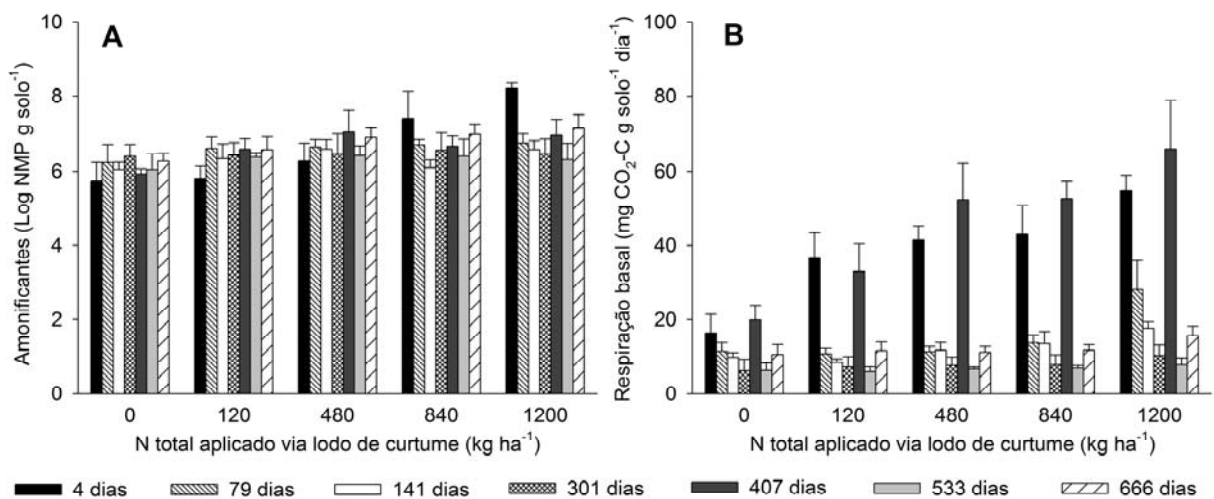


Figura 2.2 – Número mais provável (NMP) de microrganismos amonificadores (A) e respiração basal do solo (B) em área agrícola sob aplicação de doses de lodo de curtume no município de Rolândia, PR, Brasil. Barras indicam o desvio padrão da média (n = 4)

Também houve grande estímulo da respiração basal do solo pelas doses de lodo de curtume, sendo mais intenso após cada aplicação do resíduo (4 e 407 dias), com valores de produção de CO₂ até 3,3 vezes superiores que no tratamento controle (Figura 2.2 B). As atividades enzimáticas da asparaginase e urease apresentaram comportamento semelhante entre si, ou seja, foram estimuladas pelas doses de lodo de curtume principalmente após a primeira aplicação de lodo (4 dias), alcançando valores 16,9 e 4,6 superiores em relação ao tratamento controle, respectivamente (Figura 2.3

A). Aos 407 dias, logo após a segunda aplicação do lodo, a atividade da asparaginase foi até 3,9 vezes superiores ao controle, enquanto a urease foi 10% superior. A atividade da celulase também foi estimulada pela aplicação do resíduo. No entanto, diferentemente das outras atividades enzimáticas, o maior estímulo foi observado aos 301 dias, com valores 2,5 vezes superiores que os observados no controle (dados não apresentados). A atividade da fosfatase ácida apresentou comportamento diferenciado das outras enzimas em todas as épocas de coleta. Observou-se um aumento médio de 15% na atividade dessa enzima nas menores doses, seguido de um decréscimo médio nas maiores doses de 15% em relação ao tratamento controle (Fig 2.3 B).

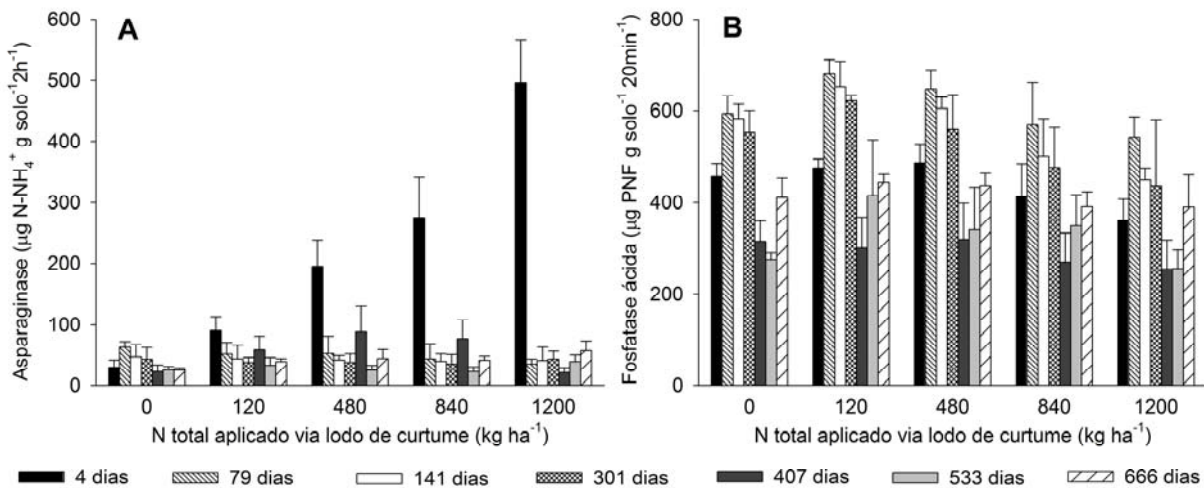


Figura 2.3 – Atividade da asparaginase (A) e fosfatase ácida (B) em área agrícola sob aplicação de doses de lodo de curtume no município de Rolândia, PR, Brasil. Barras verticais indicam o desvio padrão da média ($n = 4$)

Atributos microbiológicos do solo ao longo do tempo após a aplicação de lodo de curtume

A curva de resposta principal (PRC) revelou que os atributos microbiológicos avaliados sofreram alterações devido às doses de lodo de curtume e permitiu diferenciar os tratamentos que receberam lodo, do tratamento controle, ao longo de 7 épocas de amostragem. Os dados de fungos totais, atividade da glutaminase e o carbono da biomassa microbiana não foram incluídos nessa análise, pois, não houve efeito das aplicações de lodo de curtume pela análise de variância (Tabela 2.3). O teste

de permutações de Monte Carlo (499 permutações) mostrou que houve influência significativa dos diferentes tratamentos (doses de lodo) ao longo dos 666 dias de estudo (F ratio = 64,3; P = 0,002) explicando 22% da variabilidade total dos dados. Neste caso, o primeiro eixo canônico representa 63% da variabilidade total explicada (Figura 2.4).

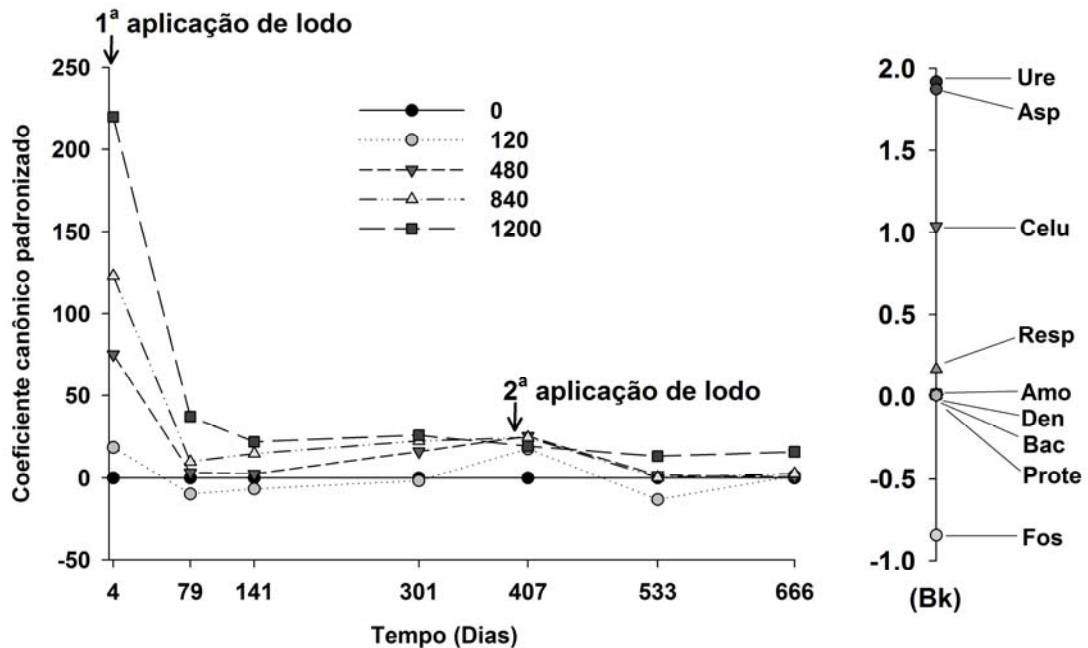


Figura 2.4 – Curvas de resposta principal (PRC) dos atributos microbiológicos do solo avaliados nas sete épocas (4, 79, 141, 301, 407, 533 e 666 dias após o início do experimento) em função das doses de lodo de curtume (0, 120, 480, 840 e 1200 kg N ha⁻¹ via lodo de curtume). Peso dos atributos microbiológicos avaliados (Bk); atividade da urease (Ure); atividade da asparaginase (Asp); atividade da celulase (Celu); respiração basal (Resp), amonificadores (Amo); desnitrificantes (Den), bactéria (Bac); proteolíticos (Prote) e atividade da fosfatase ácida (Fos)

Quando adicionado ao solo, o lodo de curtume estimulou a atividade microbiana, comportamento que pode ser visualizado aos 4 e 407 dias (Figura 2.4). A análise dos “sample scores” de cada tratamento pelo teste de Dunnett mostra que nessas coletas os solos que receberam lodo de curtume apresentaram condições microbianas diferenciadas do controle (480, 840 e 1200) (Tabela 2.4). Após o grande estímulo provocado pela primeira aplicação de lodo, a PRC e o teste de Dunnett, mostram que a atividade biológica do solo tende a cair a patamares próximos do controle. No entanto, após 300 dias, nos tratamentos 840 e 1200, os efeitos da primeira aplicação do lodo

ainda persistem. Após a segunda aplicação (407 dias), os tratamentos que receberam lodo (480, 840 e 1200) continuaram a apresentar atividade biológica diferenciada do controle, no entanto, a magnitude desse estímulo foi bem menor, quando comparado com o do primeiro ano (4 dias). Após 9 meses da segunda aplicação de lodo (666 dias), ao contrário do que foi observado no primeiro ano, a atividade de todos os tratamentos com lodo não diferiu da do tratamento controle, demonstrando efeito passageiro do estímulo.

Tabela 2.4 – Resultado do teste de Dunnett das 7 épocas avaliadas, de área sob aplicação de doses de lodo de curtume, no município de Rolândia, PR, Brasil. 0, 120, 480, 840 e 1200 kg N ha⁻¹ via lodo

Total N via lodo (kg N ha ⁻¹)	Teste de Dunnett						
	4 dias	79 dias	141 dias	301 dias	407 dias	533 dias	666 dias
0, 120	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
0, 480	*	ns	ns	ns	*	ns	ns
0, 840	*	ns	ns	*	*	ns	ns
0, 1200	*	*	ns	*	*	ns	ns

* $P < 0,1$; ns não significativo

Na Figura 2.4, os valores de Bk representam o peso de cada atributo microbiano na PRC, servindo como auxiliar de interpretação do diagrama (os atributos com valores de Bk mais afastados do valor zero são os que mais influenciam as alterações observadas entre os tratamentos ao longo do tempo). Assim, a atividade das enzimas urease e asparaginase, que apresentaram maiores valores de Bk em módulo, são as que mais foram influenciadas pela aplicação de lodo de curtume.

Relação dos atributos microbiológicos com os atributos químicos do solo

Para a análise de redundância (RDA), os dados de CE e capacidade de troca catiônica (CTC) foram eliminados, pois, apresentavam efeito de colinearidade com outras variáveis químicas. O teor de K e Ca foram desconsiderados, porque não foram significativos na seleção de variáveis ambientais (forward selection) ($P > 0,05$). As épocas de coleta de solo foram utilizadas como co-variáveis, pois, pela análise univariada, houve efeito de época em todas as variáveis respostas (atributos microbiológicos e bioquímicos) (Tabela 2.3).

A RDA revelou relação significativa dos atributos microbiológicos e bioquímicos com os químicos do solo (Teste de permutação de Monte-Carlo, F -ratio = 99,65; P = 0,002). Considerando a influência das variáveis ambientais (atributos químicos), o eixo 1 explica 85% da variabilidade e junto com o eixo 2 representam 95% (Figura 2.5).

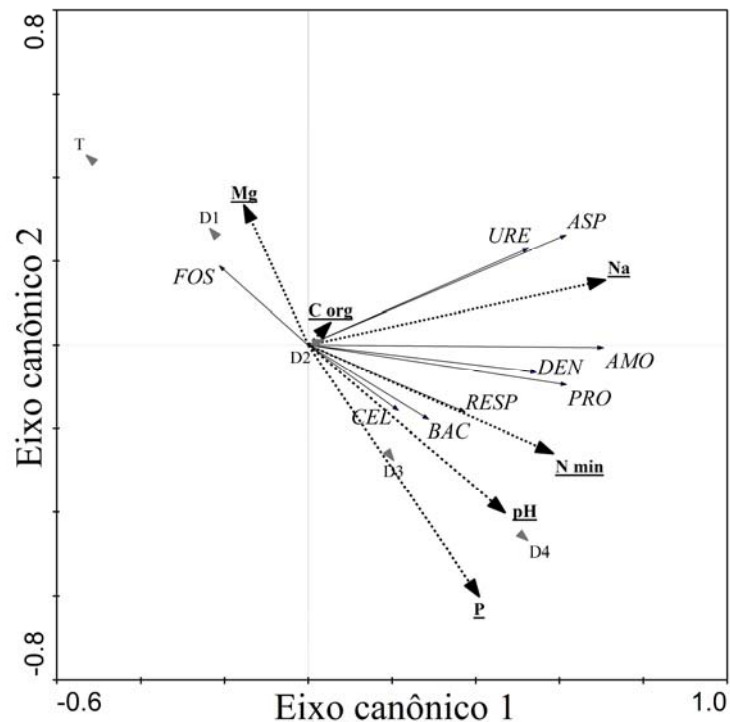


Figura 2.5 – Análise de redundância (RDA) dos atributos microbiológicos e bioquímicos do solo de área sob aplicação de lodo de curtume no município de Rolândia, PR, Brasil. Setas contínuas representam as variáveis microbiológicas e bioquímicas: ASP, asparaginase; URE, urease; CEL, celulase; FOS, fosfatase ácida; RESP, respiração basal; BAC, bactérias totais; AMO, amonificadores; DEN, desnitrificantes; PRO, proteolíticos. Setas pontilhadas representam as variáveis ambientais: pH, acidez ativa; Na, sódio; Nmin, nitrogênio mineral; Corg, carbono orgânico; P, fósforo; Mg, magnésio. Setas cinzentas representam os tratamentos, doses equivalentes em kg N ha^{-1} via lodo de curtume

A atividade da asparaginase, da urease e os microrganismos amonificadores relacionaram-se com o aumento do teor de sódio do solo. Já a atividade da celulase, as bactérias totais, os proteolíticos, os desnitrificantes, a taxa de respiração basal e também os amonificadores foram relacionados com o aumento do pH e do teor de nitrogênio mineral (Figura 2.5).

2.2.3 Discussão

Assim como no presente estudo, estímulos a grupos microbianos em solo sob aplicação de resíduos de curtume têm sido relatados (CAVALLET; SELBACH, 2008), bem como estímulo à atividade microbiana, avaliada pela produção de CO₂ (MARTINES; ANDRADE; CARDOSO, 2006) ou atividade enzimática (BARAJAS-ACEVES; VELÁSQUEZ-OCAMPO; VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, 2007). No entanto, a maioria dos estudos avalia uma gama reduzida de atributos e esses são analisados separadamente, o que limita as inferências sobre o efeito de resíduos de curtume sobre os aspectos microbianos globais do solo. A utilização combinada de vários parâmetros microbiológicos é mais adequada para avaliar alterações ou distúrbios ambientais do que aqueles que seriam obtidos por meio da análise de um único parâmetro. Dentro desse contexto, os métodos de estatística multivariada, que consideram as amostras e as variáveis em seu conjunto, permitem extrair informações complementares, o que a análise univariada não consegue evidenciar (McGARIGAL; CUSHMAN; STAFFORD, 2000).

O principal fator relacionado às alterações sobre a estrutura de comunidade bacteriana e o estímulo à atividade microbiana é que o lodo de curtume pode atuar como fonte de C, de rápida e intensa mineralização (MARTINES; ANDRADE; CARDOSO, 2006), assim como fonte de compostos nitrogenados, energia e nutrientes para os microrganismos quimioheterotróficos e, por meio da mineralização de N e S, atuam como fonte de energia aos microrganismos quimioautotróficos. Outros fatores que também podem contribuir para essas alterações é que o lodo de curtume apresenta caráter alcalino (pH 12,7 e 9,7) que garante um potencial de correção da acidez do solo. Sabe-se que o aumento do pH do solo favorece a atividade microbiana (PIETRI; BROOKES, 2008). Devido à baixa relação C/N do lodo utilizado (9:1 e 6:1), espera-se a predominância de mineralização sobre a imobilização de nitrogênio pela comunidade microbiana do solo, conforme constatado por Alcântara et al. (2007). O nitrogênio é frequentemente um fator limitante chave para os organismos do solo e a adição desse elemento via lodo pode alterar a biomassa, atividade e composição de espécies microbianas (SARATHCHANDRA et al., 2001). Esses argumentos corroboram os

resultados da RDA que relacionaram os atributos microbianos mensurados no presente estudo principalmente ao aumento do teor de N inorgânico e elevação do pH do solo pela aplicação de lodo de curtume.

Devido às características apresentadas pelo lodo de curtume, existem populações microbianas que podem ser estimuladas em maior ou menor intensidade, enquanto outras podem ser eliminadas ou inibidas em função do resíduo adicionado, promovendo alterações sobre a estrutura de comunidade microbiana do solo. Quando resíduos são aplicados ao solo, não somente substratos degradáveis e nutrientes são supridos, mas também uma grande diversidade de microrganismos já adaptados à degradação desses constituintes, podendo ter ação inoculante (BASU; BHATTACHARYA; PAUL, 1997). Contudo, a ação inoculante do lodo na comunidade microbiana do solo nem sempre é observada, ou seja, a adição da microbiota inerente a determinado resíduo não é decisiva para alterar a estrutura da comunidade do solo que o recebeu (INNEREBNER et al. 2006). A aplicação de resíduos orgânicos pode contribuir principalmente para ativar populações microbianas autóctones e copiotróficas do solo e indiretamente estimular os ciclos biogeoquímicos, fornecendo vários minerais essenciais para a nutrição das plantas.

Aplicações de lodo de curtume causaram alterações na estrutura de comunidade de bactérias, provavelmente devido ao desenvolvimento de populações microbianas adaptados para degradar o resíduo adicionado, resultando em alterações na atividade microbiana do solo, como verificado pela PRC. Alterações sobre a estrutura de comunidade bacteriana em solos que receberam diferentes tipos de resíduos têm sido relatadas (ENWALL et al., 2007, INNEREBNER et al., 2006), incluindo solos cronicamente contaminados com lodo de curtume (KAMALUDEEN et al., 2003). Esses autores atribuíram o fato principalmente ao teor de Cr^{6+} presente no contaminante. No entanto, como o lodo utilizado no presente estudo apresentava baixo teor de cromo (1613 e 580 mg kg^{-1}), na forma de Cr^{3+} , o que resulta em uma concentração no solo não maior que 27 mg kg^{-1} na maior dose de lodo (1200 $\text{kg N total ha}^{-1}$), considerando as duas aplicações anuais, as alterações promovidas pela aplicação de lodo sobre a estrutura da comunidade microbiana provavelmente ocorreu pelo aporte de C,

compostos nitrogenados e nutrientes (ALVAREZ-BERNAL et al., 2006), além do poder corretivo da acidez do solo pelo lodo aplicado (FERREIRA et al., 2003).

O PCR-DGGE mostrou diferentes perfis nas diferentes épocas de coleta, provavelmente devido ao rearranjo das comunidades bacterianas nos diferentes tratamentos, como resultado da exaustão de substrato facilmente degradável no fim de cada ciclo da aplicação de lodo de curtume, quando o declínio da atividade microbiana também foi observado. Alterações na estrutura de comunidade, juntamente com os efeitos ambientais e as interações ecológicas, têm efeitos diretos sobre a diversidade metabólica e atividade biológica do solo (ZAK et al., 1994). Diferenças na composição da matéria orgânica e alterações durante o processo de decomposição modificam a disponibilidade de substratos, que podem levar à sucessão microbiana e influenciar a estrutura de comunidade (MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003).

A diminuição da magnitude no estímulo à atividade biológica promovido pela segunda aplicação do lodo (407 dias), em comparação com a primeira (4 dias), verificado através dos menores coeficientes canônicos padronizados na PRC, pode ser explicada por um mecanismo de feedback que balanceia os processos de promoção e supressão da atividade e produção de enzimas pelas células dos organismos do solo, resultando em nível relativamente constante de atividades (MARTENS; JOHANSON; FRANKENBERGER, 1992). Esses autores estudaram a aplicação de resíduo urbano compostado ao solo durante três anos e observaram que ocorria estímulo positivo à atividade enzimática a cada aplicação do resíduo, no entanto, a magnitude do estímulo diminuía a cada aplicação.

A composição da mistura de lodo utilizado no experimento para cada ano foi diferente e pode ter contribuído para a redução do efeito estimulante do lodo sobre os atributos microbianos. Na segunda aplicação foram adicionados 1,8, 2,4, 4,5 e 7,0 vezes mais níquel, cobre, sódio e chumbo em cada dose que na primeira aplicação. Sabe-se que altos teores de alguns metais no solo são prejudiciais ao desenvolvimento microbiano (KUPERMAN; CARREIRO, 1997), bem como o excesso de sais, como o sódio, podem causar problemas de osmorregulação sobre os microrganismos, e causar impactos negativos sobre eles (RIETZ; HAYNES, 2003).

O que também pode explicar o menor estímulo aos microrganismos na segunda aplicação é que o efeito do lodo sobre os atributos químicos do solo foi menor nesse ano. O resultado da PRC dos dados químicos (dados não apresentados) (Apêndice C) mostrou efeito significativo dos tratamentos (doses de lodo) ao longo do tempo (F ratio = 339,35, $P = 0,002$), explicando 48% da variabilidade total dos dados. Em geral, os coeficientes canônicos padronizados dos dados químicos aos 407 dias dos tratamentos que receberam lodo foram entre 15% e 53% menores que os das mesmas doses equivalentes do ano anterior (4 dias após aplicação). A magnitude das alterações sobre as propriedades químicas do solo têm grande influência sobre os microrganismos, seus processos e funções no solo (AON; COLANERI, 2001).

A PRC mostrou que as atividades enzimáticas foram os atributos mais influenciados pela aplicação do lodo de curtume (valores Bk), o que permitiu diferenciar os tratamentos ao longo do tempo. As atividades enzimáticas têm sido utilizadas como indicadores sensíveis de alterações provocadas por práticas de manejo do solo (PERUCCI, 1992). De acordo com Kandeler (2007), a composição da comunidade microbiana determina o potencial da comunidade para sintetizar enzimas, e assim qualquer modificação da comunidade microbiana devida a fatores ambientais deve refletir sobre os níveis de atividades enzimáticas. No presente estudo as variações das atividades enzimáticas durante o experimento provavelmente foram reflexos das alterações promovidas na composição das populações microbianas do solo e alterações na disponibilidade de substrato para as enzimas.

A asparaginase atua na hidrólise das frações orgânicas de N com produção de amônia, que também é o produto final da atividade da urease. As formas orgânicas de N do solo são as principais fontes de substrato para asparaginase, principalmente nos solos que recebem resíduos orgânicos como o lodo de curtume, rico em compostos nitrogenados. Segundo Khorsandi e Nourbakhsh (2008) a asparaginase e a urease são as enzimas mais sensíveis para estimar a fração potencialmente mineralizável de N (N_0) de solos que recebem resíduos orgânicos, e o maior N_0 pode ser relacionado à maior atividade dessas enzimas.

O sódio está presente no resíduo e à medida que o teor de nitrogênio adicionado aumenta com as doses, o teor de sódio aplicado também aumenta. E como o lodo

promoveu estímulo a atividade microbiana, também houve correlação de alguns atributos microbianos do ciclo do nitrogênio com o sódio. No presente estudo, o efeito do sódio pode ser confundido com o do nitrogênio mineral, visto que houve relação altamente significativa entre eles pela correlação de Spearman ($r = 0,905$, $P < 0,01$). Essa relação deve ser analisada com cuidado, pois, o aumento excessivo de sódio pode aumentar a salinidade e sodicidade que podem deteriorar as propriedades físicas do solo, afetando negativamente plantas e microrganismos (RIETZ; HAYNES, 2003).

É importante monitorar a estrutura e a atividade das comunidades microbianas como um indicador de mudança em resposta aos usos do solo (KENNEDY; SMITH, 1995), pois, elas têm influência direta na redundância funcional do solo e conseqüentemente sobre a sua resiliência. De acordo com o manejo ou distúrbio a que são submetidos, grupos funcionais chave podem ser afetados negativamente, podendo comprometer a qualidade do solo, por exemplo, com a diminuição ou extinção de populações microbianas associadas a processos da ciclagem do nitrogênio, como a nitrificação (ALVAREZ-BERNAL et al., 2006; BARAJAS-ACEVES; VELÁSQUEZ-OCAMPO; VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, 2007), amonificação e denitrificação.

Apesar da aplicação de lodo de curtume não ter causado efeitos negativos nos aspectos microbianos do solo, aplicações de altas doses de lodo podem causar impactos ambientais negativos associados à lixiviação de nitrato, aumento de emissão de gases do efeito estufa (N_2O) (TRUJILLO-TAPIA et al., 2008), perdas de N por volatilização de amônia (MARTINES et al., 2010) e degradação da estrutura do solo pelo excesso de sais (ALVAREZ-BERNAL et al., 2006), o que tornam necessários estudos adicionais sobre esta prática.

2.3 Conclusões

O presente estudo mostra que duas aplicações de lodo de curtume em solo agrícola não causam efeitos negativos sobre os atributos microbianos avaliados. Também mostra que alterações na estrutura de comunidade microbiana, promovidas por essa prática, têm influência direta sobre a atividade microbiana nesse solo. As alterações sobre a estrutura da comunidade microbiana e os estímulos sobre a

atividade microbiana do solo são mais intensos e prolongados no primeiro ano de aplicação. Os atributos mais influenciados pela aplicação desse tipo de resíduo ao solo são as atividades enzimáticas (urease e asparaginase). E as alterações dos aspectos microbiológicos do solo estão relacionados principalmente com o aumento do teor de nitrogênio mineral e elevação do pH do solo, promovidos pela aplicação do lodo de curtume.

Referências

- ALCÂNTARA, M.A.K.; AQUINO NETO, V.; CAMARGO, O.A.; CANTARELLA, H. Nitrogen mineralization in soils treated with tannery sludge. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 547-555, 2007.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. 576 p.
- ALVAREZ-BERNAL, D.; CONTRERAS-RAMOS, S.M.; TRUJILLO-TAPIA, N.; OLALDE-PORTUGAL, V.; FRIAS-HERNANDEZ, J.T.; DENDOOVEN, L. Effects of tanneries wastewater on chemical and biological soil characteristics. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 269-277, 2006.
- AON, M.A.; COLANERI, A.C. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 18, p. 255-270, 2001.
- APHA. **Standard methods for the examination for water and wastewater**. 21st ed. Washington: APPA; American Water Works Association; Water Environment Federation, 2005. 1600p.
- BARAJAS-ACEVES, M.; DENDOOVEN, L. Nitrogen, carbon and phosphorus mineralization in soils from semi-arid highlands of central Mexico amended with tannery sludge. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, p. 121-130, 2001.
- BARAJAS-ACEVES, M.; VELÁSQUEZ-OCAMPO, R.; VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, R. Effects of Cr³⁺, Cr⁶⁺ and tannery sludge on C and N mineralization and microbial activity in semi-arid soils. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 143, p. 522-531, 2007.
- BASU, M.; BHATTACHARYA, S.; PAUL, A.K. Isolation and characterization of chromium-resistant bacteria from tannery effluents. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 58, p. 535-542, 1997.
- BARTLETT, R.J.; KIMBLE, J.M. Behavior of chromium in soils: I. Trivalent forms. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 5, p. 379-382, 1976.

BRASIL, 2007. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa nº 28, de 27 de julho de 2007 Dispõe sobre manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos.** Diário Oficial da União, Executivo, July, 2007, Brasília, Brazil, <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=13105>

BREMNER, J.M. Nitrogen-Total. In: BIGHAM, J.M. (Ed) **Methods of soil analysis.** Madison: Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, 1996. pt. 3, chap. 37, p. 1085-1121.

CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônomo de Campinas.** Campinas: Instituto Agrônomo, 1986, 94p. (IAC. Boletim Técnico, 106)

CAVALLET, L.E.; SELBACH, P.A. Microbial populations affected by the soil disposal of tannery sludge. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2863-2869, 2008.

COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number. **Biometrics**, Malden, v. 6, p. 105-116, 1950.

ENWALL, K.; NYBERG, K.; BERTILSSON, S.; CEDERLUND, H.; STENSTROM, J.; HALLIN, S. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 106-115, 2007.

FERREIRA, A.S.; CAMARGO, F.A.O.; TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A. Alterações de atributos químicos e biológicos de solo e rendimento de milho e soja pela utilização de resíduos de curtume e carbonífero. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 755-763, 2003.

INNEREBNER, G.; KNAPP, B.; VASARA, T.; ROMANTSCHUK, M.; INSAM, H. Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost-treated soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1092-1100, 2006.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, 2003. **Sugestão de adubação e calagem para culturas de interesse econômico no Estado do Paraná.** Londrina, 2003. 31p. (IAPAR. Circular, 128)

JAHNEL, M.C.; CARDOSO, E.J.B.N.; DIAS, C.T.S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 553-559, 1999.

KAMALUDEEN, S.P.B.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R.; SINGLETON, I.; JUHASZ, A.L.; HAWKE, B.G.; SETHUNATHAN, N. Microbial activity and phospholipid fatty acid pattern in long-term tannery waste-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 56, p. 302-310, 2003.

- KAMOGAWA, M.Y.; TEIXEIRA, M.A. A low cost autosampler for flow injection analysis. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1644-1646, 2009.
- KANDELER, E. Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. In: PAUL, E.A. (Ed.), **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. 3rd ed. Oxford: Academic Press, 2007. chap. 3, p.53-84.
- KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, p. 75-86, 1995.
- KHORSANDI, N.; NOURBAKHS, F. Prediction of potentially mineralizable N from amidohydrolase activities in a manure-applied, corn residue-amended soil. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam, v. 44, p. 341-346, 2008.
- KRAY, H.K.; TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A.; GIANELLO, C.; SILVA, K.J. Tannery and coal mining waste disposal on soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2877-2882, 2008.
- KUPERMAN, R.G.; CARREIRO, M.M. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 179-190, 1997.
- MARSCHNER, P.; KANDELER, E.; MARSCHNER, B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 453-461, 2003.
- MARTENS, D.A.; JOHANSON, J.B.; FRANKENBERGER, W.T. Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues. **Soil Science**, Baltimore, v. 153, p. 53-61, 1992.
- MARTINES, A.M.; NOGUEIRA, M.A.; SANTOS, C.A.; NAKATANI, A.S.; ANDRADE, C.A.; COSCIONE, A.R.; CANTARELLA, H.; SOUSA, J.P.; CARDOSO, E.J.B.N. Ammonia volatilization in soil treated with tannery sludge. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, p. 4690-4696, 2010.
- MARTINES, A.M.; ANDRADE, C.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Mineralization of the organic carbon in soils treated with tannery sludge. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1149-1155, 2006.
- McGARIGAL, K.; CUSHMAN, S.; STAFFORD, S. **Multivariate statistics for wildlife and ecology research**. New York: Springer, 2000. 283p.
- MULVANEY, R.L. Nitrogen-Inorganic forms, In: BIGHAM, J.M. (Ed.), **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, 1996. pt. 3, chap. 38, p. 1123-1184.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S Ribosomal-RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, p. 695-700, 1993.

NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: Bigam, J.M. (Ed.). **Methods of soil analysis: chemical methods**. Madison: Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, 1996. pt. 3, chap. 9, p. 961-1010.

OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PERUCCI, P. Enzyme-activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 14, p. 54-60, 1992.

PIETRI, J.C.A.; BROOKES, P.C. Relationships between soil pH and microbial properties in a UK arable soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1856-1861, 2008.

PRIMER 5 for Windows. **PRIMER 5 for Windows**. [5.2.6]. 2001. Primer-E.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285 p.

RIETZ, D.N.; HAYNES, R.J. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 845-854, 2003.

SARATHCHANDRA, S.U. Nitrification activities and changes in populations of nitrifying bacteria in soil perfused at 2 different h-ion concentrations. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 50, p. 99-111, 1978.

SARATHCHANDRA, S.U.; GHANI, A.; YEATES, G.W.; BURCH, G.; COX, N.R. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 953-964, 2001.

SCHINNER, F.; VON MERSI, W. Xylanase-activity, cm-cellulase-activity and invertase activity in soil - an improved method. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 511-515, 1990.

STATISTICA StatSoft, Inc. **STATISTICA** (data analysis software system), version 6, 2001.

TABATABAI, A. Soil enzymes. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, S., BOTTOMLY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, 1996, pt. 2, chap. 37, p. 775-833.

TER BRAAK, C.J.F.; ŠMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to canoco for windows: software for canonical community ordination (version 4)**. Ithaca: Microcomputer Power, 1988. 352 p.

TIEDJE, J.M. Denitrifiers. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, S.; BOTTOMLY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, 1994, pt. 2. chap. 14. p. 245-267.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V.V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo II**. Viçosa: SBCS, 2002. p. 195-276.

TRUJILLO-TAPIA, N.; MONDRAGON, C.C.; VASQUEZ-MURRIETA, M.S.; VAN CLEEMPUT, O.; DENDOOVEN, L. Inorganic N dynamics and N₂O production from tannery effluents irrigated soil under different water regimes and fertilizer application rates: A laboratory study. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 279-288, 2008.

USEPA. **Test method for evaluating solid waste, physical/chemical methods**. 3rd ed. Washington: EPA, 1986. (SW-846).

VAN DEN BRINK, P.J.; TER BRAAK, C.J.F. Principal response curves: Analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 18, p. 138-148, 1999.

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

WOOD, P.J. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 85, p. 271-287, 1980.

ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities - a quantitative approach. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

3 ALTERAÇÕES NA COMUNIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM FUNÇÃO DA DOSE DE LODO DE CURTUME APLICADA AO SOLO

Resumo

A disposição controlada de lodo de curtume ao solo é uma alternativa viável para a reciclagem desse resíduo, mas ainda são escassos estudos sobre as alterações que essa prática pode provocar na comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em solos agrícolas. Estudou-se o efeito da aplicação de lodo de curtume (baixo teor de cromo) sobre a densidade de esporos, taxa de colonização radicular e riqueza e diversidade de FMA. Foram aplicadas doses de lodo de 0, 2,3, 9,0, 15,8 e 22,6 Mg ha⁻¹, em área agrícola, em Rolândia, Paraná, Brasil. Durante três meses o lodo permaneceu na superfície do solo antes de ser incorporado por gradagem, antes da instalação da cultura de milho. Ao todo foram realizadas quatro amostragens de solo e uma amostragem de raízes de milho durante o período experimental. A densidade de esporos encontrada foi baixa (1 a 49 esporos 50 cm⁻³ solo) e diminuiu com o aumento das doses de lodo de curtume. A taxa de colonização radicular por FMA foi alta (64%), no entanto, não houve efeito significativo da aplicação de lodo. Foram encontradas 18 espécies de FMA, pertencentes a seis gêneros (*Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Paraglomus* e *Ambispora*). A diversidade e riqueza de espécies diminuiu nas maiores doses de lodo (9,0 e 22,6 Mg ha⁻¹) e houve modificação nas frequências relativas (FR) dos FMA. A análise de agrupamento mostrou que a adição de lodo de curtume ao solo alterou a composição de espécies de FMA em relação aos tratamentos que não receberam, modificando a condição micorrízica desse solo e promovendo uma pressão seletiva sobre algumas espécies.

Palavras-chave: Micorriza; Esporo; Diversidade de espécies; Composição de espécies; pH; P; N

Abstract

The controlled disposal of tannery sludge in agricultural soils is a viable alternative for recycling such waste; however, the impact of this practice on the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) communities is not well understood. We studied the effects of low-chromium tannery sludge amendment in soils on AMF spore density, species richness and diversity, and root percent colonization levels. Sludge was applied at doses of zero, 2,3, 9,0, 15,8, and 22,6 Mg ha⁻¹, to an agricultural field in Rolândia, Paraná state, Brazil. The sludge was left undisturbed on the soil surface for three months, and then the area was harrowed and planted in corn. During this year the soil was sampled at four intervals and corn roots once. AMF spore density was low (1 to 49 spores per 50 cm³ of soil) and decreased as doses of tannery sludge increased. AMF root colonization was high (64%) and unaffected by tannery sludge. Eighteen AMF species belonging to six genera (*Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Paraglomus*, and *Ambispora*) were recorded. At the highest sludge doses (9,0 and 22,6 Mg ha⁻¹) we observed decreased AMF species richness and diversity, and changes in

their relative frequencies. Hierarchical grouping analysis showed that adding tannery waste to the soil altered AMF species composition in relation to the control, modifying the mycorrhizal status of soil and selectively favoring the sporulation of certain species.

Keywords: Mycorrhizae; Spore density; Species diversity; Species composition; pH; Phosphorus; Nitrogen

3.1 Introdução

O Brasil ocupa lugar de destaque na produção mundial de couros, com 44,4 milhões de peles processadas anualmente, com exportações de 2,19 bilhões de dólares em 2007. No entanto, durante o processamento das peles são gerados grandes volumes de resíduos líquidos e sólidos, resultando na geração de 150-200 kg de lodos (base seca) para cada tonelada de pele processada (PACHECO, 2005), que precisam ser tratados e descartados de forma adequada, por isso essa atividade é alvo de grande preocupação ambiental.

Uma alternativa para a disposição desses lodos é a sua aplicação em solos agrícolas, pois, esses resíduos apresentam quantidades consideráveis de nutrientes e potencial de neutralização da acidez do solo. Essa prática pode contribuir para a melhoria da fertilidade dos solos e nutrição das plantas (ALCÂNTARA et al. 2007), mas também podem conduzir a valores inadequados de pH (CAVALLET; SELBACH, 2008), sais solúveis (AQUINO NETO; CAMARGO, 2000) e cromo (KAMALUDEEN et al., 2003) nos solos tratados, o que pode comprometer a sustentabilidade agrícola e o uso futuro dessas áreas.

Atualmente, os curtumes têm melhorado seus métodos de curtimento para reduzir o cromo total no lodo final, conseqüentemente, sua concentração no lodo de curtume não é mais excessiva. Além disso, o cromo empregado nas indústrias de couro no Brasil é o Cr(III), que é menos tóxica que o Cr(VI), e geralmente está complexado pela matéria orgânica do lodo e do solo. O Cr(III) é a forma predominante do Cr no lodo de curtume e permanece nessa forma no solo, especialmente em valores de pH acima de 5,5 (BARTLETT; KIMBLE, 1976). Desta forma, a principal prioridade é estudar o impacto de outros perigos potenciais do lodo de curtume com baixo nível de Cr, como elevadas concentrações de nitrogênio e sódio.

A aplicação de resíduos de curtume no solo pode causar alterações sobre os seus atributos físicos (MENNEER et al., 2001), químicos e biológicos (ALVAREZ-BERNAL et al., 2006). A manutenção do bom funcionamento biológico do solo em função dessa prática é uma questão que tem chamado atenção visto que pode acarretar prejuízo à atividade biológica do solo (KAMALUDEEN et al., 2003), e afetar processos chave para a ciclagem de nutrientes, como a nitrificação (ALVAREZ-BERNAL et al., 2006).

Um grupo de microrganismos de grande importância nos solos são os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que estabelece simbiose micorrízica arbuscular com a maioria das plantas. Esta associação tem sido bem documentada em beneficiar tanto o solo quanto o crescimento vegetal. Esses benefícios incluem melhora na agregação do solo, melhor balanço nutricional das plantas, aumento da proteção contra patógenos de plantas e maior tolerância a estresse hídrico (NEWSHAM et al., 1995, RILLIG, 2004). Os FMA apresentam relevância ecológica única para o ambiente e, por isso, a sua ocorrência, atividade e eficiência têm implicações diretas para a sustentabilidade agrícola e pode ser um valioso indicador de qualidade do solo (STENBERG, 1999). Enquanto alguns estudos têm avaliado FMA em áreas contaminadas por resíduos de curtume (KHADE; ADHOLEYA, 2009; KHAN, 2001; RAMAN; SAMBANDAN, 1998), poucos tem estudado como a aplicação controlada de lodo de curtume com baixo teor de Cr em área agrícola afeta esses microrganismos do solo.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da aplicação de lodo de curtume sobre a diversidade e densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares e a condição micorrízica de plantas de milho cultivadas nessa área. A hipótese do trabalho foi que a aplicação de lodo de curtume, devido ao seu considerável teor de nutrientes, promove diminuição da densidade de esporos no solo e diminuição da colonização nas plantas.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

Área experimental e doses de lodo de curtume

O experimento foi instalado em área agrícola localizada no município de Rolândia, Estado do Paraná, Brasil (latitude: 23°17'S, longitude: 51°29'W, altitude: 650 m). O clima local é classificado, segundo Köppen, como Cfa, com precipitação média anual de 1600 mm, ocorrendo principalmente de setembro a março. A área experimental é manejada há mais de 10 anos em sistema de semeadura direta com rotação das culturas soja ou milho no verão e trigo ou aveia no inverno. O solo foi classificado como Rhodic Kandudult (US Taxonomy), de textura muito argilosa. A camada de 0-10 cm apresentava as seguintes características antes da instalação do experimento: pH 5,5 em CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ (1: 2,5, solo: solução v/v), C total 24,3 g kg⁻¹, N total 5,7 g kg⁻¹, capacidade de troca catiônica 119,6 mmol_c dm⁻³, saturação por bases 65%, P disponível (resina) 34 mg dm⁻³ (RAIJ et al., 2001), argila 74%, silte 6% e areia 20% (CAMARGO, 1986).

O delineamento experimental foi em blocos completos casualizados, com quatro repetições. O lodo foi aplicado em Julho de 2006 e Agosto de 2007 em doses de 0, 3,4, 13,5, 23,6 e 33,7 Mg ha⁻¹ no primeiro ano e 0, 2,3, 9,0, 15,8 e 22,6 Mg ha⁻¹ de lodo de curtume (base seca) no segundo ano. As quantidades foram calculadas em função do teor total de N contido no lodo de curtume, equivalentes a 0, 120, 480, 840 e 1200 kg ha⁻¹ de nitrogênio total. A dose de 120 kg ha⁻¹ corresponde à exigência de N para a obtenção de altos níveis de produtividade de milho (IAPAR, 2003).

Visando reproduzir o manejo adotado em diversos curtumes brasileiros, o lodo foi aplicado, com umidade natural na superfície do solo, em parcelas de 90 m². Aos 89 dias após a primeira aplicação e aos 87 dias após a aplicação do segundo ano o lodo de curtume foi incorporado ao solo por meio de gradagem, na profundidade de 0-20 cm. Na seqüência, foi realizado o cultivo de milho. Nesse mesmo período foi instalado um sexto tratamento, tratamento agrônômico (AT), que recebeu 40 kg ha⁻¹ e 80 kg ha⁻¹ de nitrogênio no plantio e em cobertura (6 a 8 folhas totalmente expandidas) respectivamente, na forma de uréia.

Durante o período experimental do segundo ano foram realizadas coletas de solo aos 12, 136 e 271 dias após a segunda aplicação do resíduo para a contagem de esporos de FMA. Foram coletadas nove subamostras de solo por parcela, da camada

de 0-10 cm, para formar uma amostra composta. Ainda no campo, as amostras foram conservadas a 4°C e enviadas ao laboratório para as avaliações. Aos 177 dias após aplicação do lodo, que correspondeu ao final da época do florescimento da cultura de milho, foram coletadas amostras de solo e raízes de plantas de milho para avaliação de diversidade de esporos de FMA e para avaliação de colonização micorrízica radicular, respectivamente.

Lodo de curtume

O lodo de curtume utilizado no experimento foi obtido do Curtume Vanzella Ltda (Município de Rolândia, Estado do Paraná, Brasil) e foi composto de uma mistura na proporção de 1:1 do lodo do caleiro, gerado na etapa de depilação e caleiro, e do lodo primário da estação de tratamento de efluente (ETE), resultante da precipitação dos efluentes gerados no processo, com exceção dos efluentes que contêm cromo. A mistura desses lodos em partes iguais é justificada em função de os mesmos serem gerados em maiores quantidades e praticamente na mesma proporção durante o processamento das peles nesse curtume. Após a mistura dos lodos, foram coletadas amostras, conservadas a 4 °C e enviadas ao laboratório, onde cada amostra foi dividida em duas subamostras: (A) mantida com umidade natural; (B) seca a 65 °C por 48 h.

Na subamostra (A) foram determinados os teores de N-NH_4^+ e de $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ pelo método da destilação com arraste a vapor (MULVANEY, 1996); o pH e a condutividade elétrica (CE) com leituras diretas nas amostras, além dos sólidos totais e sólidos voláteis por secagem a 65 °C e 500 °C, respectivamente (APHA, 2005). A subamostra (B) foi submetida à determinação das concentrações de carbono orgânico pelo método da oxidação com dicromato sob aquecimento externo (NELSON; SOMMERS, 1996); N-total, pelo método Kjeldahl, usando bloco digestor (BREMNER, 1996); poder de neutralização, por alcalimetria (BRASIL, 2007); Ca, Mg, K, P, S, Na, Mn, Fe, B, Zn, Cu, Mo, Al, As, Cd, Pb, Hg, Ni, Se, Cr total por digestão nítrica em microondas e leitura em ICP-AES (USEPA, 1986), sendo o K e Na determinados com fotômetro de chama (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Caracterização físico-química do lodo de curtume utilizado no experimento

Variável	1ª aplicação	2ª aplicação	Varição ⁽³⁾
pH ⁽¹⁾	12,7	9,7	7,7 – 11,8
CE (dS m ⁻¹) ⁽¹⁾	29,5	16,6	-
Sólidos totais, a 65 °C (g kg ⁻¹)	53,3	55,4	120,0 – 390,0
Sólidos voláteis (g kg ⁻¹)	442	554	-
Poder de neutralização (g de CaCO ₃ kg ⁻¹)	262	361	160 – 315
C orgânico (g kg ⁻¹)	308	321	65 – 257,8
N total (g kg ⁻¹)	35,7	53,2	9,8 – 53,4
N-NH ₄ ⁺ (g kg ⁻¹)	20,4	21,9	-
N-NO ₃ ⁻ (g kg ⁻¹)	0,2	0,2	-
Relação C/N	8,7	6,0	4,1 – 13,8
Ca (g kg ⁻¹)	78,9	88,0	20,0 – 210,0
Mg (g kg ⁻¹)	0,7	1,0	0,2 – 7,5
K (g kg ⁻¹)	0,1	3,3	0,1 – 1,7
P (g kg ⁻¹)	3,9	3,8	1,1 – 7,5
S (g kg ⁻¹)	36,1	43,0	13,0 – 15,0
Na (g kg ⁻¹)	10,0	66,9	8,1 – 59,9
Mn (mg kg ⁻¹)	2858	3340	128 – 6350
Fe (mg kg ⁻¹)	408	1249	-
B (mg kg ⁻¹)	4,5	5,6	-
Zn (mg kg ⁻¹)	43,3	73,0	48,0 – 176,0
Cu (mg kg ⁻¹)	4,5	16,0	14,0 – 81,0
Mo (mg kg ⁻¹)	3,3	<0,5 ⁽²⁾	-
Al (mg kg ⁻¹)	2257	13440	-
As (mg kg ⁻¹)	<1,0 ⁽²⁾	<0,5 ⁽²⁾	-
Cd (mg kg ⁻¹)	<1,0 ⁽²⁾	<0,5 ⁽²⁾	0,1 – 4,0
Pb (mg kg ⁻¹)	<1,0 ⁽²⁾	9,3	15,0 -35,0
Hg(mg kg ⁻¹)	<1,0 ⁽²⁾	<0,5 ⁽²⁾	-
Ni (mg kg ⁻¹)	3,0	7,8	1,3 – 20,0
Se (mg kg ⁻¹)	<1,0 ⁽²⁾	<0,5 ⁽²⁾	-
Cr total (mg kg ⁻¹)	1613	580	798 – 22200

Resultados expressos em base seca a 65 °C por 48 h; ⁽¹⁾ Medida na amostra *in natura*; ⁽²⁾ Concentrações menores que o limite de detecção; ⁽³⁾ Valores obtidos de Alcântara et al. (2007); Barajas-Aceves e Dendooven (2001); Barajas-Aceves, Velásquez-Ocampo e Vázquez-Rodríguez (2007); Kray et al. (2008); Martines, Andrade e Cardoso (2006).

Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares

Para a determinação da colonização radicular por FMA, um grama de raízes finas de plantas de milho foi utilizado. As raízes foram clareadas por aquecimento (90 °C) em solução de KOH 10%, por 30 minutos, acidificadas com HCl 1% por 2 minutos e coradas com tinta de caneta a 90 °C por 30 minutos (VIERHEILIG et al., 1998). A determinação da porcentagem de colonização foi feita em microscópio estereoscópico

com aumento de até 40 vezes, pela observação de estruturas fúngicas dentro das raízes na região do córtex, pelo método de placa quadriculada, segundo Giovannetti e Mosse (1980).

Os esporos de FMA foram extraídos por meio de peneiramento úmido de 50 cm³ de solo (GERDEMANN; NICOLSON, 1963), seguido de centrifugação em água a 3000 rpm por 3 minutos, ressuspensão em sacarose 50% com centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos. Os esporos extraídos foram contados e separados por morfotipos, sob microscópio estereoscópico com aumento de até 40 vezes, e montados em lâminas com álcool polivinílico lactoglicerol e reagente de Melzer, para avaliação microscópica das características fenotípicas estruturais e identificação taxonômica. As espécies de FMA foram identificadas pela observação de atributos morfológicos dos esporos e comparações com as descrições fornecidas pela International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (<http://invam.caf.wvu.edu>).

Avaliação de atributos químicos do solo

O pH (acidez atual) foi determinado por potenciometria, em solução de CaCl₂ (0,01 mol L⁻¹) na proporção 1:2,5 solo:solução, a condutividade elétrica (CE) por condutivimetria, em solução aquosa, na proporção 1:2. O carbono orgânico total (Corg) foi determinado por oxidação com dicromato de potássio em meio ácido e mensurado colorimetricamente (NELSON; SOMMERS, 1996). O Ca, Mg, K, Na e P foram determinados em extratos de solo obtidos com resina trocadora de íons. As concentrações de Ca e Mg foram obtidas por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama, as concentrações de Na e K foram determinadas por espectrometria de emissão de chama e o P por espectrofotometria de absorção molecular.

O nitrogênio mineral (N-NH₄⁺ + N-NO₃⁻) foi extraído com KCl (2 mol L⁻¹) na relação 1:10 (m:v). O N-NH₄⁺ foi determinado mediante o emprego de um sistema de análise de injeção em fluxo contínuo (FIA) com leitura em espectrofotômetro a 605 nm (KAMOGAWA; TEIXEIRA, 2009) e o N-NO₃⁻ foi determinado por espectrofotometria em ultravioleta, com leitura em 220 nm e 275 nm (APHA, 2005).

Análise dos dados

Os dados de contagem de esporos foram transformados para Raiz ($X + 0,5$) e foram submetidos à análise estatística univariada, aplicando o procedimento ANOVA de observações repetidas "between-within subject design" (ZAR, 1988), considerando como fontes de variação as doses de lodo de curtume e as épocas de coleta de solo, pelo programa STATISTICA (STATSOFT, INC., 2001). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Neuman-Keuls. A análise estatística do índice de diversidade de Shannon foi feita através de um teste t usando os procedimentos do software PAST (HAMMER, HARPER; RYAN, 2001). Também foram calculados os coeficientes de correlação de Spearman entre os dados de contagem de esporos e os dados químicos pelo programa SAS, versão 9.2 (SAS INSTITUTE, 2008).

Os dados de diversidade de FMA (nível de espécie) também foram analisados por agrupamento hierárquico utilizando-se o programa SYSTAT 11.0, com base nos dados de densidade, pelo método de concordância simples ("simple matching"), com algoritmo de Ward e distância euclidiana como unidade de medida.

3.2.2 Resultados

Densidade de esporos de FMA

A análise de variância dos dados de densidade de esporos de FMA revelou que houve efeito significativo das doses de lodo de curtume ($F = 68,196$; $P < 0,01$) e também da época de coleta do solo ($F = 24,953$, $P < 0,01$). A aplicação de lodo de curtume promoveu a diminuição da densidade de esporos de FMA em todas as épocas avaliadas (Figura 3.1). A densidade observada foi baixa, variando de 1 a 49 esporos 50 cm^{-3} de solo. Entre os tratamentos, as maiores contagens foram registradas no controle (sem lodo). O tratamento agrônômico (AT) apresentou contagens médias de 11 e 10 esporos 50 cm^{-3} de solo, aos 136 e 271 dias após a segunda aplicação, respectivamente. O teste de Neuman-Keuls revelou que a densidade de esporos no AT

foi significativamente maior que nos tratamentos que receberam lodo de curtume (dados não apresentados).

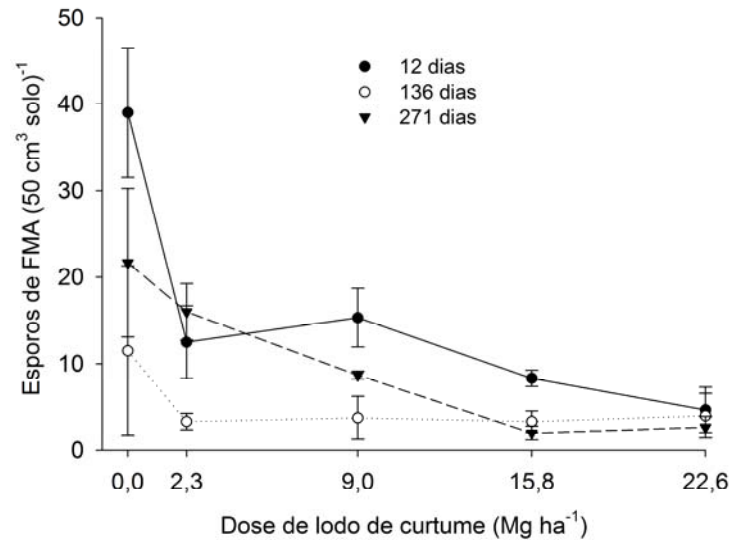


Figura 3.1 – Densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em solo sob aplicação de lodo de curtume (0 a 22,6 Mg ha⁻¹) em três épocas de avaliação (12, 136 e 271 dias após a segunda aplicação do resíduo) em Rolândia, PR, Brasil. Barras indicam o desvio padrão da média

Taxa de colonização micorrízica radicular

De acordo com a análise de variância não houve efeito significativo da aplicação de lodo de curtume sobre a colonização radicular das plantas de milho por FMA ($F = 0,78$; $P > 0,05$). A taxa de colonização radicular média foi alta, em torno de 64%. Nos tratamentos que receberam lodo de curtume (2,3 a 22,6 Mg ha⁻¹) a taxa de colonização foi de 61%. O AT apresentou taxa de colonização radicular de 74%, no entanto, também não diferiu dos outros tratamentos (dados não apresentados).

Relação entre a densidade de esporos de FMA e os atributos químicos do solo

Verificou-se elevação do pH e dos teores de P do solo com as doses de lodo de curtume em todas as épocas de avaliação (Figura 3.2 A e B). Já o teor de N mineral e a condutividade elétrica do solo aumentaram em função das doses principalmente logo

após a aplicação do lodo de curtume (12 dias), nas épocas seguintes estes apresentaram aumentos com as doses, mas em menor magnitude (Figura 3.2 C e D). Os coeficientes de correlação de Spearman mostraram relação negativa significativa ($P < 0,01$) entre as densidades de esporos e o pH (-0,38), o teor de P (-0,70), o N mineral (-0,21) e a condutividade elétrica (-0,36) do solo.

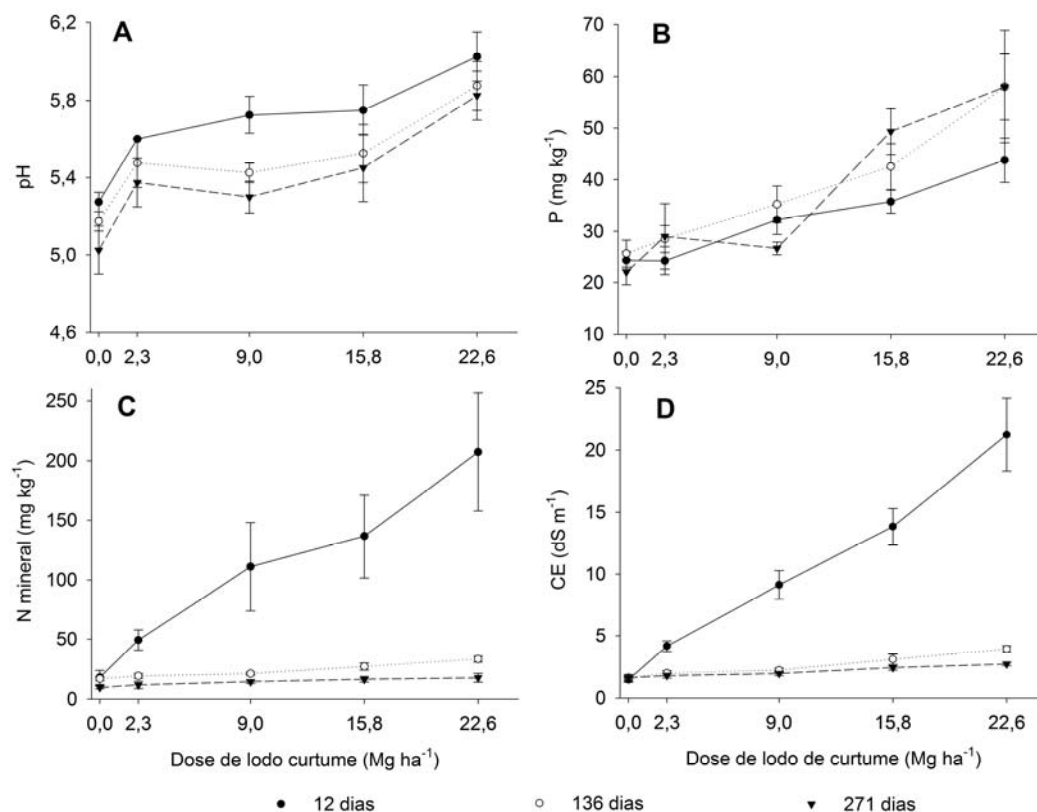


Figura 3.2 – Atributos químicos do solo sob aplicação de lodo de curtume (0 a 1200 kg ha⁻¹ N total via lodo) em três épocas de avaliação (12, 136 e 271 dias após a segunda aplicação do resíduo) em Rolândia, PR, Brasil. Barras indicam o desvio padrão da média. (A) pH, acidez atual; (B) P, fósforo disponível; (C) N mineral, nitrogênio mineral (N-NH₄⁺ + N-NO₃⁻) e (D) CE, condutividade elétrica do solo

Diversidade de esporos de FMA

Nas amostras de solo coletadas para a avaliação da diversidade de espécies de FMA, durante o ciclo da cultura do milho, também foram observadas baixas contagens de esporos e diminuição da densidade com as doses de lodo de curtume ($F = 5,11$, $P < 0,01$). As contagens variaram de 0 a 45 esporos 50 cm⁻³ de solo. No total,

independentemente do tratamento, foram identificadas 18 espécies de fungos, pertencentes aos seguintes gêneros: *Acaulospora* (6 espécies), *Glomus* (5), *Gigaspora* (3), *Scutellospora* (2), *Paraglomus* (1) e *Ambispora* (1) (Tabela 3.3). Qualitativamente houve predomínio de espécies do gênero *Acaulospora*, no entanto, quantitativamente as espécies dominantes foram do gênero *Scutellospora*, com 39% dos esporos contados.

Tabela 3.3 – Densidades de esporos identificados (em 50 cm³ de solo) de fungos micorrízicos arbusculares em solos agrícolas sob aplicação de lodo de curtume (0 a 22,6 Mg ha⁻¹) em Rolândia, PR, Brasil. AT, tratamento agrônômico, corresponde a 120 kg ha⁻¹ de N na forma de uréia

Espécies	Dose de lodo de curtume (Mg ha ⁻¹)					AT
	0,0	2,3	9,0	15,8	22,6	
<i>Gigaspora decipiens</i> Hall e Abbott	1	1	2	3	10	9
<i>Gi. albida</i> cf	0	0	0	0	0	2
<i>Gigaspora</i> sp1	5	0	0	0	0	1
<i>Scutellospora pellucida</i> (Nicol. e Schenck) Walker e Sanders	14	2	1	0	0	21
<i>S. cerradensis</i> Spain e Miranda	21	13	23	10	7	30
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe	38	14	5	4	1	8
<i>Ac. mellea</i> Spain e Schenck	1	1	0	1	0	1
<i>Ac. morrowiae</i> Spain e Schenck	0	0	0	0	0	3
<i>Ac. spinosa</i> Walker e Trappe	3	0	0	0	0	0
<i>Ac. tuberculata</i> Janos e Trappe	0	0	0	0	1	0
<i>Acaulospora</i> sp1	0	3	0	0	1	2
<i>Glomus etunicatum</i> cf	9	4	1	1	0	0
<i>Glomus</i> sp1	20	1	1	1	3	1
<i>Glomus</i> sp2	3	0	0	0	0	0
<i>Glomus</i> sp3	0	0	2	2	3	1
<i>Glomus</i> sp4	0	0	1	1	2	1
<i>Paraglomus laccatum</i> (Błaszk.) Renker, Błaszk. e Buscot	1	3	2	3	0	3
<i>Ambispora leptoticha</i> (Schenck e Smith) Walker, Vestberg e Schuessler	1	3	0	0	0	1
Indivíduos	117	45	38	26	28	84
Riqueza de espécies	13	11	10	10	8	15
Diversidade de Shannon ^(a)	2,03a	2,00ab	1,60c	1,94abc	1,74bc	2,03a

^(a)Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste *t* ($P < 0,1$)

As áreas submetidas aos tratamentos controle e agrônômico (AT) apresentaram maior riqueza de espécies, 13 e 15, respectivamente, além dos maiores índices de diversidade, 2,03 em ambos os tratamentos (Tabela 3.3). O teste *t* de Student desses índices revelou também que ambos (controle e AT) apresentaram diversidade de espécies de FMA diferentes dos tratamentos que receberam 9,0 e 22,6 Mg ha⁻¹ de lodo de curtume (Tabela 3.2).

Nos tratamentos que receberam as doses mais elevadas de lodo de curtume (9,0, 15,8 e 22,6 Mg ha⁻¹), entre 48% e 62% dos esporos foram da família Gigasporaceae, enquanto que no tratamento controle houve um equilíbrio entre 3 famílias: Gigasporaceae, Acaulosporaceae e Glomeraceae, com 33%, 33% e 25% dos esporos, respectivamente (Figura 3.3). A densidade relativa das Acaulosporaceae caiu de 36% para 11% da menor (2,3 Mg ha⁻¹) para a maior dose (22,6 Mg ha⁻¹), enquanto as Glomeraceae aumentaram de 10% para 29% da menor para a maior dose de lodo de curtume.

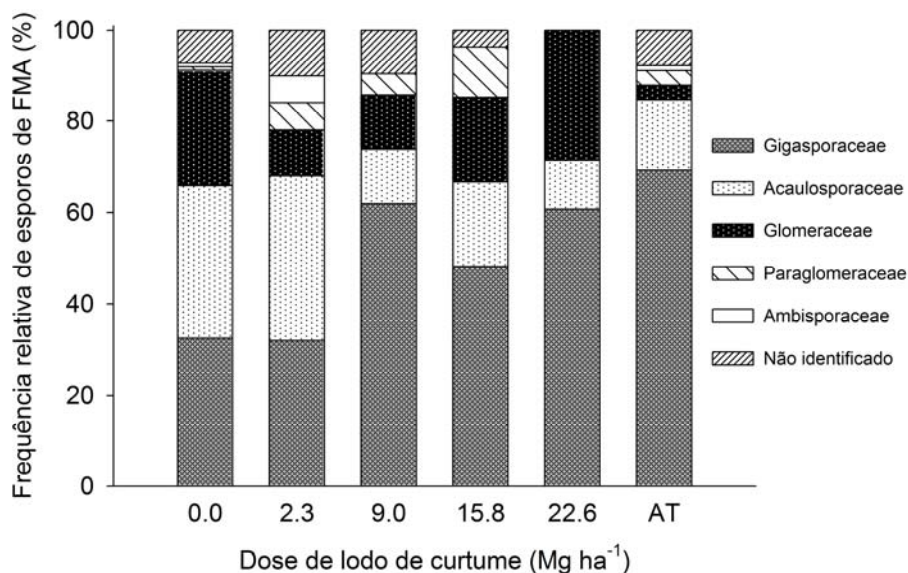


Figura 3.3 – Frequência relativa de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em solo agrícola sob aplicação de lodo de curtume (0 a 22,6 Mg ha⁻¹) em Rolândia, PR, Brasil. AT, tratamento agronômico, corresponde a 120 kg ha⁻¹ de N na forma de uréia

A análise de agrupamento hierárquico das espécies de FMA mostra que a composição de espécies dos tratamentos que receberam lodo de curtume foi diferente daqueles que não receberam (Figura 3.4). As duas menores doses de lodo foram agrupadas no mesmo ramo, assim como as maiores doses de lodo foram agrupadas juntas, em ramos diferentes do controle e AT.

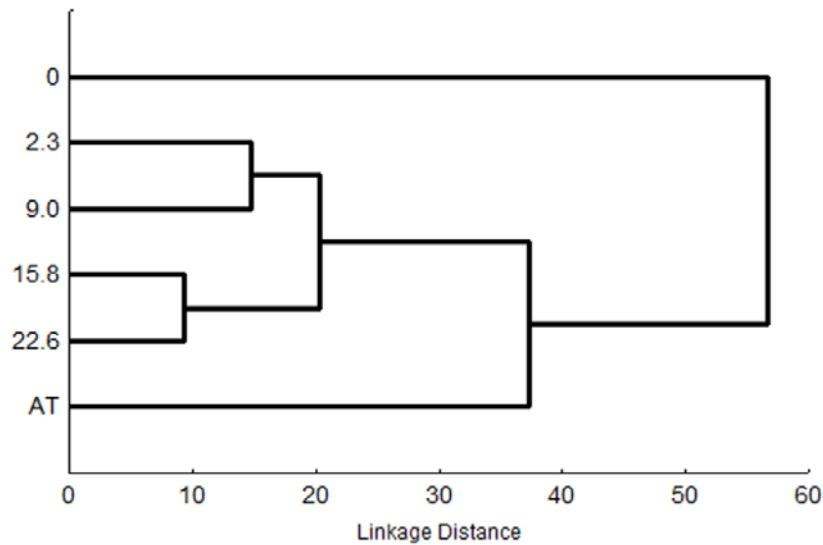


Figura 3.4 – Análise de agrupamento hierárquico da distribuição das espécies de fungos micorrízicos arbusculares em solo agrícola sob aplicação de lodo de curtume em Rolândia, PR, Brasil. 0; 2,3; 9,0; 15,8 e 22,6 representam as doses de lodo de curtume em Mg ha^{-1} . AT representa o tratamento agrônômico que corresponde a 120 kg ha^{-1} de N na forma de uréia

3.2.3 Discussão

Densidades de esporos de FMA semelhante às observadas no presente estudo têm sido registradas em áreas contaminadas com resíduos de curtume. Khade e Adholeya (2009) relataram que a contagem de esporos variou entre 4 e 38 esporos por 50 cm^3 de solo em local contaminado com lodo de esgoto. Entretanto, Raman e Sambandan (1998), avaliando área poluída com esse tipo de material, encontraram densidades mais elevadas (entre 6 e 130 esporos 50 cm^{-3} solo). Uma possível causa da baixa densidade observada é a alta fertilidade do solo constatada antes da implantação do experimento. Sabe-se que os FMA são inibidos em condições de altas disponibilidades de nutrientes, principalmente, o P (JANSA; WIEMKEN; FROSSARD, 2006) e Bhadalung et al. (2005) verificaram queda na densidade de esporos estudando fertilização com N e P, como sulfato de amônio e superfosfato triplo, respectivamente. De fato, nós detectamos relação negativa entre densidade de esporos e alguns nutrientes do solo, como P e N mineral. Portanto, a aplicação de lodo pode afetar a esporulação dos FMA pelo aumento da quantidade desses elementos no solo.

No presente estudo, a aplicação de lodo de curtume não teve efeito sobre a porcentagem de colonização radicular das plantas de milho. Ortega-Larrocea et al. (2007) também observaram que a aplicação de lodo de esgoto ao solo não teve efeito sobre a colonização micorrízica das raízes. Esse resultado é intrigante visto que a adição de lodo de curtume aumentou a disponibilidade de nutrientes e isto é bem conhecido por diminuir a colonização radicular por FMA (TRESEDER, 2004). Duas hipóteses podem explicar esses resultados. A primeira explicação é que a época na qual foi avaliada a colonização radicular foi favorável para germinação dos esporos e rápida colonização das novas raízes, resultando em baixa densidade de esporos no solo (KHADE; ADHOLEYA, 2009). O argumento em favor da segunda explicação é que a porcentagem de colonização radicular manteve seus altos valores por que a amostragem foi feita durante o estágio do florescimento das plantas de milho. Gavito e Varela (1993) observaram maior taxa de colonização micorrízica de milho durante o florescimento e queda da colonização quando a cultura atingiu a maturidade e a senescência. No entanto, é notável que outros estudos que avaliaram plantas crescendo em áreas poluídas com resíduo de curtume também relatam altas taxas de colonização radicular por FMA: até 64% de colonização em *Prosopis juliflora* (RAMAN; SAMBANDAN, 1998), até 80% em *Acacia arabica* (KHAN, 2001) e de até 100% das raízes de *Parthenium* sp. colonizadas (KHADE; ADHOLEYA, 2009).

A maioria dos estudos até agora tem registrado o número de espécies de FMA em áreas poluídas por resíduos de curtume e para o nosso conhecimento esta é o primeiro estudo reportando alterações na riqueza e diversidade de espécies de FMA em áreas que receberam aplicação controlada de lodo de curtume. Selvaraj et al. (2005) observaram nove espécies de FMA pertencentes a três gêneros em área contaminada com efluente de curtume na Índia. Raman e Sambandan (1998), também na Índia, em locais poluídos com efluente de curtume, encontraram 15 espécies de FMA e 6 gêneros. Em nosso estudo nós identificamos 12 espécies de 6 gêneros somente nos tratamentos que receberam aplicação do lodo. E esta riqueza de espécies pode ter sido subestimada visto que o uso de culturas armadilhas com diferentes plantas hospedeiras em casa de vegetação pode ter revelado espécies de FMA adicionais. Mas a

possibilidade de algumas espécies de FMA identificadas no campo desaparecer nos vasos armadilhas também deve ser reconhecida.

A riqueza e diversidade de espécies de FMA diminuíram com o aumento da dose de lodo. Menor diversidade de FMA também foi observada por Khade e Adholeya (2009) e Khan (2001) nas áreas contaminadas por resíduo de curtume em comparação com a área de referência. Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese da pressão seletiva exercida pela aplicação do lodo de curtume sobre os FMA, como também foi sugerido por Khan (2001).

A maior diversidade de espécies de FMA encontrada nos tratamentos controle e tratamento agrônômico (AT) pode ser decorrente do histórico da área, a qual vem sendo cultivada sob plantio direto por mais de 10 anos. Este tipo de manejo do solo reconhecidamente favorece a diversidade de FMA (CASTILLO et al., 2006, OEHL et al., 2003).

Alterações sobre a composição e estrutura de comunidade de FMA têm sido encontradas em outros estudos com outros tipos de resíduos (DEL VAL; BAREA; AZCÓN-AGUILAR, 1999; FARYAL; TAHIR; HAMEED, 2007; STAHL; WILLIAMS, 1986). É difícil relacionar características gerais do solo com a ocorrência de espécies de FMA, mas as possíveis causas são alterações nos atributos do solo devido ao resíduo adicionado.

O resíduo utilizado apresentava caráter alcalino, que causou elevação do pH do solo com as doses de lodo de curtume. Alterações no pH afetam várias propriedades do solo, como a disponibilidade de elementos, e essas alterações determinam direta ou indiretamente a distribuição de espécies de FMA (COUGHLAN et al., 2000). Geralmente espécies da família Acaulosporaceae são encontrados no Brasil em solos com baixo pH (MOREIRA et al., 2007), sendo essa uma provável razão para a diminuição das freqüências relativas dessa família no presente estudo com o aumento das doses.

Ezawa, Yamamoto e Yoshida (2000) verificaram que a composição de espécies de FMA foi influenciada pelo teor de P do solo após aplicação de esterco bovino ($400 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), fertilizante químico ($370 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, como uréia e $420 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de P_2O_5 , como fosfato de magnésio) e campo de alfafa. Esses autores verificaram que

espécies de *Glomus* e *Acaulospora* só foram observadas nos tratamentos com os teores mais elevados de P. Isto de certa forma corrobora os nossos resultados, pois, *Glomus* e *Acaulospora* foram os gêneros dominantes nas maiores doses, onde também foram registrados os teores mais elevados de P no solo.

Quando a densidade de esporos é considerada, as Gigasporaceae dominaram quantitativamente nas maiores doses de lodo (9,0 a 22,6 Mg ha⁻¹). Esta observação concorda com Khan (2001) que detectou predomínio de *Gigaspora* spp. em áreas poluídas com efluente de curtume. Esse domínio pode ser explicado pela forma de propagação desses FMA no solo. Segundo Klironomos e Hart (2002), as *Gigaspora* e *Scutellospora* propagam-se preferencialmente por esporos, enquanto *Glomus* e *Acaulospora* propagam-se também por hifas e raízes colonizadas, além dos esporos. Por isso, como as Gigasporaceae dependem muito mais dos esporos para se manter no ambiente, elas investem na produção de esporos, característica que pode justificar o domínio quantitativo desta família nas maiores doses.

Uma possível consequência da pressão seletiva observada pela aplicação do lodo de curtume sobre as espécies de FMA e a perda de diversidade é a seleção de espécies de baixa eficiência simbiótica, enquanto mantém seu potencial infectivo, que pode comprometer o desenvolvimento vegetal (JOHNSON, 1993), uma vez que em condições adversas, pode prevalecer a seleção de espécies fúngicas para a sobrevivência e não para a eficiência (KIERS; WEST; DENISON, 2002). Segundo Khade e Adholeya (2009), alterações na diversidade de FMA no solo por distúrbios antrópicos podem causar, em longo prazo, redução nas simbioses micorrízicas benéficas, visto que o re-estabelecimento e/ou adaptação da população de FMA é lento.

Estas hipóteses ressaltam a necessidade de estudos adicionais em longo prazo sobre a aplicação de lodo de curtume em áreas agrícolas, para que esta prática não comprometa a qualidade biológica do solo. No caso dos FMA em particular, deve-se definir doses do resíduo que não comprometam o potencial de inóculo e a sua diversidade, além da necessidade de investigação sobre a eficiência simbiótica das espécies de FMA nas condições de exposição ao efluente.

3.3 Conclusões

A aplicação de lodo de curtume por dois anos consecutivos em área agrícola promoveu diminuição na esporulação, diversidade de espécies e alterou a estrutura de comunidade de FMA, desta forma, corroborando parcialmente nossa hipótese. No entanto, não afetou a taxa de colonização micorrízica radicular, indicando que a capacidade infectiva dos FMA não foi afetada, portanto em desacordo com nossa hipótese.

Referências

- ALCÂNTARA, M.A.K.; AQUINO NETO, V.; CAMARGO, O.A.; CANTARELLA, H. Nitrogen mineralization in soils treated with tannery sludge. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v 42, p. 547-555, 2007.
- ALVAREZ-BERNAL, D.; CONTRERAS-RAMOS, S.M.; TRUJILLO-TAPIA, N.; OLALDE-PORTUGAL, V.; FRIAS-HERNANDEZ, J.T.; DENDOOVEN, L. Effects of tanneries wastewater on chemical and biological soil characteristics. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 269-277, 2006.
- APHA. **Standard methods for the examination for water and wastewater**. 21st ed. Washington: APPA; American Water Works Association; Water Environment Federation, 2005. 1600 p.
- AQUINO NETO, V.; CAMARGO, O.A. Crescimento e acúmulo de cromo em alface cultivada em dois latossolos tratados com CrCl_3 e resíduos de curtume. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 225-235, 2000.
- BARAJAS-ACEVES, M.; DENDOOVEN, L. Nitrogen, carbon and phosphorus mineralization in soils from semi-arid highlands of central Mexico amended with tannery sludge. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, p. 121-130, 2001.
- BARAJAS-ACEVES, M.; VELÁSQUEZ-OCAMPO, R.; VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, R. Effects of Cr^{3+} , Cr^{6+} and tannery sludge on C and N mineralization and microbial activity in semi-arid soils. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 143, p. 522-531, 2007.
- BARTLETT, R.J.; KIMBLE, J.M. Behavior of chromium in soils: I. Trivalent forms. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 5, p. 379-382, 1976.

BHADALUNG, N.N.; SUWANARIT, A.; DELL, B.; NOPAMORNBODI, O.; THAMCHAIPENET, A.; RUNGCHUANG, J. Effects of long-term NP-fertilization on abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi under a maize cropping system. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 270, p. 371-382, 2005.

BRASIL, 2007. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa nº 28, de 27 de julho de 2007 Dispõe sobre manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos.** Diário Oficial da União, Executivo, July, 2007, Brasília, Brazil, <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=13105>

BREMNER, J.M. Nitrogen-total. In: BIGHAM, J.M. (Ed.) **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, 1996. pt. 3, chap. 37, p. 1085-1121.

CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas**. Campinas: Instituto Agronômico, 1986. 94p. (IAC. Boletim Técnico, 106)

CASTILLO, C.G.; RUBIO, R.; ROUANET, J.L.; BORIE, F. Early effects of tillage and crop rotation on arbuscular mycorrhizal fungal propagules in an Ultisol. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 43, p. 83-92, 2006.

CAVALLET, L.E.; SELBACH, P.A. Microbial populations affected by the soil disposal of tannery sludge. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2863-2869, 2008.

COUGHLAN, A.P.; DALPE, Y.; LAPOINTE, L.; PICHE, Y. Soil pH-induced changes in root colonization, diversity, and reproduction of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi from healthy and declining maple forests. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 30, p. 1543-1554, 2000.

DEL VAL, C.; BAREA, J.M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 718-723, 1999.

EZAWA, T.; YAMAMOTO, K.; YOSHIDA, S. Species composition and spore density of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under different conditions of P-fertility as revealed by soybean trap culture. **Soil Science and Plant Nutrition**, Malden, v.46, p. 291-297, 2000.

FARYAL, R.; TAHIR, F.; HAMEED, A. Effect of wastewater irrigation on soil along with its micro and macro flora. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 39, p. 193-204, 2007.

GAVITO, M.E.; VARELA, L. Seasonal dynamics of mycorrhizal associations in maize fields under low-input agriculture. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 45, p. 275-282, 1993.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of The British Mycological Society**, London, p. 46, p. 235-244, 1963.

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

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, Amherst, v. 4, 9 p. 2001.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Sugestão de adubação e calagem para culturas de interesse econômico no Estado do Paraná**. Londrina, 2003. 31 p. (IAPAR. Circular, 128)

JANSA, J.; WIEMKEN, A.; FROSSARD, E. The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. In: FROSSARD, E.; BLUM, W. E. H.; WARKENTIN, B.P. (Ed.). **Function of soils for human societies and the environment**. London: Geological Society, Special Publications, v. 266, p. 89–115, 2006.

JOHNSON, N.C. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae. **Ecological Applications**, Washington, v. 3, p. 749-757, 1993.

KAMALUDEEN, S.P.B.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R.; SINGLETON, I.; JUHASZ, A.L.; HAWKE, B.G.; SETHUNATHAN, N. Microbial activity and phospholipid fatty acid pattern in long-term tannery waste-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 56, p. 302-310, 2003.

KAMOGAWA, M.Y.; TEIXEIRA, M.A. A low cost autosampler for flow injection analysis. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1644-1646, 2009.

KHADE, S.W.; ADHOLEYA, A. Arbuscular mycorrhizal association in plants growing on metal-contaminated and noncontaminated soils adjoining Kanpur tanneries, Uttar Pradesh, India. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 202, p. 45-56, 2009.

KHAN, A.G. Relationships between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent-polluted soil. **Environment International**, Oxford, v. 26, p. 417-423, 2001.

KIERS, E.T.; WEST, S.A.; DENISON, R.F. Mediating mutualisms: farm management practices and evolutionary changes in symbiont co-operation. **Journal of Applied Ecology**, Malden, v. 39, p. 745-754, 2002.

KLIRONOMOS, J.N.; HART, M.M. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 12, p. 181-184, 2002.

KRAY, H.K.; TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A.; GIANELLO, C.; SILVA, K.J. Tannery and coal mining waste disposal on soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2877-2882, 2008.

MARTINES, A.M.; ANDRADE, C.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Mineralization of the organic carbon in soils treated with tannery sludge. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1149-1155, 2006.

MENNEER, J.C.; McLAY, C.D.A.; LEE, R. Effects of sodium-contaminated wastewater on soil permeability of two New Zealand soils. **Australian Journal of Soil Research**, Victoria, v. 39, p. 877-891, 2001.

MOREIRA, M.; NOGUEIRA, M.A.; TSAI, S.M.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Sporulation and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazil Pine in the field and in the greenhouse. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 17, p. 519-526, 2007.

MULVANEY, R.L. Nitrogen-Inorganic forms. In: BIGHAM, J.M. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America; American Society of agronomy, 1996. pt. 3, chap. 38, p. 1123-1184.

NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. **Journal of Ecology**, Malden, v. 83, p. 991-1000, 1995.

NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: BIGHAM, J.M. (Ed.). **Methods of soil analysis: chemical methods**. Madison: Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, 1996, pt. 3, chap. 9, p. 961-1010.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; INEICHEN, K.; MADER, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 2816-2824, 2003.

ORTEGA-LARROCEA, M.P.; SIEBE, C.; ESTRADA, A.; WEBSTER, R. Mycorrhizal inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi in soils irrigated with wastewater for various lengths of time, as affected by heavy metals and available P. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 37, p. 129-138, 2007.

PACHECO, J.W.F. **Curtumes**. São Paulo: CETESB, 2005, 76 p.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 285 p.

RAMAN, N.; SAMBANDAN, K. Distribution of VAM fungi in tannery effluent polluted soils of Tamil Nadu, India. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 60, p. 142-150, 1998.

RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 84, p. 355-363, 2004.

SAS Institute. **SAS/STAT: user's guide version 9.2 (software)**. Cary, 2008.

SELVARAJ, T.; CHELLAPPAN, P.; JEONG, Y. J.; KIM, H. Occurrence and quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi in industrial polluted soils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 15, p. 147-154, 2005.

STAHL, P.D.; WILLIAMS, S.E. Oil-shale process water affects activity of vesicular arbuscular fungi and *rhizobium* 4 years after application to soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 18, p. 451-455, 1986.

STATISTICA StatSoft, Inc. **STATISTICA (data analysis software system)**, version 6. 2001.

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

TRESEDER, K.K. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. **New Phytologist**, Oxford, v. 164: p. 347-355, 2004.

USEPA. **Test method for evaluating solid waste, physical/chemical methods**. 3rd ed. Washington: EPA, 1986. (SW-846).

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.P.; WYSS, U.; PICHÈ, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 5004-5007, 1998.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall International, 1998. 929 p.

4 ALTERAÇÕES NO PERFIL FISIOLÓGICO E DE ÁCIDOS GRAXOS DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE LODO DE CURTUME

Resumo

A utilização de lodo de curtume na agricultura deve-se principalmente ao seu elevado teor de nutrientes e potencial de neutralização da acidez do solo, sendo uma alternativa para sua disposição final e reciclagem. No entanto, os seus efeitos sobre a microbiota do solo, que possui fundamental importância para a qualidade do solo, ainda não são totalmente compreendidos. Estudaram-se alterações na estrutura e perfil fisiológico da comunidade microbiana de um solo agrícola que recebeu duas aplicações de lodo de curtume (2006 e 2007), formado por uma mistura, na proporção de 1:1, do lodo do caleiro e lodo primário da estação de tratamento de efluente - ETE. Os tratamentos foram controle (zero), 2,3 e 22,6 Mg ha⁻¹ de lodo e as amostragens de solo foram realizadas aos 12 e 271 dias após a segunda aplicação do resíduo (2007). A estrutura de comunidade foi avaliada pelo perfil de ácidos graxos de fosfolípidios (PLFA) e o perfil fisiológico da comunidade microbiana do solo pelo método Biolog. A maior dose de lodo aplicada alterou a estrutura da comunidade microbiana do solo, tanto aos 12, quanto aos 271 dias após a segunda aplicação. Em adição, o metabolismo da comunidade microbiana do solo também foi afetado nos tratamentos que receberam o resíduo, diferindo do controle. A aplicação do lodo de curtume intensificou e acelerou o consumo de substratos de carbono, e esse efeito ainda foi evidente na maior dose (22,6 Mg ha⁻¹ de lodo) mesmo nove meses após a aplicação do resíduo. De acordo com os resultados, as alterações na composição da comunidade microbiana do solo foram acompanhadas de modificações no seu metabolismo. As respostas da microbiota acompanharam as modificações nos atributos químicos do solo decorrentes da aplicação de lodo de curtume, principalmente, elevação do pH e aumento no teor de N mineral.

Palavras-chave: Nitrogênio; Carbono; PLFA; Biolog

Abstract

The use of tannery sludge in agricultural soil is primarily related to its high nutrient content and potential to neutralize the soil acidity, as an alternative to its final disposal and recycling. Nevertheless, the effects on soil microbial aspects, which have primordial importance for the soil quality, are not totally understood yet. Changes in the microbial community structure and in the physiological profile in soil after two applications of tannery sludge (2006 and 2007), as a mixture of liming sludge and primary sludge from the wastewater treatment plant, were assessed. The treatments were control (zero), 2,3, and 22,6 Mg ha⁻¹ of sludge and soil samplings were collected at 12 and 271 days after the second sludge application (2007). The microbial community

structure was assessed by phospholipids fatty acid analysis (PLFA) and the community level physiological profile (CLPP) by Biolog microplates. The highest dose applied changed the soil microbial community at 12 and 271 days after the second sludge application. Moreover, the CLPP was also affected in the treatments that received the residue; they were different from the control treatment. The carbon substrate consumption was intensified and accelerated by the tannery sludge application, and this effect still was evident at the highest dose ($22,6 \text{ Mg ha}^{-1}$ of sludge) even nine months after the sludge application. According to the results, the shifts in the soil microbial community composition could be related to shifts in the microbial metabolism, and the microbial responses were related to alterations in soil chemical attributes, due to tannery sludge application, mostly, increases of soil pH and mineral N content.

Keywords: Nitrogen; Carbon; PLFA; Biolog

4.1 Introdução

A industrialização do couro é uma atividade potencialmente poluidora, na medida em que são geradas grandes quantidades de resíduos durante o seu processamento (PACHECO, 2005). Para a produção do couro denominado “wet blue” as peles são tratadas com uma ampla gama de produtos químicos (MARTINES et al., 2010), de modo que os lodos gerados apresentam grande carga de nutrientes e elevado pH. Estas características possibilitam seu uso, quando baseado em critérios técnico-científicos, como fertilizante e corretivo da acidez do solo, na recuperação de áreas degradadas e em solos agrícolas (KRAY et al., 2008) como uma forma de reciclagem. Atualmente, os curtumes têm aprimorado seus processos de curtimento, o que tem proporcionado a diminuição do teor de cromo total nos resíduos finais, fazendo com que a questão do Cr deixe de ser a principal preocupação ambiental com relação ao destino final deste material, de forma que outros aspectos, como o elevado teor de nitrogênio e sódio passam a ser os fatores mais limitantes quanto à sua disposição no solo (NAKATANI et al., 2011).

Os efeitos desse tipo de prática sobre atributos biológicos dos solos têm sido pouco estudados. Considerando que a comunidade microbiana do solo é responsável pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, além de responder prontamente a alterações ambientais, estes podem ser importantes bioindicadores da

saúde do solo ou de distúrbios que podem ocorrer devido à ação antrópica (BENDING et al., 2004).

A estrutura da comunidade ou composição das populações microbianas de um solo tem relação direta com a diversidade metabólica e com a atividade enzimática e biológica do solo (ZAK et al., 1994). Além disso, fatores ambientais, interações ecológicas, componentes genéticos das populações, quantidade e qualidade das fontes de carbono e energia também podem influenciar nessas propriedades (MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003). Uma melhor compreensão do funcionamento da comunidade microbiana pode ser obtida ao se examinar, além da diversidade de espécies, a diversidade funcional que ela representa (TÓTOLA; CHAER, 2002).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil metabólico e a estrutura da comunidade microbiana em solo tratado com lodo de curtume, visando o monitoramento das alterações decorrentes dessa prática. A hipótese de trabalho foi a de que os atributos microbiológicos do solo respondem rapidamente à aplicação do resíduo de curtume devido ao seu elevado teor de carbono, nutrientes e ao seu caráter alcalino. Em adição, as alterações na estrutura da comunidade microbiana resultam em modificações no seu perfil fisiológico.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

Área de estudo e doses de lodo de curtume

O experimento foi conduzido em área agrícola no município de Rolândia, Paraná, Brasil (23°17'S 51°29'W, 650 m). O clima local é classificado de acordo com Köppen como Cfa, com precipitação anual de 1600 mm principalmente entre Setembro e Março. A área de estudo é manejada há mais de 10 anos sob sistema de plantio direto com rotação de cultura (soja/milho no verão e trigo/aveia no inverno). O solo é classificado como Rhodic Kandudult (US Soil Taxonomy), de textura muito argilosa. A primeira aplicação do lodo na área ocorreu em 2006 e a reaplicação em 2007. O

experimento foi arranjado em blocos completos casualizados com quatro repetições. A caracterização detalhada da área experimental e as doses de lodo de curtume aplicadas nos dois anos de experimento estão descritas em Martines et al. (2010).

O objeto de estudo do presente trabalho foi o segundo ano de aplicação do resíduo (2007). Neste ano, o lodo permaneceu 87 dias na superfície do solo antes de ser incorporado por gradagem, na profundidade de 0-20 cm. Na seqüência foi realizado o cultivo do milho. Os tratamentos avaliados foram: controle (zero), 2,3 e 22,6 Mg ha⁻¹ de lodo de curtume (base seca), que são equivalentes a zero, 120 e 1200 kg ha⁻¹ de N total. Amostras de solo coletadas aos 12 e 271 dias após a segunda aplicação do lodo de curtume foram avaliadas. Foram coletadas nove subamostras de solo por parcela, da camada 0-10 cm, para formar uma amostra composta. Essas amostras foram estocadas a 4 °C e enviadas ao laboratório para avaliações.

Lodo de curtume

O lodo de curtume utilizado no experimento foi obtido do Curtume Vanzella Ltda. (município de Rolândia, Paraná, Brasil) e foi uma mistura 1:1 do lodo do caleiro e do primário da ETE. Na tabela 4.1 encontra-se a caracterização dos lodos utilizados nos dois anos de aplicação. Informações adicionais sobre as metodologias utilizadas na determinação dos atributos físicos e químicos do lodo estão descritas em Martines et al. (2010).

Tabela 4.1 – Atributos físico-químicos dos lodos de curtume utilizados no experimento

Variável	1ª aplicação	2ª aplicação	Varição ^c
pH ^a	12,7	9,7	7,7 – 11,8
CE (dS m ⁻¹) ^a	29,5	16,6	-
Sólidos totais, a 65 °C (g kg ⁻¹)	53,3	55,4	120,0 – 390,0
Sólidos voláteis (g kg ⁻¹)	442	554	-
Poder de neutralização (CaCO ₃ g kg ⁻¹)	262	361	160 – 315
C orgânico (g kg ⁻¹)	308	321	65 – 257,8
N total (g kg ⁻¹)	35,7	53,2	9,8 – 53,4
NH ₄ ⁺ - N (g kg ⁻¹)	20,4	21,9	-
NO ₃ ⁻ - N (g kg ⁻¹)	0,2	0,2	-
Relação C/N	8,7	6,0	4,1 – 13,8
Ca (g kg ⁻¹)	78,9	88,0	20,0 – 210,0
Mg (g kg ⁻¹)	0,7	1,0	0,2 – 7,5
K (g kg ⁻¹)	0,1	3,3	0,1 – 1,7
P (g kg ⁻¹)	3,9	3,8	1,1 – 7,5
S (g kg ⁻¹)	36,1	43,0	13,0 – 15,0
Na (g kg ⁻¹)	10,0	66,9	8,1 – 59,9
Mn (mg kg ⁻¹)	2858	3340	128 – 6350
Fe (mg kg ⁻¹)	408	1.249	-
B (mg kg ⁻¹)	4,5	5,6	-
Zn (mg kg ⁻¹)	43,3	73,0	48,0 – 176,0
Cu (mg kg ⁻¹)	4,5	16,0	14,0 – 81,0
Mo (mg kg ⁻¹)	3,3	<0,5 ^b	-
Al (mg kg ⁻¹)	2.257	13.440	-
As (mg kg ⁻¹)	<1,0 ^b	<0,5 ^b	-
Cd (mg kg ⁻¹)	<1,0 ^b	<0,5 ^b	0,1 – 4,0
Pb (mg kg ⁻¹)	<1,0 ^b	9,3	15,0 -35,0
Hg (mg kg ⁻¹)	<1,0 ^b	<0,5 ^b	-
Ni (mg kg ⁻¹)	3,0	7,8	1,3 – 20,0
Se (mg kg ⁻¹)	<1,0 ^b	<0,5 ^b	-
Cr total (mg kg ⁻¹)	1613	580	798 – 22200

Resultados expressos em base seca, a 65 °C por 48 h; ^a Medido na amostra *in natura*; ^b Concentrações abaixo do limite de detecção; ^c Valore obtidos de Alcântara et al. (2007); Barajas-Aceves e Dendooven (2001), Barajas-Aceves, Velásquez-Ocampo e Vázquez-Rodríguez (2007), Kray et al. (2008), Martines, Andrade; Cardoso (2006).

Análise dos ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA)

Os PLFA foram extraídos a partir de 4 g de solo (peso seco) usando o procedimento baseado em Frostegard, Baath e Tunlid (1993) e Bardgett, Hobbs e Frostegard (1996). Os lipídios foram extraídos com solvente monofásico clorofórmio-metanol-tampão citrato, a fração PLFA foi separada usando colunas de ácido silicílico antes da transesterificação com álcali brando e captação final em diclorometano. Metil-nonadecanoato (C19:0) foi adicionado a cada amostra como padrão interno. Os metil-

ester ácidos graxos foram separados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) (HP6890) usando uma coluna capilar de sílica fundida (60 m, 0.25 mm x 0.25mm de espessura de filme) (Supelco, Sigma-Aldrich, Austrália) usando o hélio como gás de transporte. As especificações de temperatura foram reguladas para 250 °C para o injetor, 260 °C para o detector, programa de temperatura: 140 °C por 5 min, gradiente de 140-240 °C a 4°C min⁻¹, 240 °C por 15 min. Os picos individuais de PLFA foram identificados por comparação do tempo de retenção com os picos da mistura padrão Supelco 37 (Supelco, Bellefonte, Pa.) e dos picos que foram identificados por GC-MS (cromatografia gasosa combinada com detector seletivo de massa HP 5973) usando a mesma coluna, condições do programa de temperatura e gás de transporte como descrito acima. Identificação dos picos de espectrômetro de massa foi baseada na comparação com o banco de dados do software NIST02.L.

A nomenclatura do ácido graxo é baseada em Frostegard, Baath e Tunlid (1993). Os PLFA marcadores foram usados como indicadores de grupos microbianos específicos (bactéria: C14:0, C15:0, C17:0, bactéria Gram-positiva: *i*C:15:0, C16:0, *i*C16:0, bactéria Gram-negativa: C16:1 ω 7c, C18:1 ω 7, actinobactéria: 10ME-C17:0, 10ME-C18:0, fungos: C18:1 ω 9c, C18:3 ω 3c, C18:2 ω 6c ou t, C18:1 ω 9c, C16:1 ω 5, C18:3 ω 6c (ZELLES, 1999; ZAK et al., 2000; GRAHAM; HODGE; MORTON, 1995).

Análise do perfil fisiológico da comunidade microbiana (CLPP)

A análise do CLPP foi realizada utilizando o sistema Biolog Ecoplate® (Biolog Inc., EUA). Para padronizar a densidade de inóculo, foi estimado o número mais provável de bactérias totais, em meio ágar nutriente, a 28 °C por 48 h, usando o método de plaqueamento por gotas (JAHNEL; CARDOSO; DIAS, 1999). As microplacas foram inoculadas com 150 μ L de suspensão de solo preparada com 10 g de solo diluída em salina estéril (NaCl; 0,85% w/v), para conter aproximadamente 1000 células mL⁻¹. As microplacas foram incubadas a 28 °C e analisada após 12 horas e então a cada 24 horas, por 7 dias, usando um leitor automático de microplacas (Model 550, Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA), ajustado para 590 nm. Os dados de densidade ótica

(OD_{590nm}) de cada poço foram corrigidos pela primeira leitura feita logo após a inoculação das placas e também pelo branco para cada leitura.

Os dados corrigidos foram transformados pela divisão de cada valor pelo desenvolvimento de cor médio dos poços (AWCD) da placa (GARLAND; MILLS, 1991). Os valores corrigidos para a placa toda foram usados para avaliar o metabolismo heterotrófico médio e para estimar os parâmetros cinéticos, empregando-se a equação de crescimento logístico proposto por Lindström, Barry e Braddock (1998), pelo ajuste da curva de absorvância a 590 nm em relação ao tempo de incubação das placas:

$$OD_{590nm} = K/(1 + e^{-R(T-S)}) \quad (1)$$

Onde “K” (assíntota) é o máximo grau de desenvolvimento de cor (OD_{590nm}), “R” (taxa de degradação) a taxa exponencial de mudança de OD_{590nm} (h⁻¹), “T” o tempo de inoculação das placas (h), e “S” o tempo para alcançar o ponto central da fase exponencial da curva, quando se tem K/2 (h).

O índice de diversidade de Shannon’s (H’) e a riqueza de consumo de substrato (Ss) foram calculados de acordo com Zak et al. (1994), considerando o AWCD para cada tempo de leitura, durante o período de incubação.

Análise química do solo

As amostras de solo foram submetidas à análise química de fertilidade, condutividade elétrica e teor de N mineral (N-NH₄⁺ + N-NO₃⁻). Mais detalhes das análises químicas são apresentados em Nakatani et al. (2011).

Análise dos dados

Os dados de PLFA foram transformados para log (x + 1) e analisados pelo programa Primer 5 (PRIMER-E, 2001) e plotados usando escala multidimensional não-métrica (NMDS). A plotagem por NMDS com estresse 2D < 0,2 representa um bom reflexo da estrutura geral da comunidade microbiana. Diferenças significativas na

estrutura de comunidade entre os tratamentos foram determinados por PERMANOVA (PRIMER-E, 2001). O procedimento DistLM no Primer foi usado para determinar as variáveis ambientais (atributos químicos do solo) que foram mais relacionados com os padrões observados. Este procedimento também foi usado para avaliar a contribuição dos diferentes ácidos graxos para os padrões observados. Diferenças significativas referem-se a $P \leq 0,05$.

Os parâmetros cinéticos estimados para o metabolismo heterotrófico médio, os índices de diversidade de Shannon's (H') e a riqueza de consumo de substrato (S_s) foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas usando o teste LSD ($P < 0,05$). Esses parâmetros foram também correlacionados com os atributos químicos do solo pela correlação de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SAS, versão 9.2 (SAS INSTITUTE, 2008).

A ordenação por NMDS foi realizada para testar diferenças no CLPP baseado na similaridade das amostras. Os parâmetros cinéticos foram transformados para $\log(x + 1)$ e usado para elaborar a matriz de similaridade, usando o modelo de Bray-Curtis. Adicionalmente, diferenças entre os tratamentos foram avaliados usando a análise de similaridade (ANOSIM) pelo programa Primer.

4.2.2 Resultados

Análise de ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA)

As concentrações de PLFA extraídos de microrganismos do solo ficaram entre 12 e 34 ng g^{-1} solo. Não houve grandes variações entre os tratamentos. Apenas na dose 22,6 Mg ha^{-1} de lodo aos 271 dias o valor foi inferior aos dos outros tratamentos dentro da mesma época (controle e dose 2,3 Mg ha^{-1} de lodo), além de ter sido inferior ao encontrado no solo do tratamento correspondente da primeira coleta (4 dias) (dados não apresentados).

A disposição gráfica dos perfis de PLFA após NMDS e PERMANOVA mostra que houve separação do tratamento 22,6 Mg ha^{-1} de lodo nas duas épocas avaliadas em relação aos tratamentos controle sem lodo e 2,3 Mg ha^{-1} (Figura 4.1 A). Esses

resultados sugerem que altas doses de lodo de curtume modificam a estrutura da comunidade microbiana do solo baseada no perfil de PLFA, e que esta modificação ainda permanece, mesmo 9 meses após a aplicação do resíduo.

De acordo com a análise DistLM, os ácidos graxos C16:0, *i*C17:0 e 15m9 C16:1, característicos de bactérias, foram os que mais contribuíram (88%) para a separação dos padrões de PLFA (Figura 4.1 B). Entre os atributos químicos do solo, os teores de P, N mineral, Ca e o pH foram os que mais contribuíram para diferenciar os tratamentos (54%) (Figura 4.1 C).

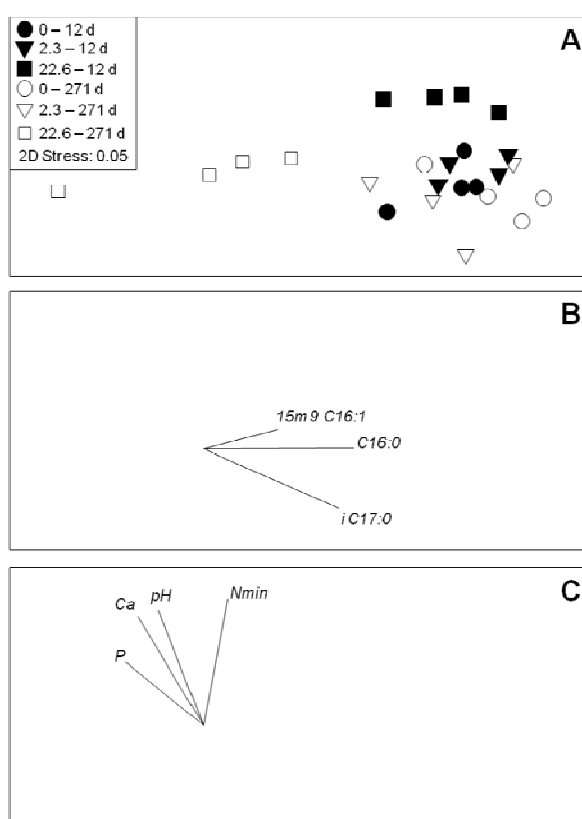


Figura 4.1 – (A) Análise em escala multidimensional não métrica (NMDS) do perfil de ácidos graxos de fosfolípidios (PLFA) da comunidade microbiana de solo agrícola sob aplicação de lodo de curtume, em duas épocas de avaliação. 0, 2,3 e 22,6 correspondem às doses de lodo de curtume em Mg ha⁻¹. 12 d e 271 d correspondem a amostragens de solo realizadas 12 e 271 dias após a segunda aplicação do resíduo, respectivamente. (B) Ácidos graxos e (C) atributos químicos do solo que contribuíram com mais de 5% para a explicação do padrão de PLFA. Direção do vetor indica um aumento no conteúdo ou valor, o comprimento do vetor indica a importância relativa

Padrões de utilização de substratos de carbono

O consumo de substratos de carbono, avaliado pelas microplacas Biolog, mostrou que o lodo de curtume modificou o potencial metabólico da comunidade microbiana do solo, e que esse efeito foi maior logo após a aplicação do resíduo (Figura 4.2). No solo coletado aos 12 dias (Figura 4.2 A), após a fase lag de 24 horas de incubação das placas, os tratamentos que receberam o resíduo (2,3 e 22,6 Mg ha⁻¹) apresentaram maior metabolismo heterotrófico médio (AWCD) que o controle sem lodo. Já no solo coletado aos 271 dias (Figura 4.2 B) da aplicação do resíduo os tratamentos apresentaram curvas de ajuste semelhantes.

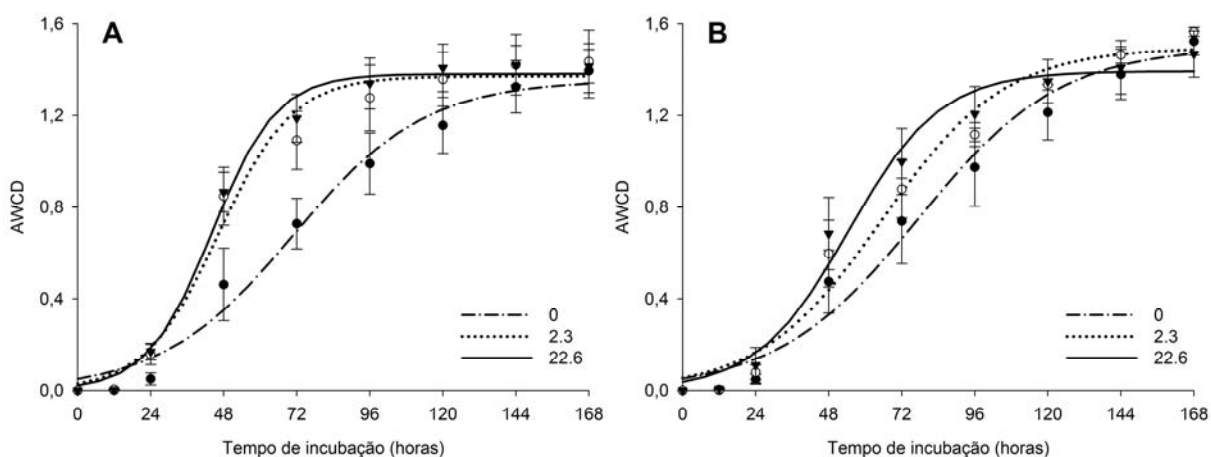


Figura 4.2 – Curva de ajuste da cinética de desenvolvimento médio de cor dos poços (AWCD) de suspensões de solo de solo tratado com lodo de curtume (0 a 22,6 Mg ha⁻¹), (A) 12 e (B) 271 dias após a segunda aplicação do lodo, em Rolândia, PR, Brasil. *Círculos cheios* Controle, *círculos vazios* 2,3 Mg ha⁻¹ de lodo, e *triângulos cheios* 22,6 Mg ha⁻¹ de lodo. As *linhas* representam as equações de ajuste; os *pontos* representam a média de cada tratamento; e as *barras verticais* representam o desvio padrão ($n = 4$)

O máximo grau de consumo de substrato (K) não diferiu entre os tratamentos dentro de cada época avaliada (Tabela 4.2). Aos 12 dias, a máxima taxa de consumo de substrato (r) foi maior nos tratamentos que receberam lodo de curtume, assim como esses mesmos tratamentos levaram menos tempo para alcançar o(s) ponto(s) médio(s) de crescimento exponencial(is). Aos 271 dias apenas a dose 22,6 Mg ha⁻¹ de lodo apresentou valores de r e s diferentes do controle. Isso demonstra que a aplicação do lodo de curtume promoveu o consumo de substratos de carbono de uma forma mais

intensa e acelerada pela comunidade microbiana do solo, ou seja, houve um forte estímulo da atividade microbiana. Os efeitos do resíduo sobre o perfil metabólico microbiano do solo ainda foram evidentes na maior dose de lodo nove meses após a segunda aplicação.

Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos da curva de ajuste do AWCD da comunidade microbiana heterotrófica de solo tratado com lodo de curtume (0, 2,3 e 22,6 Mg ha⁻¹), 12 e 271 dias após a segunda aplicação de lodo, em Rolândia, PR, Brasil

Tratamento	<i>K</i>	<i>r</i>	<i>s</i>
12 dias			
0	1,354±0,094	0,046±0,002b	70,834±6,515a
2,3	1,371±0,128	0,083±0,023a	46,389±5,854b
22,6	1,381±0,086	0,094±0,010a	44,136±2,267b
271 dias			
0	1,499±0,023	0,043±0,007B	77,471±13,497A
2,3	1,496±0,063	0,050±0,010B	65,717±9,804AB
22,6	1,393±0,096	0,066±0,012A	54,547±8,751B

Médias seguidas por letras diferentes, para cada coluna e épocas de coleta diferem entre si pelo teste LSD ($P < 0,05$). Valores representam as médias e o desvio padrão ($n = 4$). *K* = máximo grau de consumo de substrato, *r* = taxa de consumo de substrato e *s* = tempo decorrido antes de alcançar o ponto médio exponencial de consumo de substrato.

A análise de NMDS (Figura 4.3) e ANOSIM (Tabela 4.3) dos parâmetros cinéticos (*K*, *r* e *s*) confirma os resultados do teste LSD desses parâmetros (Tabela 4.2), mostrando novamente que os tratamentos que receberam o lodo apresentaram comunidade microbiana com metabolismo diferente do controle na primeira época de coleta, e que na segunda época de coleta apenas o tratamento 22,6 Mg ha⁻¹ de lodo diferiu do tratamento controle.

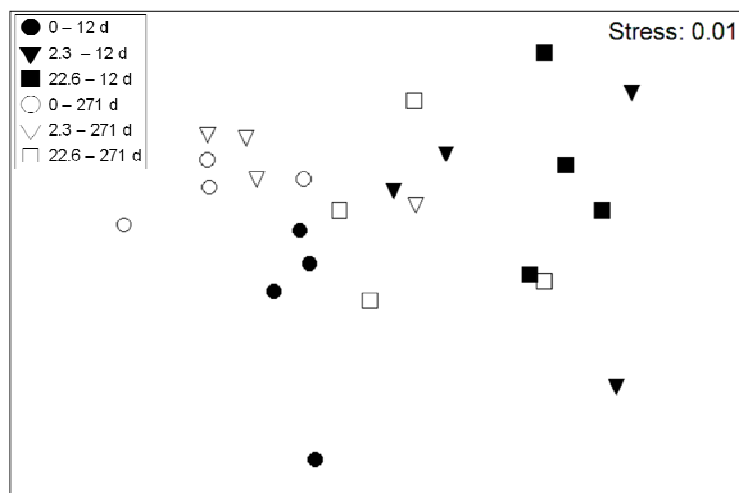


Figura 4.3 – Análise em escala multidimensional não-métrica (NMDS) dos parâmetros cinéticos do AWCD da comunidade microbiana heterotrófica de solo tratado com lodo de curtume (0 a 22,6 Mg ha⁻¹), 12 (símbolos cheios) e 271 (símbolos vazios) dias após a segunda aplicação de lodo em Rolândia, PR, Brasil. *Círculos* 0 Mg ha⁻¹ de lodo, *Triângulos* 2,3 Mg ha⁻¹ de lodo e *Quadrados* 22,6 Mg ha⁻¹ de lodo

Tabela 4.3 – Teste de pareamento (estatística R) da cinética da curva de ajuste do AWCD da comunidade microbiana de solo tratado com lodo de curtume (0, 2,3 e 22,6 Mg ha⁻¹), 12 e 271 dias após a segunda aplicação de lodo, em Rolândia, PR, Brasil. R global = 0,471, $P < 0,001$. * representa diferenças entre os parâmetros cinéticos para cada tratamento, $P < 0,05$

Tratamento	Estatística R
12 dias	
0, 2,3	0,510*
0, 22,6	0,979*
2,3, 22,6	-0,021
271 dias	
0, 2,3	-0,073
0, 22,6	0,573*
2,3, 22,6	0,177

O parâmetro K não apresentou correlação significativa com nenhum atributo químico do solo (Tabela 4.4). O parâmetro r apresentou correlação positiva significativa com a maioria dos atributos, enquanto o parâmetro s apresentou correlação negativa significativa com todos os atributos químicos do solo analisados.

Tabela 4.4 – Análise de correlação de Pearson entre os parâmetros cinéticos e atributos químicos do solo

	pH	P	Ca	Na	CTC	N min	CE
<i>K</i>	-0,383	-0,142	-0,282	-0,214	-0,273	-0,167	-0,159
<i>r</i>	0,753**	0,296	0,535**	0,756**	0,646**	0,719**	0,702**
<i>s</i>	-0,813**	-0,397*	-0,546**	-0,619**	-0,592**	-0,574**	-0,566**

K máximo grau de consumo de substrato, *r* taxa de consumo de substrato e *s* tempo para alcançar o ponto médio de consumo de substrato, pH acidez ativa, P fósforo disponível (método da resina), Ca cálcio, Mg magnésio, Na sódio, CTC capacidade de troca catiônica, N min nitrogênio mineral, CE condutividade elétrica, ** $P < 0,05$, * $P < 0,1$.

O índice de diversidade (H') e a riqueza (S_s) de consumo de substrato pela comunidade microbiana foram alterados pela adição do lodo de curtume, em maior grau aos 12 dias de avaliação (Figura 4.4). Nessa época de amostragem, os índices de diversidade (H') atingiram maiores valores entre 48 e 144 horas de incubação (Figura 4.4 A) assim como a riqueza de substrato consumido foi maior nos tratamentos que receberam lodo, o que foi constatado entre 24 e 72 horas de incubação (Figura 4.4 B). Aos 271 dias após aplicação do resíduo só houve diferença na riqueza de consumo de substrato, o que foi constatado com 72 e 96 horas de incubação, enquanto que não houve diferença entre os índices de diversidade de Shannon entre os tratamentos (dados não apresentados).

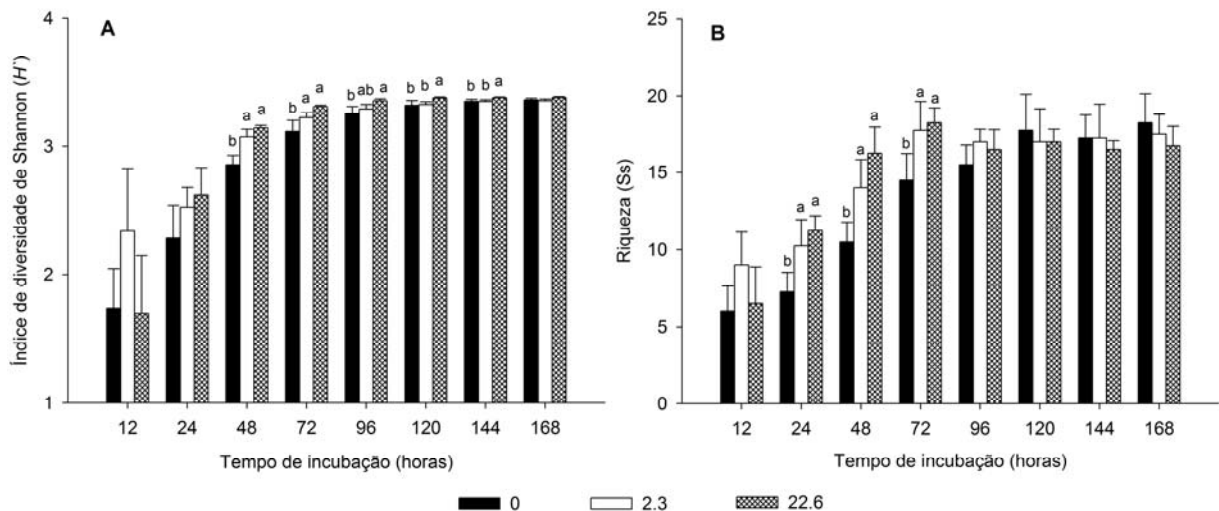


Figura 4.4 – Índice de diversidade de Shannon (H') e riqueza (S_s) de consumo de substrato, derivado da análise de CLPP da comunidade heterotrófica microbiana de solo tratado com lodo de curtume (0 a 22,6 $Mg\ ha^{-1}$), 12 dias após a segunda aplicação do lodo, em Rolândia, PR, Brasil. Médias seguidas pela mesma letra, para cada tempo de incubação, não diferem entre si pelo teste LSD ($P < 0,05$)

4.2.3 Discussão

Estrutura de comunidade microbiana baseada na análise de PLFA

A concentração de PLFA do solo pode ser considerada uma forma de quantificar a biomassa microbiana (BM). No presente trabalho e em Nakatani et al. (2011), ambos resultantes do mesmo experimento de campo, não se observaram grandes alterações no carbono da BM pelo método da fumigação-extração, nos dois anos de estudo. A BM do solo está em constante interação com outros parâmetros físicos, químicos e biológicos do ecossistema, de forma que a introdução de resíduos orgânicos pode alterar, com maior ou menor intensidade, alguns grupos funcionais de microrganismos do solo, sem, no entanto, alterar a BM total (SULLIVAN et al., 2006).

Os resultados do presente estudo suportam a hipótese de que os microrganismos respondem rapidamente à aplicação do lodo de curtume, pois a estrutura de comunidade microbiana avaliada pelo perfil de PLFA foi alterada pela aplicação de alta dose de lodo de curtume ($22,6 \text{ Mg ha}^{-1}$) pouco tempo após a aplicação do resíduo (12 dias) e esse efeito estendeu-se até 9 meses após a aplicação. Outros estudos na literatura também verificaram modificações na estrutura da comunidade microbiana do solo baseada no perfil de PLFA, em função da contaminação por lodo de curtume (KAMALUDEEN et al., 2003) e aplicação de lodo de esgoto (ABAYE et al., 2005; BAATH et al., 1998).

O lodo de curtume caracteriza-se como fonte de vários elementos químicos, principalmente N, e apresenta capacidade de elevar o pH do solo. Por essa razão, a aplicação desse resíduo pode promover alterações significativas sobre os atributos químicos do solo e conseqüente influência direta sobre a comunidade microbiana (NAKATANI et al., 2011). De fato, os resultados da análise DistLM do perfil de ácidos graxos da comunidade microbiana do solo mostram que essas alterações estão relacionadas com a elevação no teor de P disponível, de N mineral, Ca e pH do solo, promovidas pela aplicação do resíduo. Isso corrobora a nossa hipótese de que a característica do resíduo é um importante fator relacionado aos efeitos sobre a comunidade microbiana do solo. Zhong et al. (2010) também observaram que esses

atributos químicos do solo foram determinantes para a modificação do perfil de PLFA das comunidades microbianas em solos sob fertilização mineral (uréia, P_2O_5 e K_2O) e orgânica (esterco suíno compostado). Segundo Baumann et al. (2009), o suprimento e disponibilidade de N é um dos principais fatores que moldam a composição das comunidades microbianas do solo, corroborando os resultados da análise DistLM, a qual indica o aumento do teor de N no solo pela adição do lodo de curtume como um dos principais fatores de alteração do perfil de PLFA.

Visto que diferentes grupos microbianos são caracterizados por PLFA específicos e de proporção relativamente constante, uma mudança na sua composição e abundância pode caracterizar uma modificação na estrutura destas comunidades. A composição e abundância de ácidos graxos saturados e iso-ácidos graxos (e.g. C16:0 e iC17:0) têm sido consideradas importantes para diferenciar comunidades microbianas de solos irrigados com lodo de esgoto (ZHANG et al., 2008), alterações de uso da terra (BOSSIO et al., 2005) e sujeitos à contaminação por resíduos domésticos e industriais (PUGLISI et al., 2005). O PLFA C16:0 é um fosfolípídio saturado de cadeia curta, abundante nos solos (IBEKWE; KENNEDY, 1998) e foi relatado como o predominante em solos com histórico de contaminação por resíduo de curtume (KAMALUDEEN et al., 2003).

Estudos sobre a composição e estrutura da comunidade microbiana são importantes para o entendimento da sustentabilidade dos ecossistemas naturais e agrícolas, uma vez que ela é determinante para as taxas de decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes no solo (FREY; ELLIOTT; PAUSTIAN, 1999), assim como tem influência direta na redundância funcional do solo e conseqüentemente sobre a sua resiliência. Entretanto, a adição de resíduos orgânicos ao solo pode alterar a comunidade e a atividade microbiana, com possíveis efeitos sobre a ciclagem do carbono e nutrientes. Dependendo do resíduo adicionado, grupos microbianos chaves podem ser inibidos ou eliminados, como foi observado por Alvarez-Bernal et al. (2006), em solo irrigado com efluente de curtume, em relação aos microrganismos nitrificadores, que são imprescindíveis para o ciclo do N, o qual tem uma ciclagem essencialmente microbiana no solo.

Perfil fisiológico da comunidade microbiana pelo Biolog Ecoplate

Visto que a diversidade metabólica da comunidade microbiana é consequência da diversidade genética, dos efeitos ambientais na expressão gênica e das interações ecológicas entre as diferentes populações (ZAK, et al., 1994), o potencial fisiológico pode ser um indicador importante de alterações na qualidade biológica do solo. O uso de Biolog Ecoplate® é considerado um método útil e rápido para obter informação sobre a dinâmica das comunidades microbianas em solos sob aplicação de resíduos como biossólido (SULLIVAN et al., 2006), resíduo sólido doméstico compostado (GOMEZ; FERRERAS; TORESANI, 2006), efluente de esgoto (PAULA et al., 2010), mas ainda não existe este tipo de estudo para solos sob aplicação de resíduo de curtume.

Neste trabalho, o uso de microplacas Biolog permitiu a discriminação dos tratamentos (com e sem aplicação de lodo de curtume) quanto ao seu potencial fisiológico. Resultados semelhantes foram encontrados por Paula et al. (2010) que observaram, através das análises de NMDS e ANOSIM, que o perfil metabólico microbiano foi alterado pela irrigação com efluente de esgoto tratado.

A quantidade e a qualidade da matéria orgânica é um fator fundamental que controla a estrutura, função e atividade da microbiota do solo (MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003; NDAW et al., 2009). O lodo de curtume é um material de baixa relação C/N e fonte de C prontamente assimilável pela microbiota (MARTINES; ANDRADE; CARDOSO, 2006). Esses autores verificaram que mais de 50% do C do lodo de curtume adicionado ao solo foi mineralizado nos primeiros 10 dias. No presente estudo, a aplicação do lodo de curtume ao solo favoreceu o desenvolvimento de populações microbianas copiotróficas nativas do solo ou introduzidas pelo lodo, elevando o potencial funcional da comunidade (GOMEZ; FERRERAS; TORESANI, 2006), o que resultou em aceleração e intensificação do consumo de substratos de C das microplacas. Isso explica o metabolismo heterotrófico médio mais elevado nas curvas de ajuste, os maiores valores de r e menores valores de s nos tratamentos que receberam lodo, na primeira época (12 dias após a aplicação). Como consequências do maior metabolismo microbiano são esperadas maiores taxas

de ciclagem e liberação de nutrientes (BRADLEY; FYLES, 1995; LTEIF et al., 2007), indicando uma comunidade microbiana mais ativa em desempenhar essas funções no solo.

A aplicação de lodo de curtume ao solo tende a estimular a atividade microbiana (BARAJAS-ACEVES; VELÁSQUEZ-OCAMPO; VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, 2007; MARTINES, ANDRADE; CARDOSO, 2006;), o que foi confirmado neste trabalho pelo aumento do metabolismo heterotrófico potencial da comunidade microbiana. Forte estímulo à atividade microbiana (respirometria e atividade enzimática) devido à aplicação do resíduo também foi verificada por Nakatani et al. (2011). Estes últimos autores encontraram liberação de CO₂ pela atividade respiratória até 3,3 vezes maiores e atividade da asparaginase até 16,9 vezes maiores nos tratamentos que receberam lodo em comparação ao tratamento controle.

Na segunda época de amostragem (271 dias após a aplicação), a maior parte do substrato prontamente disponível proveniente do lodo já havia sido consumida pela comunidade microbiana, provavelmente restando formas de carbono mais recalcitrantes no solo. Neste período, provavelmente, houve favorecimento ou substituição por populações oligotróficas e adaptadas a esse tipo de material, o que pode explicar a queda no valor de *r* e aumento no valor de *s*, fazendo com que o perfil metabólico da microbiota do solo que recebeu a menor dose de lodo (2,3 Mg ha⁻¹) ficasse semelhante ao tratamento controle. Houve então uma queda na atividade microbiana do solo com o passar do tempo, como já observado em outros estudos com lodo de curtume (FERREIRA et al., 2003; MARTINES; ANDRADE; CARDOSO, 2006; NAKATANI et al., 2011). No entanto, na maior dose (22,6 Mg ha⁻¹), devido à grande quantidade de lodo aplicado, mesmo após 271 dias ainda continuou a influenciar o perfil metabólico da comunidade microbiana do solo que foi alterada em decorrência da adição do lodo. Essa persistência pode ser decorrente das profundas alterações causadas na comunidade microbiana em decorrência da alta dose de lodo ou ainda pela permanência de formas de carbono mais recalcitrantes ainda servindo de substrato.

Os tratamentos que receberam lodo de curtume apresentaram maiores índices de diversidade (*H'*) e riqueza de consumo de substratos de carbono (*Ss*). Resultados semelhantes foram encontrados por Gomez, Ferreras e Toresani (2006) em solo sob

aplicação de resíduo sólido doméstico e Paula et al. (2010) em solo irrigado com efluente de esgoto tratado, o que pode indicar uma maior diversidade funcional da comunidade microbiana do solo. No entanto, esses índices não refletem necessariamente uma maior diversidade de organismos, uma vez que diferentes grupos podem utilizar o mesmo substrato, bem como pode ocorrer seleção de grupos específicos de microrganismos.

Os parâmetros cinéticos r e s , que descrevem o perfil metabólico da comunidade microbiana, foram relacionados com os mesmos atributos químicos (principalmente elevação do pH e aumento do teor de N mineral) que contribuíram para modificar a estrutura da comunidade microbiana, pelo perfil de PLFA, mostrando novamente que o componente químico do solo tem grande influência sobre o componente microbiológico (AON; COLANERI, 2001).

White et al. (2005) identificaram o pH como sendo um importante fator influenciando o funcionamento de comunidades microbianas de solos florestais no Canadá, afetando diretamente a sua capacidade de utilização dos substratos. Diferenças na estrutura de comunidades relacionadas ao pH podem resultar em diferenças no perfil de utilização de substratos de C pelas comunidades microbianas (ANDERSON; JOERGENSEN, 1997). Segundo Paula et al. (2010), a adição de nitrogênio via resíduo orgânico pode ser importante para estimular a atividade microbiana e aumentar o metabolismo heterotrófico potencial da comunidade microbiana do solo.

Os resultados encontrados para o perfil metabólico da comunidade microbiana suportam as hipóteses de que os microrganismos respondem rapidamente à aplicação do lodo de curtume e que as alterações na estrutura da comunidade se refletem, também, em modificações no seu metabolismo.

4.3 Conclusões

Este estudo mostrou que a aplicação de altas doses de lodo de curtume (com baixo teor de Cr) em solo agrícola promove alterações nos atributos microbiológicos do solo, mesmo nove meses após a aplicação do resíduo, e que a comunidade microbiana

do solo que recebeu a maior dose do resíduo permanece distinta do controle. O potencial metabólico da comunidade microbiana também foi alterado, visto que o consumo de substratos de carbono foi mais intenso e acelerado na comunidade microbiana do solo que recebeu a maior dose do lodo. As alterações na estrutura da comunidade microbiana estão associadas às modificações do perfil metabólico dessa comunidade. Os efeitos nos atributos microbiológicos avaliados estão relacionados às alterações nos atributos químicos do solo, decorrentes da aplicação do lodo de curtume, especialmente à elevação do pH e do teor de N mineral no solo.

Referências

- ABAYE, D.A.; LAWLOR, K.; HIRSCH, P.R.; BROOKES, P.C. Changes in the microbial community of an arable soil caused by long-term metal contamination. **European Journal of Soil Science**, Amsterdam, v. 56, p. 93-102, 2005.
- ALCÂNTARA, M.A.K.; AQUINO NETO, V.; CAMARGO, O.A.; CANTARELLA, H. Nitrogen mineralization in soils treated with tannery sludge. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 547-555, 2007.
- ALVAREZ-BERNAL, D; CONTRERAS-RAMOS, S.M; TRUJILLO-TAPIA, N.; OLALDE-PORTUGAL, V.; FRÍAS-HERNÁNDEZ J.T.; DENDOOVEN, L. Effects of tanneries wastewater on chemical and biological soil characteristics. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 269-277, 2006.
- ANDERSON, T.H.; JOERGENSEN, R.G. Relationship between SIR and FE estimates of microbial biomass C in deciduous forest soils at different pH. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 1033-1042, 1997.
- AON, M.A.; COLANERI, A.C. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 18, p. 255-270, 2001.
- BAATH, E.; AZ-RAVINA, M.; FROSTEGARD, A.; CAMPBELL, C.D. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 238-245, 1998
- BARAJAS-ACEVES, M.; DENDOOVEN, L. Nitrogen, carbon and phosphorus mineralization in soils from semi-arid highlands of central Mexico amended with tannery sludge. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, p. 121-130, 2001.

BARAJAS-ACEVES, M.; VELÁSQUEZ-OCAMPO, R.; VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, R. Effects of Cr³⁺, Cr⁶⁺ and tannery sludge on C and N mineralization and microbial activity in semi-arid soils. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 143, p. 522-531, 2007.

BARDGETT, R.D.; HOBBS, P.J.; FROSTEGARD, A. Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 22, p. 261-264, 1996.

BAUMANN, K.; MARSCHNER, P.; SMERNIK, R.J.; BALDOCK, J.A. Residue chemistry and microbial community structure during decomposition of eucalypt, wheat and vetch residues. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1966-1975, 2009.

BENDING, G.D.; TURNER, M.K.; RAYNS, F.; MARX, M.C.; WOOD, M. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1785-1792, 2004.

BOSSIO, D.A.; GIRVAN, M.S.; VERCHOT, L.; BULLIMORE, J.; BORELLI, T.; ALBRECHT, A.; SCOW, K.M.; BALL, A.S.; PRETTY, J.N.; OSBORN, A.M. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. **Microbial Ecology**, New York, v. 49, p. 50-62, 2005.

BRADLEY, R.L.; FYLES, J.W. Growth of paper birch (*Betula papyrifera*) seedlings increases soil available C and microbial acquisition of soil nutrients. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 1565-1571, 1995.

FERREIRA, A.S.; CAMARGO, F.A.O.; TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A. Alterações de atributos químicos e biológicos de solo e rendimento de milho e soja pela utilização de resíduos de curtume e carbonífero. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 755-763, 2003.

FREY, S.D.; ELLIOTT, E.T.; PAUSTIAN, K. Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 573-585, 1999.

FROSTEGARD, A.; BAATH, E.; TUNLID, A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 723-730, 1993.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GOMEZ, E.; FERRERAS, L.; TORESANI, S. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, p. 1484-1489, 2006.

GRAHAM, J.H.; HODGE, N.C.; MORTON, J.B. Fatty acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 58-64, 1995.

IBEKWE, A.M.; KENNEDY, A.C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 151-163, 1998.

JAHNEL, M.C.; CARDOSO, E.J.B.N.; DIAS, C.T.S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 553-559, 1999.

KAMALUDEEN, S.P.B.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R.; SINGLETON, I.; JUHASZ, A.L.; HAWKE, B.G.; SETHUNATHAN, N. Microbial activity and phospholipid fatty acid pattern in long-term tannery waste-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 56, p. 302-310, 2003.

KRAY, H.K.; TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A.; GIANELLO, C.; SILVA, K.J. Tannery and coal mining waste disposal on soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2877-2882, 2008.

LINDSTRÖM, J.E.; BARRY, R.P.; BRADDOCK, J.F. Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 231-239, 1998.

MARSCHNER, P.; KANDELER, E.; MARSCHNER, B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 453-461, 2003.

MARTINES, A.M.; ANDRADE, C.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Mineralização do carbono orgânico em solos tratados com lodo de curtume. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1149-1155, 2006.

MARTINES, A.M.; NOGUEIRA, M.A.; SANTOS, C.A.; NAKATANI, A.S.; ANDRADE, C.A.; COSCIONE, A.R.; CANTARELLA, H.; SOUSA, J.P.; CARDOSO, E.J.B.N. Ammonia volatilization in soil treated with tannery sludge. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, p. 4690-4696, 2010.

NAKATANI, A.S.; MARTINES, A.M.; NOGUEIRA, M.A.; FAGOTTI, D.S.L.; OLIVEIRA, A.G.; BINI, D.; SOUSA, J.P.; CARDOSO, E.J.B.N. Changes in the genetic structure of Bacteria and microbial activity in an agricultural soil amended with tannery sludge. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 106-114, 2011.

NDAW, S.M.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; GAMA-RODRIGUES, E.F.; SALES, K.R.N.; ROSADO, A.S. Relationships between bacterial diversity, microbial biomass, and litter quality in soils under different plant covers in northern Rio de Janeiro State, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 55, p. 1089-1095, 2009.

PACHECO, J.W.F. **Curtumes**. São Paulo: CETESB, 2005. 76 p.

PAULA, A.M.; FONSECA, A.F.; CARDOSO, E.J.B.N.; MELFI, A.J. Microbial metabolic potential affected by surplus wastewater irrigation in tropical soil cultivated with Tifton 85 bermuda grass (*Cynodon dactylon* Pers. X.C. niemfuensis Vanderyst). **Water Air Soil Pollution**, Dordrecht, v. 205, p. 161-171, 2010.

PRIMER 5 for Windows. **PRIMER 5 for Windows**. [5.2.6]. 2001.

PUGLISI, E.; NICELLI, M.; CAPRI, E.; TREVISAN, M.; DEL RE, A.A.M. A soil alteration index based on phospholipid fatty acids. **Chemosphere**, Oxford, v. 61, p. 1548-1557, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: user's guide version 9.2** (software). Cary, 2008.

SULLIVAN, T.S.; STROMBERGER, M.E.; PASCHKE, M.W.; IPOLLITO, J.A. Long-term impacts of infrequent biosolids applications on chemical and microbial properties of a semi-arid rangeland soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 258-266, 2006.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M.. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V. V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo II**. Viçosa: SBCS, 2002. p. 195-276.

ZAK, D.R.; PREGITZER, K.S.; CURTIS, P.S.; HOLMES, W.E. Atmospheric CO₂ and the composition and function of soil microbial communities. **Ecological Applications**, Washington, v. 10, p. 47-59, 2000.

ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities - a quantitative approach. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

ZELLES, L. Identification of single cultured micro-organisms based on their whole-community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure. **Chemosphere**, Oxford, v. 39, p. 665-682, 1999.

ZHANG, Y.L.; DAI, J.L.; WANG, R.Q.; ZHANG, J. Effects of long-term sewage irrigation on agricultural soil microbial structural and functional characterizations in Shandong, China. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam, v. 44, p. 84-91, 2008.

ZHONG, W.H.; GU, T.; WANG, W.; ZHANG, B.; LIN, X.G.; HUANG, Q.R.; SHEN, W.S. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 326, p. 511-522, 2010.

WHITE, C.; TARDIF, J.C.; ADKINS, A.; STANIFORTH, R. Functional diversity of microbial communities in the mixed boreal plai forest of central Canada. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.37, p.1359-1372, 2005.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A aplicação de lodo de curtume ao solo altera, de forma transitória, a estrutura, a atividade e o perfil fisiológico da comunidade microbiana do solo.

Os atributos microbiológicos avaliados respondem rapidamente à aplicação do lodo de curtume. Os efeitos da aplicação do resíduo são mais acentuados logo após a aplicação do lodo de curtume e, após cerca de nove meses, estes diminuem nos tratamentos com as menores doses aplicadas ao solo, mas ainda são evidentes na maior dose.

Já nos dez primeiros dias após a aplicação do lodo de curtume as populações bacterianas diferenciam-se do controle sem lodo, alteração que também é acompanhada pelo grande estímulo à atividade microbiana. Após nove meses da aplicação ocorre uma reestruturação genética da comunidade bacteriana e concomitante queda na atividade biológica do solo.

A maioria dos atributos microbiológicos avaliados é estimulada pela aplicação do resíduo, sendo a atividade da asparaginase e urease (relacionadas ao ciclo do N) os atributos mais influenciados pela aplicação do lodo de curtume. A intensidade das alterações microbiológicas se incrementa com o aumento da dose de lodo aplicada.

O potencial metabólico da comunidade microbiana também é alterado pela aplicação de lodo, pois o consumo de substratos de carbono é mais intenso e acelerado na comunidade microbiana do solo que recebeu a maior dose do resíduo. As alterações na estrutura da comunidade microbiana estão associadas às modificações do perfil metabólico dessa comunidade.

A aplicação de lodo de curtume proporciona diminuição da densidade de esporos e queda da diversidade de espécies de FMA, assim como, alteração da composição de espécies da comunidade pelas altas doses de lodo, evidenciando pressão seletiva sobre algumas espécies de FMA. No entanto, a taxa de colonização micorrízica radicular não é afetada.

As alterações nos atributos microbiológicos são associadas às alterações nos atributos químicos do solo, decorrentes da aplicação do resíduo de curtume ao solo, principalmente ao aumento do teor de nitrogênio mineral e à elevação do pH do solo.

Em geral, a aplicação de lodo de curtume em doses equivalentes a até 1200 kg ha⁻¹ de N total alteram os atributos microbianos do solo, mas não causam efeitos negativos sobre eles; pelo contrário, mostram um efeito estimulante. O efeito estimulante sobre os atributos microbiológicos do solo é temporário, mas pode ter duração mais prolongada na dose mais elevada de lodo.

Considerações finais

A condução de experimento de campo com aplicação de doses de lodo de curtume (baixo teor de cromo) resultou em grande volume de informações a respeito dos impactos dessa prática sobre a comunidade microbiana do solo. Os resultados mostram que a avaliação dos atributos microbiológicos do solo é importante para o estudo dos impactos dessa prática e apresentam uma resposta rápida, podendo dar noção inicial dos seus efeitos no solo, trazendo informações que podem fornecer parâmetros para o monitoramento de áreas sob aplicação do resíduo, para a melhor forma de manejo do solo e para o estabelecimento de normas referentes ao uso agrícola do lodo de curtume.

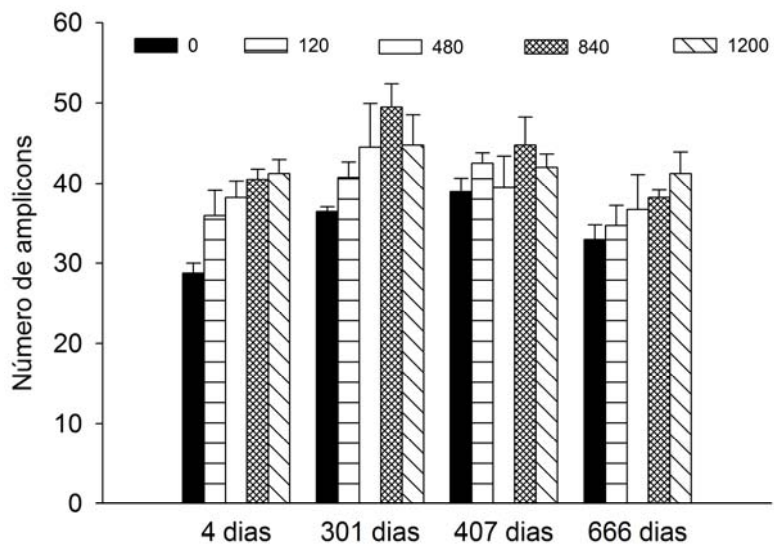
Entretanto, a aplicação de doses de lodo de curtume em solo agrícola para uma determinada cultura deve levar em consideração não só os atributos microbiológicos e químicos do solo na camada superficial, mas também o monitoramento ao longo do perfil do solo até o lençol freático, avaliando as perdas de nitrogênio por lixiviação de nitrato e volatilização de amônia, produção de gases de efeito estufa, e o excesso de sódio neste resíduo. Além disso, a dose de lodo para o maior ganho de produtividade da cultura agrícola, bem como estudos de campo em longo prazo devem ser considerados. Ou seja, todos os aspectos envolvidos nessa prática devem ser analisados em conjunto, visando à reciclagem do lodo de curtume na agricultura de forma segura e mais sustentável possível, minimizando os impactos ambientais.

O futuro em perspectiva

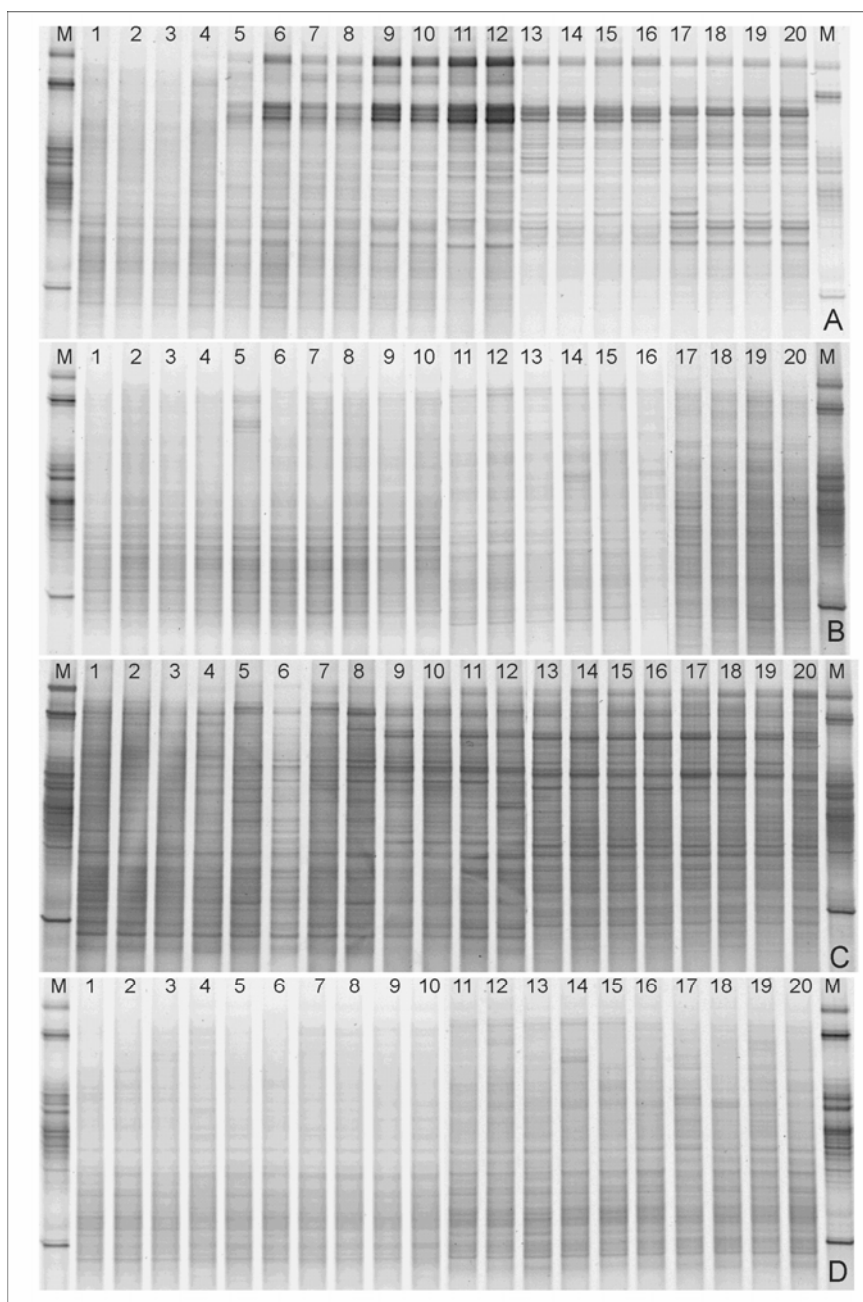
As seguintes ações virão a complementar o conhecimento adquirido durante a execução do presente trabalho e são consideradas prioritárias:

- Monitoramento de experimentos de campo de longa duração com aplicações repetidas de lodo para visualizar o comportamento dos atributos microbiológicos do solo ao longo do tempo.
- Avaliação das condições microbiológicas de áreas que apresentam um longo histórico conhecido de tipo e quantidade de lodo de curtume aplicado, como uma área de referência.
- Verificação das conseqüências de alterações observadas nos atributos microbiológicos do solo, e qual o seu significado para o sistema solo-planta-atmosfera, através do estudo de grupos funcionais ou processos microbianos específicos.
- Avaliação dos atributos microbiológicos do solo quando forem feitas aplicações de novas formas de processamento/manejo desse resíduo (como, por exemplo, compostagem, visando diminuir as perdas de N e deságüe do lodo por prensagem, centrifugação ou drenagem, visando diminuir a quantidade de água e de sódio) e a incorporação imediata do lodo após a aplicação ao solo.

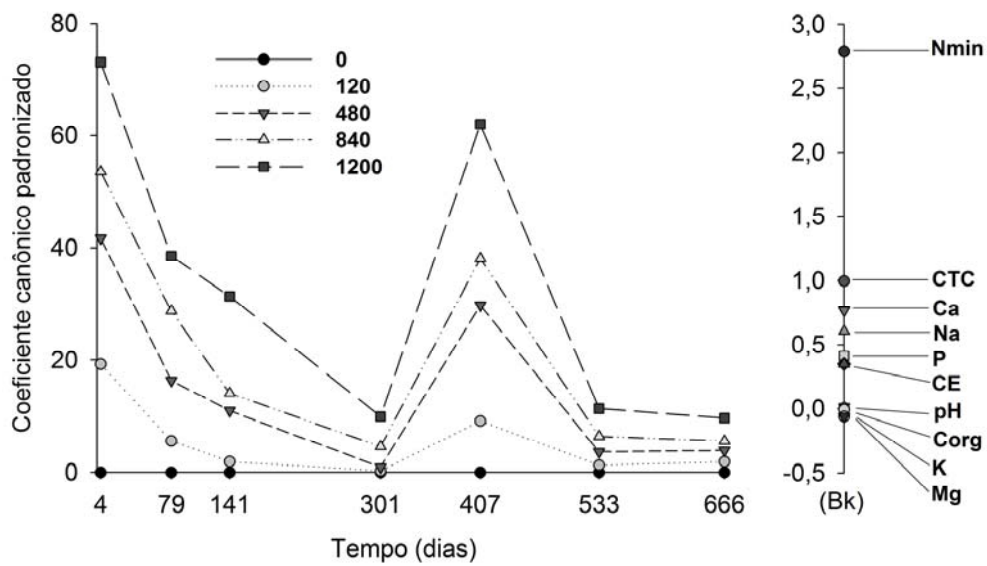
APÊNDICES



APÊNDICE A – Número de amplicons de rRNA 16S de Bacteria após DGGE, em solo após aplicação de lodo de curtume. Quatro, 301, 407 e 666 dias após o início do experimento. Zero, 120, 480, 840 e 1200 kg ha⁻¹ de N total via lodo de curtume. Barras indicam o desvio padrão ($n = 4$)



APÊNCIDE B – Perfil de amplicons de rRNA 16S de Bacteria após DGGE, em solo após aplicação de lodo de curtume. A, B, C, D; correspondem a 4, 301, 407 e 666 dias após o início do experimento, respectivamente. M, Low DNA Mass Ladder; 1 – 4, 5 – 8, 9 – 12, 13 – 16, and 17 – 20 correspondem a zero, 120, 480, 840 e 1200 kg ha⁻¹ de N total via lodo de curtume, respectivamente



APÊNDICE C – Curva de resposta principal (PRC) dos atributos químicos do solo avaliados ao longo de 22 meses (4, 79, 141, 301, 407, 533 e 666 dias após o início do experimento) em função das doses de lodo de curtume (zero, 120, 480, 840 e 1200 kg ha⁻¹ N total). (Peso dos atributos químicos medidos = Bk, Nmin = nitrogênio mineral, CTC = capacidade de troca catiônica, CE = condutividade elétrica, pH = acidez ativa, Corg = carbono orgânico, Ca, Na, P, K, Mg = nutrientes minerais)