DEGRADAÇÃO DE BIOSSÓLIDO INCORPORADO AO SOLO AVALIADA ATRAVÉS DE MEDIDAS MICROBIOLÓGICAS

PAULO FORTES NETO
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Tese apresentada à Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Outubro - 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Fortes Neto, Paulo
Degradação de biossólido incorporado ao solo avaliada através de medidas microbiológicas / Paulo Fortes Neto. - - Piracicaba, 2000.
113 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Biomassa microbiana 2. Degradação do solo 3. Lodo de esgoto 4. Microbiologia do solo 5. Microrganismo do solo 6. Mineralogia I. Titulo

CDD 631.46

AGRADECIMENTOS

À Professora Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, pelo estímulo, amizade, confiança e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais professores do Curso de Solos e Nutrição de Plantas, pelos ensinamentos transmitidos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela consessão de bolsa de estudo, sem a qual não seria posssível a realização desse Curso e à Universidade de Taubaté (UNITAU) pela oportunidade proporcionada para a realização desse curso.

À todos os colegas que compõem a equipe técnica do projeto SABESP/IPEF/ESALQ.

Aos colegas da pós-graduação: Marco, Fernando, Júlio, Adriana, Fábio Prata, Fábio Tadeu, Marchiori, Maria Izabel, Lúcia, Angela e aos demais colegas, pela convivência agradável em Piracicaba.

Em especial à Denise e o Fernando, pelo apoio, dedicação, atenção, disposição, animação e vontade, durante a realização das análises no laboratório de Microbiologia do Solo.

Ao Mauro Ricardo (Maurinho), pela disposição e amizade com que colaborou na confecção final do trabalho.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio para prosseguir estudando.

Ao seu Renato e à Erenita Terezinha, pelo apoio e colaboração para que eu pudesse ficar em Piracicaba.

À Nara, pela eterna calma, paciência, estimulo e carinho, durante a realização do trabalho.

À Isabella, por me ensinar que a vida é bela.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP, pelo oferecimento deste Curso de Pós-graduação.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS viii

LISTA DE TABELAS xii

RESUMO xv

SUMMARY xvii

1 INTRODUÇÃO 01

2 REVISÃO DE LITERATURA 04

2.1 Biossólido 04

2.2 Utilização agrícola do biossólido 05

2.3 Propriedades microbianas indicadoras de alterações no solo 08

2.3.1 Liberação de CO_2 10

2.3.2 Biomassa microbiana de carbono 13

2.3.3 Contagem de microrganismos 17

2.3.4 Mineralização do nitrogênio 19

2.3.5 Hidrólise de diacetato de fluoresceína (DAF) no solo 21

3 MATERIAL E MÉTODOS 24

3.1 Características ambientais e cobertura florestal da area experimental 24

3.2 Instalação do experimento 25

3.3 Solo 27

3.4 Biossólido 27

3.5 Aplicação dos biossólido no solo 29

3.6 Coleta e preparo de amostras 31
3.7 Variáveis avaliadas 33
3.7.1 Caracterização química do solo 33
3.7.2 Avaliação da atividade microbiana e quantificação de microrganismos do solo 34
3.7.2.1 Liberação de CO_2 34
3.7.2.2 Biomassa microbiana de carbono 35
3.7.2.3 Quociente metabólico (qCO_2) 36
3.7.2.4 Atividade microbiana celulolítica 36
3.7.2.5 Contagem de bactérias e fungos do solo 37
3.7.2.6 Quantificação de amonificadores no solo 38
3.7.2.7 Hidrólise de diacetato de fluoresceína 39
3.7.3 Variabilidade das medidas microbiológicas 40
3.7.4 Delineamento experimental 40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
4.1 Variação dos fatores ambientais 42
4.2 Composição química do solo 44
4.3 Variabilidade das medidas microbiológicas 49
4.4 Medidas microbiológicas 49
4.4.1 Liberação de CO_2 50
4.4.2 Biomassa microbiana de carbono 58
4.4.3 Quociente metabólico (qCO_2) 64
4.4.4 Atividade dos microorganismos celulolíticos no solo 67
4.4.5 Número mais provável de bactérias 71
4.4.6 Número mais provável de fungos 75
4.4.7 Microrganismos amonificadores e as transformações de nitrogênio no solo 78
4.4.8 Hidrólise de diacetato de fluoresceína 82

4.5 Resposta da microbiota do solo à adição de biossólido 83
4.6 Resposta do eucalipto à aplicação de biossólido 84
5. CONCLUSÕES 87
ANEXO 89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 92

LISTA DE FIGURAS

Página

1 Área experimental localizada no Instituto de Pesquisa Florestal (IPEF) 25

2 Unidade experimental de 1 m^2 situada entre as ruas de mudas de *Eucalyptus grandis* 26

3 Biossólido produzido pela estação de tratamento de esgoto da SABESP/Barueri - SP 27

4 Serapilheira do eucalipto sob a superfície do solo 29

5 Superfície do solo após a retirada da serapilheira 30

6 Aplicação de 60 Mg ha^{-1} de biossólido sob a superfície do solo 30

7 A superfície do solo após a incorporação de 60 Mg ha^{-1} de biossólido 31

8 Sonda de aço inoxidável utilizada na coleta de amostras de solo 32

9 Bolsa de náilon, contendo algodão em seu interior, enterradas no solo 37

10 Variação da temperatura de agosto de 1998 a abril de 1999 determinada na Estação Experimental do Instituto de Pesquisa Florestal da Universidade de São Paulo, localizado em Itatinga/SP 42

11 Variação do pH na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 45

12 Variação do teor de carbono orgânico na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 45

13 Variação da CTC na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 46

14 Variação do cálcio na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 46

15 Variação do fósforo na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 47

16 Variação do cobre na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 47

17 Variação do zinco na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 48

18 Variação do alumínio na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 48

19 Variação da liberação de CO_2 do solo entre o 1^o e 30^o dia após a aplicação de biossólido 53

20 Variação da liberação de CO_2 do solo, em períodos de 6 dias, de amostras coletadas de 30 em 30 dias durante os 240 dias após aplicação de doses de biossólido 54

21 Variação da biomassa microbiana do solo, durante os 240 dias após aplicação de doses de biossólido 63

22 Variação do quociente metabólico do solo, durante os 240 dias após aplicação de doses de biossólido 66

23 Porcentagem de degradação da celulose em solo tratado com doses de biossólido 69

24 Perda de massa seca da celulose em solo sem e com doses de biossólido 70

25 Número mais provável de bactérias x 10^{-5} g^{-1} solo determinadas na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com 60 Mg ha^{-1} de biossólido em função do tempo de coleta.....73

26 Número mais provável de bactérias x 10^{5} g^{-1} solo em parcelas sem e com 20 e 60 Mg ha^{-1} de biossólido em diferentes períodos de amostragens.....74

27 Número mais provável de fungos x 10^{4} g^{-1} solo, em solo tratado com doses de biossólido e diferentes períodos de amostragens 77

28 Número mais provável de amonificantes x 10^{3} g^{-1} solo, em solo tratado com doses de biossólido e diferentes períodos de amostragem.....81

LISTA DE TABELAS

Página

1 Composição do lodo de esgoto em base seca proveniente da estação de tratamento da SABESP de Barueri/SP 28

2 Variação da umidade determinada por metodologia gravimétrica na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido após diferentes períodos de tempo até 240 dias..... 44

3 Análise da variância das medidas microbiológicas determinadas em amostras de solo coletadas dentro de parcelas de 1 e 600 m^2 49

4 Valores médios de C-CO_2 liberado por hora em amostras de solo colhidas um dia antes e em diversos períodos após a aplicação de biossólido e incubados na presença de NaOH por seis dias consecutivos 51

5 Correlação entre as medidas microbiológicas determinadas em solo tratado com doses de biossólido..... 57

6 Correlação entre medidas microbiológicas e características químicas do solo tratado com doses de biossólido 58

7 Biomassa microbiana na camada de 0-10 cm de profundidade em solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 59

8 Variação do quociente metabólico na camada de 0-10 cm de profundidade em solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 65

9 Porcentagem de degradação da celulose na camada de 0-10 cm de profundidade em solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 68

10 Número mais provável de bactérias na camada de 0-10 cm de profundidade em solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 72

11 Número mais provável de fungos na camada de 0-10 cm de profundidade em solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 76

12 Número mais provável de amonificantes na camada de 0-10 cm de profundidade em solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 79

13 Amônio determinado na camada de 0-10 cm de profundidade em solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 81

14 Diacetato de fluoresceína hidrolisado na camada de 0-10 cm de profundidade em solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias 82

15 Quantidade de nutrientes incorporados ao solo pela adição de doses de biossólidos 86

DEGRADAÇÃO DE BIOSSÓLIDO INCORPORADO AO SOLO AVALIADA ATRAVÉS DE MEDIDAS MICROBIOLÓGICAS

Autor: PAULO FORTES NETO
Orientadora: Profa. Dra. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

RESUMO

O trabalho, com o objetivo de avaliar as alterações na atividade microbiana e na comunidade de microrganismos de um solo tratado com doses de biossólido, foi desenvolvido em condições de campo na Estação Experimental do Instituto de Pesquisa Florestal da Universidade de São Paulo, numa área com reflorestamento de eucalipto em um Latossolo Vermelho – Amarelo, localizada no município de Itatinga/SP. O lodo foi obtido na estação de tratamento de esgoto da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), em Barueri /SP. As doses correspondentes a 0, 10, 20, 40 e 60 $Mg.ha^{-1}$ de bissólidos foram aplicadas e distribuídas superficialmente na unidade experimental de $1m^2$ e, depois, incorporadas a 10 cm de profundidade no solo. Em cada unidade experimental foram coletadas 10 subamostras de solo à profundidade de 0-20 cm, antes da adição de biossólidos e, depois, de 30 em 30 dias, após a aplicação de doses de lodo, num período experimental de 240 dias. Após as amostragens no campo, os solos foram passados em peneira de malha 2 mm, retirando-se subamostras para determinação da umidade gravimétrica e análise química e microbiológica

tais como liberação de CO_2, biomassa microbiana, quociente metabólico (qCO_2), atividade celulolítica, contagem de bactérias, fungos, amonificadores, formação de NH^+_4 e hidrólise de diacetato de fluoresceína.

De acordo com os resultados obtidos, foram observadas diferenças significativas entre as doses de biossólidos e épocas de amostragem, sobre a variação das medidas microbiológicas no solo. De uma maneira geral, o impacto do biossólido sobre a atividade microbiana e os microrganismos do solo somente foi observado nas parcelas que receberam a incorporação de 40 e 60 Mg ha^{-1} de biossólido. A liberação de CO_2, biomassa microbiana, quociente metabólico, porcentagem de celulose degradada e número de bactérias e amonificantes representaram, com maior confiabilidade, a decomposição do biossólido no solo. Essas medidas microbianas foram influenciadas pela mineralização do carbono e nitrogênio, liberação de fósforo, cálcio, cobre, zinco e pela elevação no pH do solo.

Já o método de diacetato de fluoresceína hidrolisado não foi eficiente na quantificação da atividade microbiana durante a degradação do biossólido no solo, e o número de fungos foi sensível apenas durante os primeiros 120 dias.

THE USE OF MICROBIOLOGICAL MEASURES TO DETERMINE THE ALTERATIONS IN THE SOIL CAUSED BY THE APLICATION OF BIOSSOLID.

Candidate: PAULO FORTES NETO
Adviser: Profa. Dra. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

SUMMARY

This paper aims at evaluating the alterations in the microbial activity and in the micro-organisms community of a soil treated with growing doses of biossolid. The work has been carried out in field conditions at the Experimental Station of the Forest Research Institute of the "Universidade de São Paulo" in an area of Typic Hapludox reforested with *Eucalyptus grandis* located in the township of Itatinga, S.P. The biossolid has been produced in the treatment station of the Basic Sanitation Company of São Paulo State (SABESP), in Barueri, S.P. The doses of biossolid corresponding to 0, 10, 20, 40 and 60 $Mg.ha^{-1}$ have been applied and distributed superficially in the experimental unity of $1m^2$ and later incorporated at 10 cm deep in the soil. In each experimental unity 10 sub-samples of soil have been collected at a depth of 0-20 cm, before the addition of biossolid, and afterwards at every 30 days after the application of growing doses of biossolid, within a 240-day experimental period. After the field sampling, the samples were sieved on a 2mm mesh sieve, when sub-samples were taken in order to determine the gravimetric moisture and the biochemical and micro-biological analyses (liberation of CO_2, microbial

such as liberation of CO_2, microbial biomass, metabolic quotient (qCO_2), cellulolytic activity, bacteria, fungi, and amnonifiers counting, formation of NH^+_4, besides hydrolysis of the fluorescein diacetate.

According to the results obtained from this study, significant differences can be seen between the doses of biossolid and the sampling time on the variations in the microbial parameters of the soil.

In general, the impact of biossolid on the microbial activity and on the soil micro-organisms was only observed in those fragments which received the incorporation of 40 and 60 Mg ha^{-1} of biossolid. The CO_2 liberation, microbial biomass, metabolic quocient, percentation of degraded cellulose, and the number of bacteria and ammonifiers represented, more reliability, the decomposition of biossod in the soil. These microbial measures were influenced by the mineralization of carbon and nitrogen, liberation of phosphorus, calcium, copper, zinc and by the elevation in the pH of the soil.

Nevertheless, the method of hydrolysis of fluorescein diacetate was not effective was not effective on the quantification of the microbial activity the biossolid degradation in the and the number of fungi was sensitive during the first 120 days.

1 INTRODUÇÃO

A rápida urbanização, a industrialização e o crescimento populacional têm provocado os mais diversos e complexos problemas na área de saneamento básico. Dentre eles destaca-se a produção diária de esgoto que, disposto em locais sem maiores cuidados sanitários, causa a poluição e a degradação do ambiente.

O processo geralmente adotado para a destinação final, na maioria dos municípios brasileiros, é o descarte do esgoto *in natura* nos corpos d'água (rios e mar). Essa forma de deposição final favorece o desenvolvimento de organismos vetores e causadores de doenças, além de contaminar o ambiente com substâncias tóxicas. Entretanto, algumas cidades do País adotam técnicas para tratar as águas servidas, provenientes de áreas residenciais, industriais e comerciais, em estações de tratamento de esgoto. Essas estações de tratamento geram um resíduo orgânico semi- sólido denominado de biossólido ou lodo de esgoto.

Na Região Metropolitana de São Paulo, a empresa de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), por meio das cinco Estações de Tratamento de Esgotos (ETE's), produz diariamente cerca de 278 Mg dia^{-1} de lodo de esgoto (base seca). Esse resíduo, depois de desidratado, é enviado para ser depositado no aterro sanitário. A disposição do biossólido em aterro sanitário vem proporcionando aumento no custo operacional da estação de tratamento, devido às despesas com o transporte e ao confinamento do biossólido em células dentro do aterro sanitário. Além dos custos, a disposição diária de biossólido reduz o tempo de vida útil do aterro sanitário. Nesse aspecto, entre as alternativas

recomendadas para desviar o biossólido do aterro sanitário, temos: incineração, utilização do biossólido na fabricação de agregados leves e tijolos para a construção civil, produção de adubos organominerais, produção de óleo combustível e reciclagem do lodo em solos agrícolas e florestais.

Devido à composição química e à presença de matéria orgânica no biossólido, a utilização agrícola e florestal é uma das alternativas de tratamento promissora, pois, além de reduzir o custo operacional da estação de tratamento de esgoto, aumenta o tempo de vida útil do aterro sanitário e melhora as condições de fertilidade do solo e nutrição de plantas.

A utilização do lodo de esgoto em solos agrícolas vem sendo pesquisada desde 1925, nos Estados Unidos, Holanda, Reino Unido e Dinamarca. No Brasil, recentes trabalhos desenvolvidos pelo Programa de Saneamento Básico do Estado do Paraná confirmam que a reciclagem agrícola do lodo é uma técnica alternativa para a disposição desse resíduo.

Em relação ao uso agrícola do lodo de esgoto, vários trabalhos realizados, tanto em condições de clima temperado, quanto de clima tropical, relatam sobre a eficiência do lodo como: condicionador físico; fornecedor de macronutrientes (N, P, Ca, Mg, e S) e micronutrientes (Zn, Fe, Cu e Mn) para o solo e a planta e agente de aumento na produtividade de culturas de grãos e forrageiras e na liberação de metais pesados no solo. Contudo, apesar de os microrganismos atuarem nos processos de decomposição da matéria orgânica e mediarem a mineralização dos nutrientes no solo, são poucos os trabalhos desenvolvidos em condições de solos tropicais e a campo, para avaliar as alterações que ocorrem na dinâmica da comunidade de microrganismos e na atividade microbiana do solo após a aplicação de lodo de esgoto.

Com base no exposto, o presente projeto teve como objetivo avaliar, durante o período de 240 dias, as alterações na atividade microbiana e na comunidade de microrganismos do solo, a partir das estimativas de liberação de

CO_2, biomassa microbiana de carbono, coeficiente metabólico, atividade microbiana celulolítica, hidrólise de diacetato de fluoresceína, contagem de bactérias, fungos e amonificadores e as transformações de nitrogênio em solos tratados com doses de lodo de esgoto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biossólido

O biossólido é um material semi-sólido e orgânico, resultante do sistema de tratamento biológico das águas residuárias provenientes das residências e estabelecimentos comerciais, agroindustriais e industriais, que pode ser utilizado com segurança na agricultura (CETESB, 1999). Estima-se que a produção anual, em países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América e alguns da União Européia, em matéria seca, é de 4, 5 x 10^6 e 5,4 x 10^6 Mg dia^{-1}, respectivamente (Miyasaka et al., 1983; Lake et al., 1984). Segundo a SABESP (1998), são produzidos diariamente, pelas cinco Estações de Tratamento de Esgotos da Região Metropolitana de São Paulo, cerca de 278 Mg (base seca) de lodo de esgoto.

Atualmente a produção é incipiente na grande maioria das cidades brasileiras, porque os esgotos gerados são lançados *in natura* nos cursos d'água; porém, a geração de lodo tenderá a aumentar em função do crescimento populacional e industrial e do aumento da conscientização em relação à necessidade da despoluição ambiental (Melo et al., 1994; Oliveira et al., 1995).

No mundo todo a destinação final do lodo, gerado nas estações de tratamento de esgotos municipais, constitui-se num sério problema. De acordo com Vicent & Critcheley (1984) a produção média diária de esgoto por habitante é de 82g em base seca. As técnicas de disposição e/ou aproveitamento do

lodo vão desde o simples descarte no mar (proibido nos EUA e Europa), descarte em aterros sanitários, incineração, uso agrícola e florestal, recuperação de áreas degradadas, fabricação de agregados leves para construção civil, tijolos, adubos organo-minerais e produção de óleo combustível (Tsutya, 1999).

2.2. Utilização agrícola do biossólido

A utilização do lodo em solos agrícolas vem sendo avaliada desde 1925, nos EUA, Holanda, Reino Unido e Dinamarca, onde cerca de 45% do lodo de esgoto são aproveitados na agricultura (Kirkham, 1982; Juarez et al. 1987). Na cidade de Nova Iorque, a produção diária, de 220 Mg de lodo de esgoto (base seca), é transformada em grânulos com diâmetros variando entre 2 e 4 mm, que depois são transportados para várias regiões dos EUA, onde são aplicados em áreas com cultivo de trigo, citros, pastagens e recuperação de áreas degradadas (Santos, 1996). No Brasil, recentes trabalhos desenvolvidos pelo Programa de Pesquisa em Saneamento Básico (PROSAB), no Estado do Paraná, confirmaram que a reciclagem agrícola do lodo é uma técnica alternativa para o tratamento do lodo, quando os teores de metais pesados e a presença de organismos patogênicos estão dentro dos limites propostos pela legislação (Fernandes et al. 1996).

Quanto à legislação, a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) publicou, em janeiro de 1999, a norma P 4.230, com o objetivo de estabelecer os procedimentos para a elaboração de projetos de utilização de biossólido em áreas agrícolas no Estado de São Paulo (CETESB,1999).

Em relação ao uso agrícola do lodo de esgoto, vários autores relatam a eficiência do lodo como condicionador físico para o solo, melhorando a porosidade e a infiltração da água e aumentando a resistência do solo contra a ação da erosão (Jorge et al., 1991; Marciano, 1999).

Quanto ao aspecto de fertilidade do solo, Berton et al. (1989) verificaram elevação no pH do solo e redução nos teores de alumínio trocável, quando doses de lodo foram adicionadas ao solo. Esse aumento no pH, decorrente da incorporação de biossólido, deve-se à alcalinidade do material, associada às reações de oxi-redução da matéria orgânica presente no solo, à na liberação de amônio proveniente da degradação de compostos nitrogenados existentes no lodo. Devido à ocorrência dessas reações no solo, o alumínio trocável é neutralizado, por meio da precipitação com os íons hidroxilas, e também complexado, pelas frações de matéria orgânica provenientes da decomposição do lodo no solo (Berton et al., 1989; Oliveira, 1995).

A adição de lodo em doses elevadas aumenta o teor de carbono orgânico do solo. Melo et al. (1994) avaliaram as frações de matéria orgânica e a CTC de um latossolo cultivado com cana-de-açúcar com adição de 4, 8, 16 e 32 Mg ha^{-1} de lodo de esgoto. Os resultados demonstraram que o lodo apenas na dose de 32 Mg ha^{-1} determinou aumento significativo no teor de carbono orgânico e na CTC do solo. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente por Terry et al. (1979), quando a adição de 90 Mg ha^{-1} de lodo duplicou o teor de carbono orgânico nos primeiros 5cm do solo e aumentou a CTC de 1 a 2 $mmolcdm^{-3}$ de solo.

À medida que o biossólido se decompõe no solo, os nutrientes são liberados para a solução do solo, de onde serão absorvidos pelas raízes, imobilizados pelos microrganismos ou lixiviados para os horizontes inferiores do solo.Vários autores verificaram que os teores de fósforo, cálcio e magnésio aumentaram proporcionalmente ao aumento das doses de biossólido adicionadas no solo e que a baixa disponibilidade de potássio trocável no solo foi conseqüência dos baixos teores desse elemento no lodo (Berton et al. 1989; Oliveira, 1995; Silva; et al., 1998). Com respeito às necessidades das culturas, vários trabalhos têm demonstrado que a adição de lodo de esgoto proporciona

aumentos na produtividade das culturas. Leslie (1970) e Mays et al. (1973) relataram que o crescimento vegetativo e a produção de grãos de várias culturas em solos tratados com lodo foram iguais ou superiores aos das mesmas plantas desenvolvidas em solos adubados com fertilizantes minerais nas doses recomendadas.

Em experimento com as culturas de soja e de arroz, Bettiol et al (1982) verificou que o biossólido na dosagem de 9 Mg ha^{-1} supriu as necessidades das culturas. Entretanto, Reddy & Dunn (1984) observaram uma elevação na produção de soja, com doses de até 120 Mg ha^{-1}, e Rappaport et al.(1988) na cultura do milho, com doses de até 210 Mg ha^{-1}. Em um sistema de produção da bracatinga com feijão e milho consorciado, Lourenço et al. (1996) concluíram que a adição de lodo favoreceu significativamente a produtividade do feijão e do milho. A aplicação de 43 Mg ha^{-1} aumentou a produtividade do feijão e, para aumentar a de milho, foi necessária a dose de 66 Mg ha^{-1}. Dessa forma, doses ao redor de 50 Mg ha^{-1} deverão aumentar a produtividade de ambas as culturas.

Trabalho realizado por Favaretto et al. (1997), com o objetivo de analisar o efeito da adubação orgânica com doses de biossólido, em sistema de preparo convencional do solo, no crescimento e na produtividade da cultura do milho verificaram que a adição de 32 Mg ha^{-1} de lodo de esgoto substituiu a adubação mineral recomendada para a cultura desse cereal.

Os principais agentes de poluição existentes no lodo são os metais pesados, devido à alta capacidade que esses elementos apresentam para se acumular no ambiente e entrar na cadeia trófica, pelo caminho: lodo, solo, planta, animal e homem (Kabata – Pendias & Pendias, 1985).

Quanto ao potencial do biossólido para liberar metais pesados para o solo e as plantas, alguns autores têm apontado que a disponibilidade desses elementos depende do pH, teor de matéria orgânica, conteúdo de argila, CTC e presença de

óxidos de ferro e alumínio no solo (Sawhney & Norvell, 1980; Logan & Chaney, 1983; Mattiazzo-Prezotto, 1994; Bertoncini & Mattiazzo 1999).

2.3. Propriedades microbianas indicadoras de alterações no solo

Os estudos referentes ao uso de propriedades microbianas para avaliar as alterações que ocorrem no solo, após a aplicação de biossólido, têm sido desenvolvidos com o objetivo principal de verificar a ação dos metais pesados, adicionados na forma de sais, sobre a comunidade e a atividade microbiana do solo. Por isso, a maioria dos trabalhos relativos à adição de lodo refere-se aos efeitos tóxicos dos metais pesados, provenientes de biossólido, sobre os grupos de microrganismos e as atividades microbianas do solo. Praticamente são raros os trabalhos realizados em solos tropicais e sob condição de campo para análise das relações das alterações químicas no solo ocasionadas pela aplicação do lodo. Porém, são muitos os trabalhos referentes à interação da microbiota do solo e os metais pesados liberados pelo lodo em solos de região de clima temperado, em experimentos realizados em condições de laboratório e de campo. Também tem sido observado que muitos desses estudos são realizados com aplicação de metais pesados na forma de sais. De acordo com Jahnel et al. (1999), doses de metais pesados que são tóxicos na forma de sais podem não ter efeito, quando ligados à matéria orgânica; mas, com o passar do tempo, a matéria orgânica vai sendo consumida e os metais pesados poderão ser liberados para a solução e provocar alterações na comunidade microbiana do solo.

A utilização de propriedades microbianas para indicar a qualidade do solo vem sendo pesquisada porque os microrganismos mantêm uma íntima relação com as propriedades químicas e físicas e também porque são responsáveis por inúmeros processos biológicos e bioquímicos do solo; por isso, são sensíveis às alterações de origens naturais e antropogênicas que ocorrem no solo. Entretanto,

apesar dessa característica dos microrganismos, há vários critérios básicos para que uma propriedade microbiana possa ser considerada como indicadora ideal para avaliar as alterações resultantes do manejo dado ao solo (Brookes, 1995; Marchiori Júnior & Melo, 1999).

De acordo com Brookes (1995), a propriedade microbiana deve apresentar as seguintes características: (1) ser mensurável de forma acurada; (2) ser testada em uma variedade de tipos e condições de solo; (3) ser sensível à ação do poluente; e (4) apresentar validade científica confiável.

As propriedades microbianas sensíveis às variações provocadas no solo pelos elementos poluidores são divididas em três grupos. O primeiro é aquele que mede a ação de toda a atividade microbiana; o segundo determina o tamanho da população microbiana de um organismo, de um grupo funcional, ou da comunidade; e o terceiro é a correlação da atividade com a comunidade microbiana predominante no solo (Brookes, 1995).

As análises microbiológicas parecem ser úteis na avaliação da qualidade do solo; porém, vários autores relataram a necessidade de se utilizarem diversas análises ao mesmo tempo, para se ter uma noção mais precisa das interferências ocasionadas no ambiente e pelos poluentes no solo (Brookes, 1995).

Nos estudos para determinar o efeito do manejo do solo sobre as atividades e a dinâmica das comunidades microbianas no solo, as análises mais utilizadas são: liberação de CO_2 pela respiração microbiana; mineralização de nitrogênio e carbono; fixação biológica de nitrogênio; atividades de enzimas; contagem de grupos microbianos e biomassa de carbono. De acordo com Brookes (1995), esses estudos fornecem dados importantes para o descarte, monitoramento e recuperação de solos poluídos com metais pesados e, para Campbell et al. (1992), essas análises microbianas são importantes como indicativos da qualidade do solo.

2.3.1. Liberação de CO_2

A respirometria é um método que determina a quantidade de carbono liberado do solo na forma de CO_2, resultante da decomposição da matéria orgânica pela comunidade microbiana quimiorganotrófica do solo. Por esse método, pode-se quantificar a quantidade de carbono que está sendo degradada no solo e também verificar se as condições climáticas e a presença de elementos poluentes, existentes na carga orgânica do lodo, estão ou não comprometendo a atividade microbiana na decomposição e na mineralização do carbono no solo.

A determinação da liberação de CO_2 é um método que, quando utilizado sob condições controladas de umidade (40-50% da capacidade de campo) e temperatura (15-25°C), pode proporcionar dados confiáveis a respeito da decomposição da carga orgânica do resíduo no solo (Jenkinson & Powlson, 1976). Entretanto, durante a aplicação do método, deve-se verificar se a emissão do CO_2 reflete as variações proporcionadas pelo ambiente (umidade e temperatura) ou de agentes poluentes, como metais pesados, sobre a comunidade microbiana do solo (Brookes, 1995). Isso porque, quando a respiração microbiana é determinada em amostras de solo coletadas no campo, essas amostras estão sob a influência das condições climáticas do momento da coleta, o que poderá proporcionar acentuadas variações nos resultados (Brookes, 1995). Estudos realizados por Cook & Graves (1987) mostram essa flutuação ou variação de ordem natural. Nesse estudo, a liberação de CO_2 no solo foi monitorada diretamente em uma área no campo durante 52 semanas (entre abril de 1977 e maio de 1978). A liberação do CO_2 foi máxima, com aproximadamente 950 μg de CO_2 cm^{-3} de solo em condição de verão, quando a temperatura foi bastante elevada; mas depois declinou para menos do que a metade deste valor, em dezembro desse mesmo ano, quando a condição climática predominante foi de inverno com baixa temperatura. A influência da variação sazonal sobre a emissão

de CO_2 do solo natural também foi observada por Burke et al. (1995); Trasar - Cepeda et al. (1998).

No Brasil, Cattelan & Vidor (1990) e Balota et al. (1998) avaliaram a atividade microbiana do solo submetido a sistemas de preparo e sucessão de cultura e verificaram que as amostras de solo coletadas no inverno apresentaram menor atividade respiratória basal que as coletadas no período de verão. Isso ocorre porque no verão a temperatura varia dentro de uma faixa considerada como adequada para a maioria dos microrganismos mesófilos que vivem no solo (Dommergues & Mangenot, 1970).

Quanto aos estudos realizados para avaliar quais as concentrações de metais pesados existentes no lodo que inibem a respiração microbiana, alguns autores têm verificado que a atividade microbiana, de uma maneira geral, não é afetada quando biossólido contendo metais pesados é adicionado ao solo. Jahnel, et al. (1999) verificaram que a adição de lodo de curtume contendo 1.142,4 mg kg^{-1} de Cr, ao invés de diminuir, estimulou a produção de CO_2 no solo. Isso, segundo o autor, ocorreu provavelmente devido à presença da matéria orgânica prontamente decomponível e ao alto teor de nutrientes existentes no lodo. Esta relação entre maior atividade biológica de CO_2 com o aumento do carbono do solo e/ou da biomassa microbiana também foi observada por Hendrix et al. (1988) e Balota et al. (1998), em amostras de solo coletadas em parcelas submetidas ao plantio direto. De acordo com Lo et al. (1992), a matéria orgânica do lodo e do solo atua na complexação de metais, reduzindo a sua disponibilidade a curto prazo e, conseqüentemente, a sua toxicidade, fornecendo, ao mesmo tempo, carbono para os microrganismos do solo. Por outro lado, a ausência de efeitos prejudiciais da aplicação de lodo contendo metais pesados a curto prazo não é garantia de que efeitos prejudiciais sobre as atividades e comunidades microbianas não venham a ocorrer posteriormente no solo (Witter et al., 1994).

Tem sido observado que a liberação de CO_2 é influenciada pela concentração e tipo de metal pesado somente quando este é adicionado ao solo na forma inorgânica. Hattori (1989, 1992) observou uma redução acentuada na taxa de liberação de CO_2 somente quando foram aplicados no solo quantidades de metais pesados semelhantes àquelas encontradas no lodo, porém sob a forma de sais minerais. Dias-Júnior et al. (1998), por outro lado, observaram que a presença de metais pesados em altas concentrações de Cu, Cd, Pb e Zn inibiram a emissão de CO_2 no solo.

Essa tendência de redução da respiração microbiana ocorre porque os metais pesados livres são rapidamente dissolvidos na solução do solo e ficam disponíveis para serem absorvidos pelos microrganismos, causando assim modificações na morfologia, inibição no crescimento e alterações no metabolismo dos microrganismos do solo, por meio de distúrbios funcionais, desnaturação de proteínas e destruição da integridade da membrana celular (Leita et al., 1995).

Em relação à contribuição de grupos específicos de microrganismos para a respiração de solos que receberam doses de lodo contaminado com metais pesados, diferentes resultados têm sido obtidos. Fliessbach et al. (1994) observaram que 80% da emissão de CO_2 em dois solos que receberam aplicação de biossólido foram provenientes da comunidade fúngica. Em contraposição, Hattori (1992) verificou que o aumento nas populações de fungos coincidia tanto com a redução da liberação de CO_2, quanto com a diminuição da comunidade bacteriana, demonstrando que a respiração depende, principalmente, do grau de toxicidade dos metais pesados sobre as bactérias no solo.

Dias-Júnior et al. (1998), em uma área contaminada com rejeito de mineração de processamento de Zn, verificaram que a emissão de CO_2 do solo também foi influenciada pelo pH, carbono orgânico e presença de vegetação, e não apenas pela ocorrência dos contaminantes Cu, Pb, Cd e Zn. Ainda nesse mesmo estudo, pode-se verificar que as principais características biológicas,

responsáveis pela variação do CO_2 foram o número de amonificadores e de bactérias totais, além dos teores de carbono orgânico do solo e da biomassa microbiana.

2.3.2. Biomassa microbiana de carbono

A biomassa microbiana é definida como a parte viva da matéria orgânica do solo, excluídas as raízes e a mesofauna, e desta biomassa constam apenas aqueles organismos que têm um volume menor que 5×10^{-3} micrômetros. Com poucas exceções, ela representa de 2 a 3% do carbono orgânico do solo, variando de acordo com o teor de matéria orgânica do solo. Assim, há uma relação linear aproximada entre essas duas variáveis, embora possam ser influenciada pelo pH e por características físicas e profundidade do solo (Cerri et al., 1985; Post & Beeby, 1993).

A decomposição da matéria orgânica e a ciclagem dos nutrientes são processos biológicos intermediados pela atividade da biomassa microbiana do solo. Essa atividade é sensível às variações das condições bióticas e abióticas, o que permite que o seu acompanhamento reflita possíveis modificações no solo, podendo ser considerada como uma boa indicadora das alterações resultantes do preparo, do cultivo e da aplicação de lodo no solo (Chander & Brookes, 1993; Balota et al.,1998).

A biomassa microbiana do carbono no solo pode ser determinada por meio de métodos de fumigação-incubação e fumigação-extração (Jenkinson & Powlson, 1976; Brookes & McGrath, 1984). O método de fumigação-incubação apresenta a vantagem de permitir a obtenção de resultados referentes à taxa de respiração do solo e, ao mesmo tempo, de estimar a biomassa microbiana pela diferença da emissão de CO_2 entre amostras de solo não fumigadas e fumigadas. Entretanto, esse método tem as suas limitações, tais como: não ser aplicado em

condições de solos ácidos, bem drenados ou encharcados, ou em solos de rizosfera de pastagens permanentes e em solos com adição recente de resíduos orgânicos com alta relação C/N (Jenkinson & Powlson, 1976; Ocio & Brookes, 1990). Nesse caso, o método de fumigação-extração é considerado mais confiável, porque o carbono, proveniente da comunidade microbiana morta, é determinado por extração química. Evitam-se, assim, os problemas associados ao período de incubação, tais como inibição do desenvolvimento microbiano pela acidez do solo, variação da umidade e da temperatura, imobilização de nitrogênio e desnitrificação, que interferem na liberação do CO_2 durante a incubação. Por isso, o método de fumigação-extração pode ser aplicado a uma grande variedade de solos, inclusive àqueles com baixo pH, alto teor de matéria orgânica fresca e baixo teor de umidade (Brookes & McGrath, 1984; Feigl et al., 1995).

Na determinação do carbono microbiano, via fumigação-incubação e fumigação-extração, esses métodos assumem um fator denominado de constante k, para estimar a quantidade de biomassa microbiana existente no carbono total do solo. No método de fumigação-incubação, o valor dessa constante (k_c) é determinada a partir do desenvolvimento de culturas puras de microrganismos contendo glicose marcada com ^{14}C, e da determinação do ^{14}C liberado, na forma de CO_2 por esses microrganismos, durante a incubação sob fumigação com clorofórmio (Wardle & Parkinson, 1990). Nesse caso, o fator k_c representa a proporção do carbono da biomassa microbiana morta convertido em CO_2. E no método de fumigação-extração, o fator (k_{ec}) para estimar a eficiência da extração do carbono microbiano após à fumigação é cálculado por meio de regressões entre o carbono extraído e a biomassa microbiana, determinada por outros métodos com fumigação-incubação, respiração induzida pelo substrato e carbono marcado (^{14}C) (Sparling & West, 1988; Sparling & Zhu, 1993).

Estes métodos assumem que os valores de k_c e de k_{ec} são constantes para todos os solos; porém, sabe-se que, assim como a composição da comunidade

microbiana varia em razão das condições ambientais, os solos também apresentam uma ampla variação em sua constituição física e química. Por isso, alguns autores observaram variações nos valores de k_c (0,41 a 0,50) e k_{ec} (0,13 a 0,38) (Jenkinson & Powlson, 1976; Oades & Jenkinson, 1979; Anderson & Domsch, 1978; Sparling & Zhu, 1993).

Estudos mais aprofundados apontam que as medidas de biomassa microbiana certamente têm suas limitações, para avaliar a qualidade do solo. São essencialmente medidas denominadas de "caixas pretas", porque não permitem avaliação das alterações na estrutura da comunidade microbiana, por exemplo, as mudanças que ocorrem na dinâmica das populações de fungos e bactérias no solo. No entanto, esse método, quando comparado com outros, aparentemente mais sensíveis para determinar o nível de degradação do solo, tem-se revelado muito mais preciso para indicar as mudanças iniciais no conteúdo de matéria orgânica do solo (Powlson et al., 1987; Brookes, 1995).

Em relação à ação da aplicação de lodo sobre a biomassa microbiana do solo, vários autores têm observado que as alterações que ocorrem na biomassa microbiana estão relacionadas com a concentração, tipo e forma de metais pesados liberados pela decomposição do lodo no solo. Assim, Brookes & Mc Grath (1984) e Witter, et al., (1994), avaliando o balanço de carbono no solo, verificaram que o tratamento com biossólido, contendo metais pesados acima dos limites permitidos pela União Européia, proporcionou uma redução na biomassa do solo. Dodson et al., (1997) observaram, em um latossolo roxo tratado com biossólido contendo doses de crômio, que a biomassa microbiana foi afetada pela adição de lodo contendo concentração de 100 mg kg^{-1} de crômio. Por outro lado, Jahnel et al.,(1999), aplicando doses de lodo de curtume contendo concentrações de crômio acima de 100mg kg-^{1}, verificaram que a biomassa microbiana não foi inibida pela presença do crômio no resíduo. Isso pode também ter ocorrido porque o pH do solo variou entre 6 e 8 e, nessa faixa de pH, o Cr (VI) encontra-se

insolúvel; por isso, a inibição observada na biomassa microbiana foi atribuída apenas à diminuição da disponibilidade de carbono para os microrganismos do solo (Bartlett & Kimble, 1976).

Quanto ao tempo para avaliar a ação dos metais pesados, liberados pela mineralização do lodo, sobre a biomassa microbiana, Fliessbach et al. (1994) e Chander et al. (1995) observaram que a adição de doses de lodo contendo metais pesados favoreceu o crescimento da biomassa durante quatro semanas após a aplicação do lodo, independentemente do teor de metais pesados existente no lodo. Porém, depois de 64 semanas, foi verificado que a biomassa microbiana diminuiu no solo que recebeu a aplicação de lodo com teores mais elevados de metais pesados e que aumentou no solo que recebeu a incorporação de lodo com baixos teores desses elementos. Provavelmente, a inibição da biomassa microbiana do solo com lodo em concentrações mais elevadas de metais pesados ocorreu porque os complexos orgânicos contendo os metais foram desestabilizados, quando o carbono dos agentes ligantes foi consumido pelos microrganismos e os metais foram liberados para a solução e absorvidos pela microbiota do sol.

Dessa forma, nota-se que as alterações proporcionadas na dinâmica da biomassa microbiana, pela adição de lodo no solo, ocorrem também devido à variação do pH e à decomposição da matéria orgânica. A esse respeito, são poucos os trabalhos realizados para analisar o efeito da mudança de características químicas do solo ocasionada pela incorporação do lodo à biomassa microbiana. Porém, em relação aos tipos de manejo do solo, vários estudos têm verificado que a biomassa microbiana é favorecida por práticas que modificam os teores de N, Ca, Mg, K, P, pH, CTC e carbono orgânico e que melhoram a agregação das partículas do solo (Saffigna et al., 1989; Insam et al., 1991; Balota et al., 1998).

2.3.3. Contagem de microrganismos

Mudanças nas propriedades microbiológicas causadas pelo manejo, e aplicação de lodo no solo, podem ser detectadas diretamente nos microrganismos, através da sua contagem em vez da determinar sua atividade. Isto porque as alterações no solo, proporcionadas pela adição de lodo, poderão ocorrer de três formas: a) produzindo ação tóxica direta sobre o crescimento, a morfologia e/ou o metabolismo dos microrganismos; b) por meio de distúrbios funcionais, desnaturação de proteínas e destruição da integridade de membranas celulares, alterando as condições físicas e químicas do ambiente e c) diminuindo a disponibilidade de substratos energéticos essenciais ao desenvolvimento dos microrganismos (Brookes & McGrath, 1984; Brookes, 1995).

A contagem de microrganismos no solo é uma medida que poderá ser obtida diretamente por microscopia ou estimada por métodos indiretos, quando os propágulos existentes na amostra são capazes de formar colônias. Em todos os procedimentos de isolamento, os microrganismos são coletados em condições naturais e colocados em condições artificiais. Dessa maneira, qualquer que seja o método empregado, haverá seleção dos microrganismos, seja pelo meio de cultura utilizado, seja pelas condições ambientais do cultivo. Geralmente, a contagem de microrganismos no solo é realizada pela técnica de diluição e plaqueamento em meio de cultura simples. Esse procedimento tende a diminuir a diversidade de espécies de microrganismos que ocorrem naturalmente no solo, pois promove o favorecimento do crescimento de um pequeno grupo de espécies com rápido metabolismo e adaptadas a sobreviver em solo relativamente deficiente em nutrientes (Brookes & McGrath, 1984; Jahnel et al., 1999).

Estudos efetuados por Jahnel et al. (1999), para avaliar a eficiência dos métodos de quantificação de microrganismos em amostras de solo, revelaram que a metodologia do plaqueamento em gotas foi igualmente sensível para avaliar as

alterações ocasionadas pela adição de matéria orgânica e metais pesados, em comunidades de bactérias e fungos no solo, apresentando as vantagens de redução de materiais, economia de reagentes e redução no tempo dedicado ao preparo das amostras.

São poucos ou raros os trabalhos que tentam avaliar a influência da mineralização dos nutrientes e da variação do pH e da CTC, após incorporação do lodo, sobre a biodiversidade microbiana. Normalmente, esses trabalhos focalizam apenas a ação seletiva de metais pesados liberados pelo lodo ou adicionados na forma de sais sobre os diferentes grupos de microrganismos do solo (Skvortsova et al., 1988; Aoyama & Itaya ,1995).

Avaliando a ação dos metais pesados provenientes do lodo de esgoto sobre os microrganismos do solo, McGrath (1994) verificou que a presença desses elementos em concentrações de 127 Zn, 37 Cu, 21 Ni, 3,4 Cd, 52 Cr e 71 Pb (mg kg^{-1}) inibiu as bactérias heterotróficas de vida livre e fixadoras de N_2 e reduziu as cianobactérias de vida livre em 50% no solo.

A utilização do biossólido como mistura no substrato para a produção de mudas e sua incorporação no solo tem inibido e reduzido a infectividade de fungos ectomicorrízicos. Bettiol et al. (1986), em um ensaio no qual os substratos foram infestados com *Pisolithus tinctorius*, verificaram que o biossólido inibiu a formação de micorrizas em todas as proporções de lodo testadas e que a inibição se acentuava com o aumento das doses de 2 a 10% (v/v). Porém, nesse trabalho, os autores observaram que a inibição foi provocada por um desequilíbrio nutricional do substrato, e não por metais pesados. Loth & Hofner (1995) observaram que a redução na colonização radicular de fungos micorrizicos arbusculares foi independente das doses de lodo e que se devia à biodisponibilidade dos metais pesados. Assim, em solo arenoso, a incorporação de uma única dose de lodo reduziu a infecção das raízes pelo fungo em 70%, para a cevada, e em 32%, para o milho. Entretanto, essa mesma dose de lodo, em um

solo argiloso, não inibiu a atividade das micorrizas, porque nesse solo os metais pesados são adsorvidos fortemente pela superfície dos minerais de argila, reduzindo, dessa forma, a disponibilidade para plantas e microrganismos (Mattiazzo- Prezotto, 1994; Dar, 1996).

Por outro lado, Jahnel (1997), avaliando a ação da adição de lodo de curtume contaminado com crômio sobre a comunidade microbiana do solo, observou que a aplicação do lodo estimulou a multiplicação de bactérias e de fungos. Verificou, ainda, que a incorporação de lodo elevou sensivelmente o pH do solo, favorecendo mais o crescimento da comunidade de bactérias do que o da de fungos. Em um trabalho similar com biossólido, Brendecke et al. (1993) não observaram a ação tóxica de metais pesados no número de bactérias no solo. Esses estudos revelam que as alterações ocasionadas pela adição de biossólido nos grupos de microrganismos do solo poderão ocorrer em razão do incremento de nutrientes, variação do pH, CTC, da umidade e do aporte de matéria orgânica, e não somente pela ação dos metais pesados liberados pelo lodo (Dennis & Fresquez, 1989; Tauk et al., 1990).

2.3.4. Mineralização do nitrogênio

O nitrogênio orgânico existente no lodo é rapidamente mineralizado, até as formas de amônio e nitrato, pelos amonificadores e nitrificadores. Por ser um processo mediado por microrganismos, qualquer elemento poluente, na composição química do lodo ou na alteração ocasionada no solo, poderá influenciar as reações de transformação do nitrogênio. Por isso, a quantificação de amonificadores e a determinação de teores de NH_4^+ e NO_3^- poderão ser utilizadas como indicadores para avaliar a degradação de compostos nitrogenados no solo.

Vários estudos têm verificado que as concentrações de nitrogênio nas formas de NH_4^+ e NO_3^- aumentam e acumulam no solo, à medida que se elevam

as doses de lodo, pois a quantidade de nitrogênio mineralizável no solo é proporcional ao conteúdo de nitrogênio total orgânico existente no lodo (Voos & Sabey, 1987; Reddy et al., 1987; Parker & Sommers, 1983; Lindermam et al., 1989 e Serna & Pomares, 1991). Porém, convém ressaltar que a utilização da determinação dos teores de NH_4^+ e NO_3^- no solo poderá não refletir com precisão a real transformação do nitrogênio, porque esse elemento, quando disponível na solução, poderá ser imobilizado, volatilizado, desnitrificado, adsorvido e fixado pelos minerais e lixiviado pelo perfil do solo, prejudicando, dessa maneira, a interpretação dos resultados (Victoria et al., 1992).

Quanto à mineralização do nitrogênio, vários trabalhos relatam a inibição dos processos de amonificação e nitrificação pelos metais pesados liberados pelo lodo. Assim, Wilson (1977), investigando a nitrificação em solos tratados com biossólido doméstico e industrial, concluiu que a atividade dos microrganismos nitrificadores foram inibidas pelos altos teores de Cd, Pb e Zn existentes no lodo. Recentemente, trabalhos realizados por Ortiz & Acaniz (1993) e Chander et al. (1995), utilizando biossólido com concentração de zinco, cobre e cádmio duas vezes superior ao limite estabelecido pela legislação americana, constataram que a presença desses metais pesados inibiu a ação dos microrganismos na mineralização do nitrogênio no solo. Em um trabalho similar, com esterco, composto urbano e biossólido enriquecido com zinco, cobre e cádmio, Hassen et al. (1998) observaram que elevadas concentrações desses metais inibiram a amonificação e nitrificação e que baixas concentrações favoreceram a imobilização do nitrogênio no solo.

Cintra et al. (1997), trabalhando com biossólido contendo 100, 300, 900 e 2.700 mg kg^{-1} de crômio, observaram que os amonificadores foram prejudicados e que os nitratadores foram estimulados com as doses aplicadas de Cr no solo. Porém, Jahnel et al.,(1999) realizando um estudo com a adição de lodo de curtume contendo concentrações acima de 100 mg kg^{-1} de crômio, verificaram

um aumento significativo no número de microrganismos amonificantes, sem que ocorresse aparente efeito inibitório, em razão da presença de compostos potencialmente tóxicos no lodo.

Há consenso geral de que os efeitos dos metais pesados na mineralização de nitrogênio são difíceis de serem avaliados. As dificuldades são: falta de padronização dos procedimentos experimentais e variação nas propriedades do solo, que podem alterar a toxicidade absoluta ou relativa do metal e, também, porque existe um grande número de microrganismos capazes de mineralizar os compostos nitrogenados (Tyler, 1981; Baath, 1989). De forma semelhante, Duxbury (1985) concluiu que a informação sobre a ação dos agentes poluentes nestes processos é conflitante, e recomenda cautela na avaliação. Isso porque, segundo Rother et al. (1982), o processo de adaptação aos metais pesados e a seleção de estirpes resistentes podem ocorrer em prazo tão curto quanto o período de exposição dos microrganismos do solo ao lodo.

Quanto à influência da variação do pH no processo de mineralização do nitrogênio no solo, estudo realizado por Sarathchandra (1978) verificou que a taxa de nitrificação aumentou com a elevação do pH até 7,5 e que diminuiu, quando o pH do solo baixou para 4,3. Diez et al. (1992) observaram que a mineralização do nitrogênio foi mais eficiente quando o pH do solo se encontrava dentro da faixa de neutralidade, porque, nessa situação, os cátions básicos ficam disponíveis para os microrganismos, facilitando dessa forma as reações em questão.

2.3.5. Hidrólise de diacetato de fluoresceína (DAF) no solo

A atividade microbiana do solo poderá ser determinada pela avaliação de atividades de enzimas específicas ou pelo estudo das taxas de transformações de substratos adicionados ao solo. Nesse sentido, a hidrólise de diacetato de

fluoresceína (DAF) é um método que tem como princípio determinar a atividade enzimática no solo a partir de derivados de fluoresceína hidrolisados pelas enzimas lipases, esterases e, parcialmente, por proteases de células vivas. Por esse motivo, tem sido usado para avaliar a atividade microbiana do solo. A fluoresceína permanece na célula, causando fluorescência intracelular, que pode ser visualizada por microscopia de fluorescência ou quantificada por fluorometria ou espectrofotometria (Chen et al., 1988; Boehm & Hoitink, 1992).

A técnica da hidrólise de DAF, para avaliar a atividade dos microrganismos no solo, foi utilizada por Swisher & Carroll (1980), para determinar a atividade da biomassa microbiana em serapilheira de floresta de coníferas. A relação entre taxa de DAF hidrolisado e números de microrganismos decompositores de matéria orgânica foi verificada também por Schurer & Rosswall (1982), em amostras coletadas em diferentes profundidades do solo. Chen et al. (1988), realizando um estudo para avaliar a supressividade do substrato produzido a partir da compostagem de casca de madeira para *Pythium ultimum*, observaram que a atividade microbiana determinada pela hidrólise de DAF foi mais elevada nas amostras coletadas no interior das pilhas e menor nas coletadas na superfície das pilhas de compostagem. A esse respeito, Mandelbaum & Hadar (1990) e Boehm & Hoitink (1992) verificaram que a atividade da hidrólise de DAF está intimamente relacionada com o fornecimento de carbono e disponibilidade de nitrogênio no ambiente. Zablotowicz et al. (1998) observaram que a hidrólise de DAF foi influenciada, na camada superficial do solo, pelo aumento da densidade microbiana, proporcionado pela decomposição dos restos culturais de soja. Já Mandelbaum & Hadar (1990) relataram que um aumento na densidade de fungos e bactérias muitas vezes não corresponde a uma elevação na taxa de atividade da hidrólise de DAF.

Trabalho realizado por Ghini et al. (1998) demonstrou que a hidrólise de DAF está intimamente relacionada ao teor de matéria orgânica e à respiração

microbiana do solo, isto porque a matéria orgânica é o principal fornecedor de energia e nutrientes para a atividade dos microrganismos do solo.

O método de hidrólise de DAF, apesar de apresentar um excelente potencial para ser utilizado como indicador das alterações que ocorrem no solo, após a incorporação de resíduos orgânicos, apresenta algumas limitações, como: possível hidrólise de DAF por enzimas extracelulares, diferenças entre os organismos quanto ao tempo de absorção do DAF, adsorção do DAF pela matéria orgânica e partículas do solo (Schurer & Rosswall, 1982; Stotzky & Bollag, 1990).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em condições de campo, numa área localizada na Estação Experimental do Instituto de Pesquisa Florestal (IPEF), da Universidade de São Paulo (USP), no município de Itatinga – SP. (Figura 1).

As análises química e microbiológica do solo foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, em Piracicaba - SP.

3.1. Características ambientais e cobertura florestal da área experimental

O clima da região é do tipo Cwa, segundo a classificação de KÖPPEN, ou seja, mesotérmico de inverno seco, em que a temperatura média do mês mais frio (julho) é inferior a 18°C, e a do mês mais quente (janeiro), superior a 22°C. O total de chuvas no mês mais seco não ultrapassa 30mm. A precipitação média anual é de aproximadamente 1.300mm. O tipo de solo ocorrente na área experimental é caracterizado como pertencente à classe dos Latossolos Vermelho-Amarelos, textura média, distrófico. O cerrado é a vegetação natural predominante na região. Tais condições edafoclimáticas e florísticas são representativas de extensos blocos de florestas homogêneas do Planalto Paulista.

Figura 1 - Área experimental localizada no Instituto de Pesquisa Florestal (IPEF)

3.2. Instalação do experimento

A área experimental, constituída de 20 parcelas de 600m^2, encontrava-se em um terreno anteriormente ocupado por uma plantação de *Eucalyptus grandis*,

por um período de sete anos. Após o corte raso dessa vegetação, foi implantada uma nova floresta de árvores de *Eucalyptus grandis*.

As unidades experimentais, com $1m^2$ de área, foram implantadas seis meses após o plantio das mudas, nas ruas existentes entre as plantas de eucalipto plantadas dentro de uma área de $600m^2$ (Figura 2).

As unidades experimentais foram distribuídas em um delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro blocos e cinco tratamentos (sem adição de lodo e com lodo nas doses de 10, 20, 40 e 60 Mg ha^{-1}), perfazendo, assim, um total de 20 unidades experimentais implantadas dentro de uma área experimental de $12.000m^2$.

Figura 2 - Unidade experimental de $1m^2$ situada entre as ruas de mudas de *Eucalyptus grandis*

3.3. Solo

Amostras de solo foram coletadas na camada de 0-10 cm de profundidade, na área de reflorestamento com *Eucalyptus grandis*, com a seguinte caracterização química: M.O =23,6 g dm^3, P=3,0; $S\text{-}SO_4$= 9,3; Cu = 0,6; Zn = 0,4; Mn = 1,3 mg dm^3, K^+=0,4; Ca^{+2}=2,0; Mg^{+2}=1,0; Al^{+3}= 14,3; SB=4,0; T=95,2 $mmol_c dm^3$, V = 3% e pH ($CaCl_2$) = 3,8.

3.4. Biossólido

O biossólido utilizado foi obtido da digestão anaeróbia do esgoto, na estação de tratamento da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), no município de Barueri (SP), localizado na Grande São Paulo (Figura 3).

Figura 3 - Biossólido produzido pela estação de tratamento de esgoto da SABESP/Barueri - SP

Para realizar a caracterização química (Tabela 1), amostras de lodo foram coletadas e submetidas ao secamento em estufa regulada a 60°C $^{+}_{-}$ 2, com ventilação forçada até peso constante, trituradas, homogeneizadas e passadas em peneira com malha de 2mm.

Tabela 1. Composição do lodo de esgoto em base seca proveniente da estação de tratamento da SABESP de Barueri-SP

Parâmetros avaliados	Valor
pH $CaCl_2$ (0,01M)	10,6
Umidade 65° C (g kg^{-1})	628,60
Nitrogênio (g kg^{-1})	18,66
Fósforo (g kg^{-1})	9,40
Potássio (g kg^{-1})	1,96
Carbono orgânico (g kg^{-1})	172,26
Cálcio (g kg^{-1})	86,40
Magnésio (g kg^{-1})	3,80
Sódio (g kg^{-1})	0,58
Matéria orgânica no material original (g kg^{-1})	116,17
Matéria orgânica no material seco (g kg^{-1})	312,79
Cádmio (mg kg^{-1})	traços
Cobre (mg kg^{-1})	900,00
Crômio (mg kg^{-1})	268,00
Ferro (mg kg^{-1})	55056,00
Níquel (mg kg^{-1})	222,00
Zinco (mg kg^{-1})	1632,00

3.5. Aplicação do biossólido no solo

O biossólido foi seco ao ar até peso constante, moído e peneirado em malha de 0,5cm. Depois de homogeneizado, o material foi pesado e colocado em sacos plásticos nas quantidades de 1, 2, 4 e 6 kg, correspondentes aos tratamentos de 10, 20, 40 e 60 $Mgha^{-1}$ de biossólido (base seca). Antes da aplicação do lodo, efetuou-se a retirada da serapilheira acumulada na superfície do solo, para facilitar a distribuição e homogeneizar a mistura de lodo com o solo (Figuras 4 e 5).

O lodo foi aplicado e distribuído superficialmente dentro de $1m^2$ e, posteriormente, com o auxílio de uma pequena enxada, incorporado até a 10cm de profundidade (Figuras, 6 e 7).

Figura 4 - Serapilheira de eucalipto sob a superfície do solo

Figura 5 - Superfície do solo após a reitrada da serapilheira

Figura 6 - Aplicação de 60 Mg ha^{-1} de biossólido sob a superfície do solo

Figura 7 - A superfície do solo após a incorporação de 60 Mg ha^{-1} de biossólido

3.6. Coleta e preparo de amostras

As amostras de terra foram coletadas aleatoriamente em cada unidade experimental, com o auxílio de uma sonda de aço inoxidável introduzida até a camada de 10cm de profundidade (Figura 8).

As amostras compostas de cada tratamento foram constituídas da coleta e da homogeneização de 10 subamostras. Após a homogeneização das amostras de solo, elas foram acondicionadas em sacos plásticos de 0,2L e mantidas sob baixas temperaturas, (15°C) durante o tempo de transporte até o laboratório.

As amostras de terra foram coletadas em todas as unidades experimentais, antes da incorporação das doses de lodo, 15 dias após a aplicação do lodo e,

depois, periodicamente, de 30 em 30 dias, durante o período compreendido entre os dias 19 de agosto de 1998 e 19 de abril de 1999.

Figura 8 - Sonda de aço inoxidável utilizada na coleta de amostras de solo

As determinações microbiológicas, a extração para a determinação das formas de nitrogênio no solo e a aferição da umidade do solo foram realizadas 24 horas após a coleta das amostras de terra no campo, e o restante das amostras foi armazenado sob refrigeração em câmara fria à temperatura de 2° C.

Antes de serem realizadas as determinações das medidas microbiológicas, efetuou-se o peneiramento das amostras de terra em peneira com abertura de 2mm de malha.

3.7. Variáveis avaliadas

3.7.1. Caracterização química do solo

As formas de nitrogênio no solo foram determinadas em amostras de terra coletadas mensalmente durante o desenvolvimento do experimento no campo; outras características químicas do solo foram determinadas em amostras de terra coletadas de quatro em quatro meses na camada de 0-10cm de profundidade do solo.

A determinação de $N\text{-}NH_4^+$ foi realizada a partir da extração do nitrogênio do solo com a adição de 40mL de KCl (2N) em 4g de solo. A mistura foi submetida à agitação por uma hora e, depois de filtrada, alíquotas dos extratos foram utilizadas para determinar, através da condutividade elétrica da solução, a concentração de $N\text{-}NH_4^+$, pelo método analítico Sistema de Análise por Injeção em Fluxo-FIA (Bremner, 1965; Ruzicka & Hansen, 1975).

As determinações de pH, carbono orgânico, fósforo disponível, cálcio, magnésio, potássio, alumínio trocável, capacidade de troca de cátions e saturação por bases foram realizadas segundo Raij et al. (1987).

Na análise para a determinação das concentrações de Cu, Mn e Zn, pesaram-se 20g de terra em frascos cônicos de polietileno e adicionaram-se 40mL da solução extratora (DTPA 0,005 mol L^{-1} + trietanolamina 0,1 mol L^{-1} + cloreto de cálcio 0,01 mol L^{-1}, corrigidos a pH 7,3). Depois, efetuou-se, por duas horas, em uma velocidade de 240 rpm, a agitação do frasco contendo a mistura. Após a agitação, a mistura foi filtrada, e a determinação das concentrações totais de Cu, Mn e Zn no filtrado foram realizadas por espectrometria de absorção atômica (Lindsay & Novell, 1978).

3.7.2. Avaliação da atividade microbiana e quantificação de microrganismos do solo

A atividade da comunidade microbiana e o número de fungos, bactérias e amonificantes do solo foram determinados em amostras de terra coletadas mensalmente, na camada situada entre 0-10cm de profundidade solo, dentro das unidades experimentais de $1m^2$, utilizadas para detectar as variações físicas, químicas e sazonais de solos que receberam doses de lodo.

A atividade da comunidade microbiana e a quantificação de grupos de microrganismos, responsáveis pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes no solo, após a adição de doses de lodo, foram avaliadas por meio das determinações das seguintes medidas microbiológicas: liberação de CO_2; biomassa de carbono; quociente metabólico; atividade microbiana celulolítica; quantificação do número total de microrganismos (bactérias totais e fungos totais e amonificadores) e hidrólise de diacetato de fluoresceína no solo.

3.7.2.1. A liberação de CO_2

A atividade microbiana determinada pela emissão de CO_2 do solo foi realizada por meio da adição de 50g de terra peneirada e com umidade ajustada a 80% da capacidade de campo, dentro de um jarro de vidro fechado hermeticamente, contendo, em seu interior, um cadinho de vidro com 10mL de NaOH (0,5N).

Os jarros de vidro, depois de fechados, foram levados para a incubação em uma sala climatizada à temperatura de $28^oC \pm 2$, por um período de sete dias. Em intervalos de dois dias foram realizadas as determinações do CO_2 despreendido pelas amostras de terra e que foi capturado pelo hidróxido de sódio contido nos cadinhos de vidro.

Aos cadinhos contendo o hidróxido de sódio foram adicionados 1mL de $BaCl_2$ (50%) e três gotas do indicador fenolftaleína (3%) e, depois, foi efetuada a titulação com HCl (0,5N), para determinar as concentrações em mg CO_2 g^{-1} de solo (Stotzky, 1965).

O valor médio de CO_2 liberado do solo em cada período de coleta foi o resultado do somatório da quantidade de CO_2 determinado durante 6 dias de incubação das amostras de solo.

3.7.2.2. Biomassa microbiana de carbono

A determinação da biomassa de carbono no solo foi realizada usando-se o método de fumigação e extração de amostras de terra (Vance et al., 1987). Para isso, duas subamostras de 10g de terra por tratamento foram preparadas e uma subamostra foi submetida à fumigação com clorofórmio em um dessecador fechado a vácuo, por um período de 24 horas. A outra subamostra, não fumigada, foi armazenada por 24 horas na câmara fria. Após 24 horas, as subamostras fumigada e não fumigada foram retiradas do dessecador e da câmara fria. A elas foram adicionados 40mL de K_2SO_4 (0,5 M), e foram colocadas por uma hora em um agitador contínuo. Depois de agitadas, as subamostras foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 42; 10mL do filtrado das subamostras fumigada e não fumigada foram retiradas, para a determinação da biomassa de carbono.

As subamostras fumigada e não fumigada foram adicionados 1mL de $K_2Cr_2O_7$ (0,4 N) e mais 10mL de uma mistura de H_2SO_4 e H_3PO_4 concentrados; depois foram colocadas em banho-maria por uma hora, à temperatura de 60° C $^{+}_{-}$ 2. Após uma hora, as subamostras foram retiradas e, depois de resfriadas, acrescentaram-se-lhes 10mL de água destilada.

A determinação do carbono foi feita por titulação das subamostras contendo uma gota de fenantrolina com $Fe(NH_4)(SO_4)$, e o cálculo da biomassa

microbiana do carbono foi efetuado através da subtração dos valores de carbono da amostra fumigada e não fumigada e a diferença dividido pelo fator (k_{EC}) igual a 0,33.

3.7.2.3. Quociente metabólico (qCO_2)

O quociente metabólico é uma medida derivada das estimativas de carbono liberado na forma de CO_2 e do carbono fixado pela biomassa microbiana do solo. A obtenção dos dados foi realizada pela divisão da respiração basal pelo carbono da biomassa microbiana (Balota et al., 1998).

3.7.2.4. Atividade microbiana celulolítica

Para se estimar a atividade dos microrganismos celulolíticos do solo, bolsas de náilon com telas de malhas de 0,1mm contendo 0,5g de algodão hidrófilo foram enterradas nas camadas de 0-10cm de profundidade do solo e, posteriormente, retiradas nos períodos de 60, 90, 120 e 150 dias após a aplicação do lodo no solo, para avaliação do consumo de celulose (Figura 9).

A determinação da atividade foi realizada por meio da retirada do algodão da bolsa, lavando-o em água corrente. Depois de acondicionado em placa de Petri, foi colocado dentro de estufa com ventilação forçada, à temperatura de 60^{o} C $^{+}$.2, por um período de 48 horas. Após esse período, a amostra de algodão foi pesada, e a determinação da taxa de degradação da celulose foi calculada através da diferença de peso entre o valor inicial determinado antes de enterrar o algodão e o valor final determinado em cada período de retirada do algodão do solo (Santos & Grisi, 1979).

Figura 9 - Bolsa de náilon, contendo algodão em seu interior, enterradas no solo.

3.7.2.5. Contagem de bactérias e fungos do solo

A contagem de bactérias e fungos no solo foi determinada pelo Número Mais Provável (NMP) de microrganismos do solo, utilizando a técnica de plaqueamento em gotas de meio de cultura agarizado sobre placa de Petri (Jahnel et al.,1999).

As diluições para determinar a contagem de bactérias e fungos foram realizadas em uma suspensão obtida a partir de 10g de terra suspensas em 90mL de solução salina a 0,85%, contidas em frascos Erlenmeyer. Os frascos foram submetidos por 10 minutos à agitação circulante e, depois, foram realizadas as diluições sucessivas até10^{-2} para fungos e até 10^{-3} para bactérias. Essas diluições foram realizadas transferindo-se, com o auxílio de uma micropipeta, alíquotas de

0,1mL dos tubos de ensaio contendo 0,9mL de meio de cultura agarizado, mantidos em banho-maria a 45°C $^{+}_{-}$ 2 até o momento do plaqueamento.

O plaqueamento do meio de cultura agarizado foi realizado em câmara de fluxo laminar, com a distribuição de gotas com volume de 0,04 mL na superfície de placas de Petri esterilizadas .As placas foram vedadas e incubadas em estufa para D.B.O (demanda bioquímica de oxigênio) à temperatura de 28°C $^{+}_{-}$ 2, por um período de 48 horas. Após o período de incubação, foi contado o número de gotas que apresentavam crescimento microbiano em cada uma das diluições e pôde-se estimar o Número Mais Provável (NMP) de microrganismos, com o auxílio de uma Tabela de probabilidade de ocorrência (Tabela de McCrady).

Para o crescimento de bactérias, o meio de cultura utilizado foi o ágar nutriente (Burnett et al., 1957), e, para os fungos, o meio de Martin, com exclusão do corante rosa bengala (Menzies, 1978).

3.7.2.6. Quantificação de amonificadores no solo

A quantificação do número de amonificadores foi realizada em amostras de terra misturadas em solução salina de NaCl (0,85%), e preparando-se a diluição10^{-1} sucessivamente até 10^{-6}. Depois, 1mL de cada diluição foi transferido para tubo de ensaio contendo meio de cultura (0,5g K_2HPO_4, 0,2g $MgSO_4 .7H_2O$, 10g NaCl, 0,2g asparagina, 1mL sol. micronutrientes e 1mL Fe EDTA), cuja única fonte de nitrogênio foi a asparagina. (Burnett et al., 1957).

Para cada diluição foram utilizados quatro tubos de ensaio com capacidade de 20mL, contendo 7mL de meio de cultura e autoclavados a 110°C $^{+}_{-}$ 2 (1atm), por um período de 20 minutos. Os tubos, depois de receberem 1 ml das suspensões de solo, foram mantidos, por 6 dias, em sala climatizada (28°C). A presença de amônia foi determinada pela formação de uma coloração marrom aveludado, quando foram adicionadas gotas do reagente de Nessler.

A determinação do Número Mais Provável (NMP) foi realizada pela contagem dos tubos que apresentaram a ocorrência de amônia, e o cálculo foi efetuado pela utilização da Tabela de probabilidade de ocorrência.

3.7.2.7 Hidrólise de diacetato de fluoresceína

A determinação da atividade microbiana pela hidrólise de diacetato de fluoresceína está baseada no princípio de estimar em espectrômetro a fluoresceína consumida após o tratamento e incubação das amostras de terra com diacetato de fluoresceína (Chen et al., 1988).

Para estimar a atividade microbiana através da hidrólise de diacetato de fluoresceína, primeiramente foi realizado o preparo da curva de calibração para o solo referente a cada tratamento. A curva de calibração foi preparada a partir de 5mL de tampão fosfato em tubos de ensaio com rosca, adicionando-se solução contendo 0, 50, 100, 150 e 200 μL de diacetato de fluoresceína. Os tubos foram tampados e colocados em banho-maria, permanecendo em ebulição por uma hora. Depois de resfriada, a solução hidrolisada de diacetato de fluoresceína foi introduzida em frascos Erlenmeyer contendo 5g de solo, aos quais se adicionaram 15mL de tampão fosfato.

Paralelamente, quatro amostras de 5g de terra por repetição foram colocadas em frascos Erlenmeyer (125mL), aos quais se adicionaram 20mL de tampão fosfato. Em seguida, foi aplicada uma solução de 200 μL de diacetato de fluoresceína, e a mistura foi incubada sob agitação a 150 rpm, a 24° C, durante 20 minutos. Após a incubação, a reação de hidrólise de diacetato de fluoresceína foi interrompida, com a adição de 20mL de acetona.

As amostras contendo o diacetato de fluoresceína hidrolisado foram filtradas e, depois, uma alíquota do filtrado foi utilizada para realizar a leitura em espectrofotômetro ajustado a 490nm.

A atividade de diacetato de fluoresceína hidrolisado foi determinada diretamente na curva em μg DAF g^{-1} solo.

3.7.3. Variabilidade das medidas microbiológicas

No estudo para avaliar a variabilidade espacial dos valores das medidas de CO_2, bactérias, fungos, amonificadores e hidrólise de DAF, em amostras de solo coletadas em parcelas de 1 e 600 m^2 de área.

Para isso foram coletadas aleatoriamente 12 amostras de solo na camada de 0-10 cm de profundidade (item 3.6.) dentro da unidade experimental tratada com 40 Mg ha^{-1} de biossólido. Após a coleta, foram determinadas, nas amostras de solo, o CO_2 liberado (item 3.7.2.1), o número total de bactérias e fungos (item 3.7.2.5), amonificadores (item 3.7.2.6) e hidrólise de DAF (item 3.7.2.7).

3.7.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro blocos e cinco tratamentos a saber: ausência de lodo, 10, 20, 40 e 60 Mg . ha^{-1}, totalizando 20 unidades experimentais.

Os resultados de liberação de CO_2, quociente metabólico, e número total de bactérias, foram transformados por ln(X); celulose degradada por arc sen (x); biomassa microbiana por inversa de raiz (x) e diacetato hidrolizado e números totais de fungos e amonificadores, por raiz (x). Depois de transformados os resultados foram submetidos à ANOVA (Teste F) e em caso de valor F calculado significativo realizou-se o teste de comparação de médias pelo teste t de Student

($P > 0,05$). Também foi realizado análise de carelação entre as medidas microbiológicas e composição química do solo e de regressão entre a composição química e medidas microbiológicas com as doses de biossólido.

Os cálculos foram efetuados através do aplicativo estatístico "SAS – System for Windows 95 – release 6.11" (SAS Institute Inc, 1996).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Variação dos fatores ambientais

A Figura 10 apresenta a variação da temperatura máxima, mínima e média, determinada no período de agosto de 1998 até abril de 1999, na Estação Experimental do Instituto de Pesquisa Florestal da Universidade de São Paulo (USP).

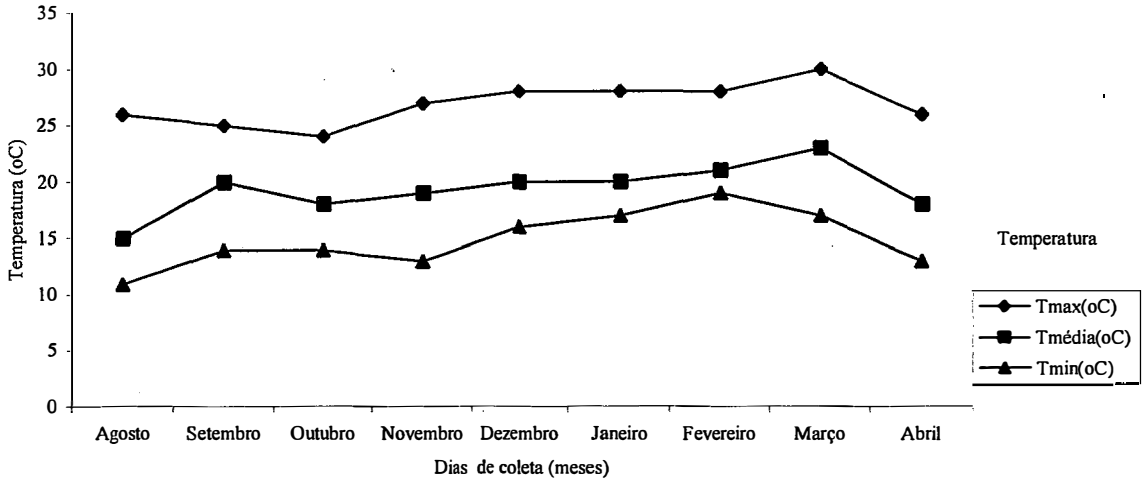

Figura 10 - Variação da temperatura de agosto de 1998 a abril de 1999 determinada na Estação Experimental do Instituto de Pesquisa Florestal da Universidade de São Paulo, localizado em Itatinga/SP

Pelos valores de temperatura mímina e máxima, observa-se que as menores temperaturas foram determinadas nos períodos de agosto a outubro e de março a abril e que as temperaturas mais elevadas ocorreram no período entre novembro e março. Porém, ao considerar a variação da temperatura média, constata-se que a diferença entre 15 e 24°C, provavelmente, não foi uma variação suficiente para influenciar a atividade microbiana do solo. Isto porque, no momento de maior atividade e crescimento microbiano, a temperatura média da área variou entre 15 e 20°C, que seria adequada para a maioria dos microrganismos do solo. Ainda, com o desenvolvimento da floresta de eucalipto, as copas e raízes dessas árvores devem ter influenciado o microclima, possivelmente deixando-o mais uniforme.

A Tabela 2 apresenta os resultados da umidade determinada através de metodologia gravimétrica em amostras de solo coletadas na camada de 0-10 cm de profundidade das parcelas sem aplicação de biossólidos e com aplicação de 10, 20, 40 e 60 Mg ha^{-1}, entre o período de agosto de 1998 e abril de 1999. Observa-se que a umidade do solo apresentou alguma variação entre os tratamentos e as épocas de amostragem; entretanto, sem grandes extremos de encharcamento ou dissecação, durante o desenvolvimento do experimento no campo.

Portanto, nas datas de coleta, presume-se que o teor de umidade não deve ter sido fator determinante da atividade microbiana no solo. Ressalta-se, porém, que pode ter havido maior desuniformidade nos períodos mensais situados entre as datas de coleta, informação da qual não se dispõe no presente trabalho.

Tabela 2. Variação da umidade determinada por metodologia gravimétrica na camada de 0 a 10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido após diferentes períodos de tempo até 240 dias

	Dias de coleta									
Biossólido (Mg ha^{-1})	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240
	(umidade gravimétrica %)									
0	11,0Aab[2]	11,0Aab	11,5Aab	13,2Aa	9,7Aab	13,0ABa	11,2Aab	12,0Ba	8,5 Ab	9,0Aab
10	12,7Aab	13,0Aab	12,7Aab	17,0Aa	8,5Ac	16,2Aa	11,0Abc	13,5Bab	7,7Ac	11,5Ac
20	12,7Aa	9,7Ab	12,2Aa	14,7Aa	9,2Ab	10,2Bab	11,5Aab	11,5Bab	9,2 Ab	8,0 Ab
40	12,7Ab	12,5Ab	12,5Ab	16,0Aa	8,7Abc	10,7Bb	9,5Abc	16,2Aa	9,5Abc	7,5Ac
60	13,5Aa	10,5Aa	13,5Aa	14,7Aa	8,5Abc	14,7Aa	9,7Abc	10,0Cb	5,7Bd	8,5Abc

[1] Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, nas colunas, e minúsculas iguais, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%

4.2 Composição química do solo

A seguir é apresentada apenas uma síntese global da composição química do solo, após a incorporação de biossólido, apenas para servir de guia ao leitor, visto que a proposta do presente trabalho restringe-se à análise das variáveis microbiológicas.

Quanto às alterações nas características químicas do solo, proporcionadas pela incorporação de doses de biossólido, observa-se, nas Figuras 11, 12, 13,14,15,16, 17 e 18, que o pH, carbono orgânico, CTC e os teores de cálcio, fósforo, cobre e zinco aumentam e que o Al^{+3} diminui significativamente no solo, após adição de biossólido. Esses resultados confirmam a observação de outros pesquisadores de que a prática de incorporação de lodo resulta na elevação do pH e na CTC, na redução do alumínio trocável e num incremento de fósforo, cálcio,

cobre e zinco (Terry et al. 1979; Berton et al., 1989, Melo et al., 1994; Mattiazzo-Prezotto, 1994; Oliveira et al., 1995; Bertoncini & Mattiazzo, 1999).

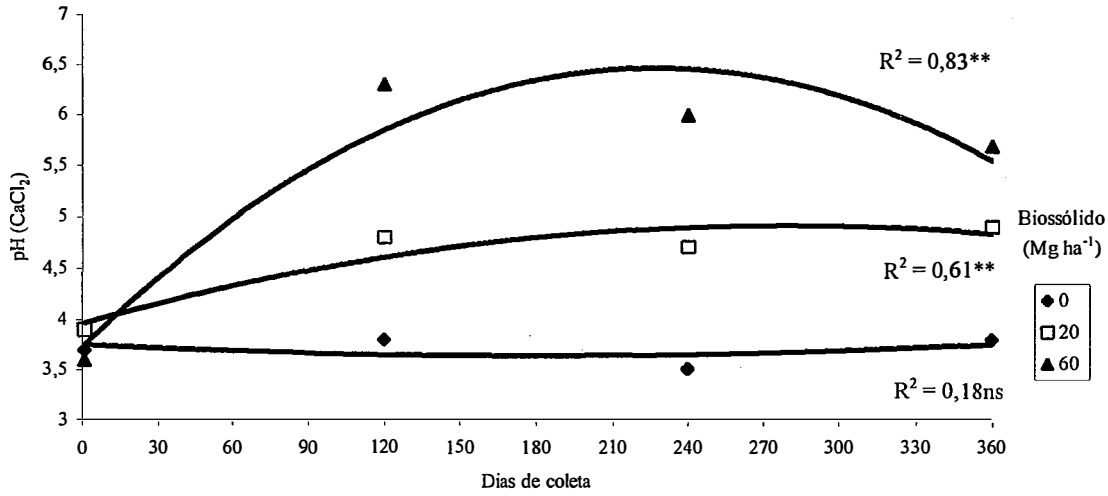

Figura 11 - Variação do pH na camada de 0 a 10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido após diferentes períodos de tempo, até 360 dias

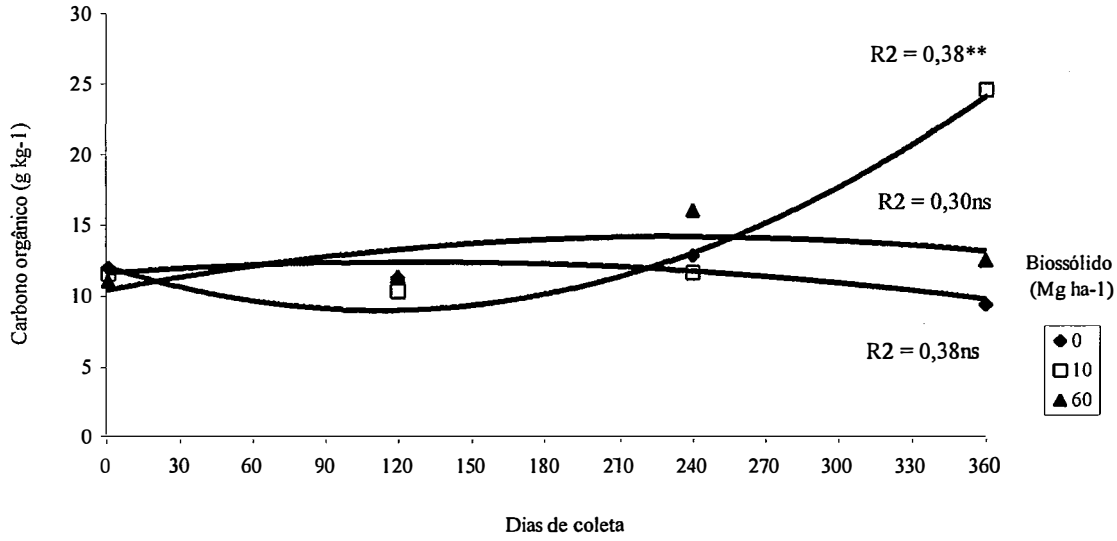

Figura 12 - Variação do teor de carbono orgânico na camada de 0 a 10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 360 dias

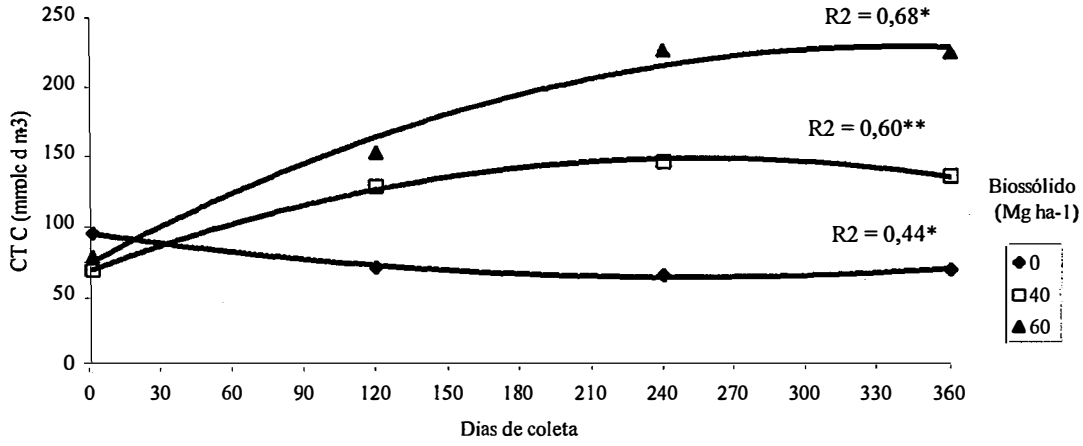

Figura 13 - Variação da CTC na camada de 0 a 10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 360 dias

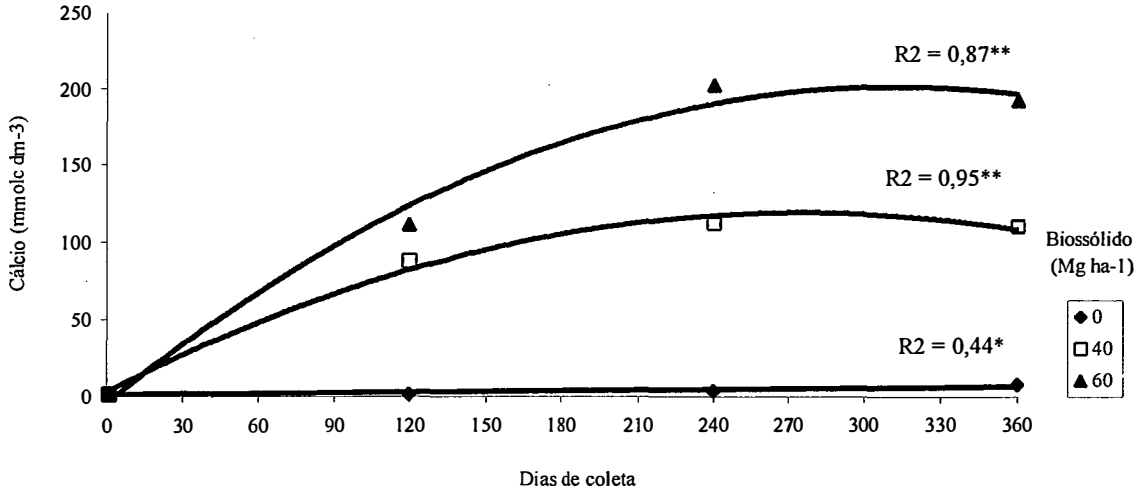

Figura 14 - Variação do cálcio na camada de 0 a 10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 360 dias

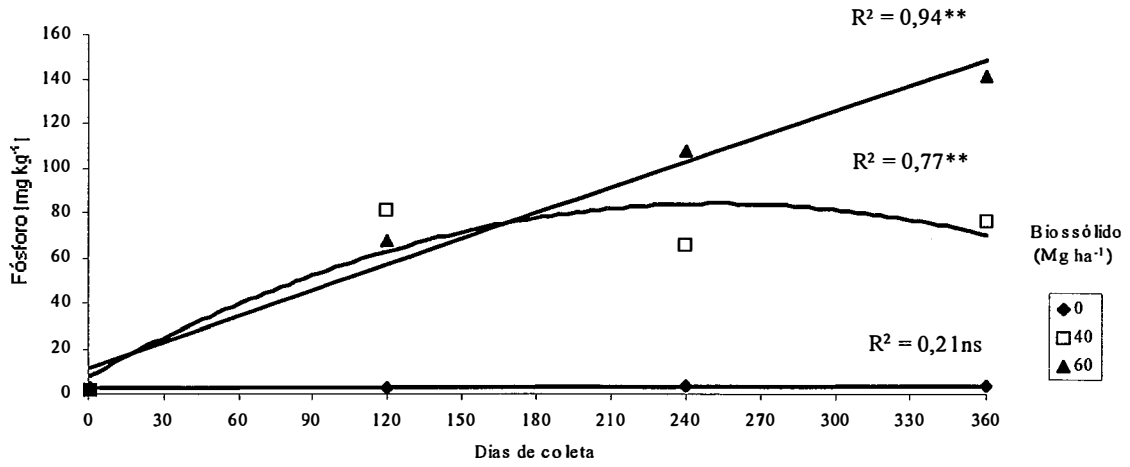

Figura 15 - Variação do fósforo na camada de 0 a 10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo até 360 dias

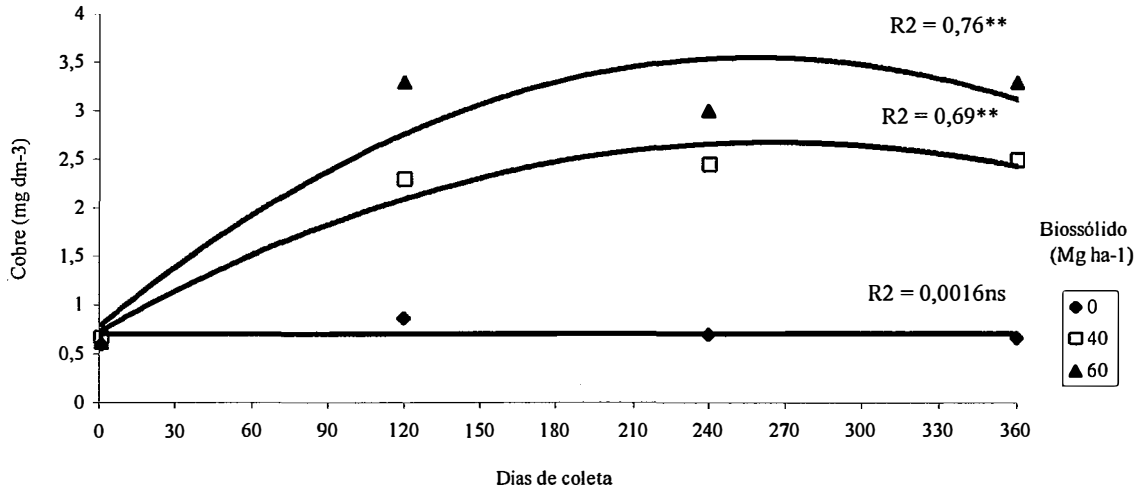

Figura 16 - Variação do cobre na camada de 0 a 10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 360 dias

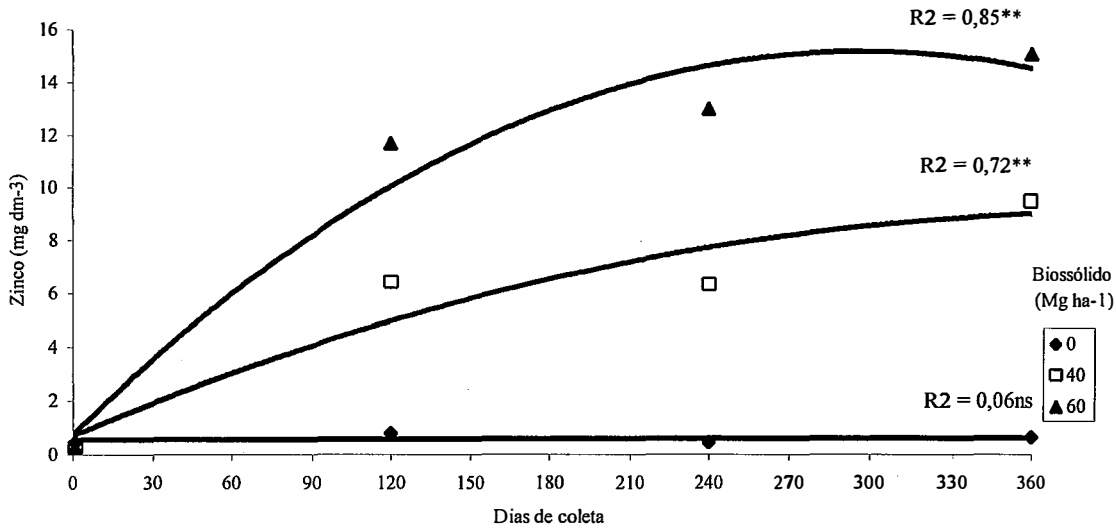

Figura 17 - Variação do zinco na camada de 0 a 10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 360 dias

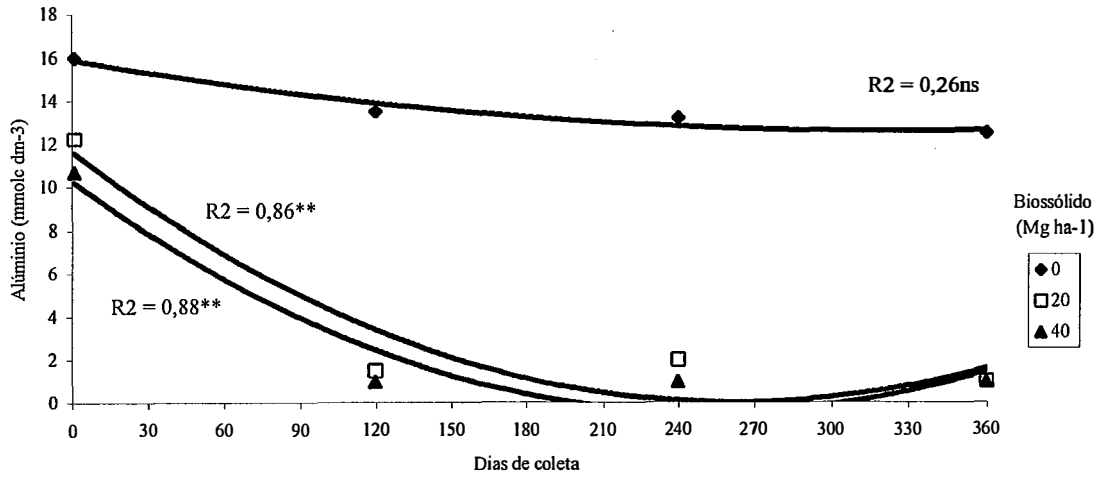

Figura 18 - Variação do alúminio na camada de 0 a 10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 360 dias

4.3 Variabilidade das medidas microbiológicas

No estudo para avaliar a variabilidade das medidas microbiológicas determinadas em amostras de solo coletadas em parcelas experimentais de $1m^2$ e $600m^2$ de área, foi constatado, quanto à dispersão dos dados, que as estimativas de liberação de CO_2, amonificadores e bactérias totais apresentaram a mesma variância, indicando que a área experimental de $1m^2$ houve menor dispersão das médias, em termos de variabilidade, para essas medidas microbiológicas (Tabela 3). Por outro lado, para os fungos e hidrólise de diacetato de fluoresceína foi observado que a variância dessas medidas em amostras de solo coletadas nas áreas de $1m^2$ e 600 m^2 foram diferentes, sugerindo que a área experimental de $1m^2$ houve maior dispersão das médias, para essas estimativas.

Tabela 3. Análise da variância das medidas microbiológicas determinadas em amostras de solo coletadas dentro de parcelas de $1m^2$ e $600m^2$.

Medidas microbiológicas	Prob > F
Liberação de CO_2	0,1508
Amonificantes	0,7268
Bactérias	0,3110
Fungos	0,0001
Hidrólise de diacetato de fluoresceína	0,0001

4.4 Medidas microbiológicas

A liberação de CO_2, biomassa microbiana de carbono, quociente metabólico, atividade de celulolíticos, bactérias totais, fungos totais, amonificadores e atividade enzimática de hidrólise de diacetato de fluoresceína foram diferentemente afetados pelas alterações químicas ocasionadas pela

incorporação de biossólido no solo, pois, conforme discutido anteriormente, a temperatura e a umidade não devem ter sido os principais fatores que exerceram influência sobre a atividade e os grupos microbianos no solo.

4.4.1 Liberação de CO_2

A atividade respiratória dos microrganismos do solo foi expressa como mg de C-CO_2 liberado por g de solo, num período de 6 dias após a data de coleta até 240 dias após a incorporação de biossólido no solo. Os valores variaram significativamente com as doses e o tempo de amostragem (Tabela 4). Os valores de C-CO_2 variaram de 90,0 mg g^{-1} solo para a dose de 40 Mg ha^{-1}, no 15 dia, até 4500,0 mg g^{-1} solo com 60 Mg ha^{-1} de lodo, no 30 dia. Observa-se que, entre o 1 e o 15 dia, ocorreu uma redução significativa na emissão de CO_2 do solo das áreas com aplicação de biossólido, seguida de um aumento acentuado até o 30 dia. Após o 30 e até o 240 dia, verifica-se que os menores valores de C-CO_2 foram determinados nas amostras de solo coletadas nas parcelas com 0 e 10 Mg ha^{-1} e que os maiores valores nas amostras de solo foram provenientes das parcelas com 20, 40 e 60 Mg ha^{-1} de biossólido.

O período de decomposição do carbono foi dependente da quantidade de biossólido aplicado no solo. Assim, com a incorporação de 10 e 20 Mg ha^{-1} verifica-se, na Tabela 4, que, após 240 dias, os valores de CO_2 liberado do solo retornam aos valores observados anteriormente, antes da aplicação do biossólido. Já nas amostras de solo coletadas nas parcelas com 40 e 60 Mg ha^{-1} de biossólido, a atividade microbiana continua ativa na decomposição do carbono no solo, com os valores de CO_2 sendo, ainda no 240 dia, superiores aos determinados no solo no início do experimento.

No Anexo A, estão apresentados os resultados do acompanhamento mensal do CO_2 realizado durante os 360 dias após a incorporação do biossólido.

Pelos dados obtidos, pode-se afirmar, que a decomposição do biossólido das parcelas com 10 e 20 Mg ha^{-1} durou 240 dias, ao passo que, nas parcelas com 40 e 60 Mg ha^{-1}, permaneceu por mais de 360 dias.

Tabela 4. [1] Valores médios de C-CO_2 liberado por hora em amostras de solo colhidas um dia antes e em diversos períodos após a aplicação de biossólido e incubadas na presença de NaOH por seis dias consecutivos.

	Dias de coleta									
Biossólido (Mg ha^{-1})	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240
	---------- (µg C- CO_2 g^{-1} solo) ----------									
0	500,0 Aa[1]	700,0 Aa	900,0 Ca	600,0 Ca	700,0 Ca	400,0 Da	500,0 Ca	500,0 Ca	400,0 Ca	200,0 Ca
10	400,0 Ab	100,0 Bc	800,0 Cb	400,0 Cb	1200,0 Ba	600,0 CDb	800,0 Cb	1500,0 Ba	900,0 Cb	300,0 Cc
20	600,0 Abc	100,0 Bd	1600,0 Ba	1300,0 Bab	1500,0 Ba	1100,0 Cab	1300,0 Bab	1000 BCab	800,0Cbc	600,0 Bc
40	400,0 Ad	90,0 Be	2900,0 Bb	1800,0 Bc	4000,0 Aa	2700,0 Bb	1300,0 Bc	1200,0 Bc	1600,0 Bc	1000 Bcd
60	900,0 Ad	100,0 Be	4500,0 Aa	2600,0 Ac	3800,0 Ab	3700,0 Ab	4000,0 Aa	3000,0 Ac	2600,0 Ac	3800,0 Ab

[1] Variável transformada por ln (x). [2] Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, nas colunas, e minúsculas iguais, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%

A Figura 19 apresenta a variação da emissão de CO_2 do solo nos 6 dias após a data de coleta dos 30 dia aplicação de biossólido. Verifica-se que a produção de CO_2 diminui significativamente, entre o 1° e o 15° dias, à medida que se elevam as doses de biossólido incorporadas ao solo. Para este comportamento, observado na liberação de CO_2, podem-se aventar duas hipóteses: na primeira, a causa seria a mudança no substrato energético, ou seja, a maioria dos microrganismos estabelecidos no solo estava adaptada a degradar

compostos orgânicos de elevada relação C/N, proveniente da serapilheira de eucalipto e não estava adaptada a decompor compostos orgânicos de baixa relação C/N fornecidos pelo biossólido. A segunda hipótese está relacionada às alterações das condições do meio, proporcionadas pela liberação de nutrientes e elevação do pH do solo. Esses fatores exigiriam dos microrganismos um determinado tempo para adaptação das enzimas e ajustamento do metabolismo das células microbianas ao novo substrato orgânico e à nova condição química do solo (Sistron, 1973; Cattelan & Vidor, 1990; Della Bruna, 1991; Wong, et al.1995).

Também não se pode esquecer que, além da comunidade microbiana original do solo, juntamente com o biossólido está sendo incorporado grande número de células microbianas estranhas ao solo em questão.

Já entre o 15^{o} e 30^{o} dias, observa-se, na Figura 19, que a produção de CO_2 aumenta significativamente, de uma maneira geral, com a elevação das doses de biossólido adicionadas ao solo. Este aumento gradativo na quantidade de carbono respirado pela comunidade microbiana, proporcional às doses de lodo aplicadas ao solo, ocorreu, provavelmente, porque os microrganismos, após se adaptarem à nova condição do meio, proporcionada pela incorporação do lodo, foram estimulados pela elevação do pH, aumentos nos teores de bases trocavéis, fósforo e nitrogênio, redução do alumínio e, principalmente, pelo fornecimento de substratos energéticos. (Benedetti et al. 1991; Eivazi & Zakaria, 1993; Jahnel, et al. 1999).

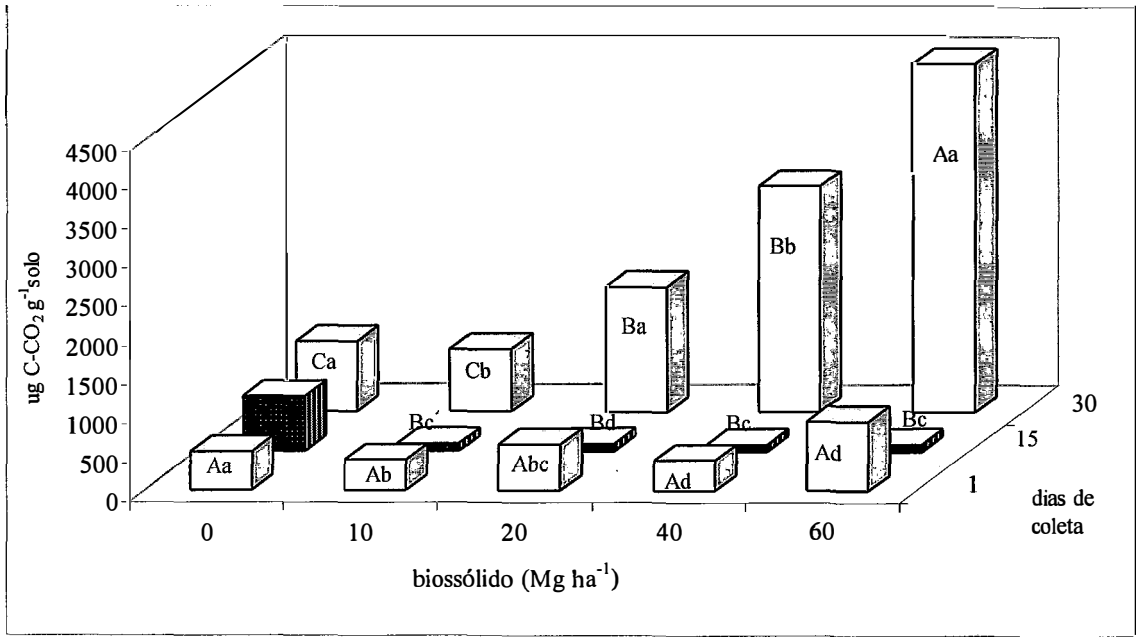

Figura 19 - Variação da liberação de CO_2 do solo entre o 1 e 30 dia após a aplicação de biossólido (Médias maiúsculas iguais, nas doses, e minúsculas iguais, nos dias de coletas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%)

A Figura 20 apresenta as curvas de liberação de CO_2 em amostras de solo coletadas nas parcelas com 0, 40 e 60 Mg ha^{-1} em 8 períodos após a adição de biossólido. Observa-se que, a partir do 30 e até o 240 dia, a emissão de CO_2 aumentou com o incremento das doses, porque a matéria orgânica fresca presente no biossólido forneceu compostos energéticos necessários para o desenvolvimento dos microrganismos. O que se constata é que a curva de produção de CO_2 reflete claramente o consumo de material energético pela comunidade microbiana do solo (Eivazi & Zakaria, 1993; Jahnel, et al. 1999), e esta tendência pode ser observada pela avaliação conjunta de produção de CO_2 (Figura 20) com o número de microrganismos determinados no solo (Figuras 26,

27 e 28). Segundo Bewley & Stotzky (1983), este fato ocorreria devido ao crescimento de espécies microbianas tolerantes às mudanças proporcionadas pela incorporação de biossólido no solo.

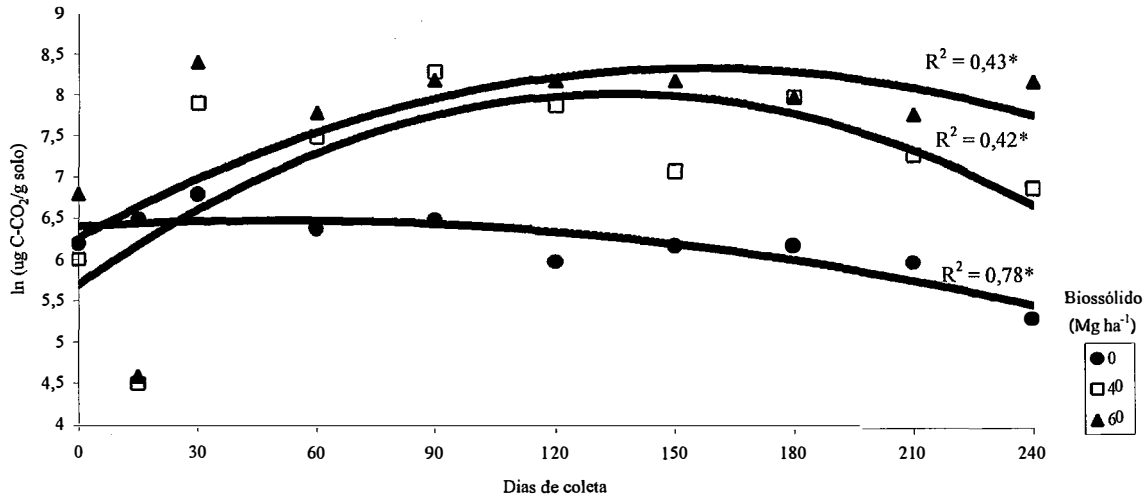

Figura 20 - Variação da liberação do CO_2 do solo, em períodos de 6 dias, de amostras coletadas de 30 em 30 dias durante os 240 dias após aplicação de doses de biossólido

Ainda na Figura 20, verifica-se que a adição de 60 Mg ha^{-1} de biossólido no solo proporcionou maior atividade respiratória em todas as épocas amostradas e que o valor da quantidade de CO_2, obtido pela dose de 60 Mg ha^{-1} após 240 dias da aplicação, foi 16 vezes maior que o valor determinado no solo sem aplicação de biossólido, 12 vezes maior em relação à dose de 10 Mg ha^{-1}, 6,2 vezes superior ao da dose de 20 Mg ha^{-1}e 3,7 vezes superior ao valor obtido com a dose de 40 Mg ha^{-1}. Também convém destacar que uma parte desse CO_2 liberado do solo poderá estar relacionada ao efeito rizosférico da cultura do eucalipto, devido ao seu desenvolvimento em resposta às doses de biossólido incorporadas no solo,

pois Nuernberg et al. (1984) e Silva Filho (1984), estudando a liberação de CO_2 durante 360 dias em áreas com diferentes sucessões de culturas, constataram aumentos na emissão de CO_2 ocasionados pelo desenvolvimento rizosférico das culturas.

Os resultados sobre liberação de CO_2 refletem a relação existente entre produção de CO_2 e o consumo de material energético e /ou carbono remanescente ainda disponível no solo para os microrganismos. Segundo Jahnel et al. (1999), este aumento na taxa de liberação de CO_2 pode ser atribuído à presença de frações lábeis de matéria orgânica, como, entre outras, certos compostos nitrogenados prontamente decomponíveis no lodo. Essa correlação entre maior atividade microbiana de CO_2 e maior teor de carbono orgânico também foi observada por Hendrix et al. (1998) e Balota et al. (1998), em amostras de solo coletadas em áreas submetidas ao plantio direto.

Em relação aos fatores climáticos, vale destacar que, apesar de não ter sido evidenciada a influência da temperatura e umidade sobre a liberação de CO_2 no solo, trabalhos realizados em condições de campo, por Cook e Graves (1987); Cattelan & Vidor (1990); Brookes (1995); Burke et al. (1995); Trasar-Cepeda et al. (1998) e Balota et al. (1998), demonstraram que amostras de solo coletadas no inverno apresentaram menor atividade respiratória que as coletadas no verão. Provavelmente esse comportamento não foi observado neste estudo, porque a variação das condições climáticas ocorridas entre o 1^o e 240^o dia não foi suficiente para exercer influências mais pronunciadas sobre a emissão de CO_2 do solo. Por outro lado, observa-se (Figura 20) que a presença de substrato energético e nutrientes, proporcionada pela adição de lodo, influenciou profundamente a atividade microbiana.

A análise de correlação entre as características microbianas demonstra que a respiração do solo se correlacionou positivamente com o quociente metabólico (r = 0,99**), celulose degradada (r = 0,73*), bactérias totais

(r = 0,94**), fungos totais (r = 0,58*), DAF (r = 0,48*), amonificantes (r = 0,95**) e NH^+_4 (r = 0,81*) e, negativamente (r = -0,77**), com a biomassa. Obviamente, era de se esperar que o coeficiente metabólico apresentasse essa alta correlação, visto que o seu valor é obtido a partir da fórmula CO_2 liberado/biomassa microbiana e, portanto, este parâmetro não é independente (Tabela 5).

Diferentes resultados têm sido obtidos em estudos sobre inter-relação entre atividades microbianas e grupos específicos de microrganismos no solo. Assim, Fliessbach et al. (1994), quantificando a liberação de CO_2 em solos tratados com biossólido, observaram que a comunidade fúngica foi responsável por mais de 80% do carbono liberado na forma de CO_2 pela respiração do solo. Os autores trabalharam com actidione para inibição de fungos e estreptomicina para bactérias. Sabe-se, entretanto, que nem todas as bactérias do solo são sensíveis à estreptomicina, o que muito provavelmente levou a uma superestimativa da parcela de CO_2 referente aos fungos. Jahnel et al. (1999), por sua vez, verificaram que o aumento da respiração em solos tratados com lodo de curtume coincidia também com o aumento da comunidade de bactérias no solo. Já Dias-Júnior et al. (1998), estudando a emissão de CO_2 em amostras de solos coletadas em áreas contaminadas com despejo industrial, contendo metais pesados, constataram que a produção de CO_2 do solo foi influenciada pela presença de amonificantes, oxidantes de nitrito, actinomicetos e biomassa microbiana.

Quanto à respiração microbiana e às alterações químicas ocasionadas pela aplicação de biossólido no solo, verifica-se (Tabela 6) que o CO_2 correlacionou-se positivamente com o pH (r = 0,92**) e teores de fósforo (r = 0,90**), cálcio (r = 0,97**), carbono orgânico (r = 0,60*), CTC (r = 0,87**), zinco (r = 0,98**) e cobre (r = 0,91**), indicando, dessa forma, que a incorporação de lodo elevou o pH do solo a valores favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos, e que

também forneceu nutrientes e carbono para o crescimento e multiplicação das células microbianas no solo (Benedetti et al., 1991; Della Bruna et al., 1991; Eivazi & Zakaria 1993; Jahnel et al., 1999). Este incremento na atividade microbiana também deve ser decorrente do fato de que o biossólido, ao elevar o pH, propiciou condições para a neutralização do alumínio no solo, reduzindo, assim, a ação tóxica desse elemento sobre a comunidade microbiana e, portanto, sobre a emissão de CO_2 no solo. Esta tendência pode ser evidenciada na correlação negativa estabelecida entre a liberação de CO_2 e Al^{+3} no solo.

Tabela 5. Correlação entre as medidas microbiológicas determinadas em solo tratado com doses de biossólido

Características	Liberação CO_2	Biomassa	qCO_2	(%) Celulose	Bactérias	Fungos	DAF	Amonificantes	NH^{+4}
Liberação CO_2	-								
Biomassa	- 0,77**	-							
qCO_2	0,99**	-0,82**	-						
(%) Celulose	0,73*	0,50*	0,65*	-					
Bactérias	0,94**	0,88**	0,79**	0,83**	-				
Fungos	0,58*	0,69*	0,56**	0,08ns	-0,55*	-			
DAF	0,48*	-0,27 ns	0,46*	0,28ns	0,47*	0,41ns	-		
Amonificantes	0,95**	-0,79**	0,81**	0,96**	0,94*	-0,61*	0,48*	-	
NH^{+4}	0,81**	-0,61*	0,82**	0,57*	0,68**	0,08ns	0,44*	0,74**	-

* e **: significativos a 5 e 1%, respectivamente ^{ns} não significativo

Em relação à Tabela 6, percebe-se que a emissão de CO_2 não foi inibida pela elevação das concentrações de cobre e zinco no solo; isso ocorreu, provavelmente, porque esses metais não estavam em concentrações que pudessem ocasionar problemas de toxicidade aos microrganismos, pois, segundo Lo et al. (1992), a matéria orgânica do lodo e do solo atuam na complexação desses metais, reduzindo a curto prazo a sua disponibilidade e, conseqüentemente, a toxidez, fornecendo, ao mesmo tempo, carbono como energia para os microrganismos. Por outro lado, a ausência de efeitos prejudiciais da aplicação de lodo contendo metais pesados não é garantia de que efeitos prejudiciais sobre as

atividades e comunidades microbianas não venham a ocorrer posteriormente no solo (Witter et al., 1994, Jahnel et al., 1999).

Tabela 6. Correlação entre medidas microbiológicas e características químicas do solo tratado com doses de biossólido

Medidas microbiológicas	pH	Fósforo	Cálcio	C-org	CTC	Zn	Cu	Al^{+3}
Liberação CO_2	0,92**	0,90**	0,97**	0,60*	0,87**	0,98**	0,91**	-0,70**
Biomassa	-0,54*	-0,47*	-0,43ns	-0,02ns	-0,32ns	-0,36ns	0,38ns	0,27ns
qCO_2	0,84**	0,89**	0,91**	0,19ns	0,82**	0,93**	0,90**	-0,51*
(%) Celulose	0,80*	0,70**	0,83*	0,33*	0,69**	0,75**	0,79**	-0,88**
Bactérias	0,70**	0,92**	0,95**	0,66**	0,93**	0,93**	0,72**	0,47*
Fungos	-0,35ns	-0,85**	0,70**	0,27ns	-0,55*	0,53*	0,61**	-0,68**
DAF	-0,74ns	-0,36ns	-0,54ns	0,06ns	0,54ns	-0,97ns	0,88ns	0,90ns
Amonificantes	0,63**	0,67**	0,72**	0,23ns	0,54*	0,56*	0,55*	-0,84**

* e **: significativos a 5 e 1%, respectivamente, ns não significativo

4.4.2 Biomassa microbiana de carbono

Os resultados do carbono da biomassa microbiana do solo tratado com doses de biossólido encontram-se apresentados na Tabela 7. Observa-se que os valores de carbono microbiano variaram significativamente com as doses de biossólido e com as épocas de amostragens, sendo o menor valor 8,2 μg C g^{-1} solo determinado no 150° dia no solo da parcela com 20 Mg ha^{-1}, e o maior, 146 μg C g^{-1}solo, no 240° dia na parcela sem aplicação de biossólido.

Os maiores teores de carbono microbiano observados neste trabalho variaram em faixas semelhantes ou próximas às dos valores relatados por outros autores. Assim, Brookes & McGrath (1984), analisando amostras provenientes de solos tratados com biossólido contaminado com metais pesados, observaram que o carbono variou de 127 a 287 μg g^{-1}solo. Dar (1996), em amostras de solo incubadas por 60 dias com biossólido sem e com adição de cádmio, observou que os valores do carbono microbiano variaram de 101 a 196 μg g^{-1}solo. Os menores

valores do presente trabalho, entretanto, apresentaram-se bem menores do que aqueles obtidos pelos autores mencionados. Mesmo Jahnel et al. (1999), em um experimento similar, com biossólido proveniente da indústria de curtume, com e sem adição de crômio, verificaram que o carbono microbiano variou de 35 a 86 μg g^{-1}solo, valores superiores ao dos menores aqui apresentados. Essa variabilidade dos resultados de diferentes autores também pode ser parcialmente devido ao fato de terem sido usadas metodologias e texturas de solo diferentes na obtenção da biomassa (Brookes & McGrath, 1984; Pfenning, et al., 1992; Rodrigues et al., 1994; Dar, 1996).

Tabela 7. [1] Biomassa microbiana na camada de 0-10 cm de profundidade em solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias

	Dias de coleta									
Biossólido (Mg ha^{-1})	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240
	(μ g C_{mic} g^{-1} solo)									
0	0,0 Af[2]	0,0 Af	40,0 Ac	95,0 Ab	89,0 Ab	76,0 Ab	10,7 Af	14,0 De	78,0 Bb	146,0 Aa
10	0,0 Ae	0,0 Ae	40,0 Ac	67,0 Ba	57,0 Bb	45,0 Bc	11,6 Ad	18,0 Cd	75,0 Ba	74,0 Ba
20	0,0 Ag	0,0 Ag	34,0 Bd	62,0 Ba	53,0 Bb	45,0 Bc	8,2 Bf	17,0 Cc	69,0 Ca	38,0 Ed
40	0,0 Af	0,0 Af	34,0 Bd	48,0 Cbc	45,0 Cbc	40,0 Bc	9,7 ABe	30,0 Bd	88,0 Ba	51,0 Db
60	0,0 Ag	0,0 Ag	32,0 Bd	34,0 Dd	44,0 Cb	26,0 Be	9,0 ABf	41,0Ac	144,0 Aa	61,0 Cb

[1] Variável transformada por inversa de raiz de (x). [2] Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, nas colunas, e minúsculas iguais, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%

Na Tabela 7, verifica-se, em amostras de solo coletadas no 1° dia antes da aplicação e no 15° dia após a aplicação de biossólido, que não foi possível quantificar a biomassa microbiana do solo pelo método de fumigação - extração. Isso, provavelmente, poderá estar relacionado com a retirada da camada de serapilheira da superfície do solo, durante a operação de implantação do

experimento, pois, com a remoção da serapilheira, pode ter ocorrido uma diminuição nas entradas de material para a decomposição e, com esta diminuição, a biomassa microbiana foi mineralizada e, como conseqüência, reduzida no solo, a ponto de nem ser detectada pelo método. A redução do valor da biomassa microbiana é relatada também por Cerri et al., 1985; Bonde et al., 1988; Pfenning et al., 1992. Porém, a partir do 30° dia, pôde-se quantificar o carbono microbiano nas amostras de solo coletadas em todos os tratamentos.

Os dados da Tabela 7, entre o 30° e 240° dia, mostram que os teores de biomassa microbiana dos solos que receberam doses de lodo tendem a ser significativamente menores que os determinados no solo sem adição de lodo. E está tendência foi mais acentuada no período compreendido entre o 30° e 150° dia, nas áreas com a aplicação de 40 e 60 Mg ha^{-1} de biossólido. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Brookes & McGrath (1984), que verificaram redução na biomassa microbiana do solo com a adição de lodo de esgoto, sugerindo um efeito tóxico devido à presença de metais pesados. Porém, em trabalhos realizados por Fliessbach et al. (1994) e Jahnel et al. (1999) verificou-se que a aplicação de lodo contendo baixos e altos teores de metais pesados estimularam a produção da biomassa microbiana do solo porque, provavelmente, a atividade desses metais foi neutralizada pela presença da matéria orgânica existente no lodo. Isto sugere, então, que a redução na biomassa microbiana do solo, observada entre o 30° e 150° dia, pode ter ocorrido devido à mudança da composição do substrato energético, ao aporte de nutrientes, elevação no pH e ao crescimento de novos grupos microbianos no solo. Além disso, o biossólido utilizado apresentou teores de metais pesados abaixo dos limites considerados como tóxicos pela norma 4.230, promulgada pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB).

A avaliação conjunta de liberação de CO_2 e quantidade de biomassa microbiana, observadas nesse período nos locais com adição de biossólido,

permitem inferir que a incorporação desse material no solo ocasionou mudanças nos padrões metabólicos dos microrganismos e que provavelmente, estimulou o desenvolvimento de novas comunidades microbianas mais ativas, consumidoras de matéria orgânica. Conseqüentemente, o consumo da matéria orgânica proporcionou aumentos na emissão de CO_2 e diminuiu a disponibilidade de carbono para os microrganismos, reduzindo, dessa forma, a produção de carbono microbiano. Vários autores relatam que o manejo intensivo de culturas incluindo tratos culturais e a adição de fertilizantes pode reduzir o teor de biomassa microbiana no solo (Cattelan & Vidor, 1990; Insam et al., 1991; Alvarez et al., 1995; Vasconcellos et al., 1999; Vargas & Scholles, 2000).

Este comportamento dos microrganismos sugere que a adição de biossólido apresentou um efeito inibitório sobre a produção de biomassa microbiana, devido ao estabelecimento de uma comunidade microbiana ineficiente na imobilização do carbono no solo, e não por causa da presença de compostos potencialmente tóxicos, como os metais pesados.

Realizando um levantamento sobre a decomposição da matéria orgânica no solo, constata-se, na maioria dos trabalhos realizados com a adição de resíduos orgânicos de elevada relação C/N, que o aumento na produção da biomassa microbiana está diretamente relacionado, à baixa concentração de nitrogênio, que limita a mineralização e favorece a imobilização do carbono pelos microrganismos do solo (Powlson et al., 1987; Saffigna et al., 1989; Insam et al., 1991; Balota et al., 1998; Vargas & Scholles, 2000). Assim, é de se esperar, então, que a incorporação no solo de resíduos orgânicos com baixa relação C/N promova uma redução na imobilização e um aumento na mineralização do carbono, devido à disponibilidade de nitrogênio para os microrganismos do solo. Isto sugere a hipótese de que a redução da biomassa microbiana, observada no presente estudo em parcelas com biossólido, esteja relacionada à baixa relação C/N (9/1) do biossólido.

Estes resultados sugerem que a biomassa microbiana de solo tratado com biossólido foi influenciada, pela presença do nitrogênio, indicando, dessa forma, que a atividade dos microrganismos decompositores está regulada mais pela disponibilidade de nitrogênio do que pelo carbono no solo. Em outras palavras, a qualidade da matéria orgânica, especificamente em relação ao equilíbrio entre o carbono/nitrogênio, tem importância prática no manejo de resíduos orgânicos no solo, pois, quando são aplicados resíduos orgânicos com baixa relação C/N, a quantidade de carbono liberado na forma de CO_2 é superior ao carbono imobilizado pelos microrganismos, acarretando uma diminuição da biomassa microbiana (Bartlett & Kimble, 1976; Powlson et al., 1987; Saffigna et al., 1989).

Ainda em relação à ação reguladora do nitrogênio durante a decomposição da matéria orgânica no solo, convém ressaltar que, nos estudos sobre alterações microbianas em solos tratados com biossólido, geralmente a redução da biomassa microbiana é relacionada à presença de metais pesados (Brookes & McGrath, 1984; Fliessbach et al., 1994; Chander et al., 1995; Witter, 1996; Dodson et al., 1997). Não existem trabalhos para verificar se a inibição da imobilização do carbono, é realmente ocasionada pelos íons metálicos ou pela disponibilidade de nitrogênio, devido à baixa relação C/N do biossólido.

A Figura 21 apresenta a curva de crescimento da biomassa microbiana durante os 240 dias após a incorporação de biossólido. Verifica-se que, provavelmente, houve efeito do crescimento das plantas de eucalipto sobre a quantidade de biomassa microbiana, ou seja, os teores de carbono microbiano apresentam uma tendência de aumento em todos os tratamentos, sendo mais acentuada no solo sem a adição de biossólido, onde a matéria orgânica gerada pelas árvores tem uma relação C/N alta e, conseqüentemente, ocorre maior acúmulo de matéria orgânica na biomassa. (Bonde, et al. 1988; Pfenning, et al. 1992).

Pelos dados apresentados na Tabela 6, observa-se que a biomassa microbiana correlacionou-se negativamente com os microrganismos amonificantes (r = -0,79**), teor de NH^{+}_{4} (r = -0,61*) e qCO_2 (r = -0,82**) no solo, sugerindo que o nitrogênio liberado pela mineralização dos compostos nitrogenados do biossólido, ocasionaram inibição na produção de biomassa, o que pode estar relacionado ao efeito tóxico de íons nitrato sobre a comunidade microbiana do solo (Söderström et al., 1983; Verhaegen, et al., 1989).

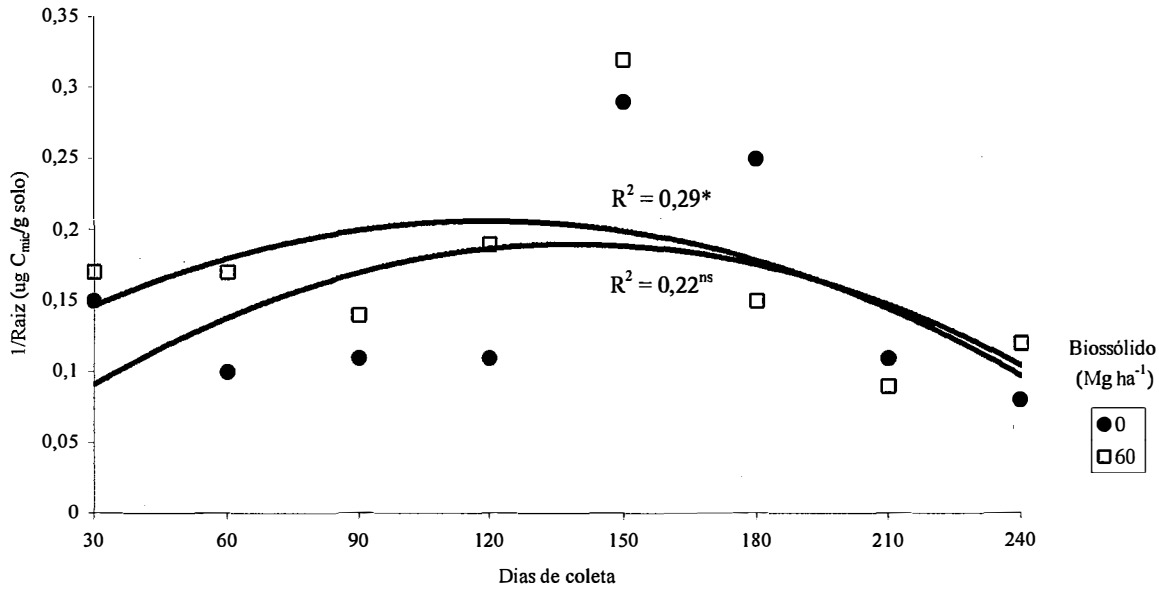

Figura 21 - Variação da biomassa microbiana do solo, durante os 240 dias após aplicação de doses de biossólido

Verifica-se, na Tabela 5, que a biomassa apresentou correlação com o número de bactérias totais (r = 0,88**) e de fungos totais (r = 0,69*) no solo. Nem sempre é possível estabelecer uma correlação entre biomassa e a simples contagem de microrganismos em placas. Entretanto, Tauk et al., 1990; Cattelan & Vidor, (1990) e Dias-Júnior, et al. (1998) revelaram que a biomassa se

correlacionou significativamente com as comunidades de fungos, actinomicetos ou de bactérias.

Quanto aos fatores do solo, observa-se (Tabela 6) que houve apenas correlação negativa e significativa entre a biomassa e o pH (r = -0,54*) e entre esta e o fósforo (r = -0,47*). Resultado similar também foi obtido por Dias-Júnior, et al. (1998), em solos de áreas contaminadas com rejeitos de metalúrgica. Por outro lado, Balota, et al. (1998), em amostras de solos coletadas em áreas submetidas ao plantio direto, observaram alta correlação significativa entre o carbono microbiano e o carbono orgânico do solo. Esses dados reforçam a possibilidade de que o biossólido, por apresentar uma estreita relação C/N, proporciona maior perda de carbono via respiração, reduzindo dessa forma a quantidade de carbono disponível para a imobilização pelos microrganismos do solo.

Não houve correlação entre a biomassa microbiana e a umidade do solo, o que reforça a idéia de que os fatores climáticos não devem ter tido influência primordial na variação dos dados microbiológicos, conforme discussão anterior.

4.4.3 Quociente metabólico (q CO_2)

Os valores obtidos na Tabela 8 evidenciam que houve diferenças significativas na variação do quociente metabólico, nas épocas de amostragens em solos sem e com adição de doses de biossólido e, também, entre as doses de biossólido. De uma maneira geral, o quociente metabólico aumentou proporcionalmente com a elevação das doses de biossólido adicionadas ao solo. Os maiores valores, durante o experimento, foram determinados no solo da área que recebeu a aplicação de 60 Mg ha^{-1} de lodo. No 150º dia, o quociente metabólico referente a este tratamento foi cerca de 9,5 vezes maior do que o valor

determinado no solo sem biossólido e 2,8 e 3,3 vezes maior que o do solo com, respectivamente, 20 e 40 Mg ha^{-1} de biossólido.

Tabela 8. Variação do quociente metabólico [1] na camada de 0-10 cm de profundidade em solo tratado com doses de biossólido após diferentes períodos de tempo, até 240 dias

	Dias de coleta									
Biossólido (Mg ha^{-1})	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240
	(µg C- CO_2/µg Cmic. h^{-1})									
0	0,0 Af[2]	0,0 Af	22,5 Dc	6,3 Dd	7,8 Dd	5,2 Dd	46,7 Ca	37,8 Bb	5,1 Cd	1,3 De
10	0,0 Af	0,0 Af	20,0 Dcd	5,9 De	21,0 Ccd	13,3 Dd	68,9 Cb	83,3 Aa	12,0 Bd	4,0Ce
20	0,0 Ad	0,0 Ad	47,0 Cb	20,9 Cc	28,3 Bbc	24,4 Cc	158,5 Ba	58,8 Ab	11,6 Bc	15,9 Bc
40	0,0 Ae	0,0 Ae	85,3 Bb	37,5 Bc	86,6 Ab	72,5 Bb	134,0 Ba	40,0 Bbc	18,1 Ad	19,6 Bd
60	0,0 Ae	0,0 Ae	140,6 Ab	76,4 Ac	86,3 Ac	142,3 Ab	444,4 Aa	73,1 Ac	18,0 Ad	62,3 Ac

[1] Variável transformada por ln (x). [2] Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, nas colunas, e minúsculas iguais, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%

A Figura 22 apresenta a variação do quociente metabólico durante os 240 dias nas parcelas sem e com 60 Mg ha^{-1}de biossólido no solo. Percebe-se que, no solo sem biossólido a curva do quociente metabólico apresenta o mesmo comportamento do solo com 60 Mg ha^{-1}.Porém, no tratamento com 60 Mg ha^{-1} à variação foi mais acentuada principalmente nos primeiros 120 dias e depois, tendem a apresentar uma diminuição ao longo do período estudado, sugerindo que a comunidade microbiana retornam às condições metabólicas iniciais. Isso pode ser atribuído, num primeiro momento, à redução de substrato energético de baixa relação C/N e, por isso, de rápida mineralização no solo, e, num segundo momento, pelo aumento da imobilização do carbono proporcionado pelo aporte de matéria orgânica com elevada relação C/N, proveniente da serapilheira em

formação na superfície do solo. Esses resultados também foram obsevados por Killham & Firestone (1984); Anderson & Domsch (1985); Ocio & Brookes (1990); Insam et al (1991); Sakamoto & Obo (1994); Fliessbach et al. (1994); Balota et al. (1998).

O aumento no quociente metabólico também poderá ocorrer quando compostos potencialmente tóxicos, como os metais pesados, atingirem concentrações que inibem a atividade microbiana do solo (Fliessbach et al., 1994; Leita et al., 1995; Dias-Júnior, et al., 1998).

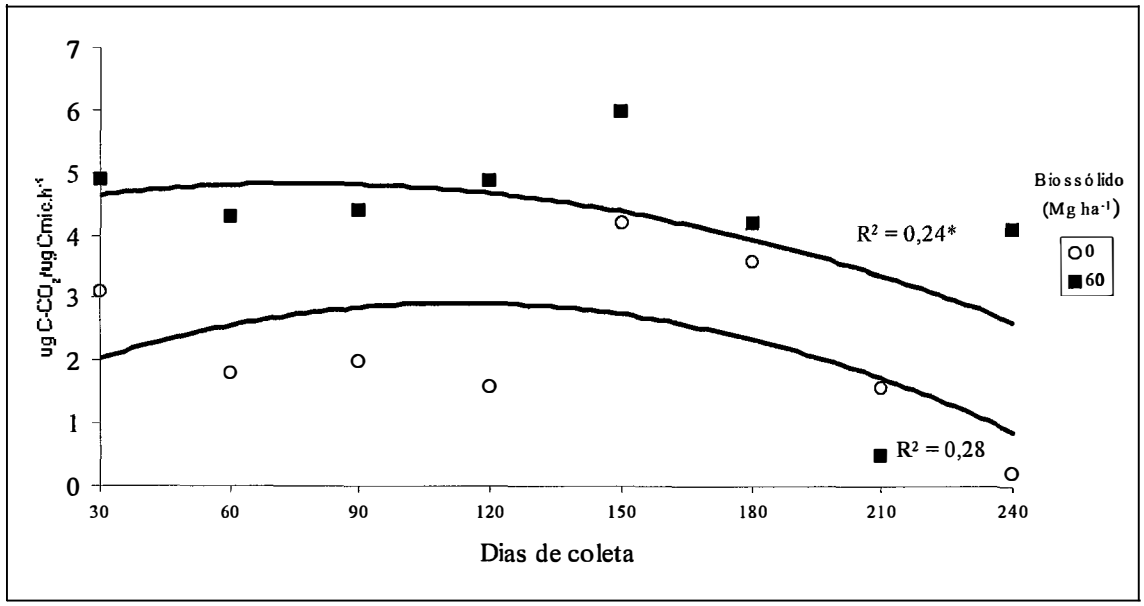

Figura 22 - Variação do quociente metabólico do solo, durante os 240 dias após aplicação de doses biossólido

A análise de correlação entre o quociente metabólico e as demais características biológicas (Tabela 5), revela que o quociente metabólico apresentou correlação positiva com a liberação de CO_2 (r = 0,99**), e negativa, com a biomassa microbiana (r = -0,82**). Esse comportamento era esperado,

tendo em vista que o quociente metabólico é o resultado da razão entre CO_2 liberado com o carbono imobilizado na biomassa pelos microrganismos.

As correlações com os fatores microbiológicos e químicos foram idênticas àquelas determinadas para a liberação de CO_2 no solo.

4.4.4 Atividade dos microrganismos celulolíticos no solo

Iniciaram-se as avaliações no período entre 60 e 180 dias após a incorporação do lodo, visto que se presumia que a degradação da celulose ocorreria lentamente no solo.

Pela análise estatística dos dados, pôde-se verificar que a atividade celulolítica, no 60º dia após a aplicação de biossólido, foi significativamente influenciada pela dose de biossólido, pois a porcentagem de celulose degradada aumentou proporcionalmente, com o aumento da dose de biossólido aplicada no solo até o 90º dia (Tabela 9). A partir desse período, as porcentagens de degradação da celulose nas parcelas com doses de biossólido não apresentaram mais diferenças significativas entre si.

É interessante observar que, no solo sem incorporação de biossólido, os microrganismos celulolíticos necessitaram de 120 dias para degradar 33,5% de celulose, ao passo que, no solo com 60 Mg ha^{-1}, esse mesmo valor foi obtido no 60º dia, e nos demais tratamentos, com 10, 20 e 40 Mg ha^{-1} de biossólido, a taxa de 33% de celulose degradada foi obtida entre o 60º e 90º dia (Tabela 9). Esses dados sugerem que a presença de matéria orgânica, fósforo, nitrogênio e cálcio existentes no biossólido, associada à elevação no pH do solo devem ter atuado no estímulo do desenvolvimento de microrganismos celulolíticos, conforme também foi observado por Della Bruna et al. (1991); Jahnel (1997). É possível, também, que a rizosfera do eucalipto tenha contribuído para a maior atividade microbiana

celulolítica, pois resultados similares também foram observados por Nascimento et al. (1995), em solo de áreas cultivadas com milho e soja.

Tabela 9. Porcentagem de degradação da celulose [1] na camada de 0-10 cm de profundidade em solos tratados com doses de biossólido após diferentes periodos de tempo, até 240 dias

	Dias de coleta				
Biossólido (Mg ha^{-1})	60	90	120	150	180
	Celulose degradada (%)				
0	6,4 De [2]	19,9 Cd	33,5 Bc	51,0 Ab	74,5 Aa
10	12,0 Cd	55,0 Ac	68,5 Ab	67,5 Abc	84,0 Aa
20	29,6 Bb	35,0 Bb	57,2 Aa	59,0 Aa	68,7 Aa
40	27,8 Bb	55,0 Ab	69,5 Aa	67,5 Aab	84,0 Aa
60	37,5 Ab	40,0 Bb	72,0 Aa	77,7 Aa	78,2 Aa

[1] Variável transformada por arc sen (x). [2] Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, nas colunas, e minúsculas iguais, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%

Analisando a Figura 23, constata-se, na parcela com biossólido, a ocorrência de duas fases distintas na curva de degradação da celulose no solo, similar à curva de crescimento microbiano. A primeira fase seria caracterizada pelo aumento acentuado no consumo de celulose (fase exponencial) até o 120º dia, e a segunda, entre o 120º e 180º dia, com a estabilização na decomposição da celulose. Resultado semelhante, em solo de área revestida com floresta tropical, foi obtido por Santos & Grisi (1979), que verificaram que, inicialmente, a celulose é rapidamente consumida pelos microrganismos do solo, e que, depois, ocorre uma diminuição na taxa de decomposição, possivelmente devido ao

escassseamento da celulose como fonte de energia para os microrganismos e também pela liberação e acúmulo de substâncias tóxicas pelos próprios microrganismos, durante a decomposição da celulose no solo. Entretanto, a celulose no tratamento sem biossólido foi degradada linearmente.

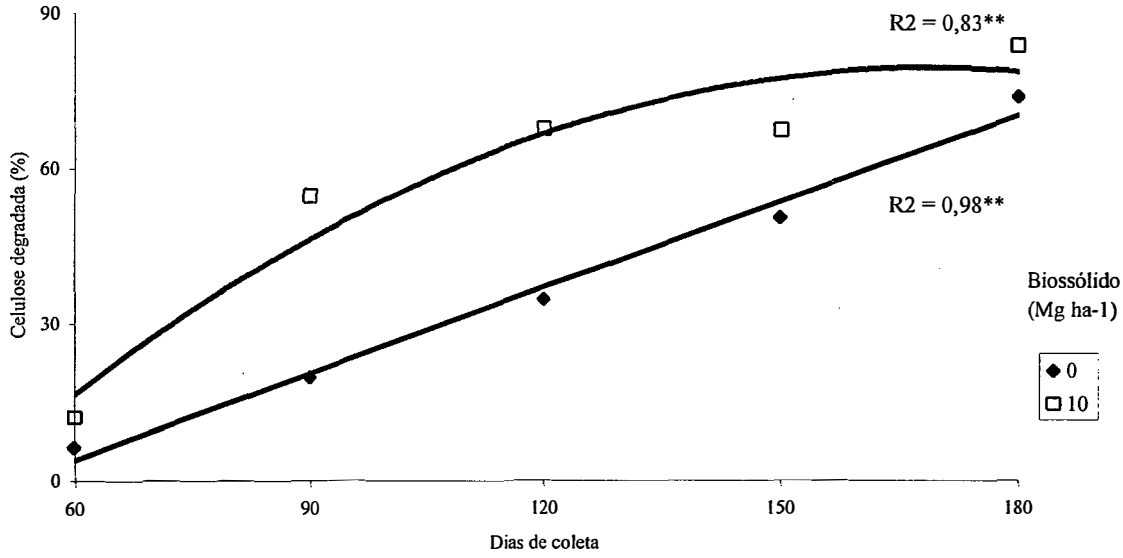

Figura 23 - Porcentagem de degradação da celulose em solo tratado com doses de biossólido

A taxa de degradação da celulose esteve estreitamente relacionada com o ciclo do carbono no solo, pois apresentou correlações significativas com a liberação de CO_2 (r = 0,73*), biomassa microbiana (r = 0,50*), q CO_2 (r = 0, 65*) e carbono orgânico (r = 0,33*), indicando que essa medida poderia ser utilizada como estimativa para avaliar a atividade dos microrganismos durante a decomposição do biossólido no solo. A degradação da celulose foi também correlacionada com a comunidade microbiana, tendo sido determinadas

correlações com as bactérias (r = 0,83**) e amonificadores (r = 0,96 **) no solo (Tabelas 5 e 6).

Quanto a composição química do solo (Tabela 6), constata-se que a melhoria nas condições de fertilidade do solo, proporcionada pela adição de biossólido, estimulou a atividade dos microrganismos celulolíticos, pois foram encontradas correlações positivas com o pH (r = 0,80*), fósforo (r = 0,70**), cálcio (r = 0,83*), NH^{+}_{4} (r = 0,57*), CTC (r = 0,69**), Cu (r = 0,79**) e Zn (r = 0,75**).

A degradação da celulose no solo foi avaliada pela perda de massa seca de amostras de celulose colocadas em sacos de malha de náilon com abertura de 1mm, enterrados na camada de 0-10 cm de profundidade no solo. Para a determinação da perda de matéria seca, amostras de celulose foram coletadas aos 60, 90, 120, 150 e 180 dias após a incorporação do biossólido. Depois de coletadas, as amostras de celulose foram secas em estufa a 60°C, determinando-se a perda de massa seca, que foi transformada para porcentagem de celulose degradada. A degradação da celulose no solo das parcelas que receberam doses de biossólido pode ser observada na Figura 24.

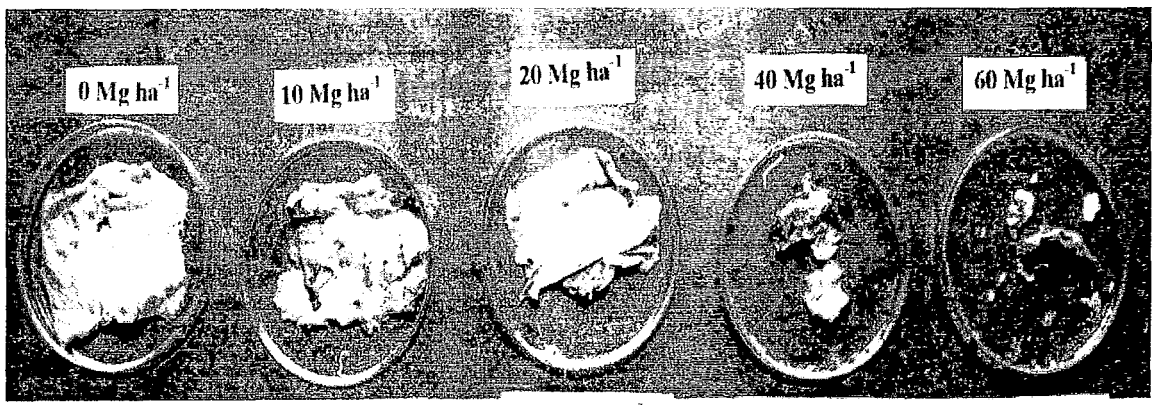

Figura 24 - Perda de massa seca da celulose em solo sem e com doses de biossólido, 120 dias após aplicação de biossólido

4.4.5 Número mais provável de bactérias

A contagem do número provável de bactérias, realizada ao longo do tempo, variou entre 0,20 e 75,08 x 10^5 por grama de solo (Tabela 10). Estes resultados são relativamente baixos, pois Silva Filho & Vidor (1984), Catellan & Vidor (1990) e Fernandes (1995), em solos submetidos a diferentes sistemas de culturas, determinaram valores variando entre 10^6 e 10^7. Dias-Júnior et al. (1998), determinando a ocorrência de bactérias em solos de áreas contaminadas com metais pesados, verificaram que o seu número se situou entre 10^5 e 10^7, e Jahnel et al. (1999), em amostras de solo com a adição de lodo de curtume e sais de crômio, observaram que a contagem de bactérias ficou em 10^6 organismos por grama de solo. Percebe-se que, nos dois últimos trabalhos citados, que também envolveram metais pesados, o número de bactérias não é muito discrepante daqueles ora apresentados.

O baixo valor determinado na contagem de bactérias pode também estar, relacionado à presença de remanescentes de substâncias inibidoras de crescimento microbiano, provenientes da serapilheira do eucalipto e não em decorrência da incorporação de biossólido ao solo.

A partir da leitura realizada aos 15 dias após a incorporação do biossólido, já era possível observar diferenças estatisticamente significativas entre as doses e o tempo (Tabela 10). Observou-se, também, que a parcela sem biossólido apresentou os menores números de bactérias, ao longo do tempo de amostragem. Por outro lado, nas parcelas com aplicação de doses de biossólido, constatou-se um aumento em consonância com o aumento da dose de biossólido. Esses aumentos na contagem de bactérias, verificados nas parcelas com biossólido, podem ter ocorrido devido à inoculação no solo de bactérias existentes no biossólido e, também, pelo fornecimento de substrato energético e nutrientes provenientes da decomposição do biossólido e pela elevação do pH do solo,

favorecendo, dessa maneira, a multiplicação das células bacterianas (Cattelan & Vidor, 1990; Brendecke, et al., 1993; Jahnel, et al., 1999).

Tabela 10. Número mais provável de bactérias [1] na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias

	Dias de coleta									
Biossólido (Mg ha^{-1})	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240
	(NMP de bactérias x 10^5 g^{-1} solo)									
0	1,33 Aa[2]	0,22 Db	0,69 Ca	0,63 Ca	0,20 Cb	0,76 Ca	0,68 Ca	0,97 Ba	0,25 Cb	0,64 Ba
10	0,77 Bc	2,80 Cb	11,70 Ba	1,57 Bb	0,18 Ce	3,02 Bb	2,06 Bb	1,49 Bd	0,38 Cd	0,67 Bc
20	0,42 Cf	10,58 Ba	12,99 Ba	1,48 Bd	0,65 Be	2,46 Bc	4,59Ab	3,55 Abc	0,82 Be	0,93 Be
40	1,10 Ad	15,40 Bb	41,01 Aa	5,21 Ac	2,05 Ac	3,06 Bc	3,84 Ac	3,41 Ac	0,93 Bd	4,50 Ac
60	1,48 Ac	75,08 Aa	51,29 Aa	5,15 Ab	1,56 Ac	4,23 Ab	4,45 Ab	4,54 Ab	2,39 Ac	4,78 Ab

[1] Variável transformada por ln (x). [2] Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, nas colunas, e minúsculas iguais, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%

Para evidenciar a influência do biossólido sobre o comportamento das bactérias no solo, a Figura 25 mostra graficamente as variações ocorridas em amostras de solo coletadas na parcela com 60 Mg ha^{-1} de biossólido, nos 4 primeiros dias de coleta. Constata-se que o número de bactérias varia no solo em três fases distintas: a primeira, com o número de bactérias aumentando de forma logarítimica, entre o 1° e 15° dias; a segunda, estacionária, com os valores de bactérias não diferindo estatisticamente entre o 15° e o 30° dia; e a terceira fase, que é de declínio, apresentando uma redução no crescimento de bactérias no solo. Possivelmente, a fase de adaptação não foi verificada, porque deve ter ocorrido

logo nos primeiros dias, após a adição de biossólido no solo, justamente no período em que não houve coletas.

Na avaliação em conjunto da liberação de CO_2 (Figura 19) e do NMP de bactérias (Figura 26), verifica-se que o número de bactérias refletiu as alterações ocasionadas pela decomposição do biossólido no solo, pois o maior aumento do número de bactérias ocorre no período inicial, na presença do substrato energético e, depois, diminui, à medida que o substrato é consumido pelos microrganismos do solo.

O NMP de bactérias apresentou correlações positivas e significativas, com as mesmas medidas microbiológicas que também se correlacionaram com a liberação de CO_2. Apenas a correlação com o NMP de fungos, embora também significativa, mostrou-se negativa, isto porque, provavelmente, as mudanças proporcionadas pelo biossólido favoreceram o desenvolvimento das células bacterianas, que por serem metabolicamente mais ativas, competiram com os fungos pelo consumo de substratos energéticos e nutrientes no solo.

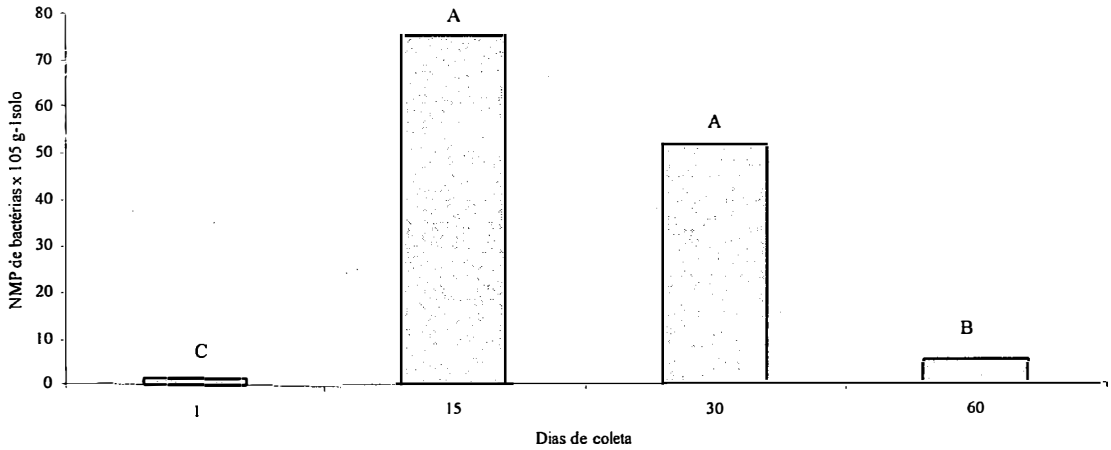

Figura 25 - Número mais provável de bactérias x 10^{-5} g^{-1} de solo determinadas na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com 60 $Mg.ha^{-1}$ de biossólido em função do tempo de coleta (Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente entre, si pelo teste t de Student 5%)

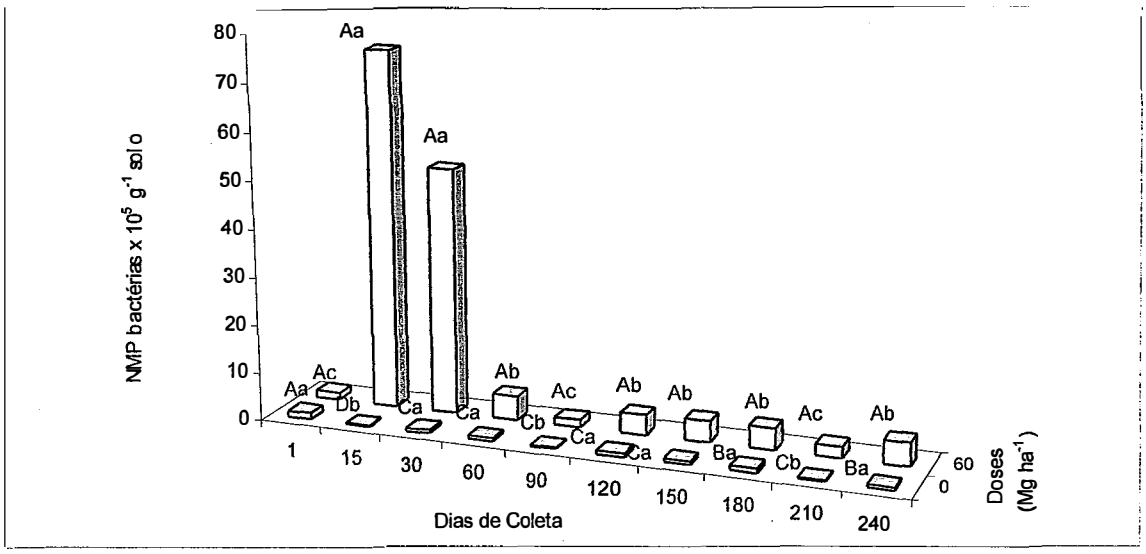

Figura 26 - Número mais provável de bactérias x 10^5 g^{-1} solo, em parcelas sem e com 60 Mg ha^{-1} de biossólido em difererentes períodos de amostragens (Médias maiúsculas iguais, nas doses, e minúsculas iguais, nos dias de coletas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%)

Na Tabela 6, observa-se que o número de bactérias apresentou correlação com o pH (r = 0,70**), CTC (r = 0,93**), carbono orgânico (r = 0,66**) e nutrientes inorgânicos no solo, o que sugere que a ocorrência de bactérias foi influenciada pela melhoria da fertilidade do solo, encontrando-se correlações significativas com o pH (r = 0,70**), CTC (r = 0,93**), fósforo (r = 0,92**), cálcio (r = 0,95**) e carbono orgânico (r = 0,66**). Provavelmente o fósforo e o cálcio devem ter sido muito importantes para o aumento da comunidade de bactérias no solo, pois o teor de fósforo e cálcio, determinado em amostras de solo coletada no 240º dia na parcela com 60 Mg ha^{-1} de biossólido, foi cerca de 33 e 50 vezes superior ao teor desses elementos determinados nessa mesma parcela antes da aplicação do biossólido. Outro fator que pode ter contribuído para esse comportamento foi à elevação no pH do solo, que variou de 3,5, antes

da adição de biossólido, para 5,5, após 240 dias da incorporação de 60 Mg ha^{-1} de biossólido. Essas condições de pH, próximas da neutralidade favorecem o crescimento das células bacterianas, que tendem a predominar no solo, devido também à neutralização do alumínio, conforme se pode observar na correlação negativa determinada entre as bactérias e o teor de Al^{+3} (r = -0,47*). Esses resultados confirmam as observações de outros pesquisadores, de que a melhoria na fertilidade do solo estimula o desenvolvimento das bactérias no solo (Nuernberg et al., 1984; Dennis & Fresquez, 1989; Cattelan & Vidor, 1990; Tauk et al., 1990; Jahnel et al.,1999).

As bactérias estiveram correlacionadas significativamente com as concentrações de cobre (r = 0,72**) e zinco (r = 0,93**) no solo, indicando que a presença desses metais não inibiu o crescimento das bactérias, porque provavelmente a quantidade desses íons metálicos adicionados via biossólido foi muito baixa, e também porque a adição de matéria orgânica associada ao aumento da CTC e pH tende a neutralizar esses elementos no solo (Mattiazzo-Prezotto, 1994; Oliveira et al., 1995; Bertoncini & Mattiazzo, 1999; Jahnel et al., 1999).

4.4.6. Número mais provável de fungos

O número mais provável de fungos por grama de solo variou de 0,20 a 4,80 x 10^4 (Tabela 11). Esses valores estão no limite abaixo dos comumente encontrados para os fungos em solos de locais que receberam intervenções antrópicas. Porém, esses valores tendem a diminuir, de acordo com o sistema agrícola adotado e a intensidade do manejo realizado no solo. Assim, em áreas de solo com cultivo agrícola, os números de fungos variam entre 10^4 a 10^6, e, em solos tratados com rejeitos orgânicos e em áreas contaminadas com despejo industrial, contendo agentes poluentes como metais pesados, esses valores variam

entre 10^3 e 10^4 (Tauk et al., 1990; Cattelan & Vidor, 1990; Dias-Júnior et al., 1998; Jahnel, et al., 1999).

No caso da área em estudo, os baixos valores verificados no número de fungos talvez possam ser atribuídos, à presença, no solo, de remanescentes de compostos inibidores microbianos provenientes da decomposição da serapilheira, durante o tempo em que a área ficou reflorestada com eucalipto. Della Bruna et al. (1991) também considera esta hipótese.

Tabela 11. Número mais provável de fungos [1] na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias

	Dias de coleta									
Biossólido (Mg ha^{-1})	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240
	(NMP de fungos x10^4 g^{-1} solo) ---									
0	1,4 ABb[1]	0,5 Bc	0,3 Ccd	0,4 Cc	0,2 Cd	0,2 Bcd	2,6 Ba	1,1 Ab	0,2 Bcd	0,2 Bcd
10	1,1 A Bb	1,4 Ab	1,5 Bb	0,5 BCc	0,8 Bbc	1,3 Ab	2,5 Ba	1,7 Aab	1,4 Ab	0,4 Ac
20	0,8 Cd	1,6 Abc	3,3 Aa	0,6 BCd	0,8 Bd	1,2 Ac	2,0 Bb	0,7 Bd	0,3 Be	0,4 Ade
40	0,9 BCc	1,6 Ab	3,3 Ab	0,9 Abc	1,3 ABc	1,3 Ac	4,8 Aa	0,7 Bc	0,6 Bc	0,2 Bd
60	1,7 Ab	1,6 Ab	4,0 Aa	1,5 Ab	1,8 Ab	1,3 Ab	4,8 Aa	0,5 Bcd	0,9 Abc	0,3 Ad

[1] Variável transformada por raiz de (x). [2] Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, nas colunas, e minúsculas iguais, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%

A Tabela 11 apresenta a média do número de fungos e a Figura 27 a forma gráfica da variação da dinâmica da comunidade de fungos do solo, após 15 dias e a intervalos de 30 dias até 240 dias após a incorporação de doses de biossólido. Observa-se que a comunidade fúngica das amostras de solo estudadas

foi significativamente influenciada pelo fator tempo, ou seja, o número de fungos diminui ao longo do período estudado, independentemente das doses aplicadas no solo.

Como pode ser visualizado na Figura 27, ocorreram dois períodos de aumento no número de fungos no solo: o primeiro, aos 30 dias após a aplicação de biossólido; e o segundo, aos 150 dias. O aumento de fungos observado no 30º dia, pode ter ocorrido, devido ao fornecimento de matéria orgância e nutrientes liberados pela decomposição do biossólido no solo, pois na parcela sem biossólido não ocorreu aumento no número de fungos (Dennis & Fresquez, 1989; Tauk et al., 1990; Hiroki, 1992; Jahnel, 1997). O crescimento no número de fungos verificado no 150º dia foi motivado provavelmente por variação sazonal, tendo em vista que o aumento ocorreu em todos os tratamentos.

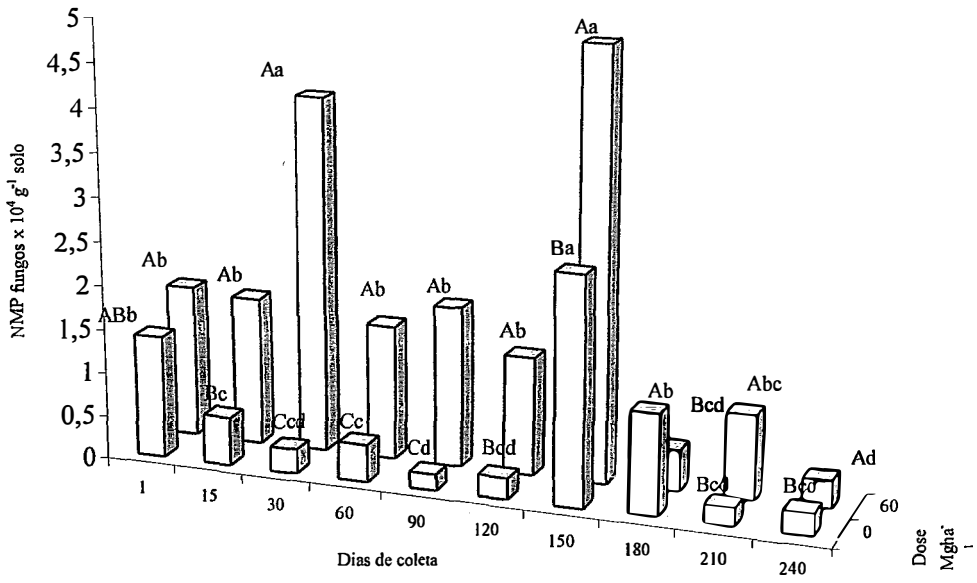

Figura 27 - Número mais provável de fungos x 10^4 g^{-1} solo, em solo tratado com doses de biossólido, em diferentes períodos de amostragens (Médias maiúsculas iguais, nas doses, e minúsculas iguais, nos dias de coletas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%)

Quanto à correlação entre fungos e as características microbiológicas do solo, foi verificado que o número totais de fungos apresentou correlações com as mesmas medidas microbiológicas correlacionadas com as bactérias, com exceção da percentagem de celulose degradada no solo. Em relação às características químicas, os fungos não apresentaram correlação com o teor de carbono orgânico e o pH do solo.

4.4.7 Microrganismos amonificadores e as transformações de nitrogênio no solo

O número de amonificadores determinado durante diferentes períodos de tempo, até 240 dias após a adição de biossólido, está apresentado na Tabela 12. Percebe-se, de uma maneira geral, que o número de amonificadores correlacionou-se positiva e significativamente com a dose de lodo aplicada no solo e com as épocas de amostragens. Nas condições de solo de textura arenosa e com baixos teores de matéria orgânica, o aumento das doses de lodo deve ser um fator determinante da quantidade de compostos nitrogenados no solo, que são utilizados pelos microrganismos a medida que degradam os compostos de carbono, para sua multiplicação e crescimento (Victoria et al.,1992; Jahnel, 1997).

A mineralização do nitrogênio orgânico, fornecido pela adição de doses de biossólido, até NH^{+}_{4} no solo, foi quantificada no período compreendido entre o 15° e 120° dia. A partir deste período, nas medições mensais não se detectou mais a presença desse íon no solo. A incorporação de doses de lodo no solo propornciou, no 30° dia, aumentos significativos nos teores de NH^{+4}, indicando que os compostos nitrogenados foram mineralizados pelos microrganismos amonificadores no solo (Tabela 13). Depois desse período, observa-se uma acentuada redução, talvez influenciada pelas transformações de imobilização, desnitrificação, nitrificação,volatilização e lixiviação pelo perfil do solo, tendo

em vista que o solo é constituído de areia quartzosa e, por isso, com baixa capacidade de adsorção e fixação de NH^+_4. Vários autores relatam que as concentrações de nitrogênio nas formas de NH^+_4 aumentam e que este se acumula no solo à medida que se elevam as doses de lodo aplicadas ao solo (Parker & Sommers, 1983; Voos & Sabey, 1987; Reedy et al., 1987; Linderman et al., 1989 e Serna & Pomares, 1991). A interpretação dada a este fato pelos autores citados é que a quantidade de nitrogênio mineralizável no solo é praticamente proporcional ao conteúdo de nitrogênio orgânico total existente no lodo.

Tabela 12. Número mais provável [1] de amonificantes na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias.

	Dias de coleta									
Biossólido (Mg ha^{-1})	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240
	(NMP de amonificantes x 10^3 g^{-1} solo)									
0	9,2 Bc[2]	0,2 Df	4,6 Dd	14,2 Bb	1,6 Ce	8,1Ec	0,7 Cf	1,2 Cf	32,1 Ca	0,4 Bf
10	7,4 Bd	0,7 Dd	12,9 Bc	9,4 Bd	3,4Bc	42,5 Da	0,8 Cd	2,3 Cc	39,9 Cb	0,2 Bd
20	11,8 Ac	2,6 Cf	9,8 Cd	12,2 Bc	3,8 Be	68,6 Bc	1,1Cg	35,6 Bb	66,8 Ba	0,4 Bg
40	7,4 Bd	5,2 Be	61,1 Ab	44,6 Ac	37,8 Ac	59,9 Cc	34,1Ad	54,2 Bc	82,3 Aa	0,2 Bf
60	9,8 ABf	9,6 Af	61,8 Ab	53,4 Ad	50,4 Ad	91,7 Ac	30,2 Be	62,4 Ac	82,7 Ab	2,9 Ag

[1] Variável transformada por raiz de (x). [2] Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, nas colunas, e minúsculas iguais, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%

Comparando o NMP de amonificantes e o teor de NH^+_4 no solo (Tabelas 12 e 13), verifica-se que, no 30° dia, as quantidades de NH^+_4 liberadas no solo com as doses de biossólido correspondem a um incremento no número de amonificadores. Estes também apresentaram uma diminuição numérica nos 15 primeiros dias após a incorporação, assim como aconteceu com os fungos e as

bactérias (Tabelas 10 e 11), o que reflete uma fase lag inicial, seguida de crescimento logarítmico, quando atingiram valores comparáveis ou maiores do que os números iniciais. Essa resposta dos microrganismos em gerar novos indivíduos provavelmente esteja relacionada ao conteúdo de nitrogênio total orgânico fornecido pelas doses de lodo, pois, conforme pode ser observado na Figura 27, nas parcelas com aplicação de 40 e 60 Mg ha^{-1} o número de amonificadores aumentou acentuadamente entre o 1° e 120° dia. Já com as doses de 10 e 20 Mg ha^{-1}, esse crescimento ocorreu timidamente, com o número de amonificadores apresentando valores semelhantes aos determinados no solo antes da incorporação de biossólido (Tabela. 12) e mantidos constantes no solo sem adição de biossólido. Depois, com a redução nos teores de NH^{+}_{4}, constata-se, também, uma tendência de redução no número de amonificadores no solo (Tabela 12). Essa redução foi verificada até o 360° dia após a incorporação de biossólido no solo, conforme pode ser observada no Anexo B.

Deve ser mencionado que, nos dois primeiros e nos cinco últimos períodos de coleta, quase não se constatou a presença de amônio no solo, o que vem mostrar que este íon é rapidamente transformado ou absorvido da solução do solo, conforme já discutido anteriormente, apontando-se as possíveis vias pelas quais pode ocorrer. Portanto, o fato de não se encontrar NH^{+}_{4} no solo não permite concluir que não tenha sido produzido. Seria necessário trabalhar com ^{15}N, para ser possível o acompanhamento das transformações sofridas.

A contagem de amonificadores correlacionou-se com as mesmas medidas microbiológicas que se correlacionaram com a liberação de CO_2 e, também, quanto aos fatores do solo, verificou-se que os amonificadores foram estimulados pela melhoria das condições de fertilidade, pois foram encontradas correlações positivas e significativas com as características químicas do solo, similares ao do qCO_2.

Tabela 13. Amônio determinado na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido após diferentes períodos de tempo, até 240 dias

Biossólido (Mg ha^{-1})	Dias de coleta									
	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240
	(mg NH^+_4 g^{-1} solo)									
0	0,0Ac[(1)]	0,0 Bc	2,7 Ca	2,6 Ba	2,8 ABa	0,2 Ab	0,0 Ac	0,0 Ac	0,0 Ac	0,0 Ac
10	0,0 Ac	0,0 Bc	4,5 Ba	2,5 Bb	3,2 ABb	0,0 Bc	0,0 Bc	0,0 Ac	0,0 Ac	0,0 Ac
20	0,0 Ac	0,0 Bc	5,1 Ba	2,3 Bb	2,5 Bb	0,0 Bc	0,0 Bc	0,0 Ac	0,0 Ac	0,0 Ac
40	0,0 Ac	2,9 Abc	5,5 Ba	3,2ABb	3,1 ABb	0,0 Bc	0,0 Bc	0,0 Ac	0,0 Ac	0,0 Ac
60	0,0 Ac	3,2 Aba	7,8 Aa	3,9Bb	3,4 Ab	0,0 Bc	0,0 Bc	0,0 Ac	0,0 Ac	0,0 Ac

(1) Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, nas colunas, e minúsculas iguais, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student a 5%

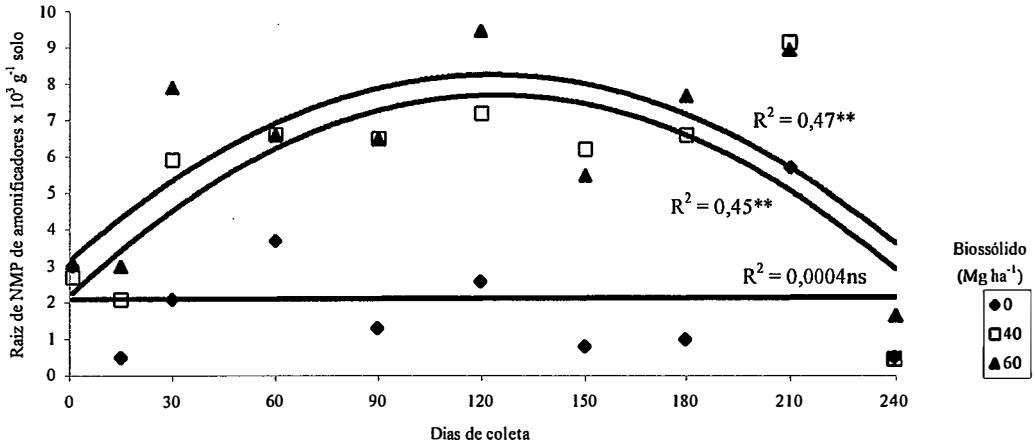

Figura 28 - Número mais provável de amonificantes x 10^3 g^{-1} solo, em solo tratado com doses de biossólido, em diferentes períodos de amostragem

4.4.8 Hidrólise de diacetato de fluoresceína (DAF) no solo

A taxa de hidrólise de diacetato de fluoresceína (DAF) foi afetada de modo significativo mais pelo período de amostragem do que pela incorporação de biossólido no solo, pois houve um aumento da atividade de DAF em todos os tratamentos, à medida que passou o tempo após a incorporação do biossólido (Tabela 14).

Tabela 14. Diacetato de fluoresceína hidrolisado [1] na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 240 dias

	Dias de coleta									
Biossólido (Mg ha^{-1})	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240
	(μ g DAF g^{-1} solo)									
0	61,0 Ac[2]	53,0 Bc	50,0 Bc	53,0 Bc	132,0 Ab	143,0 Aa	67,0 Bc	62,0 Cc	134,0 Ab	109,0 Bb
10	55,0 Ad	61,0 Bcd	56,0 Bcd	55,0 Bd	83,0 Bc	106,0 Bb	53,0 Bd	141,0 Aa	77,0 Bc	145,0 Aa
20	54,0 Ac	84,0 Ac	72,0 ABc	71,0 ABc	73,0 Bc	181,0 Aa	70,0 ABc	92,0 Bb	98,0 Bb	68,0 Cc
40	64,0 Ad	120,0 Aab	82,0 Ac	87,0 Ac	46,0 Cd	108,0 Bb	80,0 ABc	131,0 Aa	81,0 Bc	97,0 Bc
60	63,0 Ad	96,0 Ab	93,0 Ab	98,0 ABb	105,0 ABb	144,0 Aa	93,0 Ab	134,0 Aa	136,0 Aa	146,0 Aa

[1] Variável transformada por raiz de (x), [2] Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, nas colunas, e minúsculas iguais, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste t de Student 5%

Pelos dados da Tabela 14, observa-se que a estimativa de DAF hidrolisado não apresentou uma tendência de resposta à aplicação de biossólido no solo. Ou seja, essa medida não foi sensível o suficiente para expressar a atividade microbiana, durante a decomposição do biossólido no solo. Entretanto foi possível observar que a taxa de DAF hidrolisado apresentou, no 120^{o} dia, um

aumento significativo e independente da adição de biossólido, e que esse comportamento também foi determinado pelas medidas de qCO_2, porcentagem de celulose degradada, números totais de bactérias, fungos e amonificadores.

4.5 Resposta da microbiota do solo à adição de biossólido

De uma maneira geral, o impacto do biossólido sobre a atividade microbiana e os microrganismos do solo somente foi observado nas parcelas que receberam a incorporação de 40 e 60 Mg ha^{-1} de biossólido. Em doses abaixo de 20 Mg ha^{-1}, as mudanças proporcionadas no solo em geral não foram suficientes para ocasionar alterações significativas no comportamento da microbiota do solo, pois, durante o período de realização do experimento, verificou-se que as medidas microbiológicas determinadas nas parcelas com 10 e 20 Mg ha^{-1} de biossólido apresentaram comportamento similar ao observado na parcela sem a incorporação de biossólido.

Quando se analisam as médias das medidas microbiológicas do solo realizadas durante os 240 dias após a incorporação de biossólido, observa-se que a liberação de CO_2, biomassa microbiana, quociente metabólico, porcentagem de celulose degradada, número de bactérias e amonificantes representaram com maior confiabilidade a decomposição da matéria orgânica no solo. Foi possível verificar, analisando-se seus valores, uma tendência de variação relacionada com o consumo de substrato energético e nutrientes fornecidos pela adição de biossólido ao solo. Já o método de diacetato de fluoresceína hidrolisado não foi eficiente na quantificação da atividade microbiana durante a degradação da matéria orgânica no solo, e o número total de fungos foi sensível apenas durante os primeiros 120 dias.

Tendo como base o estudo de correlações, observa-se que os números totais de fungos e o diacetato de fluoresceína hidrolisado apresentaram os

menores valores de correlação com as demais medidas microbiológicas. Em relação à alteração na composição química do solo, verifica-se que apenas a liberação de CO_2, porcentagem de celulose degradada e o número de bactérias apresentaram correlações significativas com todas as características químicas determinadas no solo. Por outro lado, a atividade de diacetato de fluoresceína não apresentou correlação significativa com as características químicas do solo.

4.6. Resposta do eucalipto à aplicação de biossólido

O presente trabalho faz parte de um estudo sobre a aplicabilidade de biossólido em plantação de floresta de eucalipto. De acordo com os resultados determinados a respeito da liberação de nutrientes no solo, nutrição do eucalipto e rendimento de madeira, proporcionado pela aplicação superficial de doses de biossólido, tem se constatado que as concentrações de fósforo, potássio, cálcio e enxofre aumentam no solo à medida que se elevam as doses de biossólido, e que a menor dose de 10 Mg ha^{-1} de biossólido forneceu quantidades de potássio e cálcio no solo em concentrações suficientes para atender à demanda do eucalipto. Dentre esses elementos, o cálcio foi o nutriente que apresentou um incremento linear em sua concentração, em função das doses de biossólido aplicadas no solo, seguido depois pelo enxofre e pelo potássio (Poggiani et al., 1999).

A adição de biossólido nas dosagens de 10 a 40 Mg ha^{-1} não aumentou significativamente o teor total de N e N inorgânico no solo. A ausência de diferença entre os tratamentos poderia talvez ser explicada pela forma de aplicação do lodo (em linha, na superfície do solo) e também pela absorção do N inorgânico pelo extenso sistema radicular dos eucaliptos (Andrade & Mattiazzo, 2000).

Em relação à nutrição do eucalipto, foi constatado, seis meses após a incorporação de 10, 20 e 40 Mg ha^{-1} de biossólido, que o teor de nitrogênio foliar

foi maior do que aquele observado no tratamento com adubação mineral. Quanto ao fósforo, foi verificado, após quatro meses da aplicação de biossólido, que a concentração desse elemento nas folhas de eucalipto aumentou com as doses de biossólido, e a concentração mais elevada foi observada nas folhas das plantas que receberam a dose de 40 Mg ha^{-1} (Poggiani et al., 1999; Gonçalves, et al., 1999).

A elevação das doses de biossólido, entre 0 e 40 Mg ha^{-1}, com suplementação de potássio, resultou numa resposta quadrática em termos de produtividade de madeira com casca. A produtividade elevou-se de 6,4 para 24,0 m^3 ha^{-1}, após 1,5 ano de crescimento, quando se comparou a testemunha com o tratamento que recebeu 40 Mg ha^{-1}. Ainda neste mesmo estudo, foi verificado que a aplicação de 40 Mg ha^{-1} de biossólido, sem suplementação de potássio, resultou numa produtividade semelhante àquela obtida com esta mesma dose, com suplementação de potássio (Gonçalves, et al., 1999).

A dose de 40 Mg ha^{-1} proporcionou aumentos significativos na produção de madeira, porque com a adição dessa dose no solo, foram fornecidas quantidades elevadas de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio, conforme pode ser observado na Tabela 15. Caso essa quantidade de biossólido fosse aplicada em culturas agrícolas de grãos, por exemplo, as plantas talvez não tivessem a capacidade de absorver uma grande parte desse nutriente, que fatalmente seria lixiviado no solo e contaminaria o lençol freático. Porém, quando essa dose é recomendada para reflorestamento de eucalipto, as possibilidades de contaminação do lençol freático parecem ser bem mais reduzidas, devido ao rápido crescimento dessa cultura, que passa a concentrar esses nutrientes em sua biomassa e não no solo.

Torna-se, pois, extremamente importante fazer-se um trabalho de pesquisa com acompanhamento detalhado da cinética de mineralização do

carbono e do nitrogênio do biossólido, a fim de permitir um adequado dimensionamento das doses a serem utilizadas nas diferentes culturas.

Tabela 15. Quantidade de nutrientes incorporados ao solo pela adição de doses de biossólido.

Elementos	Lodo	10	20	40	60
	$g\ kg^{-1}$	---------- (kg ha^{-1}) ----------			
Nitrogênio	18,66	186,6	373,2	746,4	1119,6
Fósforo	9,4	94,0	188,0	376,0	564,0
Potássio	1,96	19,6	39,2	78,4	117,6
Cálcio	86,4	864	1728	3456	5184
Magnésio	3,80	38	76	156	228
	$mg\ kg^{-1}$				
Cádmio	traços				
Cobre	900	9,0	18	36	54
Crômio	268	2,6	5,2	10,4	15,6
Ferro	55056	550,5	1101	2202	3303
Níquel	222	2,2	4,4	8,8	13,2
Zinco	1632	16,3	32,6	65,2	97,8

5 CONCLUSÕES

A adição de biossólido ocasionou mudanças nas características químicas e alterações na atividade microbiana do solo. Essas alterações ocasionaram variações nos valores de CO_2 liberado, biomassa microbiana, quociente metabólico, celulose degradada, números totais de bactérias, fungos e amonificantes no solo.

A produção de CO_2 no solo com adição de biossólido ocorreu em três fases: uma, de redução, indicando que os microrganismos necessitam de um determinado tempo para se adaptar ao novo substrato energético e às novas condições do solo; outra, de estímulo, com a elevação da atividade microbiana pelo aumento na oferta de frações lábeis de matéria orgânica e nutrientes minerais; uma fase estacionária; e, finalmente a última fase, com o declínio na quantidade de CO_2 liberado do solo, devido à redução de substratos energéticos e nutrientes. Esse comportamento indica que a medida de CO_2 refletiu claramente a decomposição do biossólido no solo.

A medida de biomassa microbiana de carbono foi sensível à incorporação de biossólido, e a maior intensidade respiratória foi acompanhada por uma menor imobilização de carbono na biomassa, resultando no aumento do quociente metabólico.

A atividade dos microrganismos celulolíticos foi estimulada pela aplicação de biossólido, pois a taxa de degradação da celulose esteve estreitamente relacionada com a liberação de CO_2, biomassa microbiana,

quociente metabólico e carbono orgânico do solo. Isso indica que essa medida poderá ser utilizada para avaliar o impacto da incorporação de biossólido ao solo.

O número mais provável de bactérias foi influenciado pela aplicação de biossólido, com a variação desse número acompanhando uma curva característica de crecimento bacteriano, incluindo as fases lag, log, estacionária e de declínio populacional, conforme ocorreu com a liberação de CO_2.

O número de fungos aumentou acentuadamente, em função da dose de biossólido incorporada ao solo, até o 30^o dia, e, depois, diminuiu até o 120^o dia, com um posterior crescimento no 150^o dia, motivado provavelmente pela variação sazonal, tendo em vista que o aumento ocorreu independentemente das doses aplicadas.

Os amonificadores e a concentração de NH^+_4 mineralizado no solo aumentaram com as doses de biossólido aplicadas, certamente devido ao conteúdo de nitrogênio orgânico existente no biossólido.

No período de 240 dias de avaliação a atividade de hidrólise de diacetato de fluoresceína não foi sensível para quantificar a atividade microbiana durante a decomposição do biossólido no solo.

ANEXO

ANEXO A

Valores médios de C-CO_2 liberado por hora em amostras de solo colhidas um dia antes e em diversos períodos após a aplicação de biossólido e incubados na presença de NaOH por seis dias consecutivos.

	Dias de coleta													
Biossólido (Mg ha^{-1})	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
	(μg C- CO_2 g^{-1} solo)													
0	500,0	700,0	900,0	600,0	700,0	400,0	500,0	400,0	400,0	200,0	269,3	213,0	265,9	379,5
10	400,0	100,0	800,0	400,0	1200	600,0	800,0	1500	900,0	300,0	230,0	322,7	318,8	340,0
20	600,0	100,0	1600,0	1300,0	1800	1100	1300	1000	800,0	600,0	510,2	459,0	490,9	604,5
40	400,0	90,0	2900.0	1800	4000	2700	1300	1200	1600	1000	2837	1355,6	2192,0	1282
60	900	100	4500	2600	3800	3700	4000	3000	2600	3800	2909	1869,4	3051.1	1914

ANEXO B

Número mais provável de amonificantes na camada de 0-10 cm de profundidade de solo tratado com doses de biossólido, após diferentes períodos de tempo, até 360 dias.

Biossólido (Mg ha^{-1})	Dias de coleta													
	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
	(NMP de amonificantes x 10^3 g^{-1} solo)													
0	9,2	0,2	4,6	14,2	1,6	8,1	0,7	1,2	32,1	0,4	0,6	0,5	0,3	0,4
10	7,4	0,7	12,9	9,4	3,4	42,5	0,8	2,3	39,9	0,2	0,5	0,6	0,4	0,2
20	11,8	2,6	9,8	12,2	3,8	68,6	1,1	35,6	66,8	0,4	0,3	0,7	0,5	0,4
40	7,4	5,2	61,1	44,6	37,8	59,9	34,1	54,2	82,3	0,2	0,4	0,5	0,3	0,2
60	9,8	9,6	61,8	53,4	50,4	91,7	30,2	62,4	82,7	2,9	1,2	0,9	0,6	0,8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M.**Introduction to soil microbiology**.2.ed. New York: J. Willer, 1977. 467p.

ALVAREZ, R.; DÍAZ, R.A.; BARBERO, N. et al. Soil organic carbon, microbial biomass and CO_2-C production from three tillage systems.**Soil Tillage Research**, v. 33, p. 17-28, 1995.

ANDRADE, C.A.; MATTIAZZO, M.E.Volatilização de amônia após adição de lodo de esgoto a um latossolo vermelho amarelo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27, Brasília, 1999. **Anais.** Brasilia SBCS, 1999. p.102.

ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K.H.A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils.**Soil Biology and Biochemistry**, v.1, p.215-221,1978.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H.Determination of eco-physiological maintenance requirements of microorganisms in dormant state.**Soil Biology and Biochemistry**, v.1, p.81-89,1985.

AOYAMA, M.;ITAYA, S.Efects of cooper on the metabolic of 14C-labeled glucose in soil in relation to amendment with organic materials.**Soils Science and Plant Nutrition**, Japan, v.14, n.2, p. 245-252, 1995.

BAATH, E. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and population (a review). **Water Air Soil Pollution, v**.47, p.335-379, 1989.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. et al.Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, n.4, p.641-649, 1998.

BARTLETT, R.J.; KIMBLE, J.M.Behavior of Chromium in Soils: II. Hexavalent forms.**Journal of Environmental Quality**, v.5, n. 4, p. 383-386, 1976.

BENEDETTI, A.; CECCANTI, B.; CALCINAI, M. et al.Decomposition of chromium-containing leather residues in a sandy soil, **Suelo y Planta**, v. 1, n. 1, p. 15-24, 1991.

BERTOCINI, I.E.; MATTIAZO, M.E.Lixiviação de metais pesados em solos tratados com lodo de esgoto.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, n.3, p.737-744, 1999.

BERTON, R.S.; CAMARGO, O.A.;VALADARES, J.M.A.S.Absorção de nutrientes pelo milho em resposta a adição de lodo de esgoto a cinco solos paulistas.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.13, p.187-190, 1989.

BETTIOL,W.; CARVALHO,P.C.T.Utilização de lodo de esgoto primário e fertilizantes organo mineral IPT na cultura do milho. **Fertilizantes**, v.4, n.1, p.14-15. 1982.

BETTIOL, W.; AUER, C.C.; KRUGNER, T.L. et al.Influência de lodo de esgoto e de acículas de pinus na formação de ectomicorrizas em mudas de *Pinus caribea* Var.hondurensis pelos fungos *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris*. **IPEF,** Piracicaba, v.34, p.41-46, 1986.

BEWLEY, R.J.F.; STOTZKY, G.Effects of cadmium and simulated acid rain on ammonification and nitrification of soil.**Archives Environmental Contamination Toxicology**, v.12, p.421-426, 1983.

BOEHM, M.J.; HOITINK, H.A.J.Sustenance of microbial activity in potting mixes and its impact on severity of *Pythium* root rot of *Poinsettia*.**Phytopathology**, v.82, n. 3, p.259-264,1992.

BONDE, T.A.; SCHURER, J.; ROSSWALL, T.Microbial biomass a fraction of potentially mineralizable nitrogen in soils from long-term field experiments. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p. 447-452, 1988.

BREMMER, J.M. Total Nitrogen. In: BLACK, C.A. et al; Ed **Methods of Soil Analysis**. Madison: American Society of Agronomy. 1965. p. 1149-1178.

BRENDECKE, J.W.; AXELSON, R. D.; PEPPER, I.L.Soil microbial activity as an indicator of soil fertility: long-term effects of municipal sewage sludge on an arid soil.**Soil Biology and Biochemistry**, v.25, n.6, p. 751-758, 1993.

BROOKES, P. C.The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals.**Biology and Fertility of Soils**, v. 19, n. 4, p. 269-279, 1995.

BROOKES, P. C.; MCGRATH, S.P.Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass.**Journal of Soil Science**, v. 35, p.341-346, 1984.

BURNETT, G.W.; PELCZAR JUNIOR, M. J.; CONN, H.J.Preparation of media. In: Society of American Bacteriologists. **Manual of Microbiological Methods.** New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Company, 1957. 315p.

BURKE, I.C.; ELLIOT, E.T.; COLE, C.V.Influence of macroclimate, landscape position, and management on soil organic matter in agroecosystems.**Ecology Applied**, v.5, p.124-131, 1995.

CAMPBELL, C. A.; MOULIN, A.P.; BOWREN, K.E. et al.Effect crop rotations on microbial biomass, specific respiratory activity and mineralization nitrogen in a Black Chenorzenic soil.**Canadian Journal Soil Science,** v.72, p.417-427, 1992.

CATELLAN, A.J; VIDOR, C.R.Flutuação a biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.1, p.133-142, 1990.

CERRI, C.C.; VOLLKOFF, B.; EDUARDO, B.P.Efeito do desmatamento sobre a biomassa microbiana em Latossolo Amarelo da Amazônia.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, n.1, p.1-4, 1985.

CETESB. Sistema de aplicação de biossólidos e lodos de tratamentos biológicos em áreas de uso agrícola – critérios para projeto e operação. São Paulo, 1999. 29p. (Norma P 4.230).

CHANDER, K. & BROOKES, P.C.Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam.**Soil Biology Biochemistry**, v.25, p.1231-1239, 1993.

CHANDER, K., BROOKES, P.C.; HARDING, S. A.Microbial biomass dynamic following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam.**Soil Biology and Biochemistry**, v.27, n. 11, p. 1409-1421, 1995.

CHEN, W., HOITINK, H.A.J.; MADDEN, L.V. Microbial activity and biomass in container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*.**Phytopathology**, v.78, n.11, p.1447-1450, 1988

CHEN,W.; HOITINK, H.A.J.; FRITZ SCHIMITTHERNNER, A. et al.The role microbial activity and biomass in suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v.78, n.3, p.314-322, 1988.

CINTRA, A.A.D.; DODSON, M.S.; SILVA, T.E. et al.N-amoniacal e N-nitrato em latossolo roxo tratado com lodo de esgoto contaminado com doses crescentes de crômio e cultivado com sorgo granífeo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, Rio de Janeiro. 1997. **Anais**. Rio de Janeiro, 1997. p.481.

COOK, K.A.; GREAVES, M.P.Natural variability in microbial activities. In: SOMMERVILLE, L.;GREAVES, M.P. (Ed) **Pesticide effects on soil microflora.** London, New York, Philadelphia: Taylor and Francis, 1987. pp 15-43.

DAR, G.H.Effects of cadmium and sewage-sludge on soil microbial biomass and enzyme activities.**Bioresource Technology**. V.56, n.2-3, p.141-145, 1996.

DELLA BRUNA, E.; BORGES, A.C.; FERNANDO, B. et al.Atividade da microbiota de solos adicionados de serapilheira de eucalipto e de nutrientes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.15, p.15-20, 1991.

DENNIS, G.L.; FRESQUEZ, P.R.The soil microbial community in a sewage-sludge-arid grassland.**Biology and Fertility Soils**, v.7, n 4, p. 310-317, 1989.

DIAS-JÚNIOR, H. E.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.et al.Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, n.4, p.631-640, 1998.

DIEZ, J.A.; POLO, A.; GUERRERO, F.Effect of sewage sludge on nitrogen availibility in peat.**Biology and Fertility of Soils**, v.13, n.4, p.248-251, 1992.

DODSON, M.S.; CINTRA, A.A.D.; SILVA, T.E. et al.Biomassa microbiana em latossolo roxo tratado com lodo de esgoto contaminado com doses crescentes de crômio e cultivado com sorgo granífeo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, Rio de Janeiro. 1997. **Anais.** Rio de Janeiro, 1997. p.480.

DOMMERGUES, Y.; MANGENOT, F.**Écologie microbienne du sol**. Paris: Masson, 1970, p.796.

DUXBURY, T.Ecological aspects of heavy metal responses in micro-organisms. **Advance Microbiology Ecology**, v.8, p.185-235, 1985.

EIVAZI, F.; ZAKARIA, A.Beta-Glucosidae activity in soil amended with sewage sludge.**Agriculture, Ecosystems and Environmental**, v. 43, n.2, p. 155-161, 1993.

FAVARETTO, N.; DESCHAMPS, C.; MOTTA, A.C.V.Efeito do lodo de esgoto na fertilidade do solo e no crescimento e produtividade de milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, Rio de Janeiro. 1997**. Anais**. Rio de Janeiro, 1997. p.494**.**

FEIGL, B.J.; SPARLING, G.P.; ROSS, D.J. et al.Soil microbial in Amazonian soils: Evaluation of methods and estimates of pool sizes.**Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.1467-1472, 1998.

FERNANDES, F., ANDRAUS, S., ANDREOLI, C.V. et al.Eficiência dos processos de desinfecção do lodo da ETE-Belém com vista a seu uso agrícola.**Sanare**, v.5, n.5, p.46-58. 1996.

FLIESSBACH, A; MARTENS, R.; REBER, H.H.Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge.**Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n.9, p. 1201-1205, 1994.

GERALDES, A.P.A.Carbono, nitrogênio e biomassa microbiana do solo de uma cronossequência floresta-pastagem em Paragominas, Pará (Amazônia Oriental).Piracicaba., 1993. 68p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

GHINI, R.; MENDES, M.D.L.M.; BETTIOL,W.Método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*.**Summa Phytopathologica**, v.24, n.3/4, p. 239-242, 1998.

GRISI, B.M.; GRAY, T.R.G.Comparação dos métodos de fumigação, taxa de respiração em resposta à adição glicose e conteúdo de ATP para estimar a biomassa microbiana do solo.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.109-115, 1986.

GONÇALVES, J.L.M.; STAPE, J.L.; POGGIANI, F.et at.**Efeito do lodo de esgoto na fertilidade do solo e crescimento das árvores (subprojeto 3)**. Piracicaba: IPEF/ESALQ/USP-SABESP, 1999. 77p. (Relatório de pesquisa nº 6).

HASSEN, A. JEDIDI, N.; CHERIF, M.; HIRI, A. et al.Mineralization of nitrogen in a clayey loamy soil amended with organic wastes enriched with Zn, Cu and Cd.**Bioresource Tecnology**, v.64, p.39-45, 1998.

HATORI, H.Influence of cadmium on decomposition of sewage sludge and microbial activities in soils.**Soil Science and Plant Nutrition**, v.35, n.2, p.289-299, 1989.

HATORI, H.Influence of heavy metals on soil microbial activities.**Soil Science and Plant Nutrition**, v.38, n.1, p.93-100, 1992.

HENDRIX, P.F.; HAN, C.R.; GROFFMAN, P.M.Soil respiration in conventional and no-tillage agroecosystems under different winter cover crop rotations. **Soil Tillage Research**, v.12, p.135-148, 1998.

HIROKI, M.Effects of heavy metal contamination on soil microbial population. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.38, n.1, p.141-147, 1992.

INSAM, H.; MITCHELL, C.C.; DORMAR, J.F.Relationship of soil microbial biomass and activity with fertilization practice and crop yield of three ultisols. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, p. 459-464, 1991.

JAHNEL, M.C.Método de plaqueamento por gotas e outros parâmetros microbiológicos na avaliação da degradação de lodo ativado de curtume em solos. Piracicaba. 1997. 79 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

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**, v.23, n.3, p. 553-559, 1999.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S.The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. A method for measuring soil biomass.**Soil Biology and Biochemistry,** v.8, p.209-213, 1976.

JUAREZ, M.; SANCHEZ-ANDREW, J.; MATAIX, J.Interese agricola de lodos de depuradores de águas resíduales. An.**Edafology Agrobiology.,** v.16, p.211-228, 1987.

JORGE, J.A.; CAMARGO, O.A.; VALLADARES, J.M.A.S.Condição físicas de um Latossolo Vermelho-Escuro quatro anos após aplicação de lodo de esgoto e calcário.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.15, p. 237-240, 1991.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H.**Trace elements in soil and plants**. 3. ed. Boca Raton: CRP Press, Inc., 1985. 315p.

KILLHAM, K.; FIRESTONE, M.Salt strees control of intracellular solutes in streptomycetes indigenous to saline soils.**Applied Enviromental Microbiology**, v 47, p. 301-306, 1984.

KIRKHAM, M.B.Agricultural use of phosphorus in sewage sludge.**Advance Agronomy**, v.35, p.129-163, 1982.

LAKE, D. L.; KIRK, W.W.; LESTER, J.N.Fractionation, characterization and speciation of heavy metals in sewage sludge amended soils: a rewiew. **Journal Environmental Quality**, v.13, p.175-183, 1984.

LEITA, L.; NOBILI, M.; MUHLBACHOVA, G. et al.Biovailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass surnival during laboratory incubation.**Biology and Fertility of Soils**, v. 19, n. 2/3, p. 103-108, 1995.

LESLIE, R.Liquid sludges as a farm fertilizer.**Compost Science,** v.11, p. 24-25, 1970.

LINDSAY, W.L.; NORWELL, W.A.Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and cooper.**Soil Science Soceity American Journal**, v.42, p.421-428,1978.

LINDERMAM, W.C.; FRESQUEZ, P.R.; CARDENAS, M.Nitrogen mineralization in coal mine spoil and topsoil.**Biology and Fertility of Soils**, v.7, n. 4, p.318-324, 1989.

LO, K.L.S.; YANG, W.F.; LIN, Y.C.Effects of organic matter on the especific adsorrption of heavy metals by soils.**Toxicology Environmental Chemistry** 1992.

LOGAN, T.J.; CHANEY, R.L. Metals. In: WORKSHOP ON UTILIZATION OF MUNICIPAL WASTEWATER AND SLUDGE ON LAND, Riverside, 1983. **Proceedings**. Riverside, University of California, p.235-323, 1983.

LOTH, F.G.; HOFNER, W.Influence of sewage sludge treated soils on infectivity of VA-mycorrhizal fungi isolates in diferrent plants. Agribiological Research, v.48, n.3/4, p.269-281, 1995./**Resumo em CAB Abstract on CD-ROM**, 1979-82/.

LOURENÇO, R. S.; ANJOS, A . R. M dos.; LIBARDI, P. L.Efeito do lodo de esgoto na produdividade de milho e feijão, no sistema de produção da bracatinga.**Sanare**, v. 5, n.5, p. 90-92. 1996.

MANDELBAUM, R.; HADAR, Y.Effects of available carbon source on microbial activity and suppression of *Pythium aphanidermatum* in compost and peat container media.**Phytopathology**, v.80, n.9, p.794-804, 1990.

MARCHIORI JÚNIOR, M.; MELO, W.J.Carbono, carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 2, p. 257-263, 1999.

MARCIANO, C.R.Incorporação de resíduos urbanos e as propriedades físico-hídricas de um Latosssolo Vermelho-Amarelo. Piracicaba. 1999. 93p. Tese (Doutorado)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M.E.Comportamento de Cu, Cd, Cr, Ni e Zn adicionados à solos de clima tropical em diferentes valores de pH. Piracicaba. 1994. 197 p. Tese (Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MAYS, D.A., TERMAN, G.L.; DYGAN, J.C.Municipal compost: effects on cup yield and soil properties.**Journal Environmental of Quality**, v.2**,** p. 89-92, 1973.

MAZZARINO, C.; CIAVATTA, C.; MONTECCHIO, D. et al.Effects of lead pollution on different soil enzime activities.**Biology and Fertility Soils**, v.22, p. 53-58, 1998.

MCGRATH, S.P.Effects of heavy metals from sewage sludge on soil microbes in agricultural ecosystems. In: ROSS, S.M. (Ed.) **Toxic metals in the soil-plant system**. Wiley and Sons, 1994, p.247-274.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; SANTIAGO, G. et al.Efeito de doses crescentes de lodo de esgoto sobre frações da matéria orgânica e CTC de um latossolo cultivado com cana-de-açúcar.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 449-455, 1994.

MENZIES, J.D.Fungi. In: BLACK, C.A.; Ed **Methods of Soil Analysis.** Madison: American Society of Agronomy. v. 2, 1965. cap.107, p.1502-1505.

MIYASAKA , S.; CAMARGO, O. A.; CAVALERI, P. A.; E outros. Adubação orgânica, adubação verde e rotação de culturas no Estado de São Paulo. Fundação Cargil, 1983, p.17-18.

NASCIMENTO, J.S.do; CASTILHOS, D.D.; VAHL, L.C. et al.Decomposição da celulose num planossolo submetido a diferentes sistemas de cultivo.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.17, p.481-484, 1995.

NUERNBERG, N.J.; VIDOR, C.R.; STAMMEL, J.G.Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade de microbiana do solo.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, p.197-203, 1984.

OADES, J.M.; JENKINSON, D.S. Adenosine hiphosphate content of the soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 11, p. 201-204, 1979.

OCIO, J.A.; BROOKES, P. C.An evaluation of methods for measuring the microbial biomass in soils following recent additions of wheat straw and the caracterization of the biomass that develops.**Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p. 685-694, 1990.

OLIVEIRA, F.C. Metais pesados e formas nitrogenadas em solos tratados com lodo de esgoto. Piracicaba. 1995. 90p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, F.C; MARQUES, M.O; BELLINGIERI, P.A. et al.Lodo de esgoto como fonte de macronutrientes para cultura do sorgo granífero.**Sciencia Agrícola**, v.52, p.360-367,1995.

ORTIZ, O.; ACANIZ, J.M.Respiration potential of microbial biomass in a calcareous soil treated with sewage sludge.**Geomicrobiology Journal**, v.11, n. 3/4, p.330-340, 1993.

PARKER, C.F.; SOMMER, L.E.Mineralization of nitrogen in sewage sludges. **Journal of Environmental Quality**, v.12, n.1, p.150-156, 1983.

PENNING, L.; EDUARDO, B.P.; CERRI, C.C.Os métodos da fumigação-incubação e fumigação-extração na estimativa da biomassa microbiana de solos da Amazônia.**Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v.16, p.31-38. 1992.

POGGIANI, F.; LIMA, W.P.; GONÇALVES, J.M. et al.**Monitoramento da movimentação (ciclagem) dos nutrientes e metais na biomassa florestal, na vegetação do sub-bosque e na água dos mananciais (subprojeto 4).** Piracicaba: IPEF/ESALQ/USP-SABESP, 1999. 63P. (Relatório de pesquisa n.5).

POST, R.D.; BEEBY, A.N.Microbial biomass in suburban roaside soils estimates based on extracted microbial C and ATP.**Soil Biology and Biochemistry**, v.25, p.199-204, 1993.

POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; CHRISTESEN, B.T.Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of charges in total soil organic matter due to straw incorporation.**Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.159-164, 1987.

RAIJ, B. van; QUAGGIO, J. A; CANTARELLA, H. et al.Análise química do solo para fins de fertilidade. Campinas, Fundação Gargill, 1987. p.170.

RAPPAPORT, B.D.; MARTENS, D.C.; RENEAU JR., R.B. et al.Metal availability in sludge-amended soils with elevated metal leves.**Journal Quality Environment**, v.17, p.42-47, 1988.

REDDY, G.B.; DUNN, S.J.; ROSS, S.M.Nitrogen transformations in sludge amended soils. **Science of the Total Environmental**, v. 37, n. 2/3, p. 163-169, 1987.

ROTHER, J.A.; MILLBANK, J.W.; THORNTON, I.Seasonal of fluctuations in nitrogen fixation (acetylene reduction) by free-living bacteria in soils contaminated with cadmium, lead and zinc.**Journal Soil Science**, v.33, p.101-113, 1982.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H.Flow injection Analysis.**Analysis Chemical Acta**, v.78, p. 569-584, 1975.

SABESP. Projeto Tiête. **Revista Engenharia**, n. 527, p.82-90, 1998.

SAKAMOTO, K.; OBO, Y.Effects of fungal to bacterial ratio on the relatioship between CO_2-evolution and total soil microbial biomass.**Biology and Fertility of Soils**, v.17, p.39-44, 1994.

SAFFIGNA, P.G.; POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.et al.Influence of sorghum residues and tillage on soil organic matter and soil microbial biomass in an Australian Vertisol.**Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, p. 759-765, 1989.

SANTOS, H.F.Uso agrícola do lodo das estações de tratamento de esgoto sanitários (ETEs): Subsídios para elaboração de uma norma brasileira. São Paulo. 1996. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Mackenzie.

SANTOS, O.M.; GRISI, M.B.Decomposição da celulose e do folhedo em solo de floresta no sul da Bahia: estudo comparativo em áreas queimada e não queimada.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.3, p.149-153, 1978.

SARATHCHANDRA, S.V.Nitrification activities and the changes in population of nitrifing bacteria in soil perfused with two different H-ion concentracions. **Plant and Soil**, v.50, p.99-111, 1978.

SAS INSTITUTE INCORPORATION.**The SAS-System for Windows release 6.11** (software). Cary, North Carolina: SAS Institute Incorporation, 1996

SAWHNEY, B. L.; NORVELL, W. A.**Sewage sludge for plant growth: benefits and potencial harzads**. Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, 22p. (Bulletin, 788), 1980.

SCHURER, J.; ROSSWALL, T.Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter.**Applied and Environmental Microbiology**, v.43, n.6, p.1256-1261, 1982.

SERNA, M.D.; POMARES, F.Nitrogen mineralization in soil amended with sewage sludge and fly ash.Biology and Fertility of Soils. v.12, n.3, p.199-201, 1991.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C.R.As práticas de manejo de solo na população microbiana.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.8, p.291-296, 1978.

SILVA, F.C.; BOARETTO, A.E.; BERTON, R.S. et al.Cana-de-açúcar cultivada em solo adubado com lodo de esgoto.**Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.1-8, 1998.

SISTRON, W.R.**A vida dos micróbios**. Tradução de K.G.Hell. São Paulo: Pioneira, 1973. 149p.

SKVORTSOVA, N.I.; ZVYAGINTSEV.; BELITSYNA, G.D.Microbial subcultures from ordinary from ordinary chernozen polluted with heavy metals. Vestnik Moskovskogo Universiteta.**Pochvedenie**, v.43, n.4, p.68-70, 1988.

SÖDERSTRÖN, B.; BAATH, E.; LUNDGREN, B.Decrease in soil microbial activity and biomass owing to nitrogen amendment.**Canadian Journal Microbiology**, v 29, p.1500-1506, 1983.

SPARLING, G.P.; WEST, A.W.A direct extraction method to estimation soil microbial C. Calibration *in situ* using microbial respiration and ^{14}C labelled cells.**Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p.337-343, 1988.

SPARLING, G.P.; ZHUN, C.Evaluation and calibration of biochemical methods to measure microbial biomass C and N in soils from Western Australia.**Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.1793-1801, 1993.

SWISHER, R.; CARROLL, G.C.Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces.**Microbiology Ecology**, v.6, p.217-226, 1980.

STOTZKY, G.Microbial respiration. In: BLACK, CA. et al. (Ed.) **Methods of soil analysis.** American Society Agronomy, Madison, Wisncosin, 1965, p 1550-1570.

STOTZKY, G.; BOLLAG, J.M.**Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1990. p565.

TAUK,M.S.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; PETENATE, A.Modelo ecológico dos nutrientes, microrganismos e atividade enzimática de solo sob vegetação de cerrado tratado com vinhaça, Corumbataí, SP.**Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.21, p. 99-108, 1990.

TERRY, R.E.; NELSON, D.W.; SOMMERS, E.Carbon cycling during sewage sludge decomposition in soils.**Soil Science Society of America Journal**, v.43, p.494-499, 1979.

TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS,C.; GIL-SOTRES, S. et al.Towards a biochemical quality index for sois: An expression relating several biological and biochemical properties.**Biology Fertility Soils**, v.26, p.100-106, 1998.

TSUTYA, M.T.Tecnologias emergentes para a disposição final de biossólidos das estações de tratamento de esgotos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 20, 1999, Riode Janeiro, RJ. **Anais.** Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambieental, 1999. 10p.

TYLER, G.Heavy metals in soil biology and biochemistry. In: PAUL, E. A.: LAAD, J.N. (Ed.) **Soil biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1981.v.5, p.371-414.

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

VARGAS, L.K.; SCHOLLES, D.Biomassa microbiana e produção de C-CO_2 e N mineral de um podzólico vermelho-escuro submetido a diferentes sistemas de manejo.**Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v.24, n.1, p.35-42, 2000.

VASCONCELLOS, C.A.; CAMPOLINA, D.C.A.; SANTOS, F.G. et al. Resposta da soja e da biomassa de carbono do solo dos resíduos de cinco genótipos de sorgo.**Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, n.1, p.1-188, 1999.

VERDU, I.; GOMEZ, I.; BURLO, F.; MATAIX, J.Influence of phosphorus on nitrogen mineralization of sewage sludge in two calcareous soils. Application of EUF.**Suelo y Planta**, v.22, n.1, p.151-161, 1992.

VERHAEGEN, K.; van KLEEMPUT, O.; VERSTRAETE, W.Nitrification mediated nitrosation of organics and effects on microbial biomass.**Biology Wastes**, v.26, p.235-245, 1988.

VICENT, A. J.; CHITCHLEY, R.F.A Review of Sewage Sludge Treatment and Disposal in Europe. In: BRUCE, A (Ed.) **Sewage sludge stabilisation and desinfection**. Chichester U.K, 1984, p.550-580.

VICTORIA, R.L.; PICCOLO, M.C.; VARGAS, A. A. T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, SM.; NEVES, M.C.P. (Ed) **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. Cap. 8, p.105-119.

VISSER, S.; FUJIKAWA, J.; GRIFFITHS, C.L. et al.Effect of topsoil storage on microbial activity, primary productivity and decomposition potential.**Plant and Soil**, v.85, p.41-50, 1984.

VOOS, G.; SABEY, B.R.Nitrogen mineralization in sewage sludge amended coal mine spoil and topsoils.**Journal and Environmental Quality**, v.16, n.3 p.231-237, 1992.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D.Comparasion of physiological techniques for estimating the response of the soil microbial biomass to soil moisture.**Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.817-823,1990.

WILSON, D. O.Nitrification in soil treated with domestic and industrial sewage sludge.**Environmental Pollution**, v.12, p.73-82, 1977.

WITTER.E.; GILLER, K.E.; MCGRATH, S.P.Long-term effects of metal contamination soil microorganisms.**Soil Biology and Biochemistry**, v.26, n.3, p.421-422, 1994.

WONG J.W.C.; LI, S.W.Y.; WONG, M.H.Coal fly ash as a composting material for sewage sludge: Effects on microbial activities.**Environmental Technology**, v.16, p.527-537. 1995.

ZABLOTOWICZ, R.M.; LOCKE, M.A.; SMEDA, R.J.Degradation of 2,4-D and fluometuron in cover crop residues.**Chemosphere**, v.37, n.1, 87-101, 1998.