



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KELLEN BANHOS DO CARMO

**EFEITOS DO LODO DE ESGOTO E DO FOSFATO DE
GAFSA EM PROPRIEDADES QUÍMICAS, BIOQUÍMICAS E
MICROBIOLÓGICAS DE UM LATOSSOLO VERMELHO**

KELLEN BANHOS DO CARMO

**EFEITOS DO LODO DE ESGOTO E DO FOSFATO DE
GAFSA EM PROPRIEDADES QUÍMICAS, BIOQUÍMICAS E
MICROBIOLÓGICAS DE UM LATOSSOLO VERMELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção de título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina
2010

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G435e Carmo, Kellen Banhos do.
Efeitos do lodo de esgoto e do fosfato de Gafsa em propriedade químicas, bioquímicas e microbiológicas de um latossolo vermelho / Kellen Banhos do Carmo. – Londrina, 2010.
53 f. : il.

Orientador: Marco Antonio Nogueira.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2010.
Inclui bibliografia.

1. Solos - Fertilidade – Teses. 2. Microorganismos do solo – Teses. 3. Fertilizantes fosfatados – Teses 4. Lodo de esgoto. Teses 5. Águas residuais como fertilizantes. – Teses 6. Milho - Solos. Teses. I. Nogueira, Marco Antonio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Teses III. Título.

CDU 543

KELLEN BANHOS DO CARMO

**EFEITOS DO LODO DE ESGOTO E DO FOSFATO DE GAFSA EM
PROPRIEDADES QUÍMICAS, BIOQUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS
DE UM LATOSSOLO VERMELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção de título de Mestre em Microbiologia

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco A. Nogueira (Orientador)
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Osmar Rodrigues Brito (Banca)
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Waldemar Zangaro Filho (Banca)
UEL – Londrina - PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, por nunca medir esforços em todas as etapas deste trabalho e por transmitir todos os conhecimentos necessários para a realização desta dissertação.

Ao prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira pela concessão da casa de vegetação e o fornecimento das sementes de milho e ao prof. Dr. Ayres de Oliveira de Menezes Junior que forneceu o Fosfato de Gafsa.

À Companhia de Saneamento do Paraná (Sanepar) por fornecer o lodo de esgoto; aos programas de pós-graduação em Microbiologia (CCB) e Agronomia (CCA) e ao CNPq pela bolsa de estudos.

À equipe do laboratório de Ecologia Microbiana: prof. Dr. Galdino Andrade Filho, Marta, Vivian, Luciana, Cristiane, Junior, Suzana, Fernanda, Viviana, Eik, Dáfila, Luis, Nagomi, Lucilene, Carina, Renato, Jamile, Flávia, Cintia, Daniel e Marina por todos os momentos construídos cientificamente ou festeiramente.

Aos meus pais Antonio e Eglen pelos valores morais e intelectuais recebidos; às minhas três irmãs: Kalinka, Kalinne e Karolinne por todo incentivo e carinho de irmãs mais velhas; aos meus cunhados por serem sempre prestativos; ao exemplo de mulher que compartilha toda sua fé e bondade, a matriarca da família, Elydia Maria Banhos.

Aos meus sobrinhos Jorge Mali Neto e Rodrigo Ontiveros Filho, quem já está por vir, os quais são a mais nova alegria da minha vida.

Por último, mas não por menos, agradeço ao meu amor: Augusto César, por saber me amar em todos os momentos.

CARMO, Kellen Banhos do. **Efeitos do lodo de esgoto e do fosfato de Gafsa em propriedades químicas, bioquímicas e microbiológicas de um Latossolo Vermelho**. 2008/2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2009.

RESUMO

A disposição final do lodo de esgoto pode ser viável na recuperação da fertilidade do solo agrícola devido principalmente ao aporte de carbono e nitrogênio orgânico. Por outro lado, fontes de fósforo de menor solubilidade, como os fosfatos naturais, têm sido empregadas como alternativa aos fertilizantes fosfatados solúveis. Nesse caso, inoculações de microrganismos capazes de solubilizar fosfatos naturais podem contribuir para a liberação e aumento da disponibilidade de fósforo para os vegetais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do lodo de esgoto, do fosfato natural reativo de Gafsa e a inoculação de isolado bacteriano solubilizador de fosfato nos atributos químicos, bioquímicos e microbiológicos em um Latossolo Vermelho cultivado com milho em casa de vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições em um arranjo fatorial 3x3x2, em que os fatores foram 3 doses de lodo de esgoto (0, 325, 650 g /vaso), 3 doses de fosfato de Gafsa (0, 5, 10 g/vaso) e 2 níveis de inoculação de bactéria solubilizadora de fosfato (com e sem) em vasos contendo 7 kg de terra. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5%. Não houve efeito do isolado bacteriano solubilizador de fosfato nas variáveis avaliadas, porém houve efeito da interação entre as doses de lodo e do fosfato de Gafsa. A biomassa das plantas e seus teores de nitrogênio e fósforo aumentaram com as doses de lodo e de fosfato de Gafsa, assim como os teores de nitrogênio total e carbono total do solo. O lodo de esgoto contribuiu em algumas propriedades químicas (fósforo e ctc), bioquímicas (fosfatase alcalina) e microbiológicas (biomassa microbiana de nitrogênio e nitrificadores) do solo, provavelmente devido ao aporte de carbono, nutrientes, e seu poder de correção da acidez do solo.

Palavras-chave: Fertilidade do solo. Fosfato natural. Biossólido. Milho. Enzimas do solo. Atividade microbiana.

CARMO, Kellen Banhos do. **Effect of sewage sludge and Gafsa phosphate on chemical, biochemical and microbiological properties of an oxisol.** 2008/2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2009.

ABSTRACT

The final disposal of sewage sludge can be viable in the recovery of agricultural soil fertility mainly due to addition of organic carbon and nitrogen. Moreover, less soluble phosphorus sources, such as rock phosphates, have been used as an alternative to phosphate soluble. In this case, inoculation of microorganisms capable in solubilizing rock phosphate can increase phosphorus availability to plants. The objective of this study was to evaluate the effects of sewage sludge, rock phosphate, and inoculation with P-solubilizing bacteria on some chemical, biochemical, and microbiological attributes in an Oxysoil cropped with maize in greenhouse. The experimental design was completely randomized with four replications and consisted of 3x3x2 factorial arrangement in which the factors levels were 3 doses of sludge (0, 325, 650 g/pot), 3 doses of Gafsa rock phosphate (0, 5, 10 g/pot) and 2 levels of P-solubilizing bacteria (with and without inoculation) in pots containing 7 kg of soil. The data were subjected to analysis of variance and mean comparisons by Tukey's test at 5%. There was no effect of the P-solubilizing bacteria on any assessed attribute, but there were effects of the interaction between sludge and rock phosphate. The plant biomass, and concentrations of nitrogen and phosphorus increased with increasing doses of sludge and phosphate, as well the total soil nitrogen and carbon. Sewage sludge improved some chemical (phosphorous and ctc), biochemical (alkaline phosphatase), and microbiological (microbial nitrogen biomass and nitrifying microorganisms) properties of soil, probably due to the contribution with carbon and nutrients, and in addition to its corrective effect of soil acidity.

Keywords: Soil fertility. Maize. Rock phosphate. Biosolid. Soil enzymes. Microbial activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados constituintes do fosfato natural de Gafsa	20
Tabela 2 – Caracterização química do Latossolo tratado com lodo de esgoto e fosfato de Gafsa, após o cultivo do milho.	30
Tabela 3 – Carbono orgânico total, carboidratos solúveis e condutividade elétrica em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa	34
Tabela 4 – Microrganismos nitritadores, nitratores, desnitrificantes, solubilizadores de fosfato e comprimento de raízes micorrizadas em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa	37
Tabela 5 – Atividades das enzimas desidrogenase, urease, celulase e fosfatase ácida em solo tratado com diferentes doses lodo de esgoto e fosfato de Gafsa.....	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mineralização de carbono ao longo do período da incubação em um Latossolo tratado com quatro doses de lodo de esgoto. As doses 1 (L1) e 2 (L2) foram proporcionais às utilizadas no experimento em vasos, visando ao fornecimento de N total pela dose 1 para a produção de 100 g matéria seca de milho. A dose 2 correspondeu ao dobro da dose 1. Legendas: ●—● L₀ (Controle sem lodo); ○—○ L₁ (Dose 1= 2,32 g lodo/100 g solo); ▼—▼ L₂ (Dose 2= 4,64 g lodo/100 g solo); △—△ L₃ (Dose 3= 6,96 g lodo/100 g solo); ■—■ L₄ (Dose 4= 9,28 g lodo/100 g solo).....27
- Figura 2** – Mineralização de nitrogênio orgânico ao longo do período da incubação em Latossolo tratado com quatro doses de lodo de esgoto. As doses 1 (L1) e 2 (L2) foram proporcionais às utilizadas no experimento em vasos, visando ao fornecimento de N total pela dose 1 para a produção de 100 g matéria seca de milho. A dose 2 correspondeu ao dobro da dose 1. Legendas: ●—● L₀ (Controle sem lodo); ○—○ L₁ (Dose 1= 6,96 g lodo/300 g solo); ▼—▼ L₂ (Dose 2= 13,92 g lodo/300 g solo); △—△ L₃ (Dose 3= 20,88 g lodo/300 g solo); ■—■ L₄ (Dose 4= 27,84 g lodo/300 g solo).....28
- Figura 3** – Acúmulo de CO₂ desprendido em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa, após o cultivo do milho. Doses: L₀ = 0; L₁ = 325; L₂ = 650 g de lodo por vaso; FR₀ = 0; FR₁ = 5; FR₂ = 10 g de fosfato de rocha por vaso.....29
- Figura 4** – Matéria seca (A e B) e teores de fósforo e nitrogênio na parte aérea do milho (C e D) em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. (Doses: L₀ = 0; L₁ = 325; L₂ = 650 g de lodo por vaso; FR₀ = 0; FR₁ = 5; FR₂ = 10 g de fosfato de rocha por vaso). DMS= diferença mínima significativa (Tukey, p<0,05)32

- Figura 5** – pH (A), fósforo-resina (B), N mineral (amônio + nitrato) (C) e nitrogênio total (D) em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. (Doses: L0 = 0; L1 = 325; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso). DMS= diferença mínima significativa (Tukey, $p < 0,05$)33
- Figura 6** – Respirimetria (A), biomassa microbiana de carbono (BMC) (B), coeficiente metabólico - qCO_2 (C) e relação C/N da biomassa microbiana (D) em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. (Doses: L0 = 0; L1 = 325; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso). DMS= diferença mínima significativa (Tukey, $p < 0,05$)34
- Figura 7** – Biomassa microbiana de nitrogênio (A), taxa de amonificação (B), microrganismos amonificadores (C) e taxa de nitrificação (D) em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. (Doses: L0 = 0; L1 = 325; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso). DMS= diferença mínima significativa (Tukey, $p < 0,05$)36
- Figura 8** – Atividade da asparaginase (A) e fosfatase alcalina (B) em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. (Doses: L0 = 0; L1 = 325; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso). DMS= diferença mínima significativa (Tukey, $p < 0,05$)38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO E DA CULTURA.....	18
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO LODO DE ESGOTO	18
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO BACTERIANO SOLUBILIZADOR DE FOSFATO	19
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO FOSFATO DE GAFSA.....	19
3.5 MINERALIZAÇÃO DO LODO DE ESGOTO	20
3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ENSAIO COM MILHO.....	21
3.7 PRODUÇÃO E ANÁLISE QUÍMICAS DA MATÉRIA SECA DE MILHO.....	22
3.8 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	22
3.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	24
3.10 ANÁLISES QUÍMICAS DO SOLO.....	25
3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	26
4 RESULTADOS	27
5 DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

O lodo de esgoto ou biossólido é gerado nas estações de tratamento de esgoto (ETE) como resultado do processo de coagulação/floculação e sedimentação de partículas. Sua disposição final é normalmente direcionada para aterros sanitários, incineração, construção civil, áreas degradadas, entre outras. No entanto, devido ao alto conteúdo de matéria orgânica e nutrientes como nitrogênio, fósforo, cálcio e magnésio, a disposição deste resíduo se torna mais promissora tanto no aspecto ambiental quanto econômico se empregada diretamente em áreas agrícolas visando à melhoria das propriedades físicas, químicas e microbiológicas dos solos.

O fósforo é um nutriente essencial ao desenvolvimento das plantas, uma vez que faz parte de biomoléculas vitais, como os ácidos nucleicos (DNA), as membranas fosfolipídicas e moléculas envolvidas nos processos de transferência de energia, como o ATP (Adenosina Trifosfato). No entanto, a maior parte do fósforo presente no solo encontra-se em formas indisponíveis para os vegetais, demandando freqüentes adubações fosfatadas com emprego de fertilizantes industrializados e solúveis. Entretanto, cerca de 70% do fósforo solúvel aplicado aos solos de regiões tropicais é perdido principalmente por processos de fixação às superfícies das argilas e dos óxidos de alumínio e ferro. Uma alternativa ao uso dos fosfatos solúveis seria o emprego de fosfatos naturais, como o fosfato natural reativo de Gafsa. Estes são diferenciados dos fosfatos industrializados, devido a sua baixa solubilidade, entretanto esta solubilidade pode ser aumentada pela ação dos microrganismos do solo.

Determinados microrganismos do solo apresentam a capacidade de produzir determinados ácidos orgânicos que atuam na estrutura cristalina do fosfato natural, promovendo a solubilização do mesmo. Ao longo do tempo ocorrerão liberações de fosfatos orgânicos no solo que posteriormente serão mineralizados e liberados como fósforo disponível às plantas como para os próprios microrganismos. Diante desta constatação, microrganismos solubilizadores de fósforo inorgânico, têm sido isolados e utilizados para disponibilizar formas solúveis de fósforo às plantas. Contudo, o processo é limitado pela homeostase do sistema, muitas vezes impedindo o estabelecimento de microrganismos exógenos. Por outro lado, a adição

de matéria orgânica ao solo, pode estimular a atividade dos microrganismos e assim favorecer os processos de solubilização de fósforo proveniente de fontes insolúveis ou de baixa solubilidade.

Considerando o que foi exposto anteriormente, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de lodo de esgoto, fosfato de Gafsa e a inoculação de bactéria solubilizadora de fosfato em um Latossolo Vermelho distrófico típico, cultivado com plantas de milho em ambiente de casa de vegetação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O lodo de esgoto (ou bio sólido) é um resíduo orgânico proveniente do tratamento de esgotos domésticos, cuja destinação é um dos principais problemas operacionais nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). Essas disposições finais podem apresentar restrições econômicas e/ou de uso, como acontece com os aterros sanitários onde há grande possibilidade de percolação de lixiviados, geração de gases pela biodegradação, necessidade de controles para evitar a proliferação de vetores de moléstias e de patógenos aos seres humanos. O lodo também pode ser empregado na fabricação de tijolos, cerâmicas, cimento, recuperação de áreas degradadas e em áreas de reflorestamentos (Melo *et al.*, 2001). No entanto, somente a destinação final do bio sólido representa mais de 50% do custo operacional total do tratamento de esgoto e quando essa não é realizada de forma adequada, pode anular os benefícios da coleta e do tratamento dos esgotos, tornando-se um novo problema ambiental.

Uma alternativa recente que vem sendo avaliada consiste na utilização dos bio sólidos resultantes do tratamento de esgoto como fertilizante de solos agrícolas. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente aprovou a resolução nº 375, de 30 de agosto de 2006 que apresenta critérios e procedimentos necessários para o uso de lodos de esgoto em solos agrícolas (Brasil, 2006). No Estado do Paraná o uso agrícola de lodo de esgoto é normatizado pelo Conama e pelo Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004 que regulamenta a Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980 e pela Resolução Sema 021/09 (Paraná, 2007). Conforme Serrat *et al.* (2009) a região metropolitana de Curitiba destinou 105 mil toneladas de lodo de esgoto a 120 áreas agrícolas entre os anos de 2000 a 2008.

Apesar dos avanços tecnológicos observados em algumas regiões, a coleta e tratamento de esgoto no Brasil estão aquém do ideal. Segundo o IBGE (2002), somente 52% das cidades brasileiras possuem coleta de esgoto e destas apenas 38% do volume coletado recebem algum tipo de tratamento. A produção anual de lodo de esgoto no Brasil gira em torno de 220 mil toneladas, quantidade considerada baixa se comparada com números dos Estados Unidos, que registra produção anual de 7,1 milhões de toneladas devendo chegar a 8,2 milhões em 2010 (Andreoli *et al.*, 2001). Entretanto, há indícios atuais de crescimento na coleta e no

tratamento de lodo em diferentes regiões do Brasil. Por outro lado, deve-se observar que o lodo das ETEs só poderá ser empregado na agricultura, se estiver livre de metais pesados como cádmio, cobre, zinco, níquel, cromo, chumbo etc., como indica Bettioli *et al.* (2006).

Nogueira *et al.* (2007) avaliaram o efeito da utilização do lodo de esgoto submetido a diferentes processos de higienização, nos teores de metais pesados e densidade de patógenos no solo e em grãos de milho e de feijão caupi cultivados em sistema de consórcio. Os resultados mostraram ausência de patógenos no solo e os níveis de metais pesados (Zn, Cu, Pb, Cr, Ni e Cd) tanto nos solos como nos grãos avaliados ficaram abaixo do permitido. Da mesma forma, Nascimento *et al.* (2004) constataram que doses de até 60 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto, em ensaios com plantas de milho e feijão cultivados em ambiente de casa de vegetação não apresentaram riscos ambientais uma vez que os teores de metais pesados como Zn, Cu, Mn, Fe e Pb no solo e nas plantas ficaram abaixo dos limites de segurança.

No tratamento do esgoto, o controle de patógenos é alcançado mediante a mistura de cal virgem em proporções que variam de 30 a 50% do peso seco do lodo. A mistura com cal virgem garante elevação do pH, elimina os maus odores e reduz significativamente o número de patógenos, inclusive ovos de helmintos (Prosab, 1999). Por isso, o lodo calado (resultante da mistura com cal) tem potencial para corrigir a acidez dos solos, promovendo reduções dos teores de alumínio trocável e aumento na saturação por bases. Essas alterações resultam na melhoria do ambiente de crescimento radicular e na absorção de nutrientes pelas plantas. De acordo com Oliveira *et al.* (2002), a aplicação de lodo de esgoto calado ao solo agrícola aumentou o pH na primeira aplicação, mas esse efeito foi de menor intensidade nas reaplicações, fato atribuído ao poder tamponante do solo. Entretanto, Simonete *et al.* (2003) observaram que a adição de lodo sem tratamento com cal causou diminuição do pH e aumentos nos teores de H⁺Al e Al trocável. Além destas variações foram observados aumentos nos teores de matéria orgânica, P, K, Ca, Mg e de S-SO₄²⁻ no solo. A diminuição do pH provavelmente se deu em razão da mineralização do N-orgânico oxidação de sulfitos e liberação de ácidos orgânicos resultante do metabolismo dos microrganismos do solo.

A fração orgânica do lodo de esgoto contribui para o desenvolvimento das plantas, pois os componentes orgânicos são mineralizados

ação dos microrganismos do solo, ocorrendo uma liberação gradual de nutrientes. Isso é vantajoso, pois há menor risco ambiental visto que os nutrientes são liberados lentamente para as plantas, evitando as perdas por lixiviação ou qualquer outro processo (Andreoli *et al.*, 1999). A matéria orgânica desempenha efeitos positivos nas propriedades físicas, químicas e do solo aumentando a capacidade de retenção de água, estabilidade de agregados e capacidade de troca de cátions (CTC), fatores que contribuem para o aumento da produtividade e sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola. Resultados obtidos por Wang *et al.* (2008) com plantas nativas *Zoysia japonica* (grama-esmeralda) e *Poa annua* (Pé-de-galinha ou Poa-comum) indicaram que após a aplicação de 15 t ha⁻¹ de lodo de esgoto, a biomassa de *Z. japonica* aumentou 23% comparada ao controle, enquanto que para *P. annua* o aumento foi de 45%, assim como também houve aumento do teor de matéria orgânica do solo.

Vieira *et al.* (2005) também constataram aumento de produtividade em soja no primeiro ano de cultivo quando aplicaram 3 e 6 t ha⁻¹ de lodo. O aumento médio de produção foi de 547 e 163 kg ha⁻¹ de grãos, respectivamente, em relação aos tratamentos testemunha e adubação mineral. No segundo ano de cultivo os aumentos foram de 141 e 423 kg ha⁻¹, indicando um efeito residual do lodo. Apesar das possíveis vantagens em termos de adição de nutrientes e matéria orgânica, altas doses de lodo podem resultar em lixiviação e/ou a volatilização do nitrogênio. Neste contexto, Boeira *et al.* (2009), avaliaram após quatro cultivos de milho a campo a mineralização do nitrogênio em área que recebeu aplicação lodo de esgoto de duas origens. Após incubação por 105 dias observaram efeito residual de N orgânico e predominância de N mineral na forma de nitrato. Os teores de N orgânico foram de 1.064 mg kg⁻¹ na testemunha, 2.258 mg kg⁻¹ no tratamento que recebeu lodo da ETE de Franca e 2.482 mg kg⁻¹ no tratamento que recebeu lodo da ETE de Barueri. As maiores doses de lodo levaram a um acúmulo de nitrato no solo, com risco de impacto ambiental pela lixiviação e também pela desnitrificação. Os autores sugerem que há necessidade de calcular as doses de lodo para serem utilizadas no meio agrícola, pois os dados por eles obtidos indicam que além da dose se deve considerar o efeito residual do lodo aplicado. Da mesma forma, Oliveira *et al.* (2001) concluíram que a aplicação de doses de lodo de esgoto acima de 33 Mg ha⁻¹ pode causar a contaminação de águas subterrâneas com nitrato.

Outro nutriente importante para a produtividade das culturas é o fósforo. Elemento essencial que faz parte de biomoléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos e ATP (Vassilev *et al.*, 2006).

As formas de fósforo encontradas nos solos podem ser classificadas com lábil e não lábil, de acordo com o seu grau de interação com a fase líquida e sólida do solo. A forma lábil constitui-se na fração de fósforo disponível à biomassa, e a forma não lábil não é prontamente disponível. Segundo Whitelaw *et al.* (2000) a maior parte do fósforo do solo está complexada em hidróxidos de ferro, alumínio e silício em solos ácidos ou a carbonato de cálcio em solos alcalinos (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

As plantas absorvem fósforo lábil na forma de ânions do ácido ortofosfórico ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$), conseqüentemente somente uma pequena fração de P do solo estará disponível para os vegetais, cerca de 1 mg kg^{-1} ou menos.

Os teores de P nos solos dependem de fatores que abrangem processos biogeoquímicos, grau de intemperismo e das características químicas, bioquímicas, físicas e biológicas dos mesmos. Em solos jovens ou pouco intemperizados, predominam as formas de fósforo ligado a minerais primários como fluorapatita; em solos moderadamente intemperizados encontra-se o fósforo na forma orgânica ou adsorvido fracamente aos minerais secundários. Nos solos altamente intemperizados predominam as formas inorgânicas que fazem ligações de alta energia com as frações minerais e as formas orgânicas estabilizadas física e quimicamente (Novais & Smyth, 1999).

No lodo de esgoto o fósforo é encontrado em baixas concentrações. Mas por outro lado, a matéria orgânica do lodo contribui para diminuir a fixação deste elemento às partículas dos solos. Isso ocorre porque a matéria orgânica fornece íons que competem com os anions fosfato pelo sítio de adsorção, evitando a sua fixação e conseqüentemente aumentando a disponibilidade do fósforo para as plantas. Os resultados apresentados por Chiba *et al.* (2008) confirmam esta hipótese uma vez que a aplicação de lodo de esgoto em um Argissolo cultivado com cana-de-açúcar por dois anos consecutivos, apesar de não alterarem os valores de pH e teores de K, Ca, Mg, aumentou os teores foliares de P com obtendo-se valores entre $1,21$ a $1,99 \text{ g kg}^{-1}$ no primeiro ano de cultivo. Em outro trabalho realizado por Galdos *et al.* (2004), os autores já haviam observado que aplicação de lodo não alterava os teores de P disponível e nem do P solúvel ligado a óxidos de Al e Fe do solo.

A principal matéria prima utilizada produção dos fertilizantes fosfatados é a rocha fosfática, cujas reservas estão espalhadas por vários países do mundo. No entanto, há uma grande preocupação com o tamanho e a longevidade das reservas, por ser o fósforo considerado um recurso natural não renovável. Segundo a USGS (2009) no ano de 2008 a produção mineral de rochas fosfáticas no Brasil foi de aproximadamente 6,0 milhões de toneladas métricas, nos Estados Unidos foi de 30,9 e na China foi de 50,0 milhões de toneladas métricas. A longevidade média das reservas destes países foi estimada em 43, 40 e 86 anos, respectivamente, tomando por base a produção de 2007-2008. Nesse cenário, pode-se esperar que os custos dos fertilizantes fosfatados aumentem continuamente à medida que a reserva vão sendo consumidas. Diante desta situação a utilização de fosfatos naturais ou pó de rochas fosfáticas torna-se uma alternativa de grande valia, principalmente na redução dos custos de produção.

Os fosfatos naturais importados (reativos, de origem sedimentar) e os nacionais (baixa reatividade, de origem ígnea ou metamórfica) diferem entre si principalmente pela eficiência agrônômica e solubilidade em ácido cítrico 2%. Fosfatos naturais de alta eficiência seriam os fosfatos de Gafsa (Tunísia), de Arad (Israel) e da Carolina do Norte (EUA) (Korndörfer *et al.* 1999; Léon *et al.*, 1986). Avaliações agrônômicas realizadas com o fosfato natural reativo de Gafsa finamente moído (85% passando na peneira com malhas de 0,075 mm) e incorporado a solos ácidos do cerrado, em experimentos de longa duração com gramíneas forrageiras tropicais, indicaram que o fornecimento de fósforo ficou próximo daquele fornecido pelos fosfatos solúveis (Sanzonowicz *et al.*, 1987). Novais e Smyth (1999) consideraram a produção acumulada de vários cultivos e verificaram que o desempenho de alguns fosfatos naturais pode equiparar-se ao das fontes mais solúveis. Isso se explica pelo fato de que o P prontamente liberado dos fertilizantes solúveis passa para formas menos disponíveis mais rapidamente, enquanto que o P dos fosfatos naturais é liberado de forma gradual, ao longo do tempo de cultivo.

O aumento da disponibilidade de fósforo dos fosfatos naturais pode ocorrer pela ação dos microrganismos do solo. A solubilização do P por atividade microbiana é determinada bioquimicamente pela produção e liberação de ácidos orgânicos, em que grupos carboxílicos quelam cátions ligados ao fosfato convertendo-os em formas solúveis. Além disso, existem microrganismos solubilizadores de fosfatos que agem reduzindo o pH do meio, contribuindo assim

para aumentar a disponibilidade de P (Rashid *et al.*, 2004; Hwangbo *et al.*, 2003). Dentre os microrganismos solubilizadores de fosfato, os mais relatados na literatura pertencem aos fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e as bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Erwinia* e *Actinomycetes* (Rudresh *et al.*, 2005).

Whitelaw *et al.* (1999) cultivaram *Penicillium radicum* solubilizadores de fosfato em meio líquido com duas fontes de N (amônio e nitrato) e diferentes fontes de P. A fonte CaHPO_4 teve a maior solubilização, com a produção 475 mg P solúvel L^{-1} , seguida de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ com 360 mg P solúvel L^{-1} , principalmente na presença de amônio. De forma semelhante, Oliveira *et al.* (2008) obtiveram promissores resultados com a inoculação de duas cepas bacterianas identificadas como *Bacillus* sp. e *Burkholderia* sp. em meio de cultura líquido contendo fontes inorgânicas de fósforo. As bactérias mobilizaram 67% e 58,5% do P total, respectivamente, após 10 dias de incubação com fosfato tricálcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Além disso, Hamdali *et al.* (2008) constataram que cepas de actinobactérias inoculadas em solo fertilizado com rochas fosfáticas promoveram (ou aumentaram) o crescimento de trigo (*Triticum durum* L. cv. Vitron) 47 a 50% e 78 a 80% pelas espécies de *Micromonospora aurantiaca* e *Streptomyces griseus*, respectivamente, em relação ao controle.

As transformações do P também incluem a mineralização de compostos orgânicos e a imobilização na biomassa microbiana. A mineralização do P é feita por microrganismos heterotróficos que produzem enzimas do tipo fosfatases, fitases, fosfolipases e nucleotidases, responsáveis pela hidrólise de ésteres fosfatados, resultando na liberação de HPO_4^{2-} para a solução do solo. O P-orgânico representa de 1% a 3% da matéria orgânica, a qual pode estar na forma lábil ou resistente a mineralização (Yamada & Abdalla, 2004). As fosfatases excretadas pelas bactérias são influenciadas pelo ambiente, ou seja, sua produção é inibida por altos teores de P e estimuladas em condições de escassez, como indica Gyaneshwar *et al.* (2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO E DA CULTURA

Para instalação do experimento foi utilizada uma amostra de terra coletada da camada superficial (0-20 cm) de um Latossolo Vermelho distrófico típico, textura arenosa (Embrapa, 2006), do município de Jaguapitã (PR). Antes do enchimento dos vasos a terra foi peneirada utilizando peneira com malha de 2 mm. O resultado da análise química revelou os seguintes resultados: P=5,8 mg dm⁻³ (Mehlich-I), carbono=13 g dm⁻³ (Walkley-Black), cálcio, magnésio e potássio: 0,27, 0,2 e 0,75 cmol_c dm⁻³ (KCl 1N e Mehlich-I), respectivamente. O pH em CaCl₂ 0,01 M foi igual a 4,0. Os teores de areia, silte e argila foram de 848, 18 e 134 g kg⁻¹, respectivamente.

O milho (*Zea mays* L.) foi escolhido como planta teste por demandar alta quantidade de nitrogênio, ou seja, cerca de 120 kg ha⁻¹ para altos níveis tecnológicos (Iapar, 2003). A semente utilizada foi do híbrido simples DKB 390, caracterizado por ter ciclo precoce e sistema radicular abundante, com alto potencial de aproveitamento de água e nutrientes.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO LODO DE ESGOTO

A amostra de lodo de esgoto cedida pela Companhia de Saneamento do Paraná (Sanepar) foi proveniente da ETE Zona Sul, localizada no município de Londrina (PR). O lodo testado originou-se de efluentes de esgoto doméstico submetido a tratamento biológico, seguido por centrifugação, secagem e adição de cal virgem na proporção de 5% do peso seco do lodo. Uma análise parasitológica do resíduo, realizada pela Universidade do Oeste Paulista em Presidente Prudente (SP), revelou a inexistência de ovos de helmintos.

O pH e a condutividade elétrica foram determinados em triplicata utilizando um potenciômetro e um condutímetro. O pH, determinado em uma suspensão em água destilada (1:2,5), foi de 7,3, o que caracteriza o lodo como

sendo um material levemente alcalino. A condutividade elétrica foi de $7.650 \mu\text{S cm}^{-1}$. A umidade do lodo foi de 5,5% quando seco a 65°C e de 7,4% quando seco a 105°C . O nitrogênio total do lodo foi de $25,4 \text{ mg g}^{-1}$ (Bremner & Mulvaney, 1982) e o carbono total foi de 200 mg g^{-1} (Yeomans & Bremner, 1988), resultando na relação C/N=7,8. A quantidade de fósforo disponível, extraído por Mehlich-I, foi de $41,42 \text{ mg kg}^{-1}$ com P total= $6,6 \text{ g kg}^{-1}$ (Malavolta *et al.*, 1989).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO BACTERIANO SOLUBILIZADOR DE FOSFATO

No laboratório de Ecologia Microbiana/UEL, dois isolados bacterianos, solubilizadores de fosfato, foram obtidos de solo agrícola proveniente do município de São Gabriel do Oeste (MS) em meio específico para solubilizadores de fosfato (SF) (Sylvester-Bradley, 1982). Esses isolados foram repetidamente repicados em meio SF para verificação da persistência da capacidade solubilizadora, sendo posteriormente armazenados em glicerol 20% e a -20°C .

Os dois isolados bacterianos foram testados quanto à capacidade de solubilização de três fontes naturais de fósforo: fosfato de Gafsa, fosfato de Araxá e Itafertil®. Após inoculação em meio SF líquido por 5 dias em agitador horizontal (80 rpm) a 28°C , verificou-se que o isolado LEM 392 foi o que apresentou maior potencial solubilizador sobre os fosfatos naturais de Araxá e de Gafsa, com aumento na disponibilidade de P em cerca de 70 e 450% respectivamente, razão pela qual esse isolado bacteriano e o fosfato de Gafsa foram escolhidos para esse trabalho.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO FOSFATO DE GAFSA

A rocha fosfática empregada no trabalho é proveniente de um produto comercializado no Brasil desde 1970 e é importado da Tunísia (África). Segundo Fertipar (2009), o fertilizante é comercializado com o nome de fosfato natural reativo de Gafsa (FR), e é originário de uma rocha sedimentar orgânica, e contém 32% de Ca, 12% de P total, e 4% de P solúvel em ácido cítrico a 2%. As

partículas passam 100% na peneira de 4,8 mm (ABNT nº 4) e 80% na peneira de 2,8 mm (ABNT nº 7) (Brasil, 2008).

Tabela 1 – Dados constituintes do fosfato natural de Gafsa.

Elemento	(%)	Elemento	(mg kg ⁻¹)
SO ₃	3,2	Zn	370
SiO ₂	3,6	Cu	19
MgO	0,8	Co	20
K ₂ O	0,1	Mn	27

Fonte: Instituto de Tecnologia do Paraná - Relatório de Ensaio 3.123-8219/92

3.5 MINERALIZAÇÃO DO LODO DE ESGOTO

O lodo de esgoto foi incubado com o solo teste para determinar as taxas de mineralização do carbono (desprendimento de CO₂) e do nitrogênio (N-NO₃⁻ + N-NH₄⁺) do material orgânico presente no resíduo. Para a mineralização do carbono, triplicatas de frascos contendo 100 g de solo receberam 5 doses de lodo de esgoto (L0 = 0,0; L1 = 2,32; L2 = 4,64; L3 = 6,96 e L4 = 9,28 g/frasco) sendo duas delas (4,64 e 9,28 g/frasco) equivalentes às doses utilizadas no experimento de vaso. A umidade foi ajustada a 60% da capacidade máxima de retenção de água e foram realizadas leituras periódicas do CO₂ desprendido. Para captura do CO₂ desprendido em frascos hermeticamente fechados utilizou-se uma solução de NaOH, seguindo metodologia indicada por Alef (1995), durante o período de incubação em BOD a 28°C e no escuro foi de 317 dias. Para a mineralização do nitrogênio, foram utilizados frascos contendo 300 g de solo e a mesmas doses de lodo de esgoto (L0 = 0; L1 = 6,96; L2 = 13,92; L3 = 20,88; L4 = 27,84 g/frasco). A umidade do solo foi corrigida e mantida para 60% da capacidade máxima de retenção de água. Os frascos de incubação foram mantidos abertos em BOD a 28°C e no escuro por 247 dias. As determinações dos teores de amônio e nitrato ao longo do período de incubação foram realizadas como descrito em Keeney e Nelson (1982) após amostragem do solo de cada frasco, utilizando para extração uma solução de KCl 2 mol.L⁻¹.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ENSAIO COM MILHO

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições e os tratamentos testados foram organizados em um arranjo fatorial 3x3x2 em que os fatores foram 3 doses de lodo (0, 325, 650 g/vaso), 3 doses de fosfato de Gafsa (0, 5, 10 g/vaso) e 2 níveis (com e sem) de inoculação de microrganismo solubilizador de fosfato (isolado LEM 392). Os vasos utilizados como unidades experimentais continham 7 kg de terra e o experimento foi conduzido em casa de vegetação por um período de 54 dias. A primeira dose tanto de lodo (325 g/vaso) como a do fosfato de Gafsa (5 g/vaso) foram definidas com base nos teores totais de N e P contidos respectivamente em cada produto, considerando as quantidades necessárias para produção de 100 g de matéria seca de milho. Além disso efetuou-se a aplicação de 2,25 g/vaso de potássio (KCl) (Malavolta *et al.*, 1989). As segundas doses de lodo (L2) e fosfato de Gafsa (FR2) corresponderam ao dobro da primeira.

As sementes utilizadas foram lavadas com água destilada e detergente por três vezes pouco antes da semeadura, para remoção dos pesticidas utilizados no tratamento das mesmas. Foram semeadas 5 sementes por vaso (profundidade de 1,0 cm) e simultaneamente procedeu-se a inoculação com fungos micorrízicos aplicando 2,0 g de inóculo/vaso. Neste caso o inóculo utilizado foi um solo contendo propágulos do fungo micorrízico *Glomus clarum*, contendo 70 esporos g⁻¹. Um dia após a semeadura, o inóculo de bactérias solubilizadoras de fosfato (isolado LEM 392) foi preparado em solução salina (0,85%), contendo uma densidade de células de $2,25 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. O tratamento inoculado (B1) correspondeu à aplicação de 200 µL da suspensão bacteriana, sobre os pontos de semeadura, totalizando 1 mL do inóculo por vaso. Os vasos controle (B0) receberam 200 µL de NaCl 0,85% estéril. A inoculação foi repetida após 8 dias da semeadura, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

A reposição da umidade do solo foi feita com água de torneira, conforme a necessidade. Depois de 11 dias da semeadura, procedeu-se o primeiro desbaste deixando 2 plantas por vaso, e após 21 dias foi feito novo desbaste deixando apenas 1 planta por vaso. Aos 54 dias da semeadura, procedeu-se à colheita, separando as plantas em raízes e parte aérea. O solo cada vaso foi

homogeneizado, peneirado (malha de 2 mm), acondicionado em sacos plásticos e foi mantido em câmara fria a 5°C até o momento das análises.

3.7 PRODUÇÃO E ANÁLISE QUÍMICAS DA MATÉRIA SECA DE MILHO

Para a determinação da matéria seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) das plantas, estas foram lavadas apropriadamente, acondicionadas em sacos de papel e secadas em estufa a 60°C por 96 h.

Para a determinação do teor de fósforo da MSPA, realizou-se a digestão nítrico-perclórica de uma amostra do material moído. No extrato obtido, determinou-se o P por espectrofotometria do metavanadato de amônio a 420 nm.

O teor de nitrogênio da MSPA foi determinado mediante emprego de digestão sulfúrica, seguindo a metodologia descrita em Sarruge & Haag (1974).

3.8 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para os microrganismos cultiváveis foi realizada uma suspensão inicial a partir de 10 g de solo com umidade natural em 90 mL de solução salina (NaCl) 0,85%, seguida de uma diluição seriada até 10^{-8} .

A quantificação de microrganismos solubilizadores de fosfato em meio específico foi realizada por plaqueamento em duplicata, a partir de inóculo de 50 µL da diluição 10^{-4} (Sylvester-Bradley, 1982). Após 5 dias de incubação obteve-se a densidade de unidades formadoras de colônia (UFC). A identificação da capacidade solubilizadora de fosfato foi observada pela formação do halo de solubilização.

Para os microrganismos amonificadores (Saratchandra, 1978) e desnitrificantes (Tiedje, 1982), 250 µL da suspensão de solo provenientes das diluições 10^{-4} a 10^{-8} foram inoculados em quintuplicata em 1 mL dos respectivos meios de cultura. Para os oxidantes de amônio (nitritadores) e oxidantes de nitrito (nitratadores) foram inoculados em quadruplicata 0,5 mL da suspensão de solo em 4

mL de meio específico, a partir das diluições 10^{-2} a 10^{-5} (Saad & Conrad, 1993). O número mais provável (NMP) foi estimado considerando os tubos positivos com base numa tabela de probabilidade de ocorrência (Woomer, 1994). Esses microrganismos cultiváveis foram avaliados somente nos tratamentos inoculados com o isolado LEM 392, exceto os solubilizadores de fosfato, que foram avaliados em todos os tratamentos.

A determinação do carbono e nitrogênio da biomassa microbiana foi realizada pelo método de fumigação e extração (Vance *et al.*, 1987). De duas alíquotas de solo de cada amostra, com umidade corrigida a 70 % da capacidade de retenção de água, uma foi fumigada com clorofórmio a vácuo. Após 24 h, foi realizada extração com 100 mL de K_2SO_4 ($0,5 \text{ Mol L}^{-1}$), seguida de filtração, sendo a amostra não fumigada submetida ao mesmo procedimento. Para o carbono orgânico, o extrato foi submetido à oxidação por $K_2Cr_2O_7$ em meio ácido e determinação do teor de C pela quantificação do dicromato remanescente (Anderson & Ingram, 1993), utilizando-se um K_C (coeficiente de eficiência de extração) de 0,33. A determinação do nitrogênio da biomassa microbiana foi realizada por digestão sulfúrica e destilação a vapor, sendo a biomassa microbiana de N calculada considerando um fator K_N de 0,68 (Brookes *et al.*, 1985). Determinou-se a relação C/N da biomassa microbiana pela relação entre o carbono e o nitrogênio.

A respiração basal foi avaliada pela incubação de 100 g da amostra em recipiente fechado hermeticamente, utilizando uma solução de NaOH 0,5 N como armadilha para CO_2 e incubados a $28^\circ C$. A quantificação do CO_2 liberado foi baseada no NaOH remanescente pela titulação com HCl (Alef, 1995), com leituras realizadas periodicamente até 78 dias de incubação. A quantidade acumulada de CO_2 foi calculada pelo somatório do gás desprendido em cada intervalo de incubação. A razão entre a respiração basal e a biomassa microbiana de carbono indicou o coeficiente metabólico (qCO_2) (Anderson & Domsch, 1993). Todos os resultados foram expressos em $mg \text{ g}^{-1}$ de solo seco a $105^\circ C$.

A taxa de amonificação foi baseada no teor de N mineral antes e depois da incubação de 100 g de solo em frasco hermeticamente fechado e incubado a $28^\circ C$ por 21 dias. Para o cálculo da taxa de nitrificação considerou-se a conversão de N amoniacal para nitrato em 21 dias, considerando a quantidade de nitrogênio adicionado [$125 \mu g \text{ N g}^{-1} (NH_4)_2SO_4$], o N mineralizado da matéria

orgânica e os teores iniciais e finais de amônio e nitrato (Schuster & Schroder, 1990).

A avaliação da colonização micorrízica foi feita após clarificação com KOH 10% e HCl 0,1N e coradas com azul de tripano 0,05% (Phillips & Hayman, 1970). O cálculo da porcentagem do comprimento de raiz colonizada pelo fungo foi obtido pela técnica de intersecção dos quadrantes e expresso em metros de raízes colonizadas por planta ($m \text{ planta}^{-1}$) (Giovannetti & Mosse, 1980).

3.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para a atividade da enzima desidrogenase, 5 g de solo úmido foram incubados a 37° C com 5 mL da solução cloreto 2,3,5 trifeniltetrazólio 1,5% como substrato. Após 24 h de incubação, foi feita uma extração com metanol e realizada leitura colorimétrica utilizando um espectrofotômetro a 485 nm. O cálculo foi obtido por reta padrão construída com solução padrão cloreto de trifeniltetrazólio formazan (TTF) e os resultados expressos em μg de TTF $\text{g}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ (Casida *et al.*, 1964).

O substrato utilizado para determinar a atividade da fosfatase ácida (EC 3.1.3.2) e alcalina (EC 3.1.3.1) foi a solução de p -nitrofenil fosfato de sódio (0,05 M) no respectivo tampão universal modificado (MUB) (pH 6,5 e 11). As amostras de solo (1 g) foram incubadas com 1 mL do substrato por 15 minutos a 37°C. Após paralisação da reação com CaCl_2 e NaOH, a suspensão foi filtrada e o p -nitrofenol quantificado por leitura em espectrofotômetro a 420 nm. Os resultados foram expressos em μg de p -nitrofenol $\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabatabai & Bremner, 1969).

As atividades das enzimas urease (EC 3.5.1.5) e asparaginase (EC 3.5.1.1) foram avaliadas em tampão tris (hidroximetil) aminometano (THAM 0,05 e 0,1 M, pH 9 e 10, respectivamente) e incubados, respectivamente, na presença do substrato uréia (0,2 M) e L-asparagina (0,5 M) a 37°C por 2 h. A extração do N amoniacal foi realizada com solução de KCl 2,5 M contendo sulfato de prata (100 ppm). A amônia foi determinada por destilação a vapor e titulada com H_2SO_4 0,0025 N (Tabatabai & Bremner, 1972; Frankenberger & Tabatabai, 1991).

A atividade da celulase (EC 3.2.1.4) foi avaliada pela incubação de 5 g de solo em tampão acetato 2 M (pH 5,5) na presença de carboximetil celulose 0,7

% a 50°C por 24 h. Os açúcares redutores (AR) produzidos foram quantificados em espectrofotômetro (690 nm) pelo método do azul da prússia (Schinner & Mersi, 1990). A atividade foi calculada com o auxílio da reta padrão com glicose e expressa em $\mu\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Os carboidratos solúveis em água foram extraídos de acordo com Ball *et al.* (1996), 5 g de solo agitados com 50 mL de água quente (80°C) (proporção de 1:5) por 16 h. Após esse período, o extrato foi centrifugado (5.800 g por 10 minutos) e o sobrenadante filtrado em kitassato com membrana de nitrocelulose com 0,45 μm de porosidade. Os carboidratos solúveis do filtrado foram hidrolisados em H_2SO_4 12 M a 100°C por 35 minutos na presença de timol 1% (3-hidroxi-4-isopropil tolueno) em etanol. Após resfriamento realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 490 nm para a determinação dos açúcares redutores. Os resultados foram expressos em μg de açúcar redutor (AR) g^{-1} .

3.10 ANÁLISES QUÍMICAS DO SOLO

Para avaliação das propriedades químicas do solo, apenas a combinação dos tratamentos doses de fosfato de Gafsa e doses de lodo de esgoto foram consideradas. As 8 repetições de cada combinação (nesse caso, 4 dos tratamentos inoculados e 4 dos tratamentos não inoculados pela bactéria solubilizadora) foram juntadas para formar uma amostra composta que foi submetida à análise química de rotina no Laboratório de Fertilidade do Solo do IAPAR. As demais análises descritas abaixo foram realizadas individualmente em cada unidade experimental.

O pH foi avaliado em 10 g de solo suspensos em 25 mL de CaCl_2 0,01 M por 15 minutos a 200 rpm, conforme Pavan *et al.* (1992).

Para determinação do teor de fósforo disponível, realizou-se a extração com resina (catiônica e iônica), partindo de agitação a 220 rpm com pérola de vidro durante 15 minutos com volume de 2,5 cm^3 de solo em 25 mL de água destilada. Na sequência, retirou-se a pérola e adicionaram-se 2,5 cm^3 da resina devidamente ativada, novamente agitando-se por 16 h a 220 rpm. O P adsorvido na resina foi extraído com 50 mL de solução extratora (NH_4Cl 0,8 e HCl 0,2 M), deixado

em repouso por 1 h, para liberação de CO₂ e submetido a agitação por 1 h (220 rpm). Pipetaram-se 4 mL do extrato para tubos e adicionaram-se 16 mL de solução colorimétrica (molibdato, ácido ascórbico, gelatina em pó). Após 30 minutos, determinou-se em espectrofotômetro a 660 nm a quantidade de P disponível no solo (Raij *et al.*, 2001).

O teor de carbono orgânico total foi determinado pelo método da oxidação com dicromato de potássio em meio ácido (Walkley-Black), seguido da titulação com sulfato ferroso (Yeomans & Bremner, 1988).

O teor de nitrogênio total do solo foi quantificado após digestão sulfúrica na presença de catalisadores, a partir de 1 g de solo seco ao ar. Após neutralização do digerido com NaOH 18 N foi realizada destilação a vapor e titulação com H₂SO₄ 0,02 N na presença de solução indicadora (Bremner & Mulvaney, 1982).

O teor de N mineral foi quantificado com destilação dupla após extração com KCl 2 N, onde na primeira destilação foi determinado o amônio pela adição de óxido de magnésio antes da destilação, tendo para a segunda destilação, no mesmo extrato, recebido liga de Devarda a fim de determinar o teor de nitrato (Keeney e Nelson, 1982).

A condutividade elétrica foi determinada com solo suspenso em água deionizada (1:2) e lida em condutivímetro (Tedesco *et al.*, 1995). Todos os resultados das análises químicas foram apresentados com base em terra fina seca ao ar.

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

4 RESULTADOS

No experimento de mineralização do lodo, a liberação de CO₂ pelas amostras de solo indicou alta mineralização do carbono nos primeiros 40 dias, para todas as doses de lodo de esgoto (Figura 1). A partir dos 50 dias de incubação, o controle (L0) e o tratamento com a dose L1 praticamente se estabilizaram. Por sua vez, as maiores doses, principalmente L3 e L4 continuaram a apresentar liberação crescente de CO₂. Após 230 dias de incubação, a quantidade de CO₂ acumulada nos dois tratamentos (L3 e L4) foram equivalentes.

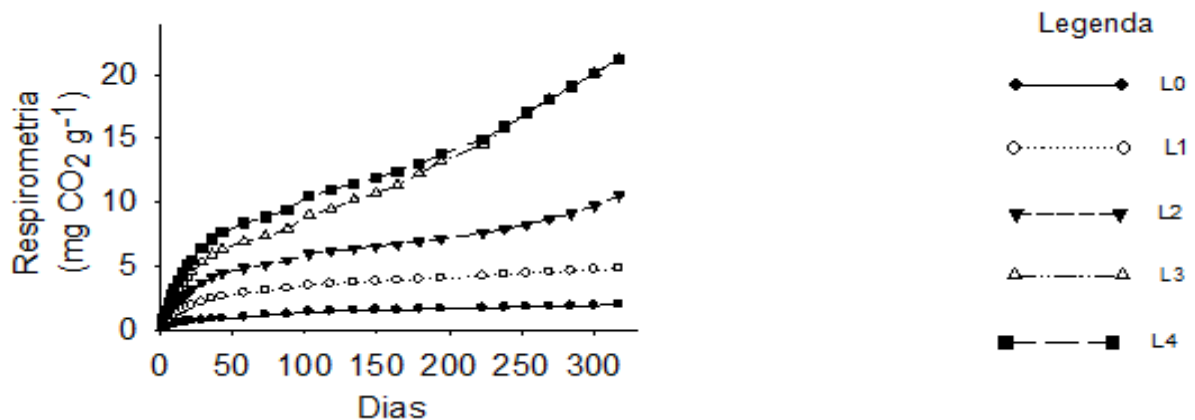


Figura 1 – Mineralização de carbono ao longo do período da incubação em um Latossolo tratado com quatro doses de lodo de esgoto. As doses 1 (L1) e 2 (L2) foram proporcionais às utilizadas no experimento em vasos, visando ao fornecimento de N total pela dose 1 para a produção de 100 g matéria seca de milho. A dose 2 correspondeu ao dobro da dose 1. Legendas: ●—● L₀ (Controle sem lodo); ○····○ L₁ (Dose 1= 2,32 g lodo/100 g solo); ▼-----▼ L₂ (Dose 2= 4,64 g lodo/100 g solo); △····△ L₃ (Dose 3= 6,96 g lodo/100 g solo); ■—■ L₄ (Dose 4= 9,28 g lodo/100 g solo).

O N mineral (NH₄⁺ + NO₃⁻) apresentou uma dinâmica variada nos seus teores ao longo do período de incubação, com aumentos e quedas (Figura 2). Os maiores teores geralmente predominaram nas maiores doses de lodo de esgoto. Essa variação pode estar relacionada com a atividade microbiana, onde os maiores picos são resultado do predomínio de mineralização do N-orgânico, disponibilizando

N mineral ao solo, enquanto que as quedas são relacionadas com a imobilização do N mineral pela biomassa microbiana.

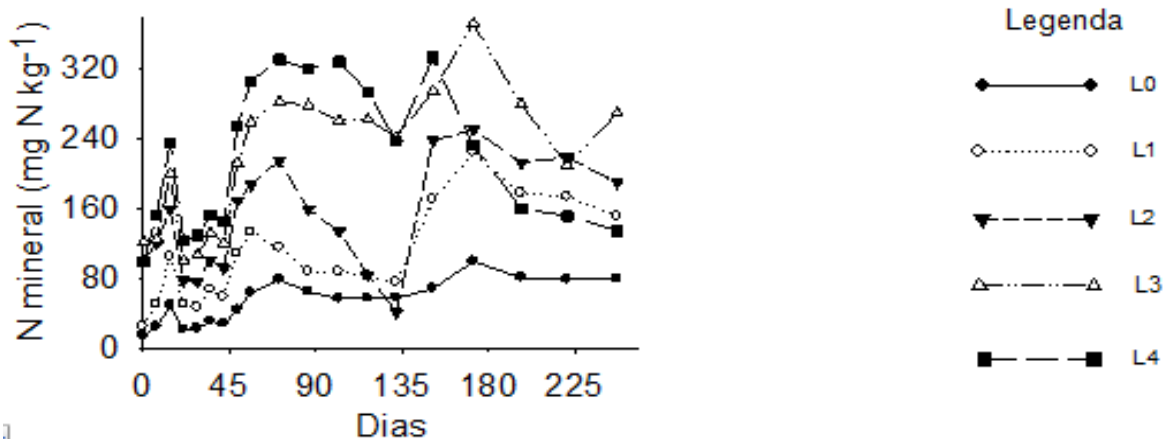


Figura 2 – Mineralização de nitrogênio orgânico ao longo do período da incubação em Latossolo tratado com quatro doses de lodo de esgoto. As doses 1 (L1) e 2 (L2) foram proporcionais às utilizadas no experimento em vasos, visando ao fornecimento de N total pela dose 1 para a produção de 100 g matéria seca de milho. A dose 2 correspondeu ao dobro da dose 1. Legendas: ●—● L0 (Controle sem lodo); ○- - -○ L1 (Dose 1= 6,96 g lodo/300 g solo); ▼- - -▼ L2 (Dose 2= 13,92 g lodo/300 g solo); △- - -△ L3 (Dose 3= 20,88 g lodo/300 g solo); ■—■ L4 (Dose 4= 27,84 g lodo/300 g solo).

No experimento em vasos, não foram observados efeitos significativos do isolado LEM 392 e nem da sua interação com as doses de lodo e fosfato de Gafsa. Desse modo, os resultados representam o desdobramento somente da interação entre fosfato de Gafsa e lodo de esgoto, ou ainda o efeito isolado de cada um desses fatores quando a interação entre eles não foi significativa.

A avaliação da mineralização do C no solo após o experimento com milho indicou que o lodo de esgoto ainda apresentou um efeito residual após 54 dias de condução do experimento, influenciando a atividade microbiana. Mesmo aos 78 dias de incubação das amostras, ainda não havia uma tendência de estabilização da liberação de CO₂, principalmente na maior dose de lodo. Nesse caso, a quantidade acumulada de CO₂ aumentou com as doses de lodo de esgoto, mas com efeitos menos evidentes das doses de fosfato de Gafsa (Figura 3). Apenas no tratamento com L2, em combinação com a maior dose de fosfato de Gafsa (FR2), a quantidade

liberada de CO₂ do solo incubado foi menor em relação às demais doses de fosfato de Gafsa.

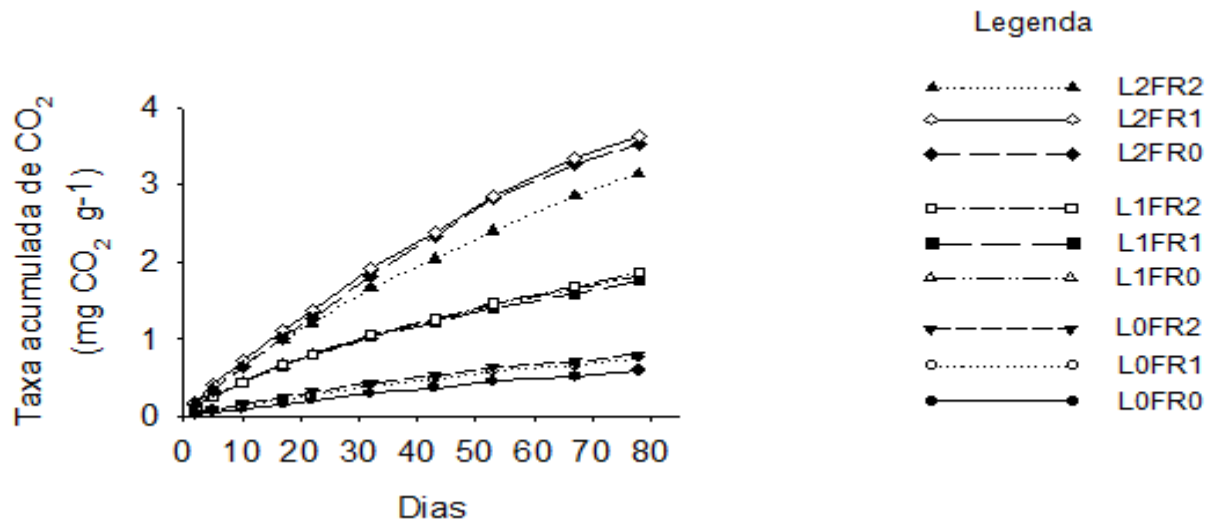


Figura 3 – Acúmulo de CO₂ desprendido em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa, após o cultivo do milho. Doses: L0 = 0; L1 = 325; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso.

A adição de fosfato de Gafsa e de lodo de esgoto causou alterações na composição química do solo de cada tratamento (Tabela 2). O aumento no teor de fósforo no solo, extraído com o extrator Mehlich-I, foi proporcional às doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa, com aumento de 5,8 mg dm⁻³ no tratamento controle para 177 mg dm⁻³ no tratamento que combinou a maior dose de fosfato de Gafsa e a maior dose de lodo. Já a determinação pelo método da resina trocadora de íons revelou uma variação menor, de 2 a 84 mg dm⁻³.

Tabela 2 – Caracterização química do Latossolo tratado com lodo de esgoto e fosfato de Gafsa, após o cultivo do milho.

	^a P	^b P	C	pH	Al	H+Al	Ca	Mg	K	SB	T	V	Al
	--mg dm ⁻³ --		g dm ⁻³		-----cmol _c dm ⁻³ de solo-----							-----%-----	
L0FR0	5,8	2	13	4,0	1,4	8	0,3	0,2	0,7	1,2	10	12	53
L0FR1	45	33	13	4,1	1,1	8	0,9	0,1	0,4	1,5	10	15	42
L0FR2	82	53	12	4,3	0,6	7	1,5	0,2	0,5	2,2	9	23	21
L1FR0	27	31	17	5,3	0	5	6,4	3,7	0,1	10,3	15	69	0
L1FR1	61	50	18	5,4	0	4	7,0	4,0	0,1	11,1	15	72	0
L1FR2	105	60	19	5,4	0	4	6,9	3,8	0,1	10,8	15	73	0
L2FR0	50	49	20	5,9	0	3	11	6,0	0,2	17,2	20	85	0
L2FR1	107	58	20	6,0	0	3	11	5,9	0,2	17,1	20	86	0
L2FR2	177	84	19	6,0	0	3	10,5	6,0	0,1	16,7	20	85	0

^aP extraído com solução Mehlich-I; ^bP extraído pelo método da resina trocadora de íons; carbono (Walkley-Black); pH CaCl₂ (0,01 M); Ca, Mg e Al (KCl 1 N); K (Mehlich-I); H+Al (solução tampão SMP). Doses: L0 = 0; L1 = 325 g; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5 g; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso. (IAPAR, 2009).

O carbono orgânico no solo não sofreu alterações entre os tratamentos com fosfato de Gafsa, mas aumentou com as doses de lodo. O aumento do pH foi mais evidente nos tratamentos com lodo de esgoto, tendo aumentado com as doses, enquanto que o fosfato de Gafsa apresentou pouco efeito nessa variável. O teor de alumínio no solo diminuiu com a adição do lodo de esgoto e do fosfato de Gafsa. Da mesma maneira, a acidez potencial (H+Al) tendeu a diminuir com o aumento das doses, principalmente de lodo. O teor de cálcio aumentou com as doses de lodo, assim como foi observada uma tendência de aumento com as doses de fosfato de Gafsa, mais evidente na ausência de lodo de esgoto. Já o Mg aumentou apenas com as doses de lodo; para o potássio os teores diminuíram com as doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. Como consequência, os valores da soma das bases trocáveis (Ca⁺ Mg⁺ K⁺) aumentaram principalmente com as doses de lodo, mas um ligeiro efeito também pode ser observado com a adição de fosfato de Gafsa, principalmente no tratamento sem lodo. A capacidade de troca de cátions (T) no solo teve aumento evidente apenas com as doses de lodo esgoto. A saturação de bases também aumentou com as doses de lodo de esgoto, com um ligeiro efeito de fosfato de Gafsa observado apenas na ausência de lodo. O alumínio foi eliminado nos tratamentos com a adição de lodo, sendo que na ausência de lodo

o aumento das doses de fosfato de Gafsa também diminuiu a saturação por alumínio.

A MSPA de milho aumentou com o lodo de esgoto em cada dose de fosfato de Gafsa. Por sua vez, os efeitos do fosfato de Gafsa foram evidenciados apenas na ausência de lodo (L0), em que as doses FR1 e FR2 aumentaram a biomassa das plantas em relação ao tratamento FR0, mas não diferenciando entre si (Figura 4 A). A MSR aumentou com a dose L1, em todos os tratamentos de fosfato de Gafsa, com menores aumentos em L2. O fosfato de Gafsa aumentou a MSR em L0 e L1, não evidenciando efeito em L2 (Figura 4 B). Para o fósforo na MSPA (Figura 4 C), os teores aumentaram com as doses de lodo no tratamento sem fosfato de Gafsa. Por sua vez, nos dois tratamentos com fosfato de Gafsa, os teores de P diminuíram do tratamento L0 em relação a L1 de lodo de esgoto, mas tornando a aumentar em L2. Os efeitos das doses de fosfato de Gafsa somente foram evidentes nos tratamentos L0 e L2, sendo observado que para L1 os teores de P na MSPA se mantiveram constantes em todos os tratamentos com fosfato de Gafsa. O nitrogênio na MSPA (Figura 4 D) foi influenciado pelas doses de lodo. O maior teor de N no tecido vegetal foi observado no tratamento sem lodo e sem fosfato de Gafsa. Nos demais tratamentos com fosfato de Gafsa, o teor de N na parte aérea das plantas aumentou com as doses de lodo. O efeito do fosfato de Gafsa só foi observado na dose L0, em que o teor de N diminuiu com as doses de fosfato.

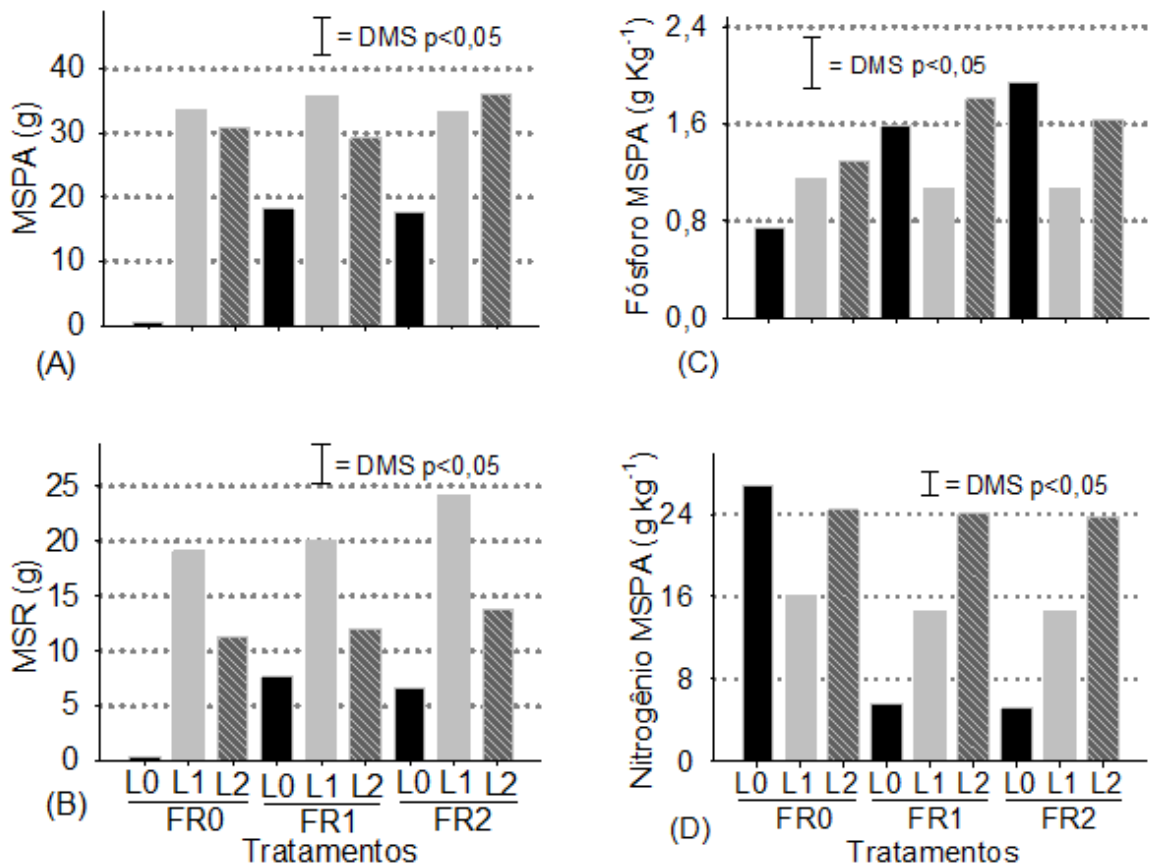


Figura 4 – Matéria seca (A e B) e teores de fósforo e nitrogênio na parte aérea do milho (C e D) em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. (Doses: L0 = 0; L1 = 325; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso). DMS= diferença mínima significativa (Tukey, $p < 0,05$).

O pH do solo aumentou com as doses de lodo de esgoto em cada tratamento de fosfato de Gafsa. Por sua vez, o fosfato de Gafsa também propiciou aumento do pH no tratamento sem lodo (L0) (Figura 5 A). O teor de fósforo no solo aumentou com as doses de lodo de esgoto e com as doses de fosfato de Gafsa (Figura 5 B). O teor de N mineral ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) diminuiu com a adição do fosfato de Gafsa no tratamento L0, permaneceu inalterado em L1 e aumentou em L2. A dose 2 de lodo resultou em maiores teores de N mineral em relação à dose 1 em todos os níveis de fosfato de Gafsa (Figura 5 C). O teor de N total no solo aumentou com as doses de lodo (Figura 5 D), enquanto que o efeito das doses de fosfato de Gafsa foi menos evidente.

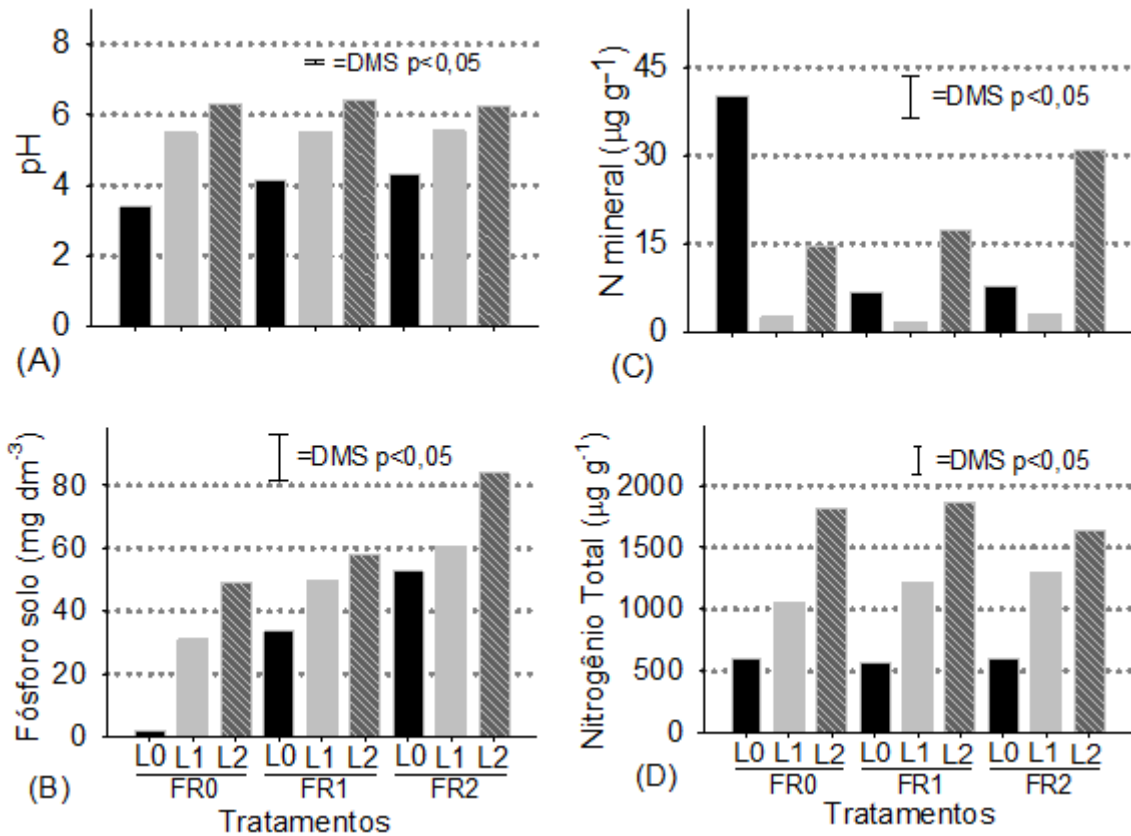


Figura 5 – pH (A), fósforo-resina (B), N mineral (amônio + nitrato) (C) e nitrogênio total (D) em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. (Doses: L0 = 0; L1 = 325; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso). DMS= diferença mínima significativa (Tukey, $p < 0,05$).

O carbono orgânico total, os carboidratos solúveis e a condutividade elétrica sofreram efeito isolado somente nas doses do lodo de esgoto (Tabela 3). No entanto, os carboidratos solúveis aumentaram significativamente apenas na maior dose.

Tabela 3 – Carbono orgânico total, carboidratos solúveis e condutividade elétrica em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa.

Análises	Fosfato de Gafsa			Lodo de esgoto		
	Doses			Doses		
	FR0	FR1	FR2	L0	L1	L2
C total ¹ (%)	1,48 A	1,47 A	1,43 A	1,15 C	1,50 B	1,74 A
Carboidratos ² ($\mu\text{g AR g}^{-1}$)	16,16 A	17,51 A	16,73 A	14,06 B	16,60 B	19,90 A
Condutividade ³ ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1493 A	1443 A	1395 A	258 C	1327 B	2746 A

¹Lodo: $p < 0,0000$; Fosfato: $p < 0,4187$; Lodo*Fosfato: $p < 0,0727$. ²Lodo: $p < 0,0000$; Fosfato: $p < 0,4687$; Lodo*Fosfato: $p < 0,6876$. ³Lodo: $p < 0,0000$; Fosfato: $p < 0,3638$; Lodo*Fosfato: $p < 0,5031$. Médias seguidas por letras distintas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

A respirometria basal (taxa de liberação diária) foi estimulada pelas doses de lodo em todos os tratamentos de fosfato de rocha (Figura 6 A).

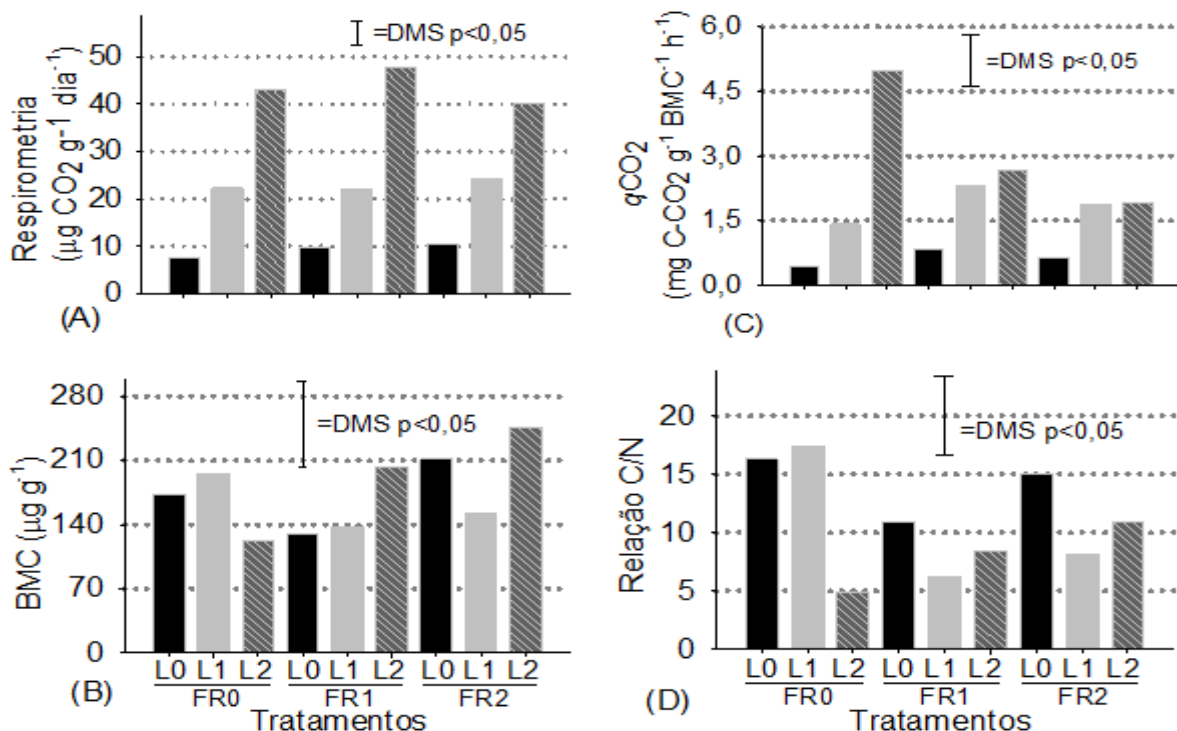


Figura 6 – Respirometria (A), biomassa microbiana de carbono (BMC) (B), coeficiente metabólico - $q\text{CO}_2$ (C) e relação C/N da biomassa microbiana (D) em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. (Doses: L0 = 0; L1 = 325; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso). DMS= diferença mínima significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Por outro lado, houve pouco efeito do fosfato de rocha sobre essa variável, tendo sido observado apenas efeito no tratamento L2 de lodo, em que FR2 causou inibição da respiração do solo em relação ao tratamento FR1. A biomassa microbiana de carbono foi influenciada pela interação entre fosfato de Gafsa e lodo de esgoto (Figura 6 B). O efeito do lodo somente foi observado em FR2, em que L1 diferiu de L2. Por sua vez, o efeito do fosfato de Gafsa foi observado apenas no tratamento L2 de lodo, em que FR2 diferiu de FR0, tendo este a menor biomassa microbiana. O coeficiente metabólico (qCO_2) aumentou com as doses de lodo nos três níveis de fosfato de Gafsa, sendo o maior valor apresentado para a dose L2 de lodo no tratamento sem adição de fosfato de Gafsa (Figura 6 C). Por sua vez, o efeito do fosfato de Gafsa só foi observado em L2, diminuindo o qCO_2 com o aumento das doses de fosfato de Gafsa. Os tratamentos também influenciaram a relação C/N da biomassa microbiana (Figura 6 D), onde a dose L2 de lodo diminuiu significativamente a relação C/N somente no tratamento FR0. Os efeitos do fosfato de Gafsa foram observados apenas na dose L1, em que a adição de fosfato de Gafsa diminuiu a relação C/N da biomassa microbiana em comparação ao tratamento sem fosfato de Gafsa (FR0).

As doses de lodo aumentaram a biomassa microbiana de nitrogênio em todas as doses de fosfato (Figura 7 A). Por sua vez, o fosfato de Gafsa estimulou a biomassa microbiana de N somente no tratamento L1 de lodo. Já a taxa de amonificação aumentou com as doses de lodo em cada nível de fosfato de Gafsa. Entretanto, os aumentos foram mais expressivos na dose FR0 e diminuíram as diferenças nos tratamentos FR1 e FR2 (Figura 7 B). Por sua vez, o aumento do fosfato de Gafsa diminuiu essa variável no tratamento L2. Os microrganismos amonificadores aumentaram nas doses L1 e L2 de lodo em comparação a L0, quando combinadas com os tratamentos FR0 e FR1 de fosfato (Figura 7 C). Por sua vez, no tratamento FR2, a população de amonificadores diminuiu nos tratamentos L1 e L2 em relação ao tratamento L0 de lodo. A taxa de nitrificação também aumentou com as doses de lodo em cada nível de fosfato de Gafsa. Considerando os efeitos do fosfato de Gafsa, a taxa de nitrificação diminuiu na maior dose de fosfato de Gafsa, no tratamento L2 de lodo (Figura 7 D).

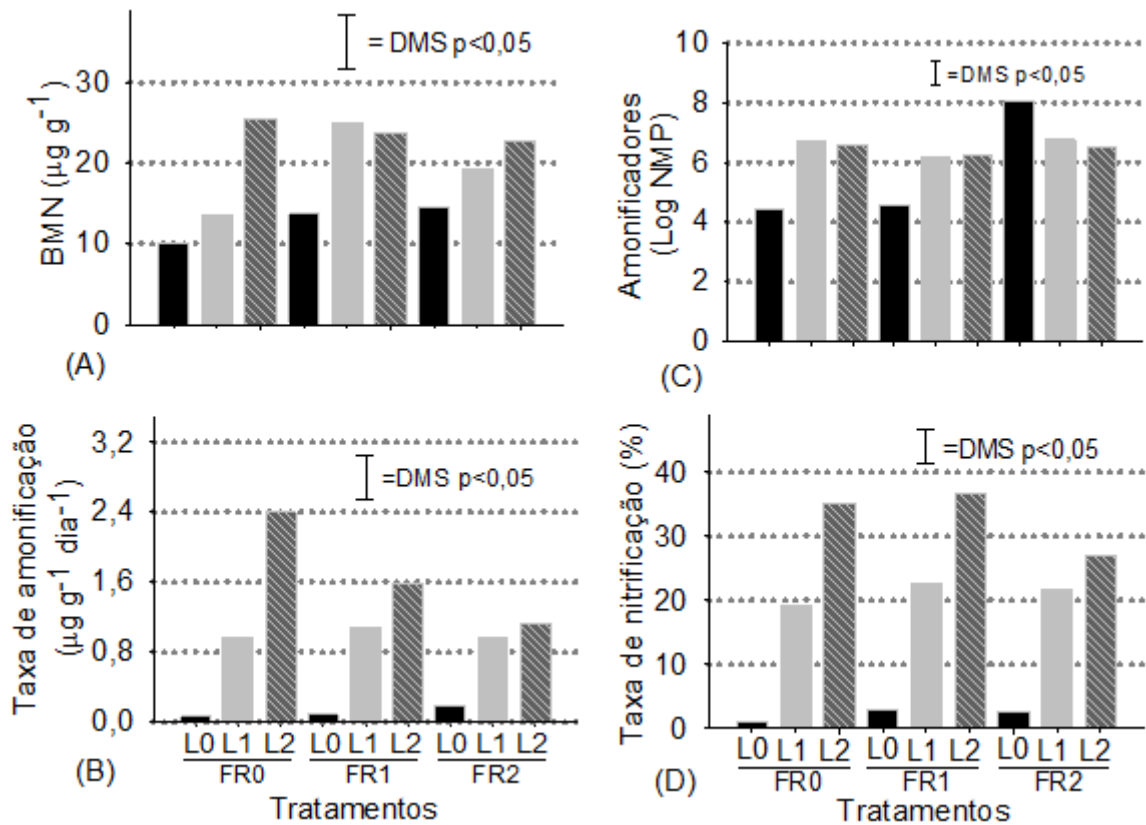


Figura 7 – Biomassa microbiana de nitrogênio (A), taxa de amonificação (B), microrganismos amonificadores (C) e taxa de nitrificação (D) em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. (Doses: L0 = 0; L1 = 325; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso). DMS= diferença mínima significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Dentre os grupos funcionais de microrganismos envolvidos nas transformações do nitrogênio, estes sofreram efeitos isolados das doses de lodo e/ou de fosfato de Gafsa (Tabela 4). Nesses casos, o aumento das doses de lodo elevou as contagens dos microrganismos considerados. As doses de fosfato de Gafsa aumentaram os microrganismos nitrificadores; e diminuíram a ocorrência dos desnitrificantes em relação ao controle FR0. O número de microrganismos solubilizadores de fosfato não sofreu influência dos tratamentos. Já a porcentagem de colonização micorrízica foi influenciada somente pelas doses de lodo de esgoto, tendo apresentado colonização média de 78% na dose L2, 85% na dose L1 e 88% na dose L0 (dados não apresentados). No entanto, o comprimento de raízes colonizadas por planta respondeu ao efeito isolado das doses lodo e fosfato de Gafsa, apresentando um aumento dessa variável com as doses.

Tabela 4 – Microrganismos nitritadores, nitratores, desnitrificantes, solubilizadores de fosfato e comprimento de raízes micorrizadas em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa.

Variáveis	Fosfato de Gafsa			Lodo de esgoto		
	Doses			L0	L1	L2
	FR0	FR1	FR2			
Nitritadores ¹ (log NMP)	1,78 B	3,59 A	3,77 A	0,22 B	3,54 A	3,59 A
Nitratores ² (log NMP)	3,84 A	4,42 A	4,44 A	2,34 C	4,43 B	5,92 A
Desnitrificadores ³ (log NMP)	6,21 A	5,77 B	5,55 B	4,04 C	6,13 B	6,55 A
SF ⁴ (log UFC g ⁻¹)	5,26 A	5,52 A	5,53 A	5,59 A	5,3 A	5,46 A
Micorriza ⁵ (m pl ⁻¹)	533,2 B	705,1 AB	935,9 A	232,8 B	1085,4 A	856,0 A

¹Lodo: $p < 0,0000$; Fosfato: $p < 0,0004$; Lodo*Fosfato: $p < 0,9975$; ²Lodo: $p < 0,0000$; Fosfato: $p < 0,0992$; Lodo*Fosfato: $p < 0,2714$; ³Lodo: $p < 0,0000$; Fosfato: $p < 0,0003$; Lodo*Fosfato: $p < 1,0000$; ⁴Lodo: $p < 0,2384$; Fosfato: $p < 0,1992$; Lodo*Fosfato: $p < 0,4268$; ⁵Lodo: $p < 0,0000$; Fosfato: $p < 0,0027$; Lodo*Fosfato: $p < 0,0831$; Médias seguidas por letras distintas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

Dentre as propriedades bioquímicas, algumas enzimas foram influenciadas pelos tratamentos (Tabela 5), dentre as quais a atividade da desidrogenase, a qual aumentou com as doses de fosfato de Gafsa, porém na maior dose de lodo de esgoto (L2), houve decréscimo da sua atividade em relação à dose L1. A urease não foi influenciada pelas doses de fosfato de Gafsa, mas sofreu influência semelhante à desidrogenase, com maior atividade na dose 1 (L1) e decréscimo na dose 2 (L2). Não houve efeito dos tratamentos sobre as atividades de fosfatase ácida e celulase.

Tabela 5 – Atividades das enzimas desidrogenase, urease, celulase e fosfatase ácida em solo tratado com diferentes doses lodo de esgoto e fosfato de Gafsa.

Variáveis	Fosfato de Gafsa			Lodo de esgoto		
	Doses			L0	L1	L2
	FR0	FR1	FR2			
Desidrogenase ¹ ($\mu\text{g TTF g}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$)	2,5 B	3,0 AB	3,9 A	1,1 B	6,4 A	1,8 B
Urease ² ($\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} 2 \text{ h}^{-1}$)	42,0 A	49,3 A	41,6 A	22,3 C	62,6 A	48,0 B
Celulase ³ ($\mu\text{g AR g}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$)	473,3 A	405,1 A	432,3 A	447,7 A	438,2 A	424,8 A
Fosfatase ácida ⁴ ($\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	574 A	569 A	576 A	567 A	572 A	581 A

¹Lodo: $p < 0,0000$; Fosfato: $p < 0,0021$; Lodo*Fosfato: $p < 0,1012$; ²Lodo: $p < 0,0000$; Fosfato: $p < 0,3052$; Lodo*Fosfato: $p < 0,6321$; ³Lodo: $p < 0,7330$; Fosfato: $p < 0,0691$; Lodo*Fosfato: $p < 0,1946$; ⁴Lodo: $p < 0,4195$; Fosfato: $p < 0,7595$; Lodo*Fosfato: $p < 0,8595$; Médias seguidas por letras distintas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

A atividade da asparaginase variou com as doses de lodo e foi diferenciada em cada tratamento de fosfato de Gafsa, ora aumentando, ora diminuindo a atividade, dependendo da dose de fosfato de Gafsa (Figura 8 A). A atividade da fosfatase alcalina aumentou com as doses de lodo de esgoto em todos os níveis de fosfato de Gafsa (Figura 8 B), mas foi pouco influenciada pelas doses de fosfato de Gafsa em cada nível de lodo.

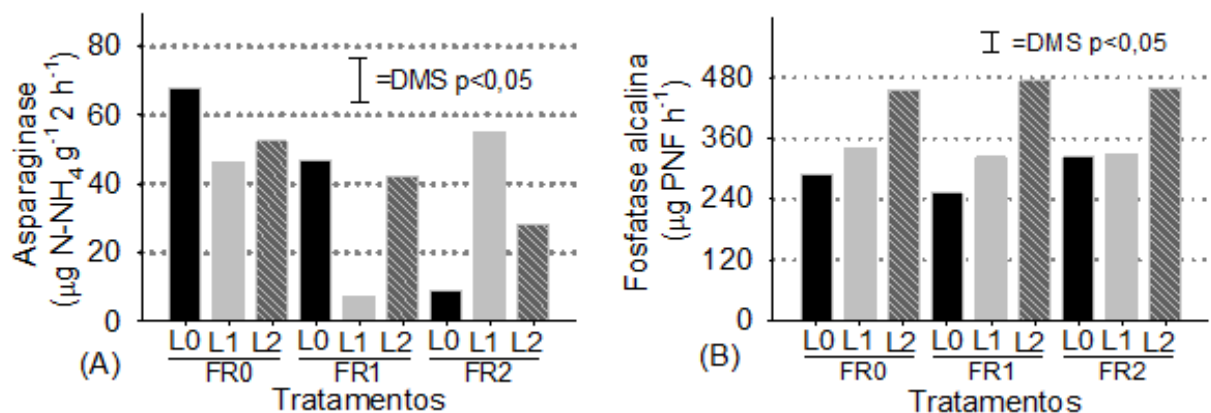


Figura 8 – Atividade da asparaginase (A) e fosfatase alcalina (B) em solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. (Doses: L0 = 0; L1 = 325; L2 = 650 g de lodo por vaso; FR0 = 0; FR1 = 5; FR2 = 10 g de fosfato de rocha por vaso). DMS= diferença mínima significativa (Tukey, $p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

A avaliação da mineralização de C proveniente do lodo no experimento de incubação indicou uma atividade microbiana intensa até 45 dias, fato atribuído ao carbono oxidável ainda encontrado no lodo, mesmo após a estabilização biológica realizada na ETE. A resposta foi diretamente proporcional ao aporte do material orgânico adicionado ao solo via lodo. Martines *et al.* (2006), avaliando a mineralização de lodo de curtume não estabilizado biologicamente, observaram uma máxima de produção de CO₂ em 15 dias de incubação, com posterior estabilização da mineralização até 105 dias. Para o lodo de esgoto utilizado neste estudo, a liberação de CO₂ não se estabilizou com o tempo de incubação até os 300 dias, como normalmente é observado para resíduos orgânicos estabilizados biologicamente. Isso provavelmente ocorreu porque a maior parte do material orgânico constituinte do lodo já estava estabilizada biologicamente, porém permanecendo formas de C mais difícil de mineralização, além de constituintes minerais. Entretanto, microrganismos do solo conseguem atuar sobre estas formas recalcitrantes do carbono, o que aliado à disponibilidade de nutrientes, resulta em estímulo à atividade biológica medida pelo desprendimento do CO₂.

Corroborando os dados da mineralização, o CO₂ acumulado pela respirometria durante a incubação por 78 dias após a desinstalação do experimento com milho em casa de vegetação, mostrou efeito positivo mesmo após a sua aplicação ao solo, proporcionando estímulo à atividade microbiana. A respirometria está diretamente ligada com a decomposição da matéria orgânica, que é resultado da atividade microbiana realizada por microrganismos heterotróficos aeróbios, principalmente sobre as frações menos recalcitrantes que podem ser utilizadas como fontes de energia e nutrientes. De acordo com Chen *et al.* (2003) a sustentabilidade do solo depende da mineralização das formas orgânicas dos nutrientes contidos nos resíduos matéria orgânicos. Dentro deste contexto, pôde-se observar que com o aumento das doses de lodo determinou maior liberação de C-CO₂ em ordem crescente para as doses L0<L1<L2 de lodo. De modo semelhante, o teor de C total no solo aumentou com as doses de lodo de esgoto, o que reflete diretamente na respiração microbiana, resultado da mineralização do carbono orgânico. Pode-se observar ainda que o teor de carboidratos solúveis, que representam a fração lábil

da matéria orgânica, também aumentou, resultando assim em maior disponibilidade de substrato de fácil degradação aos microrganismos. A utilização de lodo de esgoto pode ser vantajosa sob o aspecto do potencial de uso para recuperação de solo degradado, de baixa fertilidade, indicando que a adição desse resíduo estimula a atividade biológica não somente instantaneamente, podendo restabelecer por mais tempo os processos microbianos do solo relativos aos ciclos biogeoquímicos. Além disso, proporciona o aumento da diversidade dos microrganismos do solo, como observado por Vieublé-Gonod *et al.* (2009), em que, dependendo do resíduo orgânico utilizado, há acréscimos na biomassa e respiração microbiana após vários meses da aplicação do resíduo orgânico.

Por sua vez, o efeito da maior dose de lodo (L2) associada à maior dose de fosfato de Gafsa (FR2) sugere uma inibição da atividade microbiana, expressa pela menor atividade das enzimas desidrogenases e urease, biomassa de raízes das plantas e também pela diminuição na colonização micorrízica. Nessa condição, também foram observados os maiores valores de condutividade elétrica em relação ao controle, devido à presença de íons como cálcio, potássio, sódio, amônio, nitrato, entre outros. Segundo a FAO (1998), em presença de sais a cultura de milho mantém níveis de produção aceitáveis até um limiar em que a condutividade elétrica do extrato de saturação do solo na zona das raízes atinge 1,7 mS/cm. Acima deste valor limite, os decréscimos nas produções ocorrem de modo diretamente proporcional aos acréscimos de salinidade, a uma taxa em que para cada unidade de aumento da condutividade elétrica do extrato de saturação há um decréscimo na produção de 12%. Contudo, Bettiol e Fernandes (2004) após 4 cultivos de milho constataram valores de CE do solo que não foram prejudiciais ao desenvolvimento da cultura, em que a maior dose (oito vezes a dose de lodo de esgoto recomendada para fornecer N a cultura) obteve valores de 1,95 e 2,10 mS cm⁻¹ depois de diferentes épocas de coleta. No entanto, a condutividade elétrica obtida neste trabalho na maior dose de lodo foi de 2,75 mS cm⁻¹, o que pode sinalizar indícios de efeitos negativos, seja para as plantas, seja para os microrganismos, associada a outros fatores limitantes como, por exemplo, a possível disponibilidade excessiva de metais, pois demonstraram decréscimos nessa dose de lodo de esgoto.

A biomassa microbiana de carbono foi pouco influenciada pelos tratamentos. Por sua vez, o coeficiente metabólico (qCO_2), que pode representar

condições de estresse à comunidade microbiana, se mostrou próximo ao limite proposto por Anderson (2003), em que valores acima de $2 \text{ mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ BMC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ são indícios de condições adversas à comunidade microbiana. Valores altos de $q\text{CO}_2$ indicam condições de desequilíbrio da comunidade microbiana, seja por estresse causado pelas condições ambientais, seja pela presença de resíduos de fácil degradação no solo. Nesse caso, observa-se que a adição de lodo aumenta o $q\text{CO}_2$ em relação ao tratamento sem lodo. A presença de substrato orgânico certamente influencia a comunidade microbiana nativa do solo, a qual tem que se adaptar a uma nova condição, seja pela disponibilização de novas fontes de C, seja pela necessidade de competir com outros microrganismos adaptados àquela nova condição. Nesse caso, a maior dose de lodo sem o fosfato de Gafsa resultou em $q\text{CO}_2$ acima de $4,5 \text{ mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ BMC}^{-1} \text{ h}^{-1}$, o que indica uma condição menos favorável à comunidade microbiana que nos demais tratamentos. Esse efeito foi aparentemente atenuado na medida em que se aumentaram as doses de fosfato de Gafsa.

As variáveis relativas à fertilidade do solo, de maneira geral, foram melhoradas, principalmente com a adição de lodo de esgoto, que nesse caso apresentou efeito corretivo com a elevação dos valores de pH do solo. Houve ainda pequeno efeito do fosfato de Gafsa nos tratamentos sem lodo, provavelmente pela base Ca presente na sua constituição. O teor de P disponível foi superestimado com o extrator Mehlich-I, o que pode ser claramente observado quando se compara com os teores de P determinados pelo método da resina. Por exemplo, o maior teor disponível determinado pelo extrator Mehlich-I foi de 177 mg dm^{-3} , enquanto que no método da resina esse valor foi em torno de 85 mg dm^{-3} . Esse efeito do extrator Mehlich-I já é conhecido e isto ocorre, porque o mesmo é preparado com dois ácidos (HCl e H_2SO_4). Os extratores ácidos solubilizam e extraem P que não seria absorvido pelas plantas, superestimando assim a disponibilidade de P, em solos que recebam aplicação de fosfatos de baixa solubilidade, resultado que esta de acordo com o que foi obtido por Souza *et al.* (2009) com aplicação de até 6 Mg ha^{-1} do lodo de esgoto.

O teor de carbono orgânico do solo aumentou com as doses de lodo de esgoto. O pH aumentou de 4,0 no controle para 6,0 nas maiores doses de lodo, resultado que pode ser atribuído ao efeito da cal adicionada ao resíduo, o que lhe confere ligeira alcalinidade. Como consequência, os teores de alumínio e acidez

potencial (H+Al) diminuíram. A capacidade de troca de cátions aumentou com as doses de lodo de esgoto, o que pode ser atribuído tanto ao aumento do pH quanto aos aumentos nos teores de Ca e Mg, bem como ao fornecimento de carbono orgânico (Galdos *et al.*, 2004). Por sua vez, o fosfato de Gafsa contribuiu para o aumento de Ca no solo. O teor de potássio diminuiu com as doses dos tratamentos, provavelmente porque foi absorvido pelas plantas que apresentaram maior biomassa com o aumento das doses de lodo e fosfato de Gafsa, que por sua vez apresentam baixos teores do cátion em questão.

A biomassa da parte aérea do milho aumentou com as doses de lodo, pela maior disponibilização de nutrientes presentes no resíduo, principalmente N e P, os quais são mineralizados por processos microbiológicos e bioquímicos no solo, assim como observado por Wang *et al.* (2008). Além disso, o aumento do pH do solo pela adição do lodo favoreceu a disponibilidade dos nutrientes às plantas e eliminou os efeitos tóxicos do alumínio em solução. O lodo e o fosfato de Gafsa são importantes fontes de P, uma vez que os teores no lodo foram próximos a $6,6 \text{ g kg}^{-1}$ e no fosfato de Gafsa foi de 120 g kg^{-1} de P total, possibilitando o aumento dos teores de P na biomassa das plantas. Entretanto, a disponibilização de P dessas duas fontes depende de processos químicos, bioquímicos e microbiológicos, os quais envolvem mineralização e/ou solubilização. O teor de N na MSPA no controle sem lodo e sem fosfato de Gafsa mostrou-se bastante elevado, o que é atribuído ao baixo desenvolvimento das plantas devido à limitação de fósforo, fato já conhecido como efeito diluição. No entanto, as plantas se desenvolveram no tratamento sem lodo associada com os tratamentos FR1 e FR2, porém houve sintomas de deficiência de N demonstrado pelo baixo teor de N no solo sem lodo de esgoto. Observa-se que para a matéria seca das raízes do milho a maior dose de lodo foi aparentemente excessiva, possivelmente por um efeito de salinidade.

As oscilações dos teores de N mineral ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) no experimento de mineralização durante 247 dias de incubação indicam a atividade da comunidade microbiana sobre as formas de nitrogênio presentes no lodo, ora predominando a mineralização do N, ora predominando a imobilização do N na biomassa microbiana. Observa-se que o lodo possui um potencial para o fornecimento de N às plantas, o que está de acordo com Vieira *et al.* (2005). No entanto, a fração orgânica precisa ser mineralizada juntamente com o carbono, pois propicia o crescimento microbiano, principalmente de microrganismos heterotróficos, que utilizam os compostos de

carbono como fonte de energia. Os teores de N total aumentaram com as doses de lodo, mas apresentaram ligeira diminuição quando associados à maior dose de fosfato de Gafsa.

O mais alto teor de N mineral ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) no controle é resultado de baixa atividade microbiana e do menor desenvolvimento das plantas. O N é mantido livre na solução do solo em vez de ser imobilizado na biomassa, o que pode ter ocorrido pela baixa disponibilidade de C e nutrientes nesse tratamento, limitando o desenvolvimento de plantas e microrganismos. Por sua vez, a presença do fosfato de Gafsa contribuiu com o fornecimento de P, o que favoreceu ao desenvolvimento dos microrganismos e das plantas, resultando em maior absorção do N e diminuição dos seus teores no solo. Na maior dose de lodo (L2), em que foi constatada uma diminuição do crescimento de raízes, da atividade microbiana (baixa liberação de CO_2 na respirometria) e da atividade das desidrogenases, os teores de N mineral foram maiores que em L1, fazendo supor que a quantidade de N fornecida pelo lodo foi maior que a quantidade que poderia ser absorvida pela planta e imobilizada pela comunidade microbiana. Resultados obtidos por Melo e Ligo (2008) indicam que o aumento das doses de lodo de esgoto não foi favorável à cultura da bananeira, sendo que o aumento da produtividade em relação ao tratamento com adubação convencional somente foi observado na menor dose de lodo de esgoto (9 t ha^{-1}). Esses resultados enfatizam a necessidade de uso de doses adequadas de resíduos como fonte de nutrientes, a fim de evitar limitações (elevada salinidade, presença de substâncias e elementos tóxicos, etc.) ao desenvolvimento das plantas e microrganismos.

A biomassa microbiana de C tendeu a aumentar nos tratamentos com as maiores doses de lodo e fosfato, indicando incremento de células microbianas em relação aos demais tratamentos. Por outro lado, a biomassa microbiana de N apresentou maior resposta aos tratamentos, onde as doses de lodo resultaram em incremento, provavelmente pelas condições benéficas proporcionadas pela matéria orgânica e pela disponibilidade de nutrientes, sobretudo o nitrogênio. O fosfato de Gafsa propiciou maior biomassa microbiana de N na dose intermediária de lodo (L1), enquanto que na maior dose de lodo (L2) essa resposta foi menos evidente, provavelmente porque nessa dose de lodo, a quantidade de P fornecida apenas pelo lodo já foi adequada para os microrganismos. A imobilização do N na biomassa é benéfica, pois protege o nutriente de perdas por desnitrificação,

uma vez que fica armazenado na forma orgânica nas células. Essa forma de N constitui uma reserva de fácil mobilização, uma vez que as células microbianas após sua morte podem ser facilmente mineralizadas por outras comunidades microbianas, disponibilizando N mineral. As relações C/N mais baixas da biomassa microbiana nos tratamentos com lodo, especialmente quando fosfato de Gafsa também foi adicionado, indicam maior potencial de mineralização do N. Normalmente infere-se que relações C/N mais altas representam a predominância de fungos na biomassa microbiana, enquanto que as mais baixas sugerem a predominância de bactérias. Isso está de acordo com os valores mais elevados de pH encontrados nos tratamentos com as maiores doses de lodo, situação em que há favorecimento ao crescimento de bactérias em relação aos fungos, resultando em uma relação C/N baixa.

A maior parte do N total do solo está na forma orgânica, constituída por frações orgânicas de difícil decomposição, sendo que a taxa média anual de mineralização de N no solo é de cerca de 2 a 5%. O processo da mineralização é realizado por microrganismos e enzimas extracelulares (Moreira & Siqueira, 2006). O aumento observado da taxa de amonificação com as doses de lodo indica que o solo submetido a esses tratamentos apresentam estoques de N orgânico que pode ser mineralizado, seja ele proveniente do lodo ou da biomassa microbiana. Por sua vez, os microrganismos amonificadores também aumentaram com as doses de lodo de esgoto, o que coincide com o aumento das taxas de amonificação, normalmente favorecida pela diversidade de microrganismos e pela adaptação destes às condições adversas do solo (Fortes Neto *et al.*, 2007). A atividade da asparaginase diminuiu nos tratamentos associados ao fosfato de Gafsa, o que indica que a qualidade bioquímica desse solo foi afetada negativamente, resultado de efeitos deletérios aos microrganismos e conseqüentemente no decréscimo da síntese da enzima avaliada.

A taxa de nitrificação e a ocorrência de microrganismos nitrificantes aumentaram com as doses de lodo de esgoto, indicando alto potencial da conversão de N amoniacal a N nítrico. A nitrificação é um processo que depende da disponibilidade de N amoniacal e também é favorecido em condições de pH mais elevados, como observado nos tratamentos que receberam maiores doses de lodo. Esse aumento da taxa de nitrificação coincidiu com o aumento das comunidades de microrganismos nitritadores e nitratadores. Ainda que o processo de nitrificação

possa ser inibido pelo excesso de N amoniacal no solo (Smith *et al.*, 1998), os resultados deste trabalho indicaram que as populações de nitrificadores e a taxa de nitrificação, não foram afetadas negativamente pelas doses de lodo e de fosfato de Gafsa.

Neste estudo a ocorrência de microrganismos desnitrificadores aumentou com as doses de lodo, indicando que o solo sob esses tratamentos tem potencial de perdas de N por desnitrificação, devido à presença de N na forma mineral no solo. A desnitrificação acontece por atividade de bactérias anaeróbias facultativas, por redução bioquímica de formas oxidadas de N a formas gasosas (N_2 e N_2O), as quais são as principais vias de perda de N do solo para a atmosfera. Segundo Moreira e Siqueira (2006), perdas de N por desnitrificação variam de 5 a 15 $kg\ ha^{-1}$ e representam, em solos agrícolas, o equivalente a 20% do N fornecido por adubação mineral. No estudo realizado por Horn *et al.* 2003, os pesquisadores observaram que a maior perda de N_2O ocorreu em solos que receberam altas doses de carbono orgânico como resíduo de plantas, compostos orgânicos ou lodo de esgoto.

A bactéria solubilizadora de fosfato, LEM 392, não causou efeito sobre as variáveis avaliadas. A ausência de efeito pode ser atribuída à competição entre os microrganismos pelos nichos do solo, dificultando a adaptação do microrganismo exógeno ao novo ambiente, já que os microrganismos nativos são muito mais adaptados àquele ambiente. Entretanto, já foram observados por Hameeda *et al.* (2008) os efeitos favoráveis de duas cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato no aumento da biomassa de milho em casa de vegetação e em condições de campo.

CONCLUSÕES

O lodo de esgoto contribuiu para melhorar alguns aspectos relativos à microbiologia/bioquímica (microrganismos nitrificadores e desnitrificadores, respirometria, fosfatase alcalina, taxa de nitrificação, $q\text{CO}_2$) e à fertilidade do solo (C total, pH, P disponível por Mehlich I e resina, N total), assim como para aumentar a biomassa das plantas e seus teores de nitrogênio e fósforo. Essa melhoria pode ser atribuída ao fornecimento de matéria orgânica, pelo aporte de carbono e nitrogênio, além do efeito corretivo de acidez do solo.

Entretanto, deve-se salientar que a maior dose de lodo de esgoto associado ao fosfato de Gafsa demonstrou indícios de efeitos deletérios no milho e na comunidade microbiana do solo.

O emprego do fosfato de Gafsa como fonte de fósforo no solo mostrou efeito positivo em algumas variáveis, principalmente quando não associado ao uso do lodo de esgoto, fazendo supor que a quantidade de P fornecida pelo lodo já era suficiente para estimular a atividade microbiana e o desenvolvimento das plantas.

A bactéria solubilizadora de fosfato não causou alterações significativas na disponibilidade do fósforo e nem nas demais variáveis avaliadas, possivelmente pela falta de adaptação ao ambiente exógeno.

REFERÊNCIAS

- ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K. e NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Press, p. 214-219. 1995.
- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient form CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 25, p. 393-395, 1993.
- ANDERSON, J.M.; INGRAM, J.S.I. Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods. **CAB international Publishing**. Wallingford, 171p., 1993.
- ANDERSON, T. H. Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. v. 98, p. 285–293, 2003.
- ANDREOLI, C.V.; LARA, A.I.; FERNANDES, F. **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: Sanepar; Finep, 288p., 1999.
- ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. **Lodo de esgotos: Tratamento e disposição final**. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2001. 483p. il. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v.6).
- BALL, B. C.; CHESHIRE, M. V.; ROBERTSON, E. A. G.; HUNTER, E. A. Carbohydrate composition in relation to structural stability, compactibility and plasticity of two soils in a long-term experiment. **Soil and Tillage Research**. v. 39, p. 1647-1653, 1996.
- BETTIOL, w.; CAMARGO, O. A. de. (Eds.). **Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 350p., 2006.
- BETTIOL, W.; FERNANDES, S. A. P. **Efeito do Lodo de Esgoto na Comunidade Microbiana e Atributos Químicos do Solo**. Jaguariúna, SP. Dezembro, 2004. Embrapa Meio Ambiente (Comunicado Técnico, 24)
- BOEIRA, R. C.; MAXIMILIANO, V. C. B. Mineralização de compostos nitrogenados após aplicações de lodos de esgoto em quatro cultivos de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 33, p. 207-218, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 21 de 16/04/2008**.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução Conama nº 375**. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodo de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 167, 30 ago. p. 141-146, 2006.
- BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen-total. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (eds.). **Methods of soil analysis, part 2: Chemical and microbiological properties**. Madison: **American Society of Agronomy**. p. 595-624, 1982.

- BROOKES, P. C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 17, p. 837-842, 1985.
- CASIDA JR, L. E.; KLEIN, D. A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science Society of America Journal**. v. 98, p. 371-376, 1964.
- CHEN, G.; ZHU, H.; ZANG, Y. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. **Research in Microbiology**. v. 154, p. 393-398, 2003.
- CHIBA, M. K.; MATTIAZZO, M. E.; OLIVEIRA, F. C. Cultivo de cana-de-açúcar em argissolo tratado com lodo de esgoto. ii - fertilidade do solo e nutrição da planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 32, p. 653-662, 2008.
- DAS, A. C.; EBNATH, A.; MUKHERJEE, D. Effect of the herbicides oxadiazon and oxyfluorfen on phosphates solubilizing microorganisms and their persistence in rice fields. **Chemosphere**. v. 53, p. 217-221, 2003.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: CNPS, p. 306 2006.
- FAO. Crop Evapotranspiration – Guidelines for Computing Crop Water Requirements, Irrigation and Drainage paper, 56, Rome. 1998.
- FERTIPAR. **Fosfato natural reativo de Gafsa**. Disponível em: <<http://www.fertipar.com.br/produtos/nfr-de-gafsa-tunisia>>. Acesso em: 10 mar. 2009.
- FORTES-NETO, P., PACHECO, E., FERRARI, V. M., FORTES, N. L. P. Quantificação de microrganismos amonificadores e nitrificadores no solo tratado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Biociência**. Taubaté, v. 13, n.1-2, p. 55-62, jan/jun. 2007.
- FRANKENBERGER, W. T.; TABATABAI, M. A. Asparaginase activity of soils. **Biology and Fertility of Soils**. v. 11, p. 6-12, 1991.
- GALDOS, M. V.; MARIA, I. C.; CAMARGO, O. A. Atributos químicos e produção de milho em um latossolo vermelho eutroférico tratado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 28, p. 569-577, 2004.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. Evaluation of techniques for measuring vasicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**. v. 84, p. 489-500, 1980.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**. Dordrecht, v. 245, p. 83-93, 2002.
- HAMDALI, H.; HAFIDI, M.; VIROLLE, M. J.; OUHDOUCH, Y. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 40, p. 510-517. 2008.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**. v. 163, p. 234-242, 2008.

HORN, M. A.; SCHRAMM, A.; DRAKE, H.L. The earthworm gut: an ideal habitat for ingested N₂O-producing microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 1662–1669, 2003.

HWANGBO, H.; PARK, R.D.; KIM, Y.W.; RIM, Y.S.; PARK, K.H.; KIM, T.H.; SUH, J.S.; KIM, K.Y. 2-Ketogluconic production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium*. **Current Microbiology**. v. 47, p. 87–92, 2003.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saneamento básico 2000**. Rio de Janeiro: IBGE, 2002.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Sugestões de adubação e calagem para culturas de interesse econômico do Paraná**. Londrina, 31p., 2003. (IAPAR. Circular, 128)

KEENEY, D. R.; NELSON, D. W. Nitrogen inorganic forms. In: Page A.L. *et al.* (ed.) *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. **Soil Science Society of America Journal**. Madison, p. 643-698, 1982.

KORNDÖRFER, G. H.; CABEZAS, W. A. L.; HOROWITZ, N. Eficiência agronômica de fosfatos naturais na cultura do milho. **Scientia Agricola**. v. 56 (2), p. 32-39, 1999.

LEÓN, L. A.; FENSTER, W. E.; HAMMOND, L. L. Agronomic potential of eleven phosphate rocks from Brazil, Colombia, Peru and Venezuela. **Soil Science Society of America Journal**. Madison, v. 50, n. 3, p. 798-802, 1986.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. il: Piracicaba. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato**. p. 201, 1989.

MARTINES, A. M.; ANDRADE, C. A.; E. J. B. N. CARDOSO. Mineralização do carbono orgânico em solos tratados com lodo de curtume. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.41, n.7, p.1149-1155, jul. 2006

MELO, L. A. S.; LIGO, M. A. V. Efeitos do Lodo de Esgoto Aplicado na Cultura de Bananeiras “Grande Naine”. Jaguariúna, SP. **Comunicado Técnico, 45**, 2008.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; MELO, V. P. O uso agrícola e as propriedades do solo. In: TSUTIYA, M. T. *et al.* (Ed.). **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. p. 289-363, 2001.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª ed. Lavras. Editora UFLA, 729 p., 2006.

NASCIMENTO, C. W. A.; BARROS, D. A. S.; MELO, E. E. C.; OLIVEIRA, A. B. Alterações químicas em solos e crescimento de milho e feijoeiro após aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 28, p. 385-392, 2004.

NOGUEIRA, T. A. R.; SAMPAIO, R. A.; FONSECA, I. M.; FERREIRA, C. S.; SANTOS, S. E.; FERREIRA, L. C.; GOMES, E.; FERNANDES, L. A. Metais pesados e patógenos em milho e feijão caupi consorciados, adubados com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 11, n. 3, p. 331–338, 2007.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, MG, 399 pp. 1999.

OLIVEIRA, C. A., ALVES, V. M. C., MARRIEL, I. E., GOMES, E. A., SCOTTI, M.R., CARNEIRO, N. P., GUIMARÃES, C. T., SCHAFFERT, R. E., SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology & Biochemistry**. xxx, p.1–6, 2008.

OLIVEIRA, F. C.; MATTIAZZO, M. E.; MARCIANO, C. R.; MORAES, S. O. Lixiviação de nitrato em um latossolo amarelo distrófico tratado com lodo de esgoto e cultivado com cana-de-açúcar. **Scientia Agrícola**. v. 58, n.1, p.171-180, 2001.

OLIVEIRA, F. C.; MATTIAZZO, M. E.; MARCIANO, C. R.; ROSSETTO R. Efeitos de aplicações sucessivas de lodo de esgoto em um latossolo amarelo distrófico cultivado com cana-de-açúcar: carbono orgânico, condutividade elétrica, ph e etc. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 26, p. 505-519, 2002.

PARANÁ. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Resolução Sema 001/07**. Dispõe sobre licenciamento ambiental, estabelece condições e padrões ambientais e dá outras providências, para empreendimentos de saneamento. Diário Oficial do Estado do Paraná, Edição 7395, 23 de janeiro de 2007.

PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F.; ZEMPULSKI, H.C.; MIYAZAWA, M. & ZOCOLER, D.C. **Manual de análise química do solo e controle de qualidade**. Londrina, IAPAR, 1992. 40 p. (IAPAR. Circular, 76)

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

PROSAB – Programa de Pesquisa e Saneamento Básico. Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura. **Companhia de Saneamento do Paraná SANEPAR**. Curitiba-Pr: PROSAB, p. 76, 1999.

RAIJ, VAN, B.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Editora IAC, Campinas, 285 p., 2001.

RASHID, M.; KHALIL, S.; AYUB, N.; ALAM, S.; LATIF, F. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 7, p. 187–196, 2004.

- RUDRESH, D.L.; SHIVAPRAKASH, M.K.; PRASAD, R.D. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* sp. in relation of P uptake and growth and yield parameters of chickpea. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 51(3), p. 217–222, 2005.
- SAAD, O.A.L.O.; CONRAD, R. Temperature dependence of nitrification, denitrification, and turnover of nitric oxide in different soils. **Biology and Fertility of Soils**. V. 15, p. 21-27, 1993.
- SANZONOWICZ, C.; LOBATO, E.; GOEDERT, W. J. Efeito residual da calagem e de fontes de fósforo numa pastagem estabelecida em solo de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 22, n. 3, p. 233-243, 1987.
- SARATHCHANDRA, S.V. Nitrification activities and the changes in the population of nitrifying bacteria in soil perfused with two different H-ion concentrations. **Plant and Soil**, v.50, p.99-111, 1978.
- SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. Análises químicas em plantas. **Piracicaba: ESALQ**, p. 56, 1974.
- SCHINNER, F.; MERSE, V. W. Xylanase-, CM-cellulase and invertase activity in soil: an improved method. **Soil Biology & Biochemistry**. V. 22, p. 511-515, 1990.
- SCHUSTER, E.; SCHRODER, D. Side effects of sequentially-applied pesticides on target soil microorganisms: field experiments. **Soil Biology & Biochemistry**. V. 22, p. 67-373, 1990.
- SERRAT, B. M.; BITTENCOURT, S.; ANDREOLI, C.V.; SILVA, L. A. T. P.; SANTIAGO, T. R. Disposição de resíduos na agricultura: lodo de esgoto como fonte de nutrientes. IN: BITTENCOURT, S.; ANDREOLI, C. V.; MOCHIDA, G. A.; SERRAT, B. M. Uso agrícola de lodo de esgoto no estado do Paraná. **Trabalho apresentado no Workshop Uso Agrícola de Lodo de Esgoto: Avaliação após a resolução n. 375 do CONAMA**, Campinas. 2009.
- USGS. United States Geological Survey. **Mineral Commodity Summaries, 2009**. Phosphate rock, 193 p. Disponível em: <http://minerals.er.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2009/mcs2009.pdf> Acesso em: 27 jan 2010.
- SIMONETE, M. A.; KIEHL, J. C.; ANDRADE, C. A.; TEIXEIRA, C. F. A. Efeito do lodo de esgoto em um Argissolo e no crescimento e nutrição de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 38, n. 10, p. 1187-1195, 2003.
- SMITH, S. R.; WOODS, V.; EVANS, T. D. Nitrate dynamics in biosolids-treated soils I: influence of biosolids type and soil type. **Bioresource Technology**. Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 139-149, 1998.
- SOUZA, C. A.; JUNIOR, F. B. R.; MENDES, L. C.; LEMAINSKI, SILVA, J. E. Lodo de esgoto em atributos biológicos do solo e na nodulação e produção de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 44, n. 10, p. 1319-1327, 2009.

- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **ACTA Amazonica**. v. 12, p. 15-22, 1982.
- TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Assay of urease activity in soil. **Soil Biology & Biochemistry**. V. 4, p. 479-487, 1972.
- TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrofenol phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 1, p. 301-307, 1969.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.;BOHNEN, H.; VOKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, (Boletim Técnico, 5) 1995.
- TIEDJE, J. M. Denitrification. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). *Methods of soil analysis*. 2 ed. Madison: **American Society of Agronomy**, pt. 2: Chemical and microbiological properties, p. 1011-1026 (Agronomy. A Series of Monographs, 9), 1982.
- TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: VENEGAS, V. H. A. *et al.* (Eds.). *Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa/MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 2, p. 195-276, 2002.
- VANCE, E. D.; BROOKES, P. C. JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, v.19, p.703-707, 1987.
- VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 71, p. 137–144, 2006.
- VIEIRA, R. F.; TANAKA, R. T.; TSAI, S. M.; PÉREZ, D. V.; SILVA, C. M. M. S. Disponibilidade de nutrientes no solo, qualidade de grãos e produtividade da soja em solo adubado com lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 40, n. 9, p. 919-926, 2005.
- VIEUBLÉ-GONOD, L., BENOIT, P., COHEN, N., HOUOT, S. Spatial and temporal heterogeneity of soil microorganisms and isoproturon degrading activity in a tilled soil amended with urban waste composts. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 41, p. 2558–2567, 2009.
- WANG, X.; CHEN, T.; GE, Y.; JIA, Y. Studies on land application of sewage sludge and its limiting factors. **Journal of Hazardous Materials**. v. 160, p. 554–558, 2008.
- WHITELAW, M. A.; HARDEN, T. J.; HELYAR, K. R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biology & Biochemistry**. V. 31, p. 655–665, 1999.

WHITELAW, M. A.; HARDEN, T. J.; HELYAR, K. R. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**. V. 69, p. 99–144, 2000.

WOOMER, P. L. Most Probable Number Counts. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties. **Soil Science Society of America Journal**. Madison, p. 59-79, 1994.

YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. Fósforo na Agricultura Brasileira. **Anais do Simpósio Piracicaba: POTAFOS**, p. 726, 2004.

YEOMANS, J. C.; BREMNER, J. M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 19, p.1467-1476, 1988.