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

**Atributos microbiológicos do solo em área de pastagem irrigada com
lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado**

Alessandra Monteiro de Paula

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas

**Piracicaba
2008**

Alessandra Monteiro de Paula
Engenheiro Agrônomo

**Atributos microbiológicos do solo em área de pastagem irrigada com lâminas
excedentes de efluente de esgoto tratado**

Orientadora:
Prof^a.Dra. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas

**Piracicaba
2008**

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

Paula, Alessandra Monteiro de

Atributos microbiológicos do solo em área de pastagem irrigada com lâminas
excedentes de efluente de esgoto tratado / Alessandra Monteiro de Paula. - -
Piracicaba, 2008.
120 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Águas residuárias 2. Análise multivariada 3. Capim Tifton 4. Irrigação 5.
Microbiologia do solo 6. Pastagens I. Título

CDD 633.2

P324a

DEDICO

Aos que se empenham em aplicar a ciência
para melhorar a qualidade de vida de todos os seres vivos

AGRADECIMENTOS

Há quem diga que o acaso não existe. Ou mesmo que o destino já está traçado. Ainda tem os que confiam nos desígnios de Deus. Fato é que nessa vida tive muitos encontros agraciados, predestinados ou simplesmente ao acaso. Gostaria de aqui registrar minha gratidão as pessoas que encontrei nessa minha caminhada, durante o doutorado no programa de pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, da ESALQ/USP:

- À Professora Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, orientadora presente e exemplo de profissionalismo, sempre disposta a debater idéias e a compartilhar o seu conhecimento, declaro aqui meu sincero agradecimento e admiração.
- Ao Professor Dr. Adolpho José Melfi, Coordenador do projeto Temático da FAPESP (Uso de efluentes de esgotos tratados por processos biológicos (lagoas de estabilização e reatores UASB/lodos ativados) em solos agrícolas) e a Professora Dra. Célia Regina Montes, pelo apoio logístico e contribuições para o trabalho, durante as reuniões do grupo do projeto temático.
- Aos Professores Dr. Marco Antônio Nogueira, Dr. Carlos Eduardo Pellegrino Cerri e Dra. Brigitte Josefine Feigl, avaliadores no exame de qualificação, pelo o que contribuíram para o refinamento do trabalho.
- Ao Professor Dr. David E. Crowey, pela orientação e oportunidade oferecida para realização do estágio no exterior, no Laboratório de Microbiologia Ambiental, da Universidade da Califórnia, Riverside.
- Aos meus pais, Vera Lúcia Monteiro de Paula e Antônio Gonzaga de Paula, minha avó Maria Dolores Monteiro, meu irmão Vlademir Monteiro de Paula e meus sobrinhos Gabriel e Amanda, minha querida família, pela compreensão durante as ausências, apoio e carinho, nos momentos mais necessários.
- À família do Laboratório de Microbiologia do Solo, da Esalq/USP: Os técnicos Denise L.C. Mescolotti e Luis Fernando Baldesin, altamente competentes e simpáticos, são como padrinhos dessa tese! Aos amigos e colegas, irmãos e irmãs de orientadora: Fernanda de Carvalho, José Pereira, Maria Elda César, Rafaela Neroni, Daniel Lammel, Dilmar Baretta, Alexandre Martines, Pilar Mariani, Sandra Cardoso, André Nakatani, Simone Bertini, Mylenne Pinheiro, Rafael Vasconcellos, Rafael Valadares, Carlos Ribeiro, Priscila Azevedo, Priscila Petterman, André Cicolin, Leandro Tizato, Maurício Dagui, Henrique Robortella, Júlia Lima, Fabiana Brandão, Gabriela Gerônimo, Sara Hirata e Caroline Garcia.
- Aos amigos e colegas da pós-graduação: Isabeli Bruno, Sayonara Moreno, Adriana Silva, Caronlina Maluche Baretta, Gisele Nunes, Giselle Monteiro, Lucas Azevedo, Rafael D'Armas, Gabriel Barth, Magnus Deon, Bruno Pereira, Sandra Nogueira, Márcio Morais, Adriel da Fonseca, Tamara Gomes.
- Ao Dr. Dilmar Baretta pelas sugestões e auxílio na análise estatística multivariada, a Dra. Carolina R. D. Maluche-Baretta pelo auxílio na análise estatística do perfil metabólico da comunidade microbiana, ao Msc. Magnus Dall'Igna Deon pelo auxílio na estatística univariada e a Dra. Sandra Furlan Nogueira pelas discussões e sugestões que enriqueceram este trabalho.
- Aos colegas do estágio na Universidade da Califórnia, em Riverside: Rosario Peneda, Richard Belcher, J.P. Baquiran, Azeen Khalid e Guntram von Kiparski.

- Ao funcionário James, pelo auxílio no campo experimental, em Lins, SP.
- Aos funcionários do Departamento de Ciência do Solo, da Esalq/USP.

Às instituições:

- Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal do ensino superior, Capes, pela bolsa concedida.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa SWE concedida para estágio no exterior.
- FAPESP, pelo apoio financeiro.
- Núcleo de Pesquisas em Geoquímica e Geofísica na Litosfera, NUPEGEL.
- Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, SABESP.
- Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo.
- Universidade da Califórnia, em Riverside, Estados Unidos.

A todos que colaboraram para a realização desse trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 DESENVOLVIMENTO	14
2.1 Hipótese	14
2.2 Revisão Bibliográfica.....	14
2.2.1 Atributos microbianos indicativos de distúrbios no sistema solo-planta	14
2.2.1.1 Atividade microbiana no solo.....	16
2.2.1.2 Grupos funcionais de microrganismos	20
2.2.1.3 Avaliação de grupos funcionais de microrganismos.....	23
2.2.2 Efeito da irrigação com esgoto tratado nos atributos microbiológicos do solo	27
2.3 Objetivos	32
2.3.1 Objetivos específicos.....	32
2.4 Material e Métodos.....	33
2.4.1 Descrição da área de estudo.....	33
2.4.2 Condução do experimento	35
2.4.3 Amostras e análises de efluente e solo	37
2.4.4 Análise estatística dos dados	43
2.4.4.1 Efeito de lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado na pastagem de capim Tifton 85 sobre os atributos químicos e microbiológicos do solo ...	43
2.4.4.2 Efeito da irrigação com efluente na pastagem de Tifton 85 sobre os atributos microbiológicos comparado com área de pastagem não-irrigada	45
2.4.4.3 Perfil do consumo de fontes de carbono pela comunidade microbiana de uma área de pastagem de capim Tifton 85 irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado	46
3 Resultados	48
3.1 Precipitação e irrigação com efluente	48
3.2 Adição de carbono e nitrogênio via efluente.....	50

3.3 Efeito de lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado na pastagem de capim Tifton 85 sobre os atributos químicos e microbiológicos do solo ...	51
3.3.1 Parâmetros químicos e de atividade microbiana.....	52
3.3.2 Densidade populacional de grupos funcionais de microrganismos	65
3.3.3 Análises estatísticas multivariadas	70
3.3.3.1 Análise de curva de resposta principal (PRC)	70
3.3.3.2 Análise de Redundância (RDA).....	73
3.3.4 Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)	76
3.4 Efeito da irrigação com efluente na pastagem de Tifton 85 sobre os atributos microbiológicos comparado com área de pastagem não-irrigada	78
3.5 Perfil do consumo de fontes de carbono pela comunidade microbiana de uma área de pastagem de capim Tifton 85 irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado	83
3.6 Diversidade genética de bactérias oxidantes de amônio	93
3.7 Síntese dos resultados	97
4 CONCLUSÕES	98
Considerações Finais.....	99
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXOS	119

RESUMO

Atributos microbiológicos do solo em área de pastagem irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado

A irrigação de áreas agrícolas com efluentes de esgoto tratado (EET) é interessante e atrativa, quando realizada de forma controlada, pois além de possibilitar a liberação de recursos hídricos de melhor qualidade para outras atividades humanas, serve como uma forma de polimento dos efluentes provenientes do tratamento de esgoto por meio do “filtro biológico” constituído pelo sistema solo-planta. Entretanto, o reuso agrícola de efluentes é recente no Brasil e são poucos os estudos relacionados aos possíveis impactos dessa prática na qualidade dos solos tropicais. O presente estudo foi elaborado com o objetivo de avaliar o efeito de lâminas excedentes de irrigação de pastagem com capim Tifton, com efluente de esgoto tratado por 18 meses, na atividade microbiana, densidade de grupos funcionais, no potencial metabólico dos microrganismos e na estrutura da comunidade de bactérias oxidantes de amônio do solo. O experimento foi conduzido numa área de pastagem com capim-Bermuda Tifton 85 (*Cynodon dactylon* Pers. X *C. niemfuensis* Vanderyst) no município de Lins (SP), ao lado da estação de tratamento de esgoto operada pela Sabesp. Os tratamentos foram definidos a partir da lâmina de irrigação considerada adequada para a demanda hídrica da cultura (controle) e mais três lâminas com excesso de irrigação, sendo elas: 0% de excesso (controle), 25%, 50% e 100% de excesso de irrigação com efluente. Para avaliação do efeito do efluente sobre os atributos químicos e microbiológicos do solo, também foi avaliada uma área de pastagem de capim Tifton 85, localizada próxima à área experimental e não irrigada com efluente. A aplicação de lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado durante um ano e meio promoveu alterações nas propriedades químicas e microbiológicas do solo. Quando as lâminas de irrigação foram avaliadas em conjunto com o efeito promovido pela precipitação, constatou-se redução da acidez ativa, dos teores de magnésio e potássio trocáveis e, aumento nos teores de cálcio e sódio trocáveis do solo. A colonização radicular do capim Tifton 85 por fungos micorrízicos arbusculares não foi afetada pela irrigação com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado, pelo período de 18 meses. A análise de curva de resposta principal possibilitou constatar que dos grupos funcionais de microrganismos avaliados, os amonificantes e os desnitrificantes foram os mais influenciados pelo excesso de irrigação com efluente e, a lâmina com 25% de excesso foi a que promoveu a menor variação nos grupos funcionais de microrganismos, em relação à lâmina controle. O potencial metabólico dos microrganismos foi estimulado pela irrigação com efluente, sendo que a lâmina excedente em até 100% não modificou significativamente o potencial metabólico da comunidade microbiana em relação à lâmina controle. As áreas irrigadas com efluente de esgoto tratado apresentam dominância de bactérias oxidantes de amônio do gênero *Nitrosospira* sp.

Palavras-chave: Irrigação com efluentes; Amonificantes; Desnitrificantes; Potencial metabólico; Biolog; Sódio; Fungos micorrízicos arbusculares; análise multivariada

ABSTRACT

Microbiological soil attributes of a pasture area with surplus irrigation of wastewater effluent

Crop irrigation with treated sewage effluent (STE) is an interesting and attractive practice, when applied in a controlled manner, as well as it makes possible the release of water of better quality for other human activities and serves as a way to polish the STE through the "biological filter" comprising the soil-plant system. However, wastewater irrigation is a recent practice in Brazil and little is known about its effects on the quality of tropical soils. The aim of this work was to evaluate the effects of surplus irrigation with STE of a pasture area cultivated with Bermudagrass Tifton 85 for 18 months, on the microbial activity, functional groups of microorganisms, on the community-level physiological profile and on the community structure of ammonia oxidizing bacteria. The experiment was carried out at the municipal district of Lins, São Paulo State, close to the sewage treatment plant (STP), operated by Sabesp (Companhia de saneamento básico do Estado de São Paulo), cultivated with bermuda grass Tifton 85 (*Cynodon dactylon* Pers. X *C. niemfuensis* Vanderyst). The treatments were based on the amount of irrigation required for the adequate water amount necessity for this pasture grass, and other 3 surplus irrigation treatments, as follow: 0% of excess (control), 25%, 50% and 100% of excess of STE irrigation. Surplus STE pasture irrigation for 18 months changed soil chemical and microbiological parameters. The evaluation of surplus STE irrigation and also the precipitation effects decreased the soil pH and exchangeable magnesium and potassium, while it increased the exchangeable calcium and sodium. The root colonization of Bermudagrass by arbuscular mycorrhizal fungi was not affected by surplus STE irrigation, after 18 months. The principal response curve analysis demonstrated that the functional groups of microorganisms: ammonifiers and denitrifiers, were the most affected by surplus STE irrigation. The treatment with 25% of surplus irrigation caused only minor variation on the functional groups of microorganisms, compared to the control irrigation. The soil microorganisms' metabolic potential, evaluated by the kinetic of carbon substrates consumption, using Biolog Ecoplates, was stimulated by STE irrigation. Even 100% surplus STE irrigation did not cause a significant modification of the the microbial communities metabolic potential, when compared to the control STE irrigation. STE irrigated pasture areas presented dominance of the genus *Nitrosospira*, among ammonium oxidizing bacteria.

Keywords: wastewater irrigation; ammonifiers; denitrifiers; metabolic potential; Biolog; sodium; arbuscular mycorrhizal fungi; multivariate analysis

LISTA DE ABREVIATURAS

EET – Efluente de esgoto tratado
Cmic – Carbono microbiano
 q_{MIC} – Quociente microbiano
 q_{CO_2} – Quociente metabólico
C:N – Relação carbono: nitrogênio
BAC – Bactérias totais
FGO – Fungos totais
AMO – Amonificantes
NIT-NH₄⁺ - Nitrificantes, oxidantes de amônio
NIT-NO₂⁻ - Nitrificantes, oxidantes de nitrito
DESN - Desnitrificantes
PCR – Reação da polimerase em cadeia
DGGE – Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação
RIS – Respiração induzida por substrato
FMA – fungo micorrízico arbusculares
ETE – Estação de tratamento de esgoto
pH – Acidez ativa do solo
Ca²⁺ – Cálcio trocável
Mg²⁺ – Magnésio trocável
K⁺ – Potássio trocável
Na⁺ – Sódio trocável
CTC – Capacidade de troca catiônica do solo
CT – Carbono total do solo
NT – Nitrogênio total do solo
NMP – Número mais provável de microrganismos
RDA – análise de redundância
PRC – análise de curva de resposta principal

AWCD – média do desenvolvimento de cor do poço da placa de Biolog

'K' – parâmetro cinético de consumo que representa o potencial de substrato utilizado

'R' – parâmetro cinético de consumo que representa a taxa exponencial de utilização do substrato

'S' – parâmetro cinético de consumo que representa o tempo para alcançar o ponto médio da curva de consumo de substrato.

NMDS – Análise em escala multidimensional

ANOSIM – análise de similaridade

1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, devido a sua escassez, existe uma crescente competição pelo uso de água entre diversos setores da sociedade. O consumo de água na agricultura é grande em relação a outros tipos de uso, podendo afetar a disponibilidade deste recurso para a população urbana se este não for bem administrado. No Brasil, a agricultura consome cerca de 61% da água doce total (ANA, 2004). Portanto, é desejável uma realocação dos recursos hídricos usados na agricultura para outros setores.

Desde que realizada de forma controlada, a irrigação com efluente de esgoto tratado (EET) é altamente atrativa, pois além de possibilitar a liberação de recursos hídricos de melhor qualidade para outras atividades humanas, serve como uma forma de polimento dos efluentes provenientes do tratamento de esgoto por meio do “filtro biológico” constituído pelo sistema solo-planta. O uso de EET também pode ser considerado como recurso econômico de grande valor, pois contém nutrientes e sua utilização pode levar à diminuição de fertilizantes minerais adicionados aos agrossistemas, reduzindo os custos variáveis de produção e aumentando a competitividade do produtor, contribuindo ainda para a preservação do meio ambiente.

Dos sistemas de tratamento de esgoto doméstico disponíveis atualmente, o sistema de lagoas de estabilização é o mais utilizado nas cidades de pequeno e médio porte (FEIGIN et al., 1991), sobretudo, no interior do Estado de São Paulo. Este sistema gera efluentes que apresentam sólidos inorgânicos e material orgânico em suspensão ou dissolvido, características de um tipo de água residuária, segundo Pescod (1992).

Embora o processo de tratamento por lagoas de estabilização seja capaz de reduzir consideravelmente as concentrações de nutrientes e matéria orgânica, os efluentes de lagoas de estabilização normalmente apresentam concentrações, principalmente de fósforo e nitrogênio, acima do permitido pela legislação para a disposição em cursos d’água. Dessa forma, alternativas para a disposição dos efluentes são discutidas em diversos trabalhos (BOUWER; CHANEY, 1974; FEIGIN et al., 1991; CAMERON et al., 1997).

O reuso agrícola de efluentes destaca-se como alternativa mais econômica para a disposição ambiental desse resíduo (ASANO et al., 1996), utilizado em diversos países (FILIP et al., 1999). Contudo, a utilização extensiva e continuada de efluentes na agricultura resulta em alta carga de sais minerais dissolvidos e sólidos suspensos, alterando as características químicas, físicas e biológicas do solo (FILIP et al., 1999; BALKS et al., 1998; BOND, 1998; FRIEDEL et al., 2000) e também o ambiente (AL-NAKSHABANDI et al., 1997). As variações nas condições locais de solo, cobertura vegetal e composição do efluente são fatores determinantes da extensão dessas alterações, modificando (MOHAMMAD; MAZAHREH, 2003) ou não (MANCINO; PEPPER, 1992; WANG; CHANG; CROWLEY, 2003) a qualidade do solo.

O reuso agrícola de efluentes é recente no Brasil. Em estudo realizado em área de pastagem de capim Tifton 85 (*Cynodon dactylon* Pers. X *C. niemfuensis* Vanderyst) no município de Lins-SP, próxima à área de estudo do presente projeto, Fonseca et al. (2007a) observaram que a irrigação com efluente de esgoto tratado foi eficiente em substituir a água potável e ainda promoveu benefícios econômicos, associadas à fertilização com nitrogênio. De acordo com os autores, a irrigação com efluente foi capaz de suprir de 32 a 81% da necessidade de nitrogênio mineral requerida pelo capim para sua máxima produtividade.

Nesta mesma área, Nogueira et al. (2005) constataram que após um ano e meio de aplicação de efluente de esgoto tratado na irrigação do capim Tifton 85, a atividade microbiana, avaliada pelo quociente metabólico, aumentou somente na estação seca, devido ao estímulo desta atividade ocasionado pela umidade e adição de nitrogênio, via irrigação com efluente. Entretanto, neste período, não houve variação significativa na relação entre carbono microbiano:carbono orgânico do solo (C_{mic}/C_{OT}) para os tratamentos com efluente e com água potável, indicando a capacidade da microbiota em se adaptar às mudanças do solo ocasionadas pela irrigação.

Estes estudos anteriores comprovaram a eficiência da utilização de efluente de esgoto tratado em suprir o capim Tifton 85 em água e, parcialmente, em nutrientes (FONSECA et al., 2007a) e indicaram que a microbiota possui a capacidade de adaptar-se às mudanças no solo advindas da aplicação do efluente, em comparação à irrigação com água potável (NOGUEIRA et al., 2005).

A utilização de águas residuárias para irrigação de culturas certamente promove alterações na atividade microbiana, bem como na composição da comunidade edáfica (SPEIR, 2002; GELSOMINO et al., 2006) . Sendo a atividade microbiana do solo responsável em grande parte pela decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, síntese de substância húmicas e conseqüentemente, estabilidade estrutural do solo, é fundamental a avaliação da influência da disposição de efluentes de esgoto tratado sobre as transformações bioquímicas necessárias à qualidade do solo e seu efeito na comunidade microbiana.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Hipótese

A aplicação de lâminas excedentes de irrigação do capim Tifton 85 com efluente de esgoto tratado (EET) em até 50% da evapotranspiração da área não causará alterações negativas na qualidade química e microbiológica do solo, devido à alta produtividade e capacidade de remoção de nutrientes apresentada pelo capim Tifton 85.

2.2 Revisão Bibliográfica

2.2.1 Atributos microbianos indicativos de distúrbios no sistema solo-planta

O solo é um meio complexo e heterogêneo, resultado da alteração do material de origem (rochas, sedimentos ou outro solo) sob a ação de organismos, do clima e do relevo, ao longo do tempo. Constituído por quantidades variáveis de minerais, matéria orgânica, água, gases e organismos, este meio vivo e dinâmico pode ser considerado um recurso natural finito, limitado e não renovável.

A sua condição limitada e não renovável está baseada na relação desproporcional existente entre as taxas de formação e de degradação do solo. Do ponto de vista pedológico, a velocidade de aprofundamento de uma camada de solo é em média de 20 a 50 m por milhão de anos (BUOL; HOLE; McCRACKEN, 1973). Em contrapartida, as taxas de degradação do solo são mais rápidas. Considerando-se apenas o fenômeno da erosão dos solos, estima-se que cerca de 1,2 bilhões de hectares foram erodidos, a partir do final da Segunda Guerra Mundial (STOCKING, 2000). Além da erosão, o processo de degradação envolve também a contaminação dos solos, inutilizando-os tanto para a agricultura como para atividades urbanas e industriais. Atualmente, 24% dos solos encontram-se poluídos, pobres em nutrientes ou erodidos ao ponto de serem incapazes de sustentar plantas (Pesquisa FAPESP, 2008).

A preocupação com a conservação deste recurso é decorrente das funções que este apresenta para o ecossistema e para a sociedade. As principais funções do solo se caracterizam pela habilidade de servir como meio de sustento de vegetais e de edificações, regularizar e compartimentalizar o fluxo de água no ambiente, estocar e promover a ciclagem de nutrientes, além de decompor materiais orgânicos (LAVELLE; SPAIN, 2005)

Em função do conhecimento dessa habilidade dos microrganismos do solo em decompor os materiais orgânicos, desenvolveu-se o conceito de que o solo é capaz de absorver todo material orgânico nele adicionado. Entretanto, essa premissa não é verdadeira porque há uma série de substâncias orgânicas que não são degradáveis ou são de lenta degradação, denominadas recalcitrantes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2007).

Dessa forma, a disposição de resíduos no solo deve ser estudada com cautela, principalmente focando avaliações relacionadas com a atividade dos microrganismos edáficos. A utilização de microrganismos e processos microbianos para avaliar alterações no ambiente edáfico se justifica pela capacidade que a microbiota possui de responder prontamente às mudanças no solo (STENBERG, 1999).

2.2.1.1 Atividade microbiana no solo

A atividade dos microrganismos do solo, também denominada respiração microbiana, é considerada um indicador sensível da decomposição de resíduos, do giro metabólico do carbono orgânico do solo e de distúrbios no ecossistema (TÓTOLA; CHAER, 2002).

Altas taxas de respiração microbiana podem indicar tanto um distúrbio ecológico, como a adição de grande quantidade de matéria orgânica prontamente disponível, ou ainda um alto nível de produtividade do ecossistema (TÓTOLA; CHAER, 2002). Dessa forma, a relação da taxa de respiração com outros parâmetros microbiológicos tende a fornecer uma interpretação mais adequada dos fenômenos que possam interferir na atividade da comunidade microbiana do solo, como a ação antrópica ou mesmo mudanças climáticas naturais.

Dentre esses parâmetros, destaca-se a biomassa microbiana, definida como a fração viva da matéria orgânica do solo (JENKINSON; LADD, 1981) e composta principalmente por bactérias e fungos. Sua aplicação como indicador de mudanças nos processos que ocorrem no ambiente edáfico é atribuída a sua rápida ciclagem, em comparação com a matéria orgânica do solo, além de sua importância como reservatório temporário de nutrientes (SPARLING, 1992).

O carbono da biomassa microbiana, ou carbono microbiano (C_{mic}), tem sido utilizado em diversos estudos sobre o impacto de diferentes manejos no solo (ARAÚJO et al., 2003; KAUR et al., 2008; TRASAR-CEPEDA et al., 2008) e no monitoramento da recuperação de solos degradados e poluídos (COLODRO et al., 2007; SILVEIRA; MELLONI; PEREIRA, 2004; ZHANG et al., 2008). Entretanto, as comparações entre diferentes áreas devem ser feitas com cautela, levando em consideração a textura e o teor de carbono orgânico do solo (C_{org}), características que influenciam diretamente a biomassa microbiana (ROSCOE et al., 2006).

Para contornar as dificuldades de interpretação de resultados, alguns autores sugeriram a relação entre o carbono microbiano e o carbono orgânico do solo ($C_{mic}:C_{org}$), ou quociente microbiano ($qMIC$). Esta relação representa a proporção do

carbono orgânico total que corresponde à biomassa microbiana, o que também reflete o carbono disponível para crescimento da biomassa (ANDERSON; DOMSCH, 1985). Segundo Jenkinson e Ladd (1981), o $qMIC$ abrange valores de 1 a 5%, variando em função da classificação do solo.

Por se tratar de uma relação e não um valor absoluto, o $qMIC$ possibilita a comparação de dados entre solos com diferentes teores de matéria orgânica. De modo geral, a exploração intensiva do solo, assim como a presença de condições estressantes (contaminação do solo por metais pesados ou poluentes orgânicos, deficiências nutricionais, etc) promovem um declínio mais rápido no reservatório de carbono microbiano do que no carbono total do solo, que pode ser observado em menores taxas de $qMIC$ (WARDLE, 1997).

Outra relação amplamente estudada e discutida inclui a taxa de respiração e o carbono microbiano ($Cmic$) e é também denominada de quociente metabólico (qCO_2). Proposta por Anderson e Domsch (1993), esta relação tem sido empregada como indicador ecofisiológico na avaliação da qualidade do solo (ANDERSON, 2003).

Utilizando-se de conceitos ecológicos, como o desenvolvido por Odum (1969), no qual o autor considera que existe uma tendência ao uso mais eficiente de energia com o aumento da diversidade de produtores primários, durante os estádios de sucessão ecológica, menores valores de qCO_2 estariam relacionados com áreas de maior diversidade vegetal (ANDERSON, 2003).

Em estudos comparando áreas agrícolas cultivadas por longo tempo e florestas em clímax, com solos apresentando pH neutro, Anderson (2003) verificou valores de 2,0 a 4,4% de $Cmic:Corg$ ($qMIC$), dependendo do manejo e da fertilidade do solo, e para o qCO_2 os valores variaram de 0,5 a 2,0 $mg\ CO_2-C\ g^{-1}\ Cmic\ h^{-1}$. A partir desses resultados, o autor sugere que em solos neutros, valores de $Cmic:Corg$ ($qMIC$) menores que 2% e de qCO_2 maiores que 2,0 $mg\ CO_2-C\ g^{-1}\ Cmic\ h^{-1}$ podem ser considerados críticos para a atividade microbiana e a manutenção das funções do solo relacionadas aos microrganismos.

Entretanto, estes valores críticos e a avaliação do qCO_2 como índice capaz de discriminar efeitos de distúrbio (mudanças rápidas nas condições ambientais) ou de estresse (condições limitantes ao crescimento e manutenção da comunidade

microbiana por longos períodos) no solo têm sido questionada por diversos autores (ALVAREZ et al., 1998; BILGO et al., 2006; RABARY et al., 2008; WARDLE, GHANI, 1995).

Comparando dados compilados de diversos trabalhos, Wardle e Ghani (1995) verificaram a inconsistência da avaliação do qCO_2 como indicador de distúrbio no ecossistema. Segundo os autores, este índice mostrou-se relevante no estudo de áreas sob estresse severo, como a contaminação por metais pesados.

Para obter uma informação mais consistente e confiável, Anderson (2003) recomenda a interpretação do qCO_2 conjuntamente com o $qMIC$, bem como a avaliação ao longo do tempo, a fim de avaliar também as variações desses parâmetros para a área em estudo.

Outra forma de investigar os impactos causados por manejos que adicionam resíduos ao solo, sobre a comunidade microbiana, é a avaliação da capacidade da comunidade em responder à adição de fontes de carbono altamente energéticas e de fácil degradação, como a respiração induzida por substrato (RIS) (ANDERSON; DOMSCH, 1978).

Considerando a dinâmica de crescimento dos microrganismos, conceitos de ecologia podem ser aplicados para compreender o comportamento dos organismos do solo, em função de uma pressão de seleção (MORRIS; BLACKWOOD, 2007), como no caso da análise da RIS. A adição de glicose a uma amostra de solo sob condições controladas, uma fonte de carbono simples, poderia representar uma seleção do tipo r , ou seja, relacionada com abundância de substratos, onde há a dominância de microrganismos de crescimento rápido e hábeis no consumo de substratos simples e disponíveis (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A avaliação de padrões de utilização de fontes de carbono pelos microrganismos do solo possibilita o estudo do potencial metabólico da comunidade microbiana. Dessa forma, a análise do potencial metabólico dos microrganismos em um solo pode expor diferenças quanto ao padrão de utilização de substratos, sendo de grande interesse para estratégias de aplicação de efluentes no solo a maior diversidade metabólica possível encontrada na comunidade microbiana.

Dentre as metodologias existentes para estudos do potencial metabólico, uma

das mais empregadas envolve a incubação de suspensões de solo em placas Ecoplate, da empresa Biolog (BIOLOG Inc., HAYWARD, CA.), contendo 31 diferentes fontes de carbono. A utilização da fonte de carbono é facilmente detectada através da presença de um indicador, ocorrendo uma mudança de coloração quando um substrato é utilizado pelo microrganismo durante o processo de respiração. As informações podem ser analisadas automaticamente e podem ser comparadas em um banco de dados.

O método desenvolvido por Garland e Mills (1994), com a proposta de um sistema capaz de identificar bactérias com habilidade de metabolizar variadas fontes individuais de carbono, possibilita avaliar o potencial heterotrófico de uma comunidade microbiana em condições de cultivo. Para este tipo de avaliação, estão disponíveis comercialmente vários tipos de placas (Biolog GN2, GP2, ECO, SFN2 e SFP2). As placas Ecoplate foram desenvolvidas para a avaliação de comunidades bacterianas presentes em amostras ambientais, contendo 31 fontes de carbono em triplicata e um controle sem substrato (INSAM, 1996). Estudos publicados recentemente sugerem que o número e a diversidade de substratos presentes nas Ecoplates são suficientes para representar comunidades microbianas presentes em diferentes e contrastantes amostras ambientais (CLASSEN et al. 2003).

Embora alguns trabalhos já tenham discutido as limitações do método (PRESTON-MAFHAM et al., 2002), bem como as precauções a serem tomadas com relação à densidade de inóculo inicial, ao tempo e à temperatura de incubação das placas (CLASSEN et al., 2003) e ao método de extração dos microrganismos presentes na amostra (CALBRIX et al., 2005) a análise do padrão de consumo de substrato pela comunidade microbiana tem fornecido informações úteis na avaliação da diversidade funcional de microrganismos em amostras ambientais (CRECHIO et al., 2004).

Além de parâmetros microbiológicos relacionados à atividade dos microrganismos e sua participação na ciclagem da matéria orgânica do solo, a avaliação da comunidade microbiana e de grupos funcionais de microrganismos também possibilitam monitorar mudanças no manejo do sistema solo-planta.

2.2.1.2 Grupos funcionais de microrganismos

Os microrganismos do solo apresentam alta diversidade metabólica, característica que os torna versáteis para ocupar diversos nichos ecológicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2007). Os quimiorganotróficos, ou heterotróficos, utilizam compostos orgânicos para obter carbono e energia e são os mais abundantes no solo em densidade e diversidade, atuando principalmente na degradação da matéria orgânica do solo. A atividade de decomposição de materiais orgânicos depositados no solo é realizada por diversos microrganismos, destacando-se fungos e bactérias (LAVELLE; SPAIN, 2003).

As bactérias são capazes de realizar uma grande variedade de transformações químicas, e por consequência, fundamentais no processo de degradação de materiais orgânicos. Os fungos, considerados como organismos decompositores primários, também são reconhecidos pela capacidade de decompor substâncias complexas como a lignina (LAVELLE; SPAIN, 2005).

Dentre as etapas de degradação de resíduos orgânicos realizados pelos microrganismos heterotróficos destaca-se a amonificação. Este é o processo de transformação do nitrogênio presente nos compostos orgânicos em amônia ou amônio, conforme o pH do solo. Mediado por enzimas que são produzidas por microrganismos e animais do solo, o processo inicia com quebra primária dos polímeros orgânicos que contém nitrogênio, como proteínas, açúcares aminados e ácidos nucleicos, pela ação das enzimas extracelulares (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992).

Os monômeros resultantes desta reação inicial transpassam a membrana celular onde são metabolizados no citoplasma dos microrganismos amonificantes, resultando na produção de amônio, que por fim é liberado para a solução do solo. Na maioria das situações a degradação microbiana de aminoácidos, açúcares aminados e nucleotídeos é governada pela demanda de carbono e energia requerida pelos amonificantes (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992).

A produção líquida de amônio no solo é influenciada não apenas pelas condições ambientais e relação Carbono:Nitrogênio (C:N) dos substratos orgânicos e microrganismos, mas também por outros fatores bióticos. Os protozoários e

nematóides, são responsáveis por cerca de 30% da mineralização líquida de nitrogênio (SYLVIA et al., 2005). De acordo com os autores, no processo de predação de bactérias por protozoários geralmente ocorre liberação de amônio como produto residual. Isto porque ambos possuem relações C:N similares, o que resulta em excesso de nitrogênio, devido à perda de carbono na forma de CO₂ durante o metabolismo do protozoário.

Uma vez na solução do solo, o amônio pode ter vários destinos. Dentre eles, destacam-se a absorção pelas plantas, a assimilação microbiana, também considerada imobilização temporária e a oxidação a nitrato pelas bactérias nitrificantes.

A produção microbiana de nitrato, ou nitrificação, é realizada no ambiente edáfico principalmente por bactérias quimioautotróficas. Este processo é composto por duas etapas: a oxidação do amônio a nitrito, por bactérias do gênero *Nitrosomonas*; em seguida, a oxidação do nitrito a nitrato, por bactérias do gênero *Nitrobacter* (ROBERTSON; GROFFMAN, 2007).

O processo de nitrificação no solo também pode ocorrer via nitrificação heterotrófica (NURK et al., 2005; SU et al., 2006) e as comunidades microbianas envolvidas nesse processo também são capazes de desnitrificar, utilizando o nitrato e o nitrito formados durante a nitrificação como aceptores de elétrons, reduzindo-os a óxido nítrico (MCLAIN; MARTENS, 2006).

Em solos que não receberam fertilização nitrogenada, as populações de nitrificantes variam de 10³ a 10⁴ células g⁻¹ de solo, mas, após fertilização, observa-se aumento das populações para valores superiores a 10⁶ células g⁻¹ de solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2007).

Os principais fatores que regulam o crescimento das populações de nitrificantes são a condição de aeração, umidade do solo, disponibilidade de substrato e o pH do solo. Outros fatores como temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes além do nitrogênio também afetam a atividade dos nitrificantes (ROBERTSON; GROFFMAN, 2007).

O nitrato resultante do processo de nitrificação, uma vez na solução do solo, pode ser prontamente utilizado por outros microrganismos ou absorvido pelas raízes das plantas. Entretanto, por se tratar de um ânion, esta forma de nitrogênio é altamente

móvel no solo (CANTARELLA, 2007) e as perdas por lixiviação são de grande risco econômico e ambiental, em função do potencial de contaminação de águas subterrâneas.

Em condições de redução e limitação de oxigênio no meio, o nitrato exerce a função deceptor de elétrons em diferentes espécies bacterianas, também denominadas de desnitrificantes. A desnitrificação respiratória é geralmente a principal rota de perda de nitrogênio para a atmosfera (ROBERTSON, 2000).

As bactérias desnitrificantes compreendem de 0,1 a 5% do total da comunidade bacteriana do solo e apresentam uma grande variação de grupos taxonômicos (TIEDJE, 1988). Essa grande participação se deve à capacidade desses microrganismos em atuar também como heterotróficos aeróbios, alternando o receptor de elétrons conforme a varia a disponibilidade de oxigênio no solo (ROBERTSON; GROFFMAN, 2007).

Na maioria dos solos, a formação de condição anaeróbia é o principal fator que controla a atividade dos desnitrificantes, seguido da disponibilidade de nitrato e carbono. O estabelecimento de sítios anaeróbios no solo varia grandemente, em função da sua estrutura e da umidade do solo. Devido a esses fatores, a desnitrificação também varia muito no tempo e no espaço. Mudanças de curto prazo, como fortes chuvas e irrigação, além da adição de nutrientes, são fenômenos que estão associados com aumentos temporários nas taxas de desnitrificação em um determinado solo (ROBERTSON, 2000).

Outro grupo importante de microrganismos compreende os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) que, em simbiose com as raízes das plantas, formam as micorrizas arbusculares. Estas são conhecidas pelos benefícios que promovem à planta hospedeira, sobretudo em condições de baixa disponibilidade de nutrientes (SMITH; READ, 1997).

Juntamente com a melhoria na aquisição de nutrientes, em especial daqueles que apresentam baixa mobilidade no solo, como o fósforo, a rede de hifas formada pela associação micorrízica proporciona uma maior agregação e estabilização dos agregados do solo, além da deposição de material orgânico, como as proteínas denominadas glomalinas, que também contribuem para a agregação (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992).

Plantas micorrizadas em geral apresentam alterações fisiológicas, com o favorecimento da relação água-planta, destacando-se maior taxa de transpiração e abertura estomatal e alterações nas raízes em comprimento e profundidade e nas características de absorção, fatores que auxiliam a planta em condições de excesso de sais no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2007).

Estudos sobre o impacto da disposição de rejeitos de mineração (LINS et al., 2007), contaminação com resíduos derivados de petróleo (PAULA et al., 2006) e uso intensivo de herbicidas (VIEIRA et al., 2007) apontam uma redução na colonização micorrízica e na diversidade desses fungos, resultando na seleção de espécies menos eficientes no estabelecimento da associação simbiótica com as plantas.

Bem desenvolvidas, inteiramente funcionais, as simbioses já foram reconhecidas como fundamentais para a estabilidade do ecossistema e sua sustentabilidade (ODUM, 1959). As micorrizas arbusculares estão presentes na maioria das plantas (BRUNDRETT, 1991) e, em vista dos benefícios promovidos pela simbiose e sabendo da inibição da associação em condições de excesso de nutrientes, a avaliação da ocorrência desses fungos, bem como o status de colonização da planta são informações importantes para se obter uma acurada avaliação da eficiência da aplicação de efluente em culturas agrícolas.

2.2.1.3 Avaliação de grupos funcionais de microrganismos

A contagem ou densidade populacional de grupos funcionais de microrganismos é um método bastante utilizado e conhecido no estudo da comunidade microbiana do solo (ACEA; CARBALLAS, 1999; FILIP et al., 1999; BARROTI; NAHAS, 2000; SANOMIYA; NAHAS, 2003; LAVELLE; SPAIN, 2005). O uso do método de diluição em série a partir de uma suspensão de solo, seguido de inoculação em meios de cultivo líquidos ou sólidos e posteriores contagens são técnicas simples e reproduzíveis, não necessitando de equipamentos caros.

Devido à complexidade das populações microbianas e seus diferentes processos é difícil fazer comparações entre diferentes solos, sob diferentes condições de manejo e

uso, baseando-se no tamanho das populações ou em funções específicas da comunidade microbiana. Dessa forma, o uso de parâmetros como a contagem de microrganismos e a avaliação de seus processos é mais aplicável no estudo de uma área em particular, quando se pretende analisar a mudança de uso do solo ou o efeito de um determinado manejo (ROPER, OPHEL-KELLER, 1997).

Baseados em numerosos estudos sobre a influência de agroquímicos como fator de distúrbio do solo sobre a comunidade microbiana, Domsch et al. (1983) propuseram a seguinte classificação:

Grupo altamente sensível: bactérias nitrificantes, actinomicetos e bactérias do gênero *Rhizobium* e as funções de degradação da matéria orgânica e a nitrificação; grupo moderadamente sensível: bactérias totais, fungos totais e algas e, as funções de desnitrificação e amonificação; grupo pouco sensível: bactérias amonificantes e microrganismos proteolíticos e a função de fixação biológica de nitrogênio.

Brookes et al. (1995) também ressaltaram que os grupos de microrganismos e suas funções que podem ser indicativas de um distúrbio ou mudança de uso do solo deveriam ser facilmente distinguíveis daqueles de uma medida controle ou referência (área não sujeita ao distúrbio).

Embora a avaliação da densidade populacional por meio do método do número mais provável forneça dados interessantes, este método apresenta vários fatores que contribuem para o número relativamente baixo de bactérias ou fungos detectados. Apenas as espécies capazes de crescer utilizando os nutrientes contidos no meio de cultura e nas condições de incubação produzirão colônias. Em consequência disso, apenas uma fração muito pequena da comunidade microbiana do solo pode ser estimada (KANDELER, 2007).

Para contornar essas limitações foram desenvolvidos métodos de avaliação de grupos funcionais de microrganismos que independem de cultivo, como: a quantificação e identificação de ácidos graxos, componentes das membranas celulares; perfil de quinonas, componentes do sistema de transporte de elétrons da maioria dos organismos e, a quantificação de moléculas-assinatura, como ergosterol para fungos, lipossacarídeos e glicoproteínas, para variados grupos de bactérias, dentre outros métodos (KANDELER, 2007).

Embora esses métodos ofereçam informações mais detalhadas sobre os grupos funcionais de microrganismos, muitos deles apresentam elevados custos de execução e demandam treinamento adequado para a condução das análises. Dada essas características peculiares, esses métodos podem ser empregados como ferramentas para estudos complementares, após uma análise da área de estudo, utilizando medidas mais abrangentes, como a contagem de grupos funcionais de microrganismos.

As comunidades microbianas do solo em equilíbrio dinâmico são geralmente constituídas por poucas espécies contendo muitos indivíduos e por muitas espécies com poucos indivíduos. Embora as populações dominantes sejam as maiores responsáveis pelos fluxos de matéria e de energia na comunidade, as espécies menos abundantes são as que mais contribuem para a diversidade biológica (ATLAS; BARTHA, 1997).

Dessa forma, a alta diversidade de organismos está geralmente associada à elevada estabilidade da comunidade, onde cada população desempenha papel funcional que determina a manutenção normal dos fluxos de matéria e de energia em cada nível trófico de um ecossistema particular (MOREIRA; SIQUEIRA, 2007). Considerando o ambiente edáfico, o estabelecimento de uma condição desfavorável poderia resultar na inibição de algumas populações que desempenham papéis vitais dentro da comunidade (TÓTOLA; CHAER, 2002).

A diversidade microbiana do solo é usualmente analisada em nível de espécie ou diversidade genética, mais do que em nível de diversidade estrutural e funcional (HOBEN; HARRIS, 1995; VAN BRUGGEN; SEMENOV, 2000).

Estudos moleculares de ecologia microbiana dependem da extração e caracterização de ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico – DNA; ácido ribonucleico – RNA) de organismos do solo. Uma vez extraídos, os ácidos nucleicos ou outras moléculas também consideradas biomarcadores podem ser diretamente analisados (THIES, 2007).

A partir dos extratos de DNA de amostras de solo, têm-se disponíveis diversos métodos moleculares de análise, que podem ser diretos ou dependentes da reação em cadeia da polimerase (em inglês, polimerase chain reaction – PCR), utilizada para aumentar o número de cópias de um gene de interesse, que seja de fácil detecção.

(NAKATSU, 2007).

A reação de PCR envolve a separação da dupla-fita de DNA molde em duas fitas (desnaturação), seguido da hibridização (anelamento) de oligonucleotídeos iniciadores (fitas curtas de nucleotídeos com uma seqüência conhecida) às fitas de DNA separadas, sendo um iniciador e outro finalizador de uma dada seqüência de interesse. Por fim, ocorre a elongação do híbrido iniciador-fita molde de DNA pela enzima TaqDNA polimerase. Este ciclo é então repetido de 25 a 30 vezes, dobrando o número de produtos (amplicons) em cada ciclo (THIES, 2007).

Os iniciadores utilizados para estudos de ecologia do solo podem ter várias finalidades, dependendo da informação que se deseja. Estes podem buscar seqüências específicas do DNA molde, como aqueles que codificam genes de uma pequena subunidade do rRNA (THIES, 2007), ou podem também enfocar seqüências de genes com uma função conhecida.

O gene *amoA* enquadra-se nos genes de interesse que codificam funções ecológicas significantes, como a nitrificação (ROTTHAUWE et al., 1997). Este gene codifica a unidade α da enzima amônia monooxigenase, que catalisa a primeira etapa da nitrificação: a oxidação da amônia à hidroxilamina (KLOTZ; NORTON, 1995). As técnicas moleculares têm sido utilizadas com mais freqüência no estudo desse grupo de microrganismos, as bactérias oxidantes de amônio (CHU et al., 2007; SCHMIDT et al., 2007), em função das limitações da avaliação em meios de cultivo, ocasionadas pela taxa de crescimento lento e baixa produção de biomassa desse grupo de bactérias em meios de cultivo (PROSSER, 1989).

Das técnicas moleculares dependentes das reações de PCR atualmente disponíveis, a eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (em inglês, denaturing gradient gel electrophoresis – DGGE) é a mais comumente utilizada. De modo geral, técnicas genéticas de identificação da comunidade microbiana, como o DGGE, possibilitam a comparação de grande número de amostras, o que facilita a análise temporal e espacial das comunidades nos variados ecossistemas (NAKATSU, 2007).

No DGGE, o gel possui um gradiente de desnaturação geralmente composto de uréia e formamida, que funciona como a matriz e fornece resistência para a

movimentação das cópias de DNA molde, obtidas na PCR, durante a eletroforese. Esses compostos desnaturantes têm efeito diferenciado sobre as pontes de hidrogênio formadas entre as bases nitrogenadas, sendo necessária uma maior concentração de desnaturante para romper as pontes entre as bases Guanina e Citosina (NAKATSU, 2007).

As variações nas seqüências de fragmentos de DNA com até 500 pares de base podem ser detectados pela técnica PCR-DGGE. A eficiência na detecção de diferentes seqüências pode ser ampliada com a adição de um fragmento rico em Guanina+Citosina, em um dos lados do fragmento de DNA a ser analisado (SHEFFIELD et al., 1989). Essa técnica, associada ao seqüenciamento tem sido empregada com sucesso no estudo das comunidades microbianas, em diferentes condições de manejo e atividades impactantes no solo (BRIONES et al., 2002; CHU et al., 2007; NICOLAISEN; RAMSING, 2002;).

Segundo Nakastu (2000), a avaliação de comunidades microbianas que respondem a estresses externos, utilizando iniciadores de grupos específicos, como aqueles menos abundantes da microbiota do solo, que provavelmente exercem uma função ecológica chave na manutenção da fertilidade, possibilita explorar melhor a complexidade da comunidade.

2.2.2 Efeito da irrigação com esgoto tratado nos atributos microbiológicos do solo

A utilização agrícola de efluentes de esgoto doméstico tratado é uma prática comum e antiga em diversos países (FILIP et al., 1999; RAMIREZ-FUENTES et al., 2002; WANG et al., 2003), entretanto, no Brasil, as pesquisas sobre esta prática são recentes (NOGUEIRA et al., 2005; GLOAGUEN et al., 2007; HERPIN et al., 2007; FONSECA et al., 2007a).

O interesse sobre este tema é atual e relevante, visto a crescente preocupação com a disponibilidade dos recursos hídricos existentes, bem como os aspectos ambientais da prática, entre eles, o alívio dos corpos receptores e a reutilização de

nutrientes presentes nas águas residuárias (HEIDARPOUR et al., 2007). O Brasil apresenta potencial para essa prática, pois possui grandes áreas agricultáveis e clima favorável para a irrigação com efluente (FONSECA et al., 2007b).

A irrigação de forrageiras com águas residuárias, assim como a de outras culturas anuais ou perenes, fornece ao solo, junto com a água, sais minerais e compostos orgânicos, que modificam as condições ambientais, podendo afetar a estrutura da comunidade edáfica, a atividade microbiana, a atividade bioquímica, a densidade de grupos funcionais de microrganismos e a qualidade sanitária (OVIED et al., 2001; SPEIR, 2002; IBEKWE et al., 2003; MANTIS et al., 2005; GELSOMINO et al., 2006), além das propriedades químicas e físicas do solo (CANDELA et al., 2007; HEIDARPOUR et al., 2007; WARRINGTON et al., 2007).

A capacidade do solo em remover diferentes compostos presentes nos efluentes inclui reações químicas, como trocas iônicas, sorção química, precipitação, complexação e reações bioquímicas, mediadas por microrganismos. As transformações bioquímicas da matéria orgânica e a liberação de nutrientes no solo irrigado com efluentes, através de rotas de mineralização, são conduzidas por microrganismos autóctones e introduzidos no solo, junto com o efluente. Dessa forma, os microrganismos e suas atividades bioquímicas podem ser úteis não apenas para avaliar a capacidade depuradora, mas também sua atividade biológica como parte da qualidade do solo (FILIP et al., 1999).

Os trabalhos relacionados com disposição de efluente no solo e parâmetros microbianos têm focado principalmente na caracterização e mudanças na estrutura da comunidade edáfica, atividade microbiana, atividade bioquímica, densidade de grupos funcionais de microrganismos, qualidade sanitária e ecotoxicidade (SPEIR, 2002; IBEKWE et al., 2003; MANTIS et al., 2005)

A aplicação de efluente tem proporcionado efeito benéfico sobre o crescimento de culturas e promovido incrementos significativos na atividade bioquímica do solo, avaliada através da respiração basal, da sua relação com a biomassa microbiana, ou seja, respiração específica da biomassa ou quociente metabólico e, atividade de diversas enzimas hidrolíticas (SPEIR, 2002). Estes parâmetros, de acordo com o autor,

mostraram-se sensíveis a alterações como mudanças drásticas na composição e na quantidade de efluente aplicado ao solo.

Em estudo do perfil de utilização de substratos de carbono, utilizando microplacas Biolog[®], Gelsomino et al. (2006) observaram que a constante inundação de áreas agrícolas com efluentes alterou a diversidade funcional da comunidade microbiana, de forma que esta se apresentou mais homogênea, em comparação à área agrícola não impactada pela inundação com efluente.

Outros autores observaram que a irrigação com efluente promoveu um aumento significativo no consumo de fontes de carbono em comparação a áreas irrigadas com água potável, utilizando placas Ecoplate, da Biolog (ZHANG et al., 2008). Entretanto, esses autores não observaram diferença significativa entre as áreas irrigadas com efluente e com água para o índice de diversidade de Shannon (H).

Em conformidade ao estímulo à atividade microbiana, a utilização de efluentes na irrigação de culturas tende a aumentar a densidade de grupos de microrganismos como bactérias totais, actinomicetos e fungos (FILIP et al., 1999; MEKKI et al., 2006), nitrificantes e desnitrificantes (TAM, 1998) e as bactérias amonificantes, que refletem a mineralização do nitrogênio orgânico (KERN; IDLER, 1999).

Em pastagens irrigadas com EET foi constatado aumento das concentrações de amônio na solução do solo e, principalmente, de nitrato (FONSECA, 2005) que, em excesso, pode ser perdido por lixiviação, contaminando lençóis freáticos e cursos d'água, além de estimular a desnitrificação.

O amônio da solução do solo pode ser utilizado por microrganismos quimiolitotróficos atuantes na nitrificação, sendo que ainda são poucos os estudos relacionados ao efeito da disposição de efluentes no solo sobre esses microrganismos (OVED et al., 2001; IBEKWE et al., 2003; MEKKI et al., 2006). Estes microrganismos se encontram em desvantagem competitiva pela adição de compostos orgânicos, que favorecem a atividade dos heterotróficos, apresentando em geral, reduções na densidade populacional dos nitrificantes autotróficos devido ao incremento de material orgânico disponível via efluente ou resíduos orgânicos (ACEA; CARBALLAS, 1999).

Ainda com relação ao nitrato, a sua formação nessas condições pode ocorrer via nitrificação heterotrófica (NURK et al., 2005; SU et al., 2006) e as comunidades

microbianas envolvidas nesse processo também são capazes de desnitrificar, utilizando o nitrato e o nitrito formados durante a nitrificação como aceptores de elétrons, reduzindo-os a óxido nitroso (MCLAIN; MARTENS, 2006). As perdas de nitrogênio para a atmosfera, principalmente na forma de óxidos de nitrogênio, são indesejáveis em função da contribuição potencial dos óxidos de nitrogênio para o aquecimento global, e também pela redução na eficiência de utilização desse nutriente nas culturas irrigadas.

Em estudo investigando os fatores limitantes das populações desnitrificantes em uma área florestal irrigada com efluente de esgoto tratado, na Nova Zelândia, foi constatado que, em condição de baixo oxigênio, os microrganismos desnitrificantes da área irrigada com efluente produziram enzimas que atuam no processo de desnitrificação antes e em maior taxa do que na área controle, que não recebia efluente, embora ambas as áreas apresentassem populações semelhantes de desnitrificantes (BARTON et al., 2000). Este fato evidencia um efeito seletivo da irrigação com efluente sobre as populações de desnitrificantes, contudo, sem alterar a sua densidade.

A avaliação do impacto da irrigação com efluente de esgoto sobre a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) foi pouco estudada (ORTEGA-LARROCEA et al., 2001; ORTEGA-LARROCEA et al., 2007), sendo praticamente restrita aos trabalhos desenvolvidos no Vale do Mezquital, no México. Esta região recebe o efluente da Cidade do México por mais de 100 anos, sendo utilizada para a produção agrícola (SIEBE, 1998).

No ano de 2001, Ortega-Larrocea et al. investigaram o efeito da disposição do efluente da Cidade do México por longos períodos, mais de 90 anos e com pouco tempo de irrigação, 5 anos, sobre as populações de FMAs em dois tipos de solos diferentes. Os autores constaram que o acúmulo de fósforo e de metais pesados, principalmente nos solos irrigados por longos períodos, contribuiu para a diminuição no número de esporos recuperados do solo.

Aprofundando os estudos sobre o impacto da irrigação com efluente sobre os FMAs, Ortega-Larrocea et al. (2007) verificaram que o tempo de irrigação com efluente promoveu uma pressão de seleção nas espécies, com a predominância do gênero *Glomus* nas áreas com maior tempo de irrigação. Os autores sugeriram que a irrigação

com efluente por longos períodos tende a reduzir a diversidade de espécies e a abundância de esporos de FMAs.

Outro enfoque interessante é a avaliação do efeito do uso de efluente de esgoto em áreas agrícolas sobre a diversidade genética dos microrganismos. A avaliação de comunidades microbianas que respondem a estresses externos, utilizando iniciadores de seqüências de grupos específicos, como aqueles menos abundantes da microbiota do solo, que provavelmente exercem uma função ecológica chave na manutenção da fertilidade, possibilita explorar melhor a complexidade da comunidade (NAKATSU et al., 2000).

O impacto da irrigação com efluente de esgoto tratado em pomar de citros sobre a composição do grupo específico das bactérias oxidantes de amônio, foi avaliado por Oved et al. (2001), por meio da amplificação de fragmentos específicos do DNA presente no solo através de reação em cadeia da polimerase (PCR) e posteriormente, avaliando o produto da reação através de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Os autores constataram uma mudança consistente e significativa na composição das populações de bactérias oxidantes de amônio, sendo dominante o gênero *Nitrosomonas* no solo irrigado com efluente, enquanto no solo não irrigado o predomínio foi do gênero *Nitrospira*.

Mudanças marcantes na estrutura da comunidade bacteriana total foram observadas em área agrícola constantemente alagada com efluente, com redução da diversidade genética na comunidade de bactérias oxidantes de amônio, avaliada por análise de restrição (GELSOMINO et al., 2006).

Apesar de ser conhecida a capacidade dos grupos de microrganismos em metabolizar os diversos compostos orgânicos e de suprimir patógenos presentes nos efluentes (IBEKWE et al., 2003), estudos avaliando o impacto da disposição de efluentes sobre os grupos funcionais de microrganismos e sua diversidade metabólica em solos tropicais se fazem necessários para a avaliação da viabilidade desta prática.

2.3 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de lâminas excedentes de irrigação do capim Tifton 85 com efluente de esgoto tratado, por um período de um ano e meio sobre a comunidade microbiana e alguns atributos químicos e microbiológicos do solo.

2.3.1 Objetivos específicos

a) Avaliar o efeito das lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos, fungos micorrízicos arbusculares, atributos microbiológicos e químicos do solo.

b) Verificar a participação dos atributos microbiológicos e químicos do solo na variabilidade dos grupos funcionais de microrganismos, em função das lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado.

c) Avaliar o efeito da irrigação de pastagem de capim Tifton 85 com efluente de esgoto tratado sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos, comparando com área de pastagem não irrigada e não manejada, verificando também a participação dos atributos microbiológicos e químicos na variabilidade dos grupos funcionais de microrganismos.

d) Avaliar o efeito da irrigação de pastagem de capim-Bermuda (Tifton 85) com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por 18 meses sobre o padrão de consumo de substratos da comunidade microbiana do solo, avaliando a diversidade e a cinética de consumo de substrato.

e) Avaliar o efeito da irrigação de pastagem de capim-Bermuda (Tifton 85) com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por 18 meses sobre a estrutura das populações de bactérias oxidantes de amônio.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Descrição da área de estudo

O estudo foi realizado no município de Lins, no Estado de São Paulo. O experimento foi instalado em dezembro de 2005 (Figura 1a), no Campo Experimental de Lins-SP, ao lado da estação de tratamento de esgoto (ETE) operada pela Sabesp (Figura 1b) (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo).

Figura 1 - Campo experimental (a) e estação de tratamento de esgoto (b) operada pela Sabesp, no município de Lins, SP

O solo, classificado como Argissolo Vermelho distrófico latossólico de textura média-argilosa e caracterizado por uma baixa fertilidade natural (Tabela 1), é cultivado com capim-Bermuda Tifton 85 (*Cynodon dactylon* Pers. X *C. niemfuensis* Vanderyst) e anteriormente encontrava-se em pousio. O plantio do capim foi realizado 3 anos antes da instalação do experimento, em janeiro de 2002, quatro meses após a aplicação de aproximadamente $2,0 \text{ t ha}^{-1}$ de calcário dolomítico (contendo 30,8% de CaO e 19,8% de MgO), visando a elevação da saturação de bases para 60% na camada de 0-20 cm. Após o plantio não foi realizada correção de acidez, bem como fertilização do solo até o

momento da instalação do experimento, mesmo tendo ocorrido dois cortes anuais do capim.

Tabela 1- Características químicas e físicas do solo por ocasião da instalação do experimento. Média de 16 amostras

pH ⁽¹⁾	H + Al	Al	Ca	Mg	K	Na	CTC ⁽³⁾	V ⁽⁴⁾
mmol _c Kg ⁻¹								%
4,90	15,17	1,00	10,26	5,61	1,45	ND ⁽²⁾	32,49	53,31
P	CT ⁽⁵⁾	NT ⁽⁶⁾	Areia	Silte	Argila		Classe text. ⁽⁹⁾	
mg Kg ⁻¹			g Kg ⁻¹			AT ⁽⁷⁾	ADA ⁽⁸⁾	
6,23	5,97	0,46	740	60	200	21	MAre	

(1) pH em solução de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹;

(2) ND: elemento químico não detectado;

(3) CTC: capacidade de troca catiônica a pH 7,0, $CTC = H + Al + Ca + Mg + K + Na$;

(4) V: saturação por bases, $V = \frac{Ca + Mg + K + Na}{CTC} * 100$;

(5) CT: carbono total;

(6) NT: nitrogênio total.

(7) AT: concentração total de argila;

(8) ADA: concentração de argila dispersa em água;

(9) Classe text.: classe textural (MAre: textura média-arenosa).

O clima da região caracteriza-se como mesotérmico de inverno seco, com temperaturas médias variando de 18 a 26°C e uma precipitação anual entre 1100 a 1300 mm (CIIAGRO, 2007) (Figura 1).

Figura 2 - Precipitação mensal (mm) e temperatura média (Tmédia), mínima (Tmín) e máxima (Tmáx) mensal (°C) do município de Lins, SP, no período de dezembro de 2005 a julho de 2007

2.4.2 Condução do experimento

Os tratamentos constituíram-se em lâminas excedentes em relação a uma lâmina controle de irrigação com efluente de esgoto tratado, baseando-se na capacidade de água disponível para a cultura. A lâmina controle, também denominada 0% de excesso, foi considerada como a quantidade de efluente adequada para suprir a demanda hídrica do capim Tifton 85, admitida como a quantidade suficiente para manter a tensão de água no solo em 20 kPa (valor admitido como sendo capacidade de campo para solo de textura média).

As demais lâminas foram calculadas a partir da quantidade de efluente aplicado na lâmina controle, de forma a corresponder a 25, 50 e 100% de excesso de irrigação em relação à lâmina controle, a fim de avaliar a capacidade máxima de suporte de efluente pelo sistema solo-planta.

Dispostos em um delineamento experimental em faixas, as quais foram separadas por curvas de nível, os quatro tratamentos: controle (0% de excesso), 25, 50 e 100% de excesso de irrigação com efluente, foram repetidos quatro vezes. Cada parcela, com o tamanho de 7,0 x 12,0 m, totalizou uma área de 84 m², sendo delimitada uma bordadura de 1 m de cada lado da parcela, o que reduziu a área útil para 50 m², em cada unidade experimental.

Para a aplicação das lâminas foi utilizado o sistema de irrigação por aspersão convencional (Figura 3). O manejo da irrigação foi realizado com base na umidade crítica do solo na camada 0 a 60 cm. O potencial mátrico (ψ_m) foi monitorado a cada dois dias, a partir de leituras de tensiômetros instalados no meio das camadas 0-20, 20-40 e 40-60 cm, nas parcelas do tratamento controle. A capacidade de água disponível (CAD) para o capim-Bermuda Tifton 85 foi estimada no tratamento controle (0% de excesso) para a camada de 0-60 cm, a partir da diferença entre a umidade volumétrica em ψ_m -20 kPa e ψ_m -1500 kPa. O início da irrigação ocorria sempre que a umidade volumétrica do solo correspondia a 70% da CAD no tratamento controle.

Figura 3 - Detalhe do sistema de irrigação por aspersão do capim Tifton 85, para a aplicação das lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado

O efluente utilizado era originário da estação de tratamento de esgoto doméstico operada pela Sabesp, localizada adjacente ao experimento. O sistema de tratamento empregado é o de lagoas de estabilização, passando por lagoas anaeróbia e facultativa, com tempo de retenção hidráulica de aproximadamente 5 e 15 dias, respectivamente, em que são produzidos em média $500 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ de efluente.

O capim foi cortado bimestralmente, durante o período de avaliação, a uma altura de aproximadamente 5,0 cm, com roçadora costal mecanizada e o material vegetal retirado manualmente da parcela. Partindo-se dos estudos anteriores de fertilização mineral e irrigação com efluente de esgoto tratado em capim-Bermuda Tifton 85 (FONSECA, 2005), tem-se que apenas 50% da dose de fertilizante nitrogenado mineral sugerida por Werner et al. (1996) seria o suficiente para obtenção de alta produtividade (acima de $30 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de massa de matéria seca) de capim em áreas irrigadas com efluente. Considerando um sistema de produção de forragem para fenação (WERNER et al., 1996), foram aplicados fertilizante mineral fosfatado (superfosfato simples), à taxa de 100 kg ha^{-1} , a cada 6 meses; 50 kg ha^{-1} de fertilizante mineral nitrogenado (nitrato de amônio) e 80 kg ha^{-1} de fertilizante mineral potássico (cloreto de potássio), aplicados imediatamente após cada corte do capim (PREMAZZI et al., 2003).

2.4.3 Amostras e análises de efluente e solo

Amostras de efluente foram coletadas mensalmente durante o período experimental, junto à saída da tubulação do sistema de irrigação, para caracterização (Tabela 2) e monitoramento das adições de carbono e nitrogênio via efluente. As amostras coletadas foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo e encaminhadas para o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Geoquímica e Geofísica da Litosfera da USP (NUPEGEL/USP) onde foram preparadas para as determinações analíticas, segundo metodologia da APHA – AWWA (1999).

Tabela 2 - Características do efluente de esgoto tratado utilizado para irrigação e valores de orientação para irrigação agrícola de acordo com WHO (2006)

Características	Unidade	EET	Graus de restrição de uso ⁽¹⁾		
			baixo	baixo a moderado	Severo
SST ⁽²⁾	mg L ⁻¹	127,8 ± 20,4	<50	50-100	>100
<i>Salinidade</i>					
CE ⁽³⁾	dS m ⁻¹	0,85 ± 0,1	< 0,7	0,7 – 3,0	> 3,0
SDT ⁽⁴⁾	mg L ⁻¹	691 ± 70	< 450	450-2000	> 2000
<i>Infiltração</i>				CE	
RAS ^(5,6) de 6-12	(mmol L ⁻¹) ^{0,5}	11,9 ± 2,9	> 1,9	1,9 – 0,5	< 0,5
<i>Toxicidade</i>					
Na ⁺	mg L ⁻¹	131,7 ± 6,6	< 69	> 69	
Cl ⁻	mg L ⁻¹	63,4 ± 7,9	< 106	> 106	
B ⁽⁶⁾	mg L ⁻¹	0,17 ± 0,08	< 0,7	0,7 – 3,0	> 3,0
N-NO ₃ ⁻	mg L ⁻¹	0,30 ± 0,43	< 5	5 - 30	> 30
HCO ₃ ⁻	mg L ⁻¹	449,0 ± 79,1	< 92	92 - 519	> 519
pH		7,5	Intervalo normal 6,5 – 8,0		
<i>Demais elementos</i>			Valores limites		
P-H ₂ PO ₄ ⁻	mg L ⁻¹	4,3 ± 1,1			
N-NH ₄ ⁺	mg L ⁻¹	23 ± 3,5			
Ca	mg L ⁻¹	8,1 ± 1,1			
Mg	mg L ⁻¹	1,9 ± 0,5			
K	mg L ⁻¹	17 ± 1,8			
Al	mg L ⁻¹	0,03 ± 0,02		5,0	
Cd ⁽⁷⁾	mg L ⁻¹	Nd		0,01	
Cr ⁽⁷⁾	mg L ⁻¹	Nd		0,1	
Cu	mg L ⁻¹	0,002 ± 0,001		0,2	
F	mg L ⁻¹	0,48 ± 0,32		1,0	
Fe	mg L ⁻¹	0,08 ± 0,06		5,0	
Mn	mg L ⁻¹	0,015 ± 0,006		0,2	
Ni ⁽⁷⁾	mg L ⁻¹	Nd		0,2	
Zn	mg L ⁻¹	0,02		2,0	

⁽¹⁾ AYERS; WESTCOT (1985); ⁽²⁾ Sólidos suspensos totais; ⁽³⁾ Condutividade elétrica; ⁽⁴⁾ Sólidos dissolvidos totais (GLOAGUEN et al, 2006); ⁽⁵⁾ Razão de adsorção de sódio; ⁽⁶⁾ FONSECA (2005), ⁽⁷⁾ Concentração abaixo do limite de detecção

Amostras de solo foram coletadas ao acaso na profundidade de 0-10 cm, com a coleta de 6 subamostras simples para compor uma amostra composta. Na instalação do experimento, em dezembro de 2005, foi realizada uma coleta de amostras para avaliação da área antes de iniciar a aplicação e, utilizada também para a análise do efeito da irrigação ao longo do tempo, para cada tratamento, denominada de coleta de referência.

As coletas seguintes foram organizadas de forma a acompanhar o efeito da irrigação do efluente no início e no final das estações chuvosa (novembro a abril) e seca (maio a outubro). Dessa forma, as coletas, a partir da coleta de referência, ocorreram com 3 meses (março/2006), 7 meses (julho/2006), 9 meses (setembro/2006), 12 meses (dezembro/2006), 13 meses (janeiro/2007), 15 meses (abril/2007) e 18 meses (julho/2007), totalizando 8 tempos de avaliação.

Para comparação do efeito do efluente sobre as propriedades microbiológicas do solo, foi selecionada uma área de pastagem de capim Tifton 85, não irrigada e não manejada, próxima a área experimental, denominada 'não irrigada com efluente (NE)'. Foram coletadas amostras nessa área aos 7, 12, 13, 15 e 18 meses de condução do experimento.

Após coletadas, as amostras foram colocadas em caixas de isopor com gelo, até a chegada ao Laboratório de Microbiologia do Solo, do Departamento de Ciência do Solo, da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP. No laboratório, as amostras foram peneiradas em peneira de 2 mm, para então proceder as avaliações microbiológicas e químicas do solo.

Para a caracterização química, uma parte das amostras acima citada foi seca e peneirada para se obter terra fina seca ao ar (TFSA), conforme metodologia proposta por Raij et al. (2001). Posteriormente foram determinados: acidez ativa, por pH em solução de cloreto de cálcio 0,02 M; Ca^{2+} e Mg^{2+} trocáveis, por extratos de TFSA em solução de cloreto de potássio 1 M, quantificados por espectrofotometria de absorção atômica; Na^+ , K^+ e P disponível por extratos de TFSA em solução Mehlich 1 (HCl 0,05 M + H_2SO_4 0,025 M), sendo o Na^+ e K^+ quantificados em fotômetro de chama e o P por colorimetria, utilizando solução de molibdato de sódio; CT e NT, por combustão à seco.

Para avaliação da atividade microbiana foram realizadas as seguintes análises: a biomassa microbiana, estimada pelo método da fumigação-extração (VANCE et al., 1987), que apresenta como princípio básico a extração do carbono microbiano após a morte dos microrganismos e lise celular pelo ataque do clorofórmio e liberação dos constituintes celulares, os quais são degradados por autólise enzimática e transformados em componentes orgânicos extraíveis, expresso em $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. (solo seco) (JOERGENSEN, 1995). A partir dos resultados de carbono microbiano e carbono total, foi estimada a relação entre o carbono microbiano e o carbono total do solo, denominada quociente microbiano, ou q_{MIC} .

O quociente metabólico (q_{CO_2}), expresso em $\text{mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ CBM h}^{-1}$, foi obtido pela relação entre a quantidade de carbono liberada na respiração basal e a quantidade de carbono quantificada na biomassa microbiana. O ensaio de respirometria foi executado pela estimativa do CO_2 liberado durante a incubação do solo, expresso em $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, conforme metodologia descrita por Anderson (1982). Para a análise se respiração induzida por substrato (RIS), foi adicionado 0,05% de glicose (p/p) ao solo, nos mesmos frascos onde foi avaliada a respiração basal. Após a adição de glicose, foram feitas leituras diárias, por 7 dias. Os resultados foram expressos em $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, conforme metodologia descrita por Anderson e Domsch (1978). Para todos esses parâmetros, a umidade do solo foi corrigida para 60% do volume total de poros (VTP).

A densidade de grupos funcionais de microrganismos (bactérias totais, fungos totais, amonificantes, nitrificantes, desnitrificantes) foi avaliada pela técnica do número mais provável (NMP). As amostras de solo foram suspensas em solução salina (NaCl 0,55%) esterilizada e, então, diluídas para $0,1 \text{ g mL}^{-1}$. A seguir, foram feitas diluições sucessivas na magnitude de 10 vezes para se obter concentrações de 10^{-2} a 10^{-9} g de solo mL^{-1} de cada amostra. A partir das diluições foram inoculadas alíquotas de $100 \mu\text{L}$ em meio de cultivo para amonificantes (SARATHCHANDRA, 1978), nitrificantes (SAAD; CONRAD, 1993) e desnitrificantes (TIEDJE, 1982), com 4 repetições. O meio de cultivo utilizado para bactérias totais foi o ágar-nutriente e o meio de MARTIN (1950) para

fungos totais, pelo método do plaqueamento por gotas, com 5 repetições (JAHNEL et al., 1999).

Após doze meses de aplicação das lâminas de efluente foi avaliada a abundância de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a colonização micorrízica do capim Tifton 85. A ocorrência de FMAs foi analisada por contagem de esporos, conforme método descrito por Gerdemann e Nicolson (1963). Para a avaliação da porcentagem de colonização micorrízica, foram coletadas raízes até a profundidade de 10 cm. Depois de lavadas, aproximadamente 1g de raízes frescas, separadas de vários pontos, foram coloridas, segundo Phillips e Haymann (1970) e avaliada a porcentagem de colonização micorrízica, de acordo com Giovannetti e Mosse (1980).

Para a avaliação do perfil de consumo de fontes de carbono, de microrganismos foi utilizado o kit Ecoplate® da empresa BIOLOG (Biolog, Hayward, CA, USA), para a coleta realizada aos 18 meses de aplicação de efluente. Cada placa continha 31 fontes de carbono, em triplicata, totalizando 96 poços por placa e um controle sem fonte de carbono. Previamente à inoculação, a concentração do inóculo foi estimada com a determinação do número mais provável de bactérias totais, em meio ágar-nutriente, incubado por 48 horas, a 25 °C.

Uma alíquota de 120 µL de suspensão do solo diluída correspondente a uma concentração em torno de 10^3 células mL⁻¹ foi injetada em cada um dos 96 poços, com o auxílio de uma pipeta multicanal. As placas foram incubadas a 28°C e analisadas com 12h e depois dessa leitura, a cada 24 horas, por 7 dias, medindo-se a absorbância a 590nm, usando um leitor de placas automático (Model 550, Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). A densidade ótica foi corrigida pelo branco para cada leitura e, em seguida, corrigido para a primeira leitura feita logo após a inoculação das placas.

As fontes de carbono presentes nas placas Ecoplate® podem ser agrupadas em função do grupo químico, como: aminas (feniletilamina e putrescina), aminoácidos (L-arginina, L-asparagina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina e ácido glicil-L-glutâmico), carboidratos (D-celobiose, α-D-lactose, β-metil-D-glucosídeo, D-xilose, i-eritritol, D-manitol e N-acetil-D-glucosamina), ácidos carboxílicos (ácido D-galacturônico γ-Lactona, ácido D-galacturônico, ácido 2-hidroxibenzóico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido

γ -hidroxibutírico, ácido itacônico, ácido α -cetobutírico, ácido D-málico e ácido D-glicosamínico), polímeros (tween 40, tween 80, α -ciclodextrina e glicogênio) e miscelânea de compostos (ácido pirúvico, glicose1-fosfato e D,L α -glicerolfosfato).

A diversidade genética de bactérias oxidantes de amônio também foi analisada em amostras de solo coletadas em julho de 2007, após 18 meses de aplicação de efluente, no Laboratório de Microbiologia Ambiental, na Universidade da Califórnia, em Riverside, Estados Unidos. Para a extração do DNA do solo foi utilizado o kit FastDNA SPIN kit for soil (QBIogene, BIO 101 systems). O DNA extraído foi quantificado com o auxílio do aparelho Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer).

A partir do DNA extraído do solo, uma região de aproximadamente 500 pares de bases do gene *amoA*, que codifica a subunidade α da enzima amônia monooxigenase, relacionado com as bactérias oxidantes de amônio, foram amplificados utilizando-se os iniciadores: *amoAf-i* (Clamp-GGGGITTITACTGGTGGT) e *amoAr-f* (CCCCTCIGIAAAICCTTCTTC), descritos em Hornek et al. (2006).

A reação de amplificação foi conduzida num volume final de 50 μ L, contendo 1 μ L de DNA molde, 2 mM de $MgCl_2$, 0,5 μ M dos primers, 0,25 mM do mix de dNTP, 0,05M da solução tampão Tris-KCl (pH 8,3), 0,12 mg L^{-1} de BSA, e 1 U de TaqDNA polimerase. O perfil térmico para a amplificação foi de 95° C por 5 minutos, 35 ciclos de 94° C por 30 segundos; 47° C por 40 segundos; 72° C por 40 segundos; finalizando com 72° C por 2 minutos (HORNEK et al., 2006). Confirmação da eficiência da reação com a visualização do produto em gel de agarose 1%, após eletroforese de 25 minutos, a 100V, após coloração do gel com brometo de etídio, na concentração de 0,5 μ g/mL, visualização após a exposição do gel a transiluminação com ultra-violeta (UV).

Os produtos de amplificação foram posteriormente separados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). O gel foi confeccionado na concentração de 8% de poliacrilamida (37:1 acrilamida: bis,acrilamida em tampão TAE 0,5X). O gradiente de desnaturação foi de 45-60%, utilizando-se as soluções desnaturantes de 7 M de uréia e 40% de formamida. Após confeccionado, foi realizada a aplicação dos produtos das reações de amplificação e a eletroforese do gel foi conduzida por 14 horas, a 50V, na temperatura de 60° C, em tampão TAE 1X.

Para visualização das bandas, o gel foi corado em solução de brometo de etídio, na mesma concentração descrita previamente, por 10 minutos e, visualização após a exposição do gel a transiluminação com UV. A partir do resultado obtido, foi selecionada uma amostra de cada tratamento, para nova amplificação e posterior seleção de bandas para seqüenciamento.

As amostras selecionadas (amostras números: 2, 8, 11 e 15, dos tratamentos 0, 25, 50 e 100% de excesso, respectivamente) foram novamente amplificadas, utilizando os mesmos iniciadores, contudo, o iniciador *amoAf-i* foi utilizado sem o grampo necessário apenas para a análise de DGGE. Esses produtos de amplificação foram novamente conduzidos a análise de DGGE, conforme descrito anteriormente. Do gel de DGGE resultante, foram cortadas 6 bandas.

Para a excisão das bandas, foi utilizada uma pipeta específica para essa atividade. O material foi disposto em microtubos de 1,5 mL, contendo 10 microlitros de água nanopura. Os fragmentos de DNA das bandas selecionadas foram utilizados para a condução de nova reação de amplificação, utilizando os mesmos primers sem o grampo necessário para a análise de DGGE. O produto da reação de amplificação foi visualizado após eletroforese em gel de agarose 1% por 25 minutos, a 100V, corando-se o gel em brometo de etídio por 10 minutos e expondo a transiluminação com UV.

Após confirmação da eficiência da reação de amplificação das bandas, o produto da reação foi então purificado, utilizando-se o kit de purificação do produto de PCR (QIAquick, QIAGEN Science, Inc.). O produto purificado foi encaminhado para para seqüenciamento, no centro de genômica (Genomic Core), da Universidade da Califórnia, em Riverside, Estados Unidos.

As seqüências obtidas foram analisadas utilizando-se o programa Phred/Phrap (EWING; GREEN, 1998), para a remoção das extremidades de baixa qualidade. Posteriormente, as seqüências foram alinhadas, usando o programa ClustalW e construídas as árvores de similaridade, após seleção de seqüências disponíveis no banco de dados do GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), utilizando os métodos “*Neighbor-joining*”, “*Minimum evolution*” e “*Maximum parsimony*”, com o auxílio do programa Mega 3.1 (método UPGMA, p-distance), com as configurações padrões do programa e 1000 amostras bootstrap.

2.4.4 Análise estatística dos dados

2.4.4.1 Efeito de lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado na pastagem de capim Tifton 85 sobre os atributos químicos e microbiológicos do solo

Os resultados foram submetidos à análise estatística univariada, aplicando o procedimento 'general linear model', considerando como fontes de variação a lâmina de irrigação acumulada e a precipitação acumulada no período de 18 meses de avaliação, utilizando o programa SAS Versão 7.1 (SAS Institute Inc., 2002). Também foi conduzida a análise de correlação simples (correlação de Pearson) entre as variáveis analisadas.

As parcelas foram fixadas como classificatórias, com a finalidade de isolar para o estudo apenas as alterações observadas pela medição repetida em cada parcela, devidas às condições ambientais ou provocadas pela irrigação. Para os resultados apresentados, não houve interação significativa entre as parcelas e as fontes de variação.

Para testar a existência de relações significativas entre os atributos microbiológicos e químicos do solo, em função das lâminas de irrigação aplicadas durante os 18 meses, foram utilizadas análises estatísticas multivariadas. A análise multivariada é uma ferramenta útil para a análise de muitas variáveis, pois possibilita analisar vários atributos ao mesmo tempo (MALUCHE-BARETTA; AMARANTE; KLAUBERG-FILHO, 2006; BARETTA, 2007).

Foi realizada uma análise de redundância (RDA), utilizando os dados de 8 tempos de aplicação de efluente (com 3, 7, 9, 12, 13, 15 e 18 meses de irrigação). Esta análise é compreendida como um método de ordenação condicionada ou canônica, baseada na distribuição normal, no qual as variáveis explicativas ou ambientais (atributos químicos e microbiológicos) condicionam a resposta das variáveis a serem analisadas. Dessa forma, os eixos da ordenação condicionada correspondem às direções da maior variabilidade explicada pelas variáveis ambientais (LEPŠ; ŠMILAUER, 2003). Nesta análise, as variáveis foram transformadas $[\text{Log}(x+1)]$ e foi empregado o método de seleção das variáveis ambientais (Forward Selection), o qual

permite selecionar e introduzir no modelo somente as variáveis que foram significativas ($P < 0,05$) e que mais contribuíram para a variabilidade dos grupos funcionais.

Posteriormente, foram conduzidas novas RDAs, com o objetivo de efetuar a partição da variabilidade. Os atributos químicos e microbiológicos do solo foram utilizados como variáveis ambientais e a densidade de grupos funcionais de microrganismos como variáveis resposta, para determinar o quanto da variabilidade total dos dados eram explicados pelas variáveis ambientais. Posteriormente, análises de redundância adicionais foram realizadas para determinar a participação individual dos atributos químicos e dos microbiológicos na variabilidade total, bem como a parte da variabilidade que é influenciada por ambos os atributos.

Para testar a hipótese de que as lâminas excedentes à lâmina controle para o capim-Bermuda Tifton 85 promovem alterações significativas na densidade de grupos funcionais de microrganismos do solo ligados ao ciclo do nitrogênio, foi empregada a análise de curva de resposta principal (principal response curve, PRC), para 8 tempos de avaliação dos tratamentos 0, 25, 50 e 100% de excesso de irrigação com efluente de esgoto tratado (com 0, 3, 7, 9, 12, 13, 15 e 18 meses de irrigação), utilizando o software CANOCO 4.5 (ter BRAAK, 1988), desenvolvido pela empresa Microcomputer Power (Ithaca, NY, USA).

A PRC (Van den BRINK; Ter BRAAK, 1999) é um método de ordenação conhecido como análise de redundância parcial (*p*RDA), indicada para avaliar o efeito de um determinado fator sobre uma comunidade ao longo do tempo. Este método possibilita resumir os efeitos de cada tratamento em relação ao controle sobre os grupos funcionais de microrganismos e exibi-los em um único diagrama. A PRC extrai informação de apenas parte da variância que é explicada pelo fator empregado como tratamento (as lâminas de irrigação com efluente) e o tempo (épocas de amostragem do solo), que é utilizado como co-variável (LEPŠ; ŠMILAUER, 2003). Na PRC, o tempo é disposto no eixo X e o coeficiente canônico, também denominado como coeficiente canônico padronizado, relativo ao tratamento controle (0% de excesso), no eixo Y. Os coeficientes canônicos dos demais tratamentos são apresentados como desvios em relação ao tratamento controle, para cada tempo avaliado.

Junto ao gráfico da PRC é apresentado um diagrama, no qual estão plotados os pesos (valores positivos ou negativos) dos grupos funcionais de microrganismos avaliados. O peso dos grupos funcionais pode ser interpretado como o peso de cada grupo funcional único para a resposta dos tratamentos observada na PRC. No presente trabalho, o maior valor de peso para um determinado grupo funcional de microrganismo indica uma maior contribuição desse grupo para a variação das lâminas de irrigação na PRC. Complementarmente, é fornecida uma estatística, que corresponde a uma medida da qualidade do ajuste e do poder explicativo da RDA. São obtidos uma razão F e um valor P de significância, determinados por meio do teste de permutação de Monte Carlo e um teste F (LEPŠ; ŠMILAUER, 2003).

2.4.4.2 Efeito da irrigação com efluente na pastagem de Tifton 85 sobre os atributos microbiológicos comparado com área de pastagem não-irrigada

O efeito da irrigação com efluente de esgoto tratado sobre os grupos funcionais de microrganismos foi avaliado comparando-se com área de pastagem não irrigada. Para este estudo, foram coletadas amostras da pastagem não irrigada junto com as coletas realizadas aos 7, 12, 13, 15 e 18 meses de aplicação de efluente nas áreas irrigadas.

Para testar a existência de relações significativas entre os atributos microbiológicos e químicos do solo com a resposta dos grupos funcionais de microrganismos aos tratamentos, foi realizada uma RDA utilizando os dados de 5 coletas, as quais foram coletadas amostras nas áreas não irrigadas com efluente (com 7, 12, 13, 15 e 18 meses de irrigação). Esta análise foi conduzida conforme descrito no item 2.4.4.1.

2.4.4.3 Perfil do consumo de fontes de carbono pela comunidade microbiana de uma área de pastagem de capim Tifton 85 irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado

As leituras de absorvância obtidas das placas Ecoplate, conforme descrito no item 2.4.3, avaliadas durante os 7 dias, foram corrigidas para a absorvância medida no tempo zero, e em seguida, corrigidas também para a leitura dos poços com ausência de fonte de carbono.

Com os dados corrigidos foi calculada a média do desenvolvimento de cor dos poços (average well color development, AWCD): $(L - B) / [\sum(L - B) / 31]$, sendo L – a leitura das fontes de carbono, B – leitura do branco, contendo apenas a suspensão de solo (GARLAND; MILLS, 1991). O AWCD foi calculado para cada fonte de carbono em cada placa.

A partir do AWCD foram avaliados dois parâmetros: o padrão de consumo de fontes de carbono e o estudo da cinética de consumo de fontes de carbono.

No estudo da cinética de consumo de fontes de carbono foi empregado o modelo de crescimento logístico (LINDSTRÖM; BARRY; BRADDOCK, 1998), no qual foram estimados os parâmetros cinéticos, em função do ajuste da curva de absorvância a 590 nm em relação ao tempo de incubação das placas:

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

sendo 'K' a assíntota ou o máximo desenvolvimento de cor ($A_{590\text{ nm}}$), 'R' a taxa exponencial de mudança de $A_{590\text{ nm}}$ (h^{-1}), 'T' o tempo de incubação (h) e 'S' o tempo para alcançar o ponto central da fase exponencial da curva, quando se tem K/2 (h).

Cada um destes parâmetros fornece informações sobre o consumo das fontes de carbono, onde o 'K' estima a quantidade potencial de substrato utilizado, o 'R' representa a taxa exponencial de consumo de substrato, que indica a rapidez com que a fonte de carbono é consumida pela comunidade e o 'S' é a taxa de crescimento relativo dos microrganismos capazes de consumir as fontes de carbono e está relacionado com a densidade inicial de inóculo (ROS et al., 2006).

Os parâmetros cinéticos estimados gerados a partir da aplicação dos dados no modelo logístico, para o metabolismo heterotrófico médio e para os grupos de

substratos, o índice de diversidade de Shannon (H) e a riqueza de substratos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste LSD ($P < 0,05$). Estes parâmetros também foram correlacionados com os atributos químicos do solo e com os conteúdos das frações de C e N particuladas e dissolvidas, adicionadas ao solo via efluente, utilizando-se a análise de correlação de Pearson, com o auxílio do programa SAS 7.1 (SAS Institute Inc. 2002).

A análise em escala multidimensional (Non-metric Multidimensional Scaling – NMDS) foi utilizada na ordenação das amostras, baseadas na similaridade entre as mesmas. Os parâmetros cinéticos estimados foram transformados [$\text{Log}(x+1)$] e utilizados no cálculo da “Distância Euclidiana normalizada”, a partir da qual foi elaborada a matriz de similaridade. Posteriormente, uma análise de similaridade (ANOSIM) foi aplicada para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, com o auxílio do programa Primer 5 (Primer-E Ltda., 2001).

3 Resultados

3.1 Precipitação e irrigação com efluente

No período de dezembro de 2005 a julho de 2007 a quantidade de irrigação acumulada variou de 1254,23 a 2296,60 mm, na menor e maior lâmina de irrigação respectivamente e, a precipitação acumulada no mesmo período foi de 2422,45 mm. A precipitação ocorreu de acordo com o esperado para a região de Lins, SP, com chuvas concentradas nos meses de outubro a março e estiagem de abril a setembro (Figura 2).

Os maiores volumes de efluente foram aplicados nos períodos de novembro de 2006 a janeiro de 2007 (Figura 4), período que concentra as maiores temperaturas médias, o que colabora com o crescimento e com o aumento da evapotranspiração do capim Tifton 85. Nos meses de maio a agosto, nos quais são observadas as menores temperaturas médias do ano (Figura 2), a taxa de crescimento do capim Tifton 85 é menor (NOGUEIRA, 2008), bem como sua evapotranspiração, exigindo menores volumes de água.

Figura 4 - Precipitação (p) e lâminas excedentes de irrigação com efluente, aplicadas na área de pastagem de capim Tifton 85 (0, 25, 50 e 100% de excesso) por 18 meses, no período de dezembro (D) de 2005 a julho de 2007 (J), em Lins, SP

Nos últimos meses de avaliação da área experimental, a aplicação das lâminas de efluente foi afetada por fatores de ordem operacional. A irrigação da área experimental foi interrompida durante o período de 29 de janeiro a 20 de fevereiro de 2007, totalizando 23 dias. Neste período os equipamentos de irrigação permaneceram parados para manutenção, devido a um dano causado pelo excesso de sobrenadante na lagoa de captação do efluente. Na primeira semana de março de 2007 a irrigação foi novamente interrompida durante 7 dias, devido ao baixo nível de efluente na lagoa de captação. Possivelmente estes fatos interferiram nos resultados observados, para as avaliações realizadas aos 15 e aos 18 meses de condução do experimento.

3.2 Adição de carbono e nitrogênio via efluente

A aplicação de efluente proporcionou a adição de material orgânico, que variou de 78,4 kg ha⁻¹ para a menor lâmina e 144,1 kg ha⁻¹ para a maior (Tabela 3). Deste material orgânico, 35% correspondem ao carbono (carbono particulado total, CPT) e 6,6% ao nitrogênio (nitrogênio particulado total, NPT). A fase particulada dos efluentes de lagoas de estabilização é composta principalmente por algas (SNOW et al., 1999; VON SPERLING, 2002), que possui uma baixa relação C:N (Carbono:Nitrogênio).

Tabela 3 - Caracterização do efluente quanto aos conteúdos de frações particuladas e dissolvidas de C e N; quantidade adicionada pela aplicação das lâminas de irrigação com efluente (0, 25, 50 e 100% de excesso de irrigação) ao solo destas frações no período de janeiro de 2006 a julho de 2007, de N via fertilizante, carbono orgânico, N total e relação C:N

de 2007, de N via fertilizante, carbono orgânico, N total e relação C:N											
	Irrig.	SST ⁽¹⁾	CPT ⁽²⁾	NPT ⁽³⁾	CID ⁽⁴⁾	COD ⁽⁵⁾	NO ₂ + NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	COT ⁽⁶⁾	NT ⁽⁷⁾	COT:N T ⁽⁸⁾
mg L ⁻¹											
Efluente		128	44,9	8,5	88,3	17,8	3,8	23,1			
Lâminas	m ³ ha ⁻¹	kg ha ⁻¹									
0%	12542,2	160,5	56,1	10,6	110,7	22,3	4,8	28,9	78,4	44,3	1,77
25%	15094,0	193,2	67,7	12,8	133,3	26,9	5,7	34,9	94,6	53,4	1,77
50%	17722,9	226,8	79,6	15,1	156,5	31,6	6,7	40,9	111,2	62,7	1,77
100%	22966,0	293,9	103,2	19,5	202,8	40,9	8,7	53,1	144,1	81,3	1,77

⁽¹⁾Sólidos solúveis totais; ⁽²⁾Carbono particulado total; ⁽³⁾Nitrogênio particulado total; ⁽⁴⁾Carbono inorgânico dissolvido; ⁽⁵⁾Carbono orgânico dissolvido; ⁽⁶⁾Carbono orgânico total; ⁽⁷⁾Nitrogênio total; ⁽⁸⁾Relação carbono orgânico total (via efluente): nitrogênio total.

A adição de nitrogênio via efluente na forma mineral (NH₄⁺, NO₂⁻ + NO₃⁻) foi de 33,7 kg ha⁻¹ para a lâmina controle e de 61,8 kg ha⁻¹ na lâmina com 100% de excesso de irrigação. Esses valores, somados ao nitrogênio mineral fornecido via fertilizante (390 kg ha⁻¹ ano⁻¹), proporcionaram uma entrada de nitrogênio da ordem de até 471,3 kg ha⁻¹ na lâmina com 100% de excesso de irrigação.

O capim Tifton 85 apresenta alta capacidade de produção de massa seca em função da adubação nitrogenada, respondendo linearmente até a aplicação de 600 kg ha⁻¹ ano⁻¹, em cultivo sem irrigação (ALVIM et al., 1999). Na presença de irrigação com efluente de esgoto tratado, o capim Tifton 85 teve aumento linear em seu rendimento para adição de até 856 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, sendo 520 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ na forma de nitrogênio mineral e 336 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ de nitrogênio do efluente (FONSECA et al.

2007a). Estes fatos demonstram a capacidade do capim Tifton 85 em utilizar o nitrogênio disponível pela adubação e pela irrigação com efluente, mesmo na maior lâmina, com 100% de excesso.

A disponibilidade de nitrogênio no solo é favorecida pela adição de materiais com baixa relação C:N (BUCHANAM; GLIESSMAN, 1991). Dessa forma, a adição ao solo do efluente, de baixa relação C:N (1,77:1), somada à entrada de massa seca de alta relação C:N do capim-Bermuda Tifton 85 (21:1), e à relação C:N do solo, em torno de 14:1 (Tabela 4), em conjunto com as condições favoráveis de umidade e temperatura configuram um cenário propício ao metabolismo microbiano.

3.3 Efeito de lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado na pastagem de capim Tifton 85 sobre os atributos químicos e microbiológicos do solo

A aplicação de lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado e o tempo de irrigação promoveram efeito diferenciado nas propriedades químicas e microbiológicas do solo, considerando a lâmina de irrigação acumulada em cada tratamento e a precipitação acumulada no período de 18 meses de avaliação. A precipitação acumulada foi adicionada ao modelo, pois, tratando-se de uma variável independente e com oscilação ao longo do período avaliado, influenciou diretamente os tratamentos.

Os parâmetros químicos: carbono e nitrogênio total e os grupos funcionais de microrganismos: desnitrificantes e fungos totais tiveram sua variação influenciada significativamente ($P < 0,05$) pelas lâminas excedentes de irrigação.

O efeito conjunto da irrigação e precipitação acumulada promoveu variação significativa ($P < 0,05$) nos parâmetros químicos: pH, cátions trocáveis (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+), relação C:N, nos parâmetros microbiológicos: C_{mic} e, nos grupos funcionais de microrganismos nitrificantes (oxidantes de amônio e de nitrito).

A precipitação acumulada promoveu variação significativa ($P < 0,05$) apenas na densidade populacional de bactérias totais do solo.

As variações observadas na densidade populacional de amonificantes, no $q\text{CO}_2$ e na respiração basal do solo não foram influenciadas apenas pela irrigação com efluente e precipitação acumulada no período analisado. Possivelmente outro fator não controlado e não determinado, somado ao efeito da precipitação e irrigação acumuladas durante a avaliação do experimento, ocasionaram essas variações.

3.3.1 Parâmetros químicos e de atividade microbiana

Considerando a variação do pH ao longo dos 18 meses de irrigação com efluente (Figura 5), observaram-se os maiores valores no período de 9 a 12 meses (5,8 e 5,7, média das 4 lâminas de irrigação). Aos 18 meses o pH diminuiu para valores em torno de 5,5. Essa redução pode estar relacionada com a redução na lâmina de irrigação aplicada entre 13 a 18 meses de avaliação e também pela maior precipitação (Figura 2), em comparação com o período de 9 a 12 meses, conforme comentado no item 3.1.

Figura 5 - Acidez ativa (pH) do solo de área de pastagem de capim Tifton 85 irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por um período de 18 meses, no município de Lins, SP, Brasil. Barras representam o erro-padrão da média

O modelo estimado para a variação da acidez ativa do solo em função das lâminas excedentes de efluente e, também, da precipitação acumulada no período de 18 meses de avaliação, indicou uma diminuição da acidez ativa com o aumento da lâmina de irrigação acumulada, considerando uma precipitação acumulada de até 1500 mm (Figura 6). Fixando um valor de lâmina de irrigação acumulada acima de 1000 mm, o comportamento observado indicou que a precipitação teve um efeito acidificante, reduzindo os valores de pH (Anexo A).

Figura 6 - Acidez ativa do solo (isolinhas) em função da lâmina acumulada (eixo x) de irrigação com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado (0%: 1254 mm; 25%: 1509 mm; 50%: 1772 mm e 100% excesso: 2296 mm) e precipitação acumulada (eixo y), durante o período de 18 meses (8 tempos de avaliação), em área de pastagem de capim Tifton 85, no município de Lins, SP

Dentre os fatores que influenciam a variação do pH do solo na área estudada, destacam-se o manejo bimestral de corte e fertilização nitrogenada da pastagem, a precipitação pluviométrica e a irrigação com efluente. O manejo da pastagem tende a promover um efeito acidificante no solo, pela ação do fertilizante nitrogenado (nitrato de amônio) e também da atividade microbiana na decomposição do material vegetal depositado naturalmente sobre o solo ou proveniente do corte do capim, após a retirada da biomassa vegetal, para a simulação de produção de feno.

A precipitação pluviométrica também apresenta um efeito acidificante no solo, uma vez que a água da chuva, ainda que isenta de poluentes, possui um pH em torno de 5,4 (SIMON; DEFRIES, 1992), devido a reação do vapor de água com o gás carbônico presente na atmosfera (HUMERES, 1992).

O efluente de esgoto tratado do município de Lins apresenta pH em torno de 7,5 e elevada concentração de íons bicarbonato (HCO_3^-), em média $449 \pm 79 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 2) que, em conjunto com seus demais constituintes, tendem a estimular o aumento do pH do solo irrigado.

Considerando estes três fatores como as principais interferências no ambiente em estudo, a irrigação com efluente destaca-se como a mais freqüente, em relação ao manejo da pastagem e os eventos de chuva. Dessa forma, os maiores valores observados no período de 3, 7 e 9 meses, nas maiores lâminas de irrigação, possivelmente estão relacionados com as características do efluente.

Por outro lado, a diminuição no pH a partir da avaliação realizada aos 12 meses, considerando a média das lâminas de irrigação, pode ter relação com a redução no volume de efluente aplicado nesse período e também com as características do solo da área experimental, que apresentava inicialmente condições de acidez, baixa CTC e teor de matéria orgânica que, somadas à sua classe textural médio-arenosa, conferiam ao solo uma baixa capacidade de tamponamento ou de resistência à mudança de pH (SABATTI et al., 2003).

De forma semelhante ao constatado nesse trabalho, Nogueira (2008), avaliando o efeito do manejo de corte e adubação com diferentes doses de nitrogênio, do capim Tifton 85 irrigado com água potável e com efluente, verificou que todos os tratamentos apresentaram elevação de pH, sendo que os tratamentos irrigados e fertilizados apresentaram aumento de pH temporariamente após a adição de N mineral (3 e 15 dias após o manejo) e, que o tratamento sem irrigação apresentou maior pH em virtude da maior entrada de resíduos vegetais (corte) e conseqüente decomposição. Nogueira (2008) também constatou que a freqüência da irrigação foi o fator mais relevante nas variações de pH do solo, visto que a diminuição do pH seguida da aplicação do adubo nitrogenado foi temporária, com os valores de pH das avaliações antes do manejo não diferindo entre as épocas avaliadas, para um mesmo tratamento.

Elevações no pH do solo cultivado com variadas culturas, irrigadas com efluentes de esgotos domésticos, foram relatadas em diversos trabalhos (SCHIPPER et al, 1996; FONSECA et al., 2005; HERPIN et al., 2007). Entretanto, essas variações tendem a ser de pequena amplitude, como as constatadas neste trabalho, não representando grande influência na disponibilidade de nutrientes para as culturas (SPEIR et al., 1999).

Com relação aos cátions trocáveis, o efeito da irrigação com efluente acumulada somado ao efeito da precipitação acumulada proporcionou ajustes para todos os cátions avaliados (Anexo A). Observou-se aumento nos teores de Ca^{2+} com o aumento da lâmina acumulada e, com o aumento da precipitação esse efeito é reduzido (Figura 7a). Considerando apenas o efeito da irrigação, o aumento da lâmina acumulada tende a diminuir o teor de Mg^{2+} (Figura 7b). Para uma lâmina acumulada variando de 1250 a 1750 mm, o aumento da precipitação acumulada praticamente não interfere no teor de Mg^{2+} , mantendo-se entre 4 a 5 $\text{mmol}_c \text{ kg}^{-1}$. Para o K^+ , a combinação de precipitação e lâmina de irrigação acumulada acima de 1000 e 1500 mm, respectivamente, proporcionou redução em seus teores (Figura 7c).

A área experimental apresentava um teor de Na^+ praticamente irrelevante (Tabela 1). A irrigação com efluente adicionou este cátion ao solo e o aumento na precipitação atuou reduzindo o seu teor no solo (Figura 7d).

O aumento nos teores de Ca^{2+} com o aumento da lâmina de irrigação com efluente provavelmente está relacionado com a substituição de cátions trocáveis no complexo de troca do solo, principalmente o K^+ , em condições de alta precipitação, e em menor intensidade o Mg^{2+} , em condições de menor precipitação.

O elevado aporte de Na^+ via efluente também pode ter influenciado a presença de Mg^{2+} e K^+ no solo, promovendo a substituição de parte do Mg^{2+} e K^+ , presentes no complexo de troca, deslocando-os para a solução do solo, o que tornaria possível a perda desses nutrientes por lixiviação.

Além desse cenário, cabe ressaltar a elevada demanda do capim Tifton 85 por K^+ , como observado no acúmulo desse nutriente na avaliação da concentração de nutrientes na parte aérea do capim Tifton 85 durante o primeiro ano de condução desse experimento (FONSECA et al., 2008, dados não publicados).

Figura 7 - Ca^{2+} (a), Mg^{2+} (b), K^{+} (c) e Na^{+} (d) trocáveis ($\text{mmol}_c \text{kg}^{-1}$) do solo de área de pastagem de capim Tifton 85, em função das lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado [0%: 1254 mm; 25%: 1509 mm; 50%: 1772 mm e 100% excesso: 2296 mm] e da precipitação acumuladas durante o período de 18 meses (8 tempos de avaliação), no município de Lins, SP

Considerando uma precipitação acumulada de 1500 mm, em torno da média anual observada no município de Lins, aplicação de uma lâmina de irrigação com efluente acumulada de até 1750 mm promove uma adição anual de aproximadamente $4,5 \text{ mmol}_c \text{kg}^{-1}$ de Na^{+} (Figura 8).

Figura 8 - Na⁺ trocável em área de pastagem de capim Tifton 85, em função da lâmina de irrigação com efluente, considerando a precipitação acumulada de 1500 mm anuais, para o município de Lins, SP

Este aumento no teor de Na⁺ está relacionado com o efluente proveniente da estação de tratamento de esgoto do município de Lins, que apresenta uma concentração de Na⁺ em torno de 131 mg L⁻¹. Este valor, avaliado em conjunto com a razão de adsorção de sódio e a condutividade elétrica do efluente (Tabela 2), possibilita inferir sobre suas restrições de uso, quanto aos possíveis impactos na qualidade de solo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006), o efluente de Lins enquadra-se na classe de grau de risco baixo a moderado para a qualidade do solo.

O capim Tifton 85 apresenta a capacidade de tolerar elevadas concentrações de Na⁺ no sistema (GRATTAN et al., 2004; GRIEVE et al., 2004) e também apresenta uma elevada taxa de absorção de água e nutrientes (FAGERIA et al., 1997). Essas características são favoráveis para que a cultura receba irrigação com efluente, entretanto, a disposição dessa água residuária tende a promover um acúmulo gradual de Na⁺ no solo e, com isso, a possibilidade de sodificação do solo. Este processo pode inviabilizar esse tipo de manejo a médio e longo prazo, devido à redução na infiltração de água no solo e limitação do crescimento vegetal (BISSANI; MEURER; BOHNEN,

2004). O aumento na concentração de sais no solo tem sido observado principalmente em áreas áridas e semi-áridas, irrigadas com efluentes (BARGARELLO et al., 2006).

Herpin et al. (2007) estudaram o efeito da irrigação de uma área de café com efluente de esgoto tratado sobre as propriedades químicas do solo, no campo experimental da Sabesp, em Lins, SP. Neste trabalho, os autores verificaram aumento nos teores de K^+ após um ano de irrigação com efluente e nos teores de Ca^{2+} e Na^+ , após 3 anos de irrigação com efluente, não sendo observada variação significativa para o Mg^{2+} , para a camada de 0-10 cm de solo. Os resultados de Herpin et al (2007) diferiram do observado neste trabalho apenas para K^+ , que teve seus teores reduzidos com a irrigação com efluente ao longo dos 18 meses.

Avaliando um Latossolo cultivado com cana-de-açúcar irrigado com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por 16 meses, no campo experimental da Sabesp, em Lins, SP, Leal (2007) também verificou um pequeno aumento no pH do solo e incrementos significativos nos teores de Na^+ trocável.

O carbono (CT) e o nitrogênio total (NT) apresentaram uma resposta quadrática para as lâminas de irrigação com efluente de esgoto tratado, com ajustes abaixo de 60% (Figuras 9a e 9b).

Figura 9 - Carbono (a) e nitrogênio total (b) em função de lâminas excedentes de irrigação com efluente [0%: 1254 mm; 25%: 1509 mm; 50%: 1772 mm e 100% excesso: 2296 mm], acumuladas durante o período de 18 meses (8 tempos de avaliação), em área de pastagem de capim Tifton 85, no município de Lins, SP

O carbono total apresentou um aumento no intervalo de 500 a 1500 mm de irrigação acumulada com efluente, acima de 2000 mm os teores observados ficaram próximos aos encontrados no início da condução do experimento. A variação do nitrogênio total em função das lâminas acumuladas de efluente dificulta a interpretação do efeito, o que se reflete no baixo coeficiente de determinação da equação (0,28).

A relação C:N variou principalmente em função da lâmina de irrigação aplicada, sendo pequeno o efeito da precipitação acumulada (Figura 10a). Embora o modelo sugira um aumento quase que linear da relação C:N em função da lâmina de irrigação acumulada no período de 18 meses, sua interpretação deve ser feita com cautela. Observou-se um aumento médio em torno de 33% entre a coleta referência (13:1) e a avaliação aos 8 meses de aplicação do efluente (18:1) e, esta relação de 18:1 manteve-se praticamente constante, entre todas as lâminas, até os 18 meses de aplicação do efluente de esgoto tratado.

Nogueira (2008), ao monitorar a dinâmica do CT e NT do solo em uma área de pastagem de capim-Bermuda Tifton 85, irrigada com efluente de esgoto tratado e adubada com diferentes doses de nitrogênio, no campo experimental da Sabesp, em Lins, SP, observou reduções no estoque de CT do solo nas áreas irrigadas tanto com água como com efluente de esgoto tratado, quando comparado com o tratamento sem irrigação e adubação nitrogenada, após 3 anos de manejo da área. Para o NT, a autora observou redução no estoque apenas para o tratamento irrigado com água.

Firme (2007), estudando um Latossolo cultivado com cana-de-açúcar irrigado com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por 16 meses, no campo experimental da Sabesp, em Lins, SP, diferente do observado neste trabalho, não encontrou variação significativa nos teores de CT e NT do solo.

Mudanças expressivas no CT, NT e C:N, ocasionadas pela irrigação com efluente de esgoto tratado têm sido observadas em áreas irrigadas, porém em condições de longos períodos de aplicação, como descrito nos estudos realizados por Friedel et al. (2000), Ramirez-Fuentes et al (2002) e Walker e Lin (2008).

O carbono microbiano (Cmic) apresentou os maiores valores associado à maior precipitação e lâmina de irrigação acumulada (Figura 10b). Considerando a média das lâminas de irrigação com efluente, o Cmic variou em torno de 141,34 (coleta de

referência) a $300 \mu\text{g g}^{-1}$ s.s. (aos 8 e aos 12 meses de aplicação do efluente). No período de 18 meses, considerando apenas a coleta de referência e a última coleta realizada, o Cmic teve um aumento médio de aproximadamente 34%.

O modelo obtido para o Cmic, a partir da precipitação e da lâmina de irrigação acumulada durante o período de 18 meses possibilita inferir que a aplicação de uma lâmina de efluente de até 2300 mm acumulados, somados a uma precipitação acumulada de cerca de 2500 mm não teve efeito negativo sobre o Cmic, pelo contrário, estimulou o acúmulo de carbono na biomassa microbiana do solo.

Figura 10 - Relação C:N (a) e carbono microbiano, em mg g^{-1} s.s. (de área de pastagem de capim Tifton 85, em função da precipitação e das lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado [0%: 1254 mm; 25%: 1509 mm; 50%: 1772 mm e 100% excesso: 2296 mm], acumuladas durante o período de 18 meses de avaliação

A disposição de efluente no solo por longos períodos tem promovido diferentes efeitos no carbono da biomassa microbiana. Constatou-se, em concordância com o observado neste trabalho, em relação à média das lâminas aplicadas ao longo de 18 meses, aumento do Cmic em diversos estudos (MELI et al., 2002; RAMIREZ-FUENTES et al., 2002; GELSOMINO et al., 2006), bem como a ausência de efeito (SCHIPPER et al., 1996; WANG et al., 2003). O efeito da disposição de efluente no solo sobre o carbono da biomassa microbiana está principalmente relacionado com a adição de

carbono dissolvido no efluente e o favorecimento das condições ambientais que propiciam o crescimento da microbiota.

O quociente microbiano ($qMIC$), que representa a participação do carbono microbiano no carbono total do solo, aumentou aos 4 meses de aplicação do efluente, e após esse período, manteve-se entre 2 e 3% (Figura 11), semelhante ao observado por Nogueira (2008), em área de Tifton 85 irrigada com efluente de esgoto tratado e com doses de adubação nitrogenada e, em áreas de pastagem de braquiária e capim-mombaça (SILVA et al., 2007). Valores muito baixos, próximos de zero, para o $qMIC$ são observados em áreas sob severo estresse, como a contaminação por metais (BANNING et al., 2008; BHATTACHARYYA et al., 2008).

Figura 11 - Quociente microbiano ($qMIC$) da área de pastagem de capim-Bermuda Tifton 85, irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto (0, 25, 50 e 100% de excesso), no período de dezembro de 2005 (tempo 0) a julho de 2007 (18 meses), no município de Lins, SP. As barras representam o erro padrão da média

A respiração induzida por substrato respondeu negativamente ao efeito da lâmina acumulada de efluente de esgoto tratado. Observou-se uma redução na RIS em torno de 28% entre o período de 4 e 18 meses de aplicação do efluente, no qual o valor observado na última avaliação para a RIS foi de $4,5 \text{ mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, considerando a média das lâminas de irrigação (Figura 12).

Figura 12 - Respiração induzida por substrato (RIS) da área de pastagem de capim-Bermuda Tifton 85, irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto (0, 25, 50 e 100% de excesso), no período de dezembro de 2005 (tempo 0) a julho de 2007 (18 meses), no município de Lins, SP. As barras representam o erro padrão da média

A respiração basal, representada como $C-CO_2$ e o quociente metabólico (qCO_2), que corresponde à fração ativa da biomassa microbiana, não apresentaram variação significativa em função das lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado e da precipitação, acumuladas no período de 18 meses (Tabela 4).

Tabela 4 - Respiração basal ($C-CO_2$) e quociente metabólico (qCO_2) de área de pastagem irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado (0, 25, 50 e 100% de excesso). Média de oito tempos de avaliação, seguidas do erro-padrão

Tratamentos	$C-CO_2$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	Coeficiente de variação (%)	qCO_2 (mg C-CO ₂ g ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	Coeficiente de variação (%)
0	1,56 ± 0,28	76	5,86 ± 1,14	69
25	1,14 ± 0,26	73	5,69 ± 1,51	74
50	1,25 ± 0,22	49	5,05 ± 0,97	57
100	1,23 ± 0,22	49	6,28 ± 1,02	71

A respiração basal apresentou grandes variações ao longo dos 18 meses, com os maiores valores aos 4 (1,9 mg kg⁻¹ h⁻¹) e 8 meses (2,4 mg kg⁻¹ h⁻¹) e os menores no período dos 12 aos 15 meses de aplicação do efluente (em torno de 0,8 mg kg⁻¹ h⁻¹). Na última avaliação a respiração basal tornou a aumentar, aos 18 meses de irrigação (2 mg kg⁻¹ h⁻¹), considerando a média das 4 lâminas excedentes de irrigação.

A resposta da atividade microbiana à aplicação de lâminas de irrigação com efluente também foi avaliada em outros estudos, como o trabalho realizado por Schipper et al. (1996), em área de floresta de *Pinus* irrigada com efluente. Os autores testaram lâminas de 49 e 74 mm semana⁻¹ de efluente e de água, pelo período de 3 anos e observaram que a atividade e a biomassa microbiana não apresentaram mudanças significativas, tanto entre as fontes de irrigação (efluente e água), como entre as lâminas testadas (de 49 e 74 mm semana⁻¹). Embora em condições diferentes daquelas presentes neste trabalho, os autores também não constataram variação significativa na atividade dos microrganismos do solo.

Após longo período de aplicação de efluente para a produção de várias culturas anuais, em torno de 70 anos, também não foram constatadas alterações significativas na atividade microbiana, em parcelas irrigadas com efluente e com água potável (WANG et al., 2003). Os autores atribuem esse efeito à capacidade adaptativa da microbiota do solo.

Refletindo o comportamento da respiração basal, o qCO_2 apresentou grande variação ao longo dos 18 meses de aplicação do efluente (Tabela 4). Aos 4 e 8 meses de avaliação, o qCO_2 praticamente dobrou em relação aos valores observados antes de iniciar a aplicação de efluente, alcançando os maiores valores aos 9 meses de aplicação do efluente, com média de 10 mg C-CO₂ g⁻¹ Cmic h⁻¹ para as 4 lâminas de irrigação.

Nos meses seguintes, que compreendem o período de chuvas, o quociente metabólico retornou a valores próximos aos observados antes de iniciar a irrigação com efluente. Na última avaliação, aos 18 meses de irrigação, o qCO_2 alcançou valores próximos ao observado aos 9 meses (10 mg C-CO₂ g⁻¹ Cmic h⁻¹). Este fato está possivelmente relacionado com o efeito da irrigação, uma vez que este período corresponde à estação seca, caracterizada por poucas chuvas e baixas temperaturas (Figura 2). Nestes períodos (aos 9 e aos 18 meses de irrigação), o carbono da biomassa microbiana diminuiu e a respiração basal do solo manteve-se constante (aos 9 meses) ou aumentou (aos 18 meses de irrigação), o que pode indicar a existência de um período desfavorável aos microrganismos.

O comportamento observado para o $q\text{CO}_2$ foi semelhante ao descrito por Nogueira et al. (2005), em um experimento conduzido numa área próxima à deste trabalho. Os autores observaram que após 18 meses de aplicação de EET em área cultivada com capim Tifton 85, o $q\text{CO}_2$ aumentou somente na estação seca, devido ao estímulo desta atividade ocasionado pela umidade e a adição de nitrogênio, via irrigação com efluente, sendo que o mesmo comportamento também foi observado nas parcelas que receberam água potável.

Embora alguns autores sugiram valores como limite para determinar uma condição de estresse sobre a comunidade microbiana, como o valor de $2 \text{ mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ Cmic h}^{-1}$, proposto por Anderson (2003), a interpretação de índices como o $q\text{CO}_2$ deve ser conduzida em conjunto com a avaliação do cenário o qual se está estudando, utilizando outros parâmetros microbiológicos de atividade microbiana, como a atividade de enzimas no solo (NOGUEIRA et al., 2006).

Os altos valores de $q\text{CO}_2$ observados nesse trabalho possivelmente estão relacionados com a alta atividade metabólica dos microrganismos, desencadeada pelo manejo do capim e a irrigação com efluente. O manejo do capim realizado bimestralmente representava uma entrada de carbono, do cisalhamento do corte do capim e de nitrogênio, proveniente da adubação mineral. Essa interferência, somada a irrigação com efluente, indicou um cenário favorável à atividade microbiana.

De forma geral, mudanças nos atributos químicos e microbiológicos em áreas irrigadas com efluente por curtos períodos de tempo, como neste trabalho, têm sido pouco observadas. Avaliando o efeito da irrigação com efluente de esgotos de tratamento terciário, Pollice et al. (2004) não constatarem mudanças nas propriedades químicas do solo, após dois anos de irrigação. Ao comparar áreas agrícolas irrigadas com efluente e áreas irrigadas com água tratada, na Califórnia, Wang et al. (2003) observaram diferenças apenas na porosidade total e no teor de magnésio, dentre vários atributos químicos, físicos e microbiológicos avaliados.

As principais alterações têm sido observadas nos estudos em longo prazo. No estado da Pensilvânia, nos Estados Unidos, a Universidade da Pensilvânia mantém uma área experimental por 40 anos, com culturas anuais e arbóreas irrigadas com efluente municipal. Ao avaliar o efeito desse manejo, sob a perspectiva da paisagem,

Walker e Lin (2008) verificaram que a irrigação com aproximadamente 2400 mm anuais de efluente, somadas a precipitação da região, fornecia ao solo em torno de 3350 mm anuais de água. Essa quantidade de água promoveu períodos de saturação localizada e transporte de materiais no solo nas áreas mais baixas da paisagem e, na área como um todo, aumentos consideráveis no teor de matéria orgânica e no pH do solo.

No México, a irrigação de culturas com efluente urbano tem sido utilizada no Vale do Mezquital, por mais de 90 anos (ORTEGA-LARROCEA et al., 2001). Nos trabalhos realizados, diversos autores observaram aumento nos teores de carbono e nitrogênio total, carbono e atividade microbiana (FRIEDEL et al., 2000; RAMIREZ-FUENTES et al., 2002). Entretanto, os autores também evidenciam o acúmulo de sais e de metais pesados, em consequência da utilização de efluentes de áreas urbanas e industriais.

3.3.2 Densidade populacional de grupos funcionais de microrganismos

As lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado promoveram efeito na densidade populacional de desnitrificantes e fungos totais, considerando as lâminas acumuladas no período de 18 meses (Figuras 13a e 13b). Efeito conjunto da precipitação acumulada e das lâminas de irrigação acumuladas no período avaliado foi observado para as bactérias nitrificantes, oxidantes de amônio (Figura 13c) e de nitrito (Figura 13d).

Para as populações de desnitrificantes, embora o ajuste ao modelo linear tenha sido baixo ($R^2 = 0,25$), o aumento da lâmina de irrigação acumulada proporcionou aumento da ordem de mais de 100 vezes na densidade populacional desse grupo, que era de 4,89 Log NMP antes de iniciar a aplicação de efluente e passou para 6,15 Log NMP, considerando a média das lâminas de irrigação.

De acordo com alguns autores, a desnitrificação é um processo importante em áreas que recebem efluente de esgoto tratado, uma vez que remove do solo o nitrato antes que este alcance o lençol freático (BARTON et al., 2000). Entretanto, neste processo são emitidos gases potencialmente danosos que contribuem para o efeito estufa e, conseqüentemente, para o aquecimento global (HALL; MATSON, 1999).

Aumento na população de desnitrificantes, como verificado neste trabalho, pode estar relacionado com a diminuição na concentração de O_2 no ambiente edáfico (BOUWER; CHANEY, 1974; POLGLASE et al., 1995; SCHIPPER et al., 1996). A alta concentração de nitrato na solução do solo, aliada à baixa concentração de O_2 , explica os aumentos na desnitrificação em solos irrigados com efluente, como observado por Schipper et al. (1996) e por Friedel et al. (2000).

Figura 13 - Densidade populacional de desnitrificantes (a), fungos totais (b), bactérias oxidantes de amônio (c) e oxidantes de nitrito (d) (Log NMP – Logaritmo do número mais provável) do solo de área de pastagem de capim Tifton 85, em função da precipitação e das lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado [0%: 1254 mm; 25%: 1509 mm; 50%: 1772 mm e 100% excesso: 2296 mm], acumuladas durante o período de 18 meses de avaliação

As populações de fungos totais do solo diminuíram com o aumento da lâmina acumulada de irrigação com efluente, com valores em torno de 4 Log NMP antes de iniciar a aplicação do efluente, passando para 2,3 Log NMP aos 18 meses de irrigação com efluente, uma redução de mais de 100 vezes no período avaliado. A redução na população de fungos está possivelmente relacionada com o aumento do pH do solo e o favorecimento do crescimento das populações de bactérias. A formação de sítios anaeróbios no solo, devido a fatores como a intensa atividade respiratória de bactérias aeróbias ou locais com alta viscosidade que dificultam a difusão de oxigênio, também pode limitar a população de fungos, que em sua maioria são aeróbios estritos, excetuando-se algumas leveduras (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

Para o grupo dos microrganismos nitrificantes, o comportamento foi semelhante para as oxidantes de amônio e de nitrito. As lâminas de irrigação acumuladas, acima da lâmina que representa o tratamento controle, ou seja, acima de 1250 mm, tendeu a diminuir a densidade populacional desse grupo, somando-se também o efeito da precipitação acumulada acima de 1250 mm. Este resultado é coerente com a ecologia desse grupo de microrganismos, reconhecidos como aeróbios obrigatórios (ROBERTSON; GROFFMAN, 2007). Tanto as lâminas excedentes de irrigação acumulada, acima de 1700 mm ou a lâmina com 50% de excesso, como um evento de chuva intenso, podem favorecer a formação temporária de condições anaeróbicas, limitando o crescimento desse grupo de microrganismos.

Para as bactérias totais do solo, observou-se efeito quadrático da precipitação acumulada no período de 18 meses (Figura 14), com os maiores valores observados com a precipitação acumulada em torno de 800 mm, que corresponde a avaliação realizada aos 9 meses de condução do experimento, relativa ao período seco na região de Lins, SP (Figura 2).

As variações observadas na densidade populacional de amonificantes não foram afetadas significativamente pela precipitação e lâmina de irrigação com efluente acumuladas. Observou-se que as populações de amonificantes aumentaram em relação à avaliação realizada antes de iniciar a irrigação com efluente (5 Log NMP), até os 8 meses de aplicação de efluente (6 Log NMP), considerando a média das lâminas de irrigação). Nos períodos seguintes, a densidade populacional diminuiu a valores

próximos aos observados no início do experimento, com destaque para a avaliação aos 13 meses de irrigação, no qual a maior lâmina de irrigação (100% de excesso) apresentou a menor densidade populacional registrada (3,3 Log NMP). A partir dos 15 meses de irrigação, os amonificantes apresentaram um aumento, mantendo-se em torno de 10^5 unidades formadoras de colônias (5 Log NMP).

Figura 14 - Bactérias totais (Log NMP – Logaritmo do número mais provável) do solo de área de pastagem de capim Tifton 85, em função da precipitação acumulada durante o período de 18 meses de avaliação

Aumentos na densidade de bactérias copiotróficas (de alto requerimento de nutrientes para crescimento) e oligotróficas (de baixo requerimento de nutrientes para crescimento) foram observados em áreas que receberam aplicação de efluentes por longos períodos (FILIP et al., 1999; FILIP et al., 2000). As bactérias totais, que também podem ser consideradas como bactérias copiotróficas, pois são cultivadas em meio rico em nutrientes, diferente do observado pelos autores, foram afetadas principalmente pela precipitação acumulada no período de 18 meses de avaliação.

A análise das relações existentes entre as variáveis químicas e de atividade microbiana com a densidade populacional de grupos funcionais de microrganismos foi estudada por meio das correlações de Pearson (Tabela 5). Grupos funcionais de microrganismos que contribuem para o carbono da biomassa microbiana, como as bactérias e fungos totais e, também as oxidantes de amônio, apresentaram relação positiva com esse parâmetro ($r = 0,21$; $0,29$ e $0,49$, respectivamente). A respiração

basal do solo teve correlação positiva com os grupos de microrganismos avaliados, excetuando-se os desnitrificantes e os fungos totais.

A respiração induzida por substrato correlacionou-se positivamente com as bactérias ($r = 0,24$) e os fungos totais ($r = 0,55$), que compreendem os microrganismos atuantes na decomposição dos materiais orgânicos presentes no solo e com habilidade de consumir fontes de carbono prontamente disponíveis. Já os grupos que representam as bactérias nitrificantes tiveram relação inversa com esse parâmetro. Reconhecidamente, as bactérias nitrificantes utilizam CO_2 como fonte de carbono e amônio e nitrito como fonte de elétrons para suas atividades vitais, dessa forma, um aumento na RIS indica uma predominância de bactérias heterotróficas em detrimento as autotróficas. Correlação negativa também foi observada para o grupo dos desnitrificantes ($r = -0,39$), como esperado, pois o processo de desnitrificação é anaeróbico.

Tabela 5 - Correlação de Pearson entre a densidade populacional de grupos funcionais de microrganismos e parâmetros químicos e de atividade microbiana de área de pastagem irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado (0, 25, 50 e 100% de excesso). Coeficientes com *, significativos a 5% e com ** significativos a 1%

	DESN	NIT-NH ₄	NIT-NO ₂	AMO	BAC	FGO
Cmic	- 0,215**	0,496**	0,135	0,135	0,208*	0,295**
C-CO ₂	- 0,053	0,172*	0,289**	0,179*	0,243**	0,092
RIS	- 0,391**	- 0,496**	- 0,436**	0,101	0,217**	0,557**
qCO ₂	0,079	0,181	0,179	0,105	0,088	- 0,370
qMIC	0,041	0,016	- 0,030	- 0,117	0,217*	0,014
CT	0,104	0,400*	0,444**	0,024	0,128	- 0,132
NT	- 0,021	0,034	0,091	- 0,071	0,237*	0,079
C:N	0,213**	0,696**	0,698**	0,142	- 0,104	0,142
pH	0,003	0,280**	0,243*	- 0,061	0,442**	0,029
Na ⁺	0,176*	0,597**	0,434**	0,194*	- 0,003	- 0,286**
N (efluente) ¹	- 0,018	0,427**	0,252**	0,222*	0,514**	0,348**

Acidez ativa (pH), sódio trocável (Na⁺), carbono (CT) e nitrogênio total (CT), relação carbono e nitrogênio total de solo (C:N), carbono da biomassa microbiana (Cmic), respiração basal (C-CO₂), respiração induzida por substrato (RIS), quociente microbiano (qMIC), quociente metabólico (qCO₂), bactérias totais (BAC), fungos totais (FGO), amonificantes (AMO), bactérias oxidantes de amônio (NIT-NH₄), bactérias oxidantes de nitrito (NIT-NO₂) e desnitrificantes (DESN); ¹N (efluente) – nitrogênio adicionado na irrigação com efluente.

O carbono total (CT) apresentou relação positiva com os nitrificantes e o nitrogênio total (NT) correlacionou-se positivamente com as bactérias totais. Assim como para o CT, também foi observada correlação positiva entre os grupos de

microrganismos nitrificantes e a relação C:N, este comportamento também foi notado para os desnitrificantes.

O pH do solo também apresentou relação positiva com os grupos de nitrificantes ($r = 0,28$) e também com as bactérias totais ($r = 0,44$). O aumento do pH até valores próximos ou superiores a neutralidade favorece o crescimento de nitrificantes, dentre outros grupos de microrganismos (ROBERTSON; GROFFMAN, 2007).

Relações positivas foram observadas entre alguns grupos funcionais de microrganismos e o teor de Na^+ no solo. Entretanto, o teor de Na^+ também apresentou relação positiva altamente significativa com o nitrogênio adicionado via irrigação com efluente (0,52). Como o nitrogênio é adicionado ao solo na mesma proporção que o Na^+ , porém em quantidades bem menores (Tabela 2), é esperado que o efeito positivo ocasionado pelo nitrogênio adicionado sobre os grupos funcionais seja confundido com o efeito do Na^+ acumulado no solo, durante o período avaliado.

Entretanto, o aumento no teor de Na^+ no solo tende a causar efeito adverso na comunidade microbiana (RIETZ; HAYNES, 2003; WICHERN; WICHERN; JOERGENSEN, 2006). Assim sendo, a relação positiva observada entre o teor de Na^+ e a densidade populacional de alguns grupos de microrganismos não pode ser considerada real.

3.3.3 Análises estatísticas multivariadas

3.3.3.1 Análise de curva de resposta principal (PRC)

A análise da PRC, para a avaliação do efeito da irrigação excedente sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos ligados ao ciclo do nitrogênio, revelou que 32,5% da variabilidade total está representada no primeiro eixo canônico (Figura 15) (499 permutações do teste de Monte Carlo; $F = 10,556$; $P = 0,012$).

Aos quatro meses de irrigação com efluente observou-se que a lâmina de 50% de excesso de irrigação se distanciou das demais, com diminuição das populações de microrganismos amonificantes (AMO) e aumento dos desnitrificantes (DESN) (Figura

15). As maiores diferenças foram observadas aos 13 meses de aplicação do efluente, período no qual a lâmina de 100% de excesso de irrigação apresentou a maior redução na densidade de microrganismos amonificantes (AMO) e maior crescimento de desnitrificantes (DESN).

Figura 15. - Curvas de resposta principal do efeito da irrigação de pastagem de capim Tifton 85 com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado [0(controle), 25, 50 e 100% de excesso] durante 15 meses, sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos ligados ao ciclo do nitrogênio (Cdt – Coeficiente canônico padronizado da RDA parcial) e o peso dos grupos funcionais (Bk) (BAC, bactérias totais; FGO, fungos totais; AMO, amonificantes; NIT-NH₄, oxidantes de amônio; NIT-NO₂, oxidantes de nitrito; DESN, desnitrificantes), no município de Lins, SP, Brasil

Os grupos funcionais de microrganismos nitrificantes (NIT-NH₄; NIT-NO₂), bactérias (BAC) e fungos (FGO) totais apresentaram pouca variação em suas populações para todas as lâminas avaliadas, ao longo dos 15 meses de aplicação do efluente, com valores de Bk próximos a zero. As duas maiores lâminas, de 50 e de 100% de excesso de irrigação, mantiveram-se abaixo da lâmina controle, aos 15 meses

de disposição do efluente. A lâmina de 25% de excesso mostrou-se como a lâmina com menor variação ao longo do tempo, em relação ao tratamento controle.

A análise de curva de respostas principais possibilita resumir as mudanças na comunidade microbiana, avaliadas pela densidade populacional de grupos funcionais de microrganismos ligados ao ciclo do nitrogênio, de forma a projetar os efeitos de uma variável em relação a uma referência, neste trabalho, as lâminas excedentes de efluente em relação à lâmina controle (LEPŠ; ŠMILAUER, 1999).

A partir da transformação exponencial do produto entre o coeficiente canônico padronizado (Cdt) em um dado tempo de avaliação, representado no eixo y e, o peso do grupo funcional de microrganismo (Bk) que se pretende estudar, conforme a fórmula: $\exp(cdt*Bk)$, é possível prever o tamanho relativo da densidade populacional desse grupo em comparação ao tratamento controle ($1 - \exp(cdt*Bk)$) (LEPŠ; ŠMILAUER, 1999). Dessa forma, para a avaliação realizada aos 13 meses de aplicação de efluente, a densidade populacional de amonificantes (AMO) na lâmina com 100% de excesso de irrigação foi cerca de 200% menor que na lâmina controle. Já para os desnitrificantes (DESN), neste mesmo tempo de avaliação, a lâmina com 100% de excesso promoveu um aumento de aproximadamente 45% na densidade populacional desse grupo. Para a lâmina com 25% de excesso, a densidade populacional de desnitrificantes (DESN) foi aproximadamente 19% menor que a lâmina controle.

Com esta análise foi possível constatar que os desnitrificantes e os amonificantes foram os grupos funcionais mais influenciados pela aplicação de lâminas excedentes de irrigação com efluente ao longo de 18 meses. Esta informação não foi obtida procedendo-se a análise univariada, considerando como fontes de variação as lâminas de irrigação com efluente e a precipitação acumuladas, na qual apenas foi observado efeito para o grupo dos desnitrificantes. A PRC mostrou-se de grande utilidade e eficiência na previsão do efeito das lâminas excedentes de irrigação com efluente sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos.

3.3.3.2 Análise de Redundância (RDA)

A aplicação das lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado afetou a densidade de grupos funcionais de microrganismos, conforme constatado na análise univariada e na análise de PRC. Adicionalmente, este efeito foi observado para determinados atributos químicos e microbiológicos do solo. Entretanto, a relação entre esses atributos e a densidade de grupos funcionais de microrganismos também pode ser testada, utilizando-se a RDA.

A RDA foi empregada para avaliar as possíveis relações existentes entre os atributos químicos e microbiológicos, considerados como variáveis ambientais, com a densidade de grupos funcionais de microrganismos, considerados como variáveis respostas, em área de pastagem irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado. Aplicou-se também a seleção de variáveis ambientais com o teste de permutação de Monte Carlo, que fornece um teste de significância para as variáveis. Na seleção de variáveis, a respiração basal e o quociente metabólico foram eliminados por apresentarem efeito de colinearidade, ou seja, estas variáveis apresentaram alta correlação com outras variáveis ambientais e, portanto, não contribuiriam para o resultado da análise.

Para os tratamentos irrigados com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado, a RDA representou 42,8% da variabilidade dos dados ($F\text{-ratio} = 39,11$; $P\text{ value} = 0,002$). Desta variabilidade, sem considerar a influência das variáveis ambientais (atributos químicos e microbiológicos), 37,1% estão representados nos dois primeiros eixos, sendo 24,7% representada pelo eixo 1 e 12,4% pelo eixo 2 (Figura 16). Com a participação das variáveis ambientais a representação da variabilidade pelos eixos canônicos 1 e 2 aumenta para 57,9% e 28,9%, respectivamente, totalizando 86,8% da variabilidade dos dados.

Figura 16 - Análise de redundância da densidade de grupos funcionais de microrganismos ligados ao ciclo do nitrogênio (BAC: bactérias totais; FGO: fungos totais; AMO: amonificantes; NIT-NH₄: oxidantes de amônio; NIT-NO₂: oxidantes de nitrito; DESN: desnitrificantes), de área de pastagem de capim Tifton 85 irrigado com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado (0, 25, 50 e 100% de excesso) no município de Lins, SP, Brasil. (setas tracejadas representam as variáveis ambientais: carbono da biomassa microbiana (Cmic), respiração induzida por substrato (RIS), quociente microbiano (qMIC), acidez ativa do solo (pH), potássio trocável (K⁺), cálcio trocável (Ca²⁺), magnésio trocável (Mg²⁺); sódio trocável (Na⁺); precipitação acumulada (PA))

No diagrama da RDA a proximidade entre os vetores que representam as variáveis ambientais e as variáveis respostas fornece informações a respeito das relações existentes entre elas, portanto, vetores apontando para a mesma direção indicam uma relação positiva entre as variáveis (LEPŠ; ŠMILAUER, 1999). Os grupos de bactérias e fungos totais encontram-se relacionados com a maior respiração induzida por substrato, relação também constatada pela análise de correlação simples

(Tabela 5), que representa uma medida de atividade dos microrganismos denominados zimógenos, ou seja, os responsáveis pela degradação dos compostos orgânicos simples e também são considerados de rápido crescimento. Estes grupos também se relacionaram com os maiores teores de potássio e magnésio trocáveis no solo. O quociente microbiano ficou próximo ao centro do gráfico, com valores baixos, não se relacionando fortemente com nenhum grupo funcional de microrganismo.

Os microrganismos amonificantes apresentaram relação positiva com o aumento do carbono da biomassa microbiana e do pH do solo, o que não foi observado pela análise de correlação simples (Tabela 5), e em menor intensidade com os teores de cálcio e sódio trocáveis. Já os nitrificantes relacionaram-se fortemente com o aumento dos teores de sódio, como observado na análise de correlação simples (Tabela 5), e em menor intensidade com o cálcio.

A precipitação acumulada no período de 18 meses, também considerada como variável ambiental nesta análise, teve maior relação com o aumento na densidade populacional de desnitrificantes, mas também influenciou o aumento da densidade de amonificantes e nitrificantes.

A partição da variabilidade dos dados influenciada pelos atributos químicos (pH, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e PA) e microbiológicos (Cmic, RIS e qMIC) indica uma maior participação dos atributos microbiológicos (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de variância multivariada com partição da variabilidade do efeito dos tratamentos (0, 25, 50 e 100% de excesso de irrigação com efluente e área não irrigada) na densidade de grupos funcionais de microrganismos ligados ao ciclo do nitrogênio (bactérias e fungos totais, amonificantes, nitrificantes e desnitrificantes). RDA testada por 499 permutações

Fonte de variação	% da variância	F	P
Explicada	41,8	34,95	0,002**
Atributos químicos	12,1	14,71	0,002**
Atributos microbiológicos	16,8	16,84	0,002**
Atributos químicos e microbiológicos	12,1	26,73	0,002**
Não explicado	58,2	-	-

**Significante a 1% para o teste de permutação de Monte Carlo.

A participação dos atributos químicos e microbiológicos na variabilidade total dos dados indica que a interação desses atributos promove efeito semelhante ao observado

apenas para os atributos químicos sobre a resposta dos grupos funcionais de microrganismos a aplicação das lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado.

A análise de redundância possibilitou inferir que há relação entre os atributos químicos e microbiológicos do solo e, estes afetam em proporções relativamente próximas a densidade de grupos funcionais de microrganismos em área de pastagem irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado.

3.3.4 Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

A taxa de colonização micorrízica do capim Tifton 85, avaliada após doze meses de aplicação de efluente, não variou em função das lâminas excedentes de irrigação com efluente de esgoto tratado (Tabela 7). O número de esporos variou entre as lâminas, sendo os maiores valores observados nas lâminas de 25% e 100% de excesso e, na área de pastagem não irrigada com efluente.

Tabela 7 - Taxa de colonização micorrízica, número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares e fósforo disponível em área de pastagem de capim Tifton 85 irrigado com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por 18 meses, no município de Lins, SP

Lâmina de irrigação (% de excesso)	Taxa de colonização (%)	Número de esporos (50g ⁻¹ solo)	Fósforo disponível (mg kg ⁻¹)
0	47,3 a	58 b	19,45 a
25	40,2 a	113 a	19,29 a
50	44,6 a	34 b	19,31 a
100	48,5 a	78 a	27,25 b
NE	39,0 a	112 a	22,01 a

* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não variaram entre si, pelo teste LSD (P < 0,05).

Este resultado difere do observado por Buratti (2007), que avaliou a colonização micorrízica de pastagem de capim Tifton 85 no município de Jóia, RS, sob diferentes condições de fertilidade do solo. Os autores verificaram que a colonização variou de 15% para a área com teor de fósforo de 7 mg dm⁻³, a apenas 4% para a área com 24 mg dm⁻³ de fósforo. A colonização observada por esses autores foi bem inferior a encontrada neste trabalho, tanto para as áreas irrigadas com o efluente (Tabela 7),

como para a área não irrigada com efluente, onde a colonização micorrízica foi de 39%, para o teor de fósforo foi de 22 mg kg⁻¹.

No período de 18 meses de irrigação, a área experimental recebeu 131 kg ha⁻¹ de fósforo, na forma de superfosfato simples. Embora seja esperada uma menor colonização micorrízica em áreas com fertilidade adequada para a cultura (MOREIRA; SIQUEIRA, 2007), a porcentagem de colonização observada na área pode ser considerada elevada. Este fato indica que a disponibilidade de nutrientes não está inibindo a presença do fungo micorrízico, tão pouco a colonização micorrízica e, possivelmente, a associação contribuiu para a nutrição da planta.

A colonização micorrízica de gramíneas do gênero *Cynodon* estimula a produção de pêlos radiculares pela planta, contribuindo na aquisição de nutrientes e também na agregação do solo, principalmente em solos de textura arenosa (MORENO-ESPÍNDOLA et al., 2007).

Outra função importante que as micorrizas arbusculares exercem é de proteção a condições adversas, como a presença de sais no solo (GARCÍA; MENDONZA, 2007) e metais pesados (LEUNG; YE; WONG, 2007). A maior tolerância à presença de sais pelas plantas micorrizadas pode estar relacionada com a aquisição de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio (GRAHAM, 1986) e mudanças em processos fisiológicos, como a taxa de transpiração e eficiência no uso da água (RUIZ-LOZANO; AZCÓN, 2000). Esse benefício promovido pela associação micorrízica é de grande interesse para áreas que recebem efluentes, devido à alta carga de sais adicionada ao solo nessas áreas (Tabela 2) e, em regiões com parques industriais, onde se tende também a adicionar metais pesados, como no México (ORTEGA-LARROCEA et al., 2001) e na China (ZHANG et al., 2008).

Os estudos avaliando o efeito da irrigação com efluentes de esgoto tratado sobre os fungos micorrízicos arbusculares são muito restritos (ORTEGA-LARROCEA et al., 2001; ORTEGA-LARROCEA et al., 2007; HUANG et al., 2005). Avaliando o efeito da irrigação com esgoto tratado, em dois tipos de solo, no vale do Mezquital, no México, Ortega-Larrocea et al. (2001) observaram que, independentemente do tipo de solo, a irrigação com esgoto tratado pelo período de 90 anos reduziu o número de esporos de FMAs em comparação com áreas irrigadas por apenas 5 anos. Os autores relacionaram

esse efeito com o aumento do fósforo e do teor de metais pesados, devido às características do esgoto tratado utilizado para a irrigação.

A escolha de uma cultura para receber irrigação com efluentes de esgoto tratado, considerando também os benefícios da associação micorrízica, como a tolerância a presença de sais no solo e melhor aproveitamento dos nutrientes podem auxiliar no planejamento do manejo da área irrigada, de forma a promover o crescimento da cultura e também a aplicação prática do reuso de água.

3.4 Efeito da irrigação com efluente na pastagem de Tifton 85 sobre os atributos microbiológicos comparado com área de pastagem não-irrigada

Os grupos funcionais de microrganismos ligados ao ciclo do nitrogênio responderam ao aporte de nutrientes e de material orgânico, presentes no efluente aplicado ao longo dos 18 meses de avaliação, conforme o resultado do teste de média (Tabela 8) e da RDA, com seleção de variáveis ambientais.

A densidade populacional de grupos funcionais de microrganismos foi maior nas áreas irrigadas do que na área de pastagem não irrigada, exceto para fungos totais. A irrigação com efluente promoveu aumento no C_{mic} , entretanto, não foi constatado efeito significativo nos parâmetros de atividade microbiana, como a respiração basal e o qCO_2 , possivelmente, devido à alta variação desses parâmetros (coeficientes de variação de 60 e 56,7%, respectivamente). Embora tenha sido observado aumento do C_{mic} , a participação deste no carbono total do solo, avaliado pela determinação do $qMIC$, não diferiu entre as áreas. Este resultado tem relação com o aumento observado para o carbono total do solo, apesar diferir da área não irrigada apenas na lâmina com 50% de excesso, o aumento ocasionado pela irrigação foi suficiente para manter a participação do C_{mic} no carbono total entre 2,15 a 2,45%.

A acidez ativa do solo diminuiu com a aplicação de efluente, para todas as lâminas avaliadas (média das quatro lâminas de irrigação: 5,5), diferindo apenas da área não irrigada com efluente (4,9). Para os cátions trocáveis, as lâminas de irrigação promoveram aumento significativo no teor de Ca^{2+} , reduziu o teor de Mg^{2+} na lâmina com 25% de excesso e o teor de K^+ nas lâminas com 0 e 100% de excesso de

irrigação. O teor de Na^+ foi significativamente maior nas áreas irrigadas com efluente, devido ao aporte desse elemento exclusivamente pelo efluente. Para a relação C:N, observou-se uma redução nas áreas irrigadas, o que se justifica pela adição de nitrogênio tanto pela adubação mineral como pela irrigação com efluente.

O aumento no teor de Ca^{2+} nas áreas irrigadas é consequência do aporte desse nutriente via efluente (Tabela 2). Para o potássio, embora as áreas irrigadas também recebessem adubação potássica (item 2.4.2), não apresentaram diferença da área de pastagem não irrigada e não manejada, exceto a lâmina com 100% de excesso, que apresentou o menor teor. O manejo aplicado às áreas irrigadas favoreceu a utilização desse nutriente pelo capim Tifton 85, que apresenta grande demanda por esse nutriente, conforme comentado no item 3.3.1, o que pode ter contribuído para a manutenção do teor desse nutriente em valores próximos ao observado na área que não é manejada nem irrigada.

Tabela 8 - Densidade de grupos funcionais de microrganismos, atributos microbiológicos e químicos de área de pastagem irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado (0, 25, 50 e 100% de excesso) por 18 meses e área de pastagem não irrigada (NE), no município de Lins, SP.

Tratamentos	Densidade populacional de grupos de microrganismos (Log NMP)					
	DESN	NIT-NH ₄	NIT-NO ₂	AMO	BAC	FGO
0%	5,34 a	3,93 a	4,20 a	5,65 a	5,59 a	3,03 a
25%	5,18 a	3,90 a	4,00 a	5,55 a	5,54 ab	3,13 a
50%	5,65 a	3,92 a	3,95 a	5,38 a	5,31 ab	3,19 a
100%	5,41 a	3,89 a	3,98 a	5,18 ab	5,47 ab	3,12 a
NE	3,91 b	2,99 b	3,07 b	4,75 b	5,16 b	2,97 a
CV (%)	8,76	10,52	11,39	6,72	9,30	8,81
	Atributos microbiológicos e químicos do solo					
	Cmic (mg g ⁻¹)	C-CO ₂ (mg kg ⁻¹ h ⁻¹)	qMIC (%)	qCO ₂ (mg C-CO ₂ g ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	NT (g kg ⁻¹)	CT (g kg ⁻¹)
0%	252,72 a	1,66 a	2,45 a	6,02 a	0,68 ab	10,52 ab
25%	253,63 a	1,64 a	2,41 a	6,78 a	0,69 a	10,73 ab
50%	256,09 a	1,33 a	2,36 a	5,35 a	0,72 a	11,09 a
100%	228,22 ab	1,20 a	2,22 a	5,60 a	0,67 ab	10,44 ab
NE	204,58 b	1,28 a	2,17 a	5,50 a	0,60 b	9,71 b
CV (%)	11,31	60,00	16,69	56,70	14,95	11,12
	Atributos químicos do solo					
	pH (CaCl ₂)	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	C:N
	-	mmol _c kg ⁻¹				-
	-	-	-	-	-	-
0%	5,54 a	12,30 a	4,27 a	1,55 ab	4,28 a	15,4 a
25%	5,45 a	11,32 a	4,17 b	1,73 a	4,89 a	15,4 a
50%	5,60 a	13,21 a	4,70 a	1,97 a	4,87 a	15,5 a
100%	5,51 a	13,17 a	4,87 a	1,30 b	4,55 a	15,4 a
NE	4,93 b	8,82 b	4,80 a	1,90 a	0,65 b	16,2 b
CV (%)	1,92	14,70	12,83	19,59	10,18	14,33

[CV(%): coeficiente de variação; DESN: desnitrificantes; NIT-NH₄: oxidantes de amônio; NIT-NO₂: oxidantes de nitrito; AMO: amonificantes; BAC: bactérias totais; FGO: fungos totais; Cmic: carbono microbiano; C-CO₂: respiração basal do solo; qMIC: quociente microbiano; q CO₂: quociente metabólico; NT: nitrogênio total; CT: carbono total; pH: acidez ativa; Ca²⁺: cálcio trocável; Mg²⁺: magnésio trocável; K⁺: potássio trocável; Na⁺: sódio trocável; C:N: relação carbono:nitrogênio]. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste LSD (P < 0,05)

A RDA, utilizada para avaliar se há relação entre os atributos microbiológicos e químicos sobre a densidade populacional de grupos de microrganismos, de áreas de pastagem irrigada com efluente de esgoto tratado, comparadas com as áreas de pastagem não irrigada, revelou relações significativas entre eles. Da variabilidade explicada pelos dois primeiros eixos canônicos, 21% está explicada pelo eixo canônico 1 e 15% pelo eixo canônico 2, totalizando 36% da variabilidade dos dados (Figura 17). Considerando a influência das variáveis ambientais (atributos químicos e microbiológicos), a porcentagem da variabilidade representada pelos eixos canônicos 1 e 2 aumenta para 94%, ou seja, correspondendo por grande parte da variabilidade explicada pelos eixos canônicos. O teste de permutação de Monte Carlo indica que a relação entre os atributos químicos e microbiológicos sobre a densidade de grupos

funcionais de microrganismos é mais forte que a esperada ao acaso (F-ratio = 24,51; P value = 0,002).

Figura 17 - Análise de redundância (RDA) da densidade de grupos funcionais de microrganismos ligados ao ciclo do nitrogênio (*BAC*, bactérias totais; *FGO*, fungos totais; *AMO*, amonificantes; *Namo*, oxidantes de amônio; *Nnit*, oxidantes de nitrito; *DESN*, desnitrificantes), de área de pastagem de capim Tifton 85 irrigado com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado (0, 25, 50 e 100% de excesso) e área não-irrigada com efluente (NE) no município de Lins, SP, Brasil; (setas tracejadas representam as variáveis ambientais: respiração basal ($C-CO_2$), quociente metabólico (qCO_2), acidez ativa do solo (pH), potássio trocável (K^+), cálcio trocável (Ca^{2+}), magnésio trocável (Mg^{2+}), sódio trocável (Na^+))

Na seleção de variáveis, o carbono microbiano (C_{mic}), o quociente microbiano ($qMIC$) e os atributos químicos: Ca^{2+} trocável, carbono e nitrogênio total, bem como a relação C:N foram retiradas da análise por apresentarem efeito de colinearidade (LEPŠ; ŠMILAUER, 1999).

A área de pastagem não irrigada (NE) mostrou-se relacionada com os menores valores de pH, atributos de atividade microbiana, como a respiração basal (C-CO₂) e quociente metabólico (*q*CO₂) e, teor de Na praticamente irrelevante. As áreas irrigadas com efluente estão relacionadas com os maiores teores de Na⁺, pH e de atributos microbiológicos, como *q*CO₂ e C-CO₂. As áreas irrigadas com efluente de esgoto tratado apresentaram maiores valores de densidade de microrganismos, para todos os grupos avaliados.

A partição da variabilidade dos dados afetada pelos atributos químicos e microbiológicos mostra que a densidade de grupos funcionais de microrganismos nas áreas irrigadas com efluente de esgoto tratado e na área de pastagem não irrigada foram fortemente influenciados pelas variações dos atributos químicos, sendo pouco expressiva a participação dos atributos microbiológicos e da interação entre ambos (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise de variância multivariada com partição da variabilidade do efeito dos tratamentos (0, 25, 50 e 100% de excesso de irrigação com efluente e área não irrigada) na densidade de grupos funcionais de microrganismos ligados ao ciclo do nitrogênio (bactérias e fungos totais, amonificantes, nitrificantes e desnitrificantes). Análise de redundância (RDA) testada por 499 permutações

Fonte de variação	% da variância	F	P
Explicada	38,4	24,51	0,002**
Atributos químicos	29,3	21,14	0,002**
Atributos microbiológicos	3,7	9,194	0,002**
Atributos químicos e microbiológicos	5,4	17,82	0,002**
Não explicado	61,6	-	-

**Significante a 1% para o teste de permutação de Monte Carlo

A densidade dos grupos funcionais de microrganismos é estimulada pela irrigação com efluente, sendo que as variações dos atributos químicos do solo ocasionadas pela irrigação, como o pH e os cátions trocáveis, contribuíram consideravelmente para a resposta dos grupos de microrganismos, observada nas áreas irrigadas. As lâminas excedentes de irrigação com efluente apresentaram comportamento semelhante, diferindo apenas da área de pastagem não irrigada.

3.5 Perfil do consumo de fontes de carbono pela comunidade microbiana de uma área de pastagem de capim Tifton 85 irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado

O consumo das fontes de carbono, avaliado pelo metabolismo heterotrófico médio, não variou entre as lâminas excedentes de efluente, entretanto, as áreas irrigadas apresentaram maiores valores do que os observados na área de pastagem que não recebeu irrigação (Figura 19). A fase lag, de crescimento inicial, se concentrou nas primeiras 20 horas, para todos os tratamentos e, a partir desse ponto, inicia-se a fase exponencial de crescimento, praticamente igual para as áreas irrigadas com efluente, que diferiram da área não irrigada. Esta última apresentou uma fase exponencial mais longa que as áreas irrigadas com efluente. A lâmina controle (0% excesso) distanciou-se das demais lâminas de irrigação apenas na fase estacionária.

O nível de consumo de substrato, representado pelo parâmetro K, foi mais elevado na lâmina controle, semelhante às demais áreas irrigadas com efluente, diferindo apenas da área não irrigada com efluente, que apresentou o menor nível de consumo de substrato (Tabela 10).

Figura 19 - Metabolismo heterotrófico médio (média do desenvolvimento de cor do poço - AWCD) de áreas de pastagem irrigadas com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado (0, 25, 50 e 100% de excesso) e área não irrigada com efluente (NE) no município de Lins, SP, Brasil. As linhas representam o ajuste ao modelo logístico e os pontos representam a média de cada tratamento

Já o parâmetro R, que reflete a taxa de crescimento exponencial da comunidade bacteriana heterotrófica (ROS et al., 2006), evidencia o efeito diferenciado da aplicação das lâminas excedentes de efluente, em relação à lâmina controle e à área de pastagem não irrigada com efluente. O maior tempo para alcançar o ponto médio da fase exponencial de consumo dos substratos, indicado pelo parâmetro S (ROS et al., 2006), foi verificado na área de pastagem não irrigada com efluente, sendo que para as áreas irrigadas, o comportamento foi semelhante ao verificado para o nível de consumo de substratos, parâmetro K.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos da curva de ajuste do metabolismo heterotrófico médio (K= quantidade potencial de substrato utilizado, R = taxa de crescimento exponencial e S = tempo para alcançar o ponto médio da fase exponencial), para área de pastagem irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por 18 meses [0 (controle), 25, 50 e 100% de excesso] e área de pastagem sem irrigação com efluente (NE) no município de Lins, SP, Brasil. Valores médios e desvio-padrão

Tratamento	K	R	S
0	1,557 ± 0,06 a	0,082 ± 0,014 b	37,079 ± 3,01 b
25	1,438 ± 0,04 ab	0,098 ± 0,015 a	34,910 ± 2,27 b
50	1,464 ± 0,05 ab	0,096 ± 0,027 a	36,856 ± 2,77 b
100	1,465 ± 0,05 ab	0,097 ± 0,016 a	35,579 ± 2,55 b
NE	1,353 ± 0,08 b	0,053 ± 0,099 c	57,679 ± 5,01 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste LSD ($P < 0,05$)

A análise em escala multidimensional dos parâmetros cinéticos obtidos do ajuste aos dados de metabolismo heterotrófico médio pode ser observada na Figura 20. O valor de estresse (0,01) informa que a representação gráfica apresenta baixa probabilidade de interpretação dos dados de forma errônea.

Figura 20 - Análise em escala multidimensional (NMDS) dos parâmetros cinéticos do MHM de áreas de pastagem irrigadas com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado ($\blacktriangle$ 0, $\blacktriangledown$ 25, $\blacksquare$ 50 e $\blacklozenge$ 100% excesso) e área não irrigada com efluente ($\bullet$ NE), no município de Lins, SP

A análise de similaridade baseada nos parâmetros cinéticos estimados para o metabolismo heterotrófico médio indicou diferença significativa (R global = 0,468, $P < 0,001$) e o resultado do teste *Pairwise* revela que as áreas de pastagem irrigadas com efluente foram significativamente diferentes da área não irrigada, não sendo observada variação entre as lâminas excedentes de efluente (Tabela 11).

Tabela 11 - Resultado do teste *Pairwise* (Estatística R) para os parâmetros cinéticos do metabolismo heterotrófico médio das áreas de pastagem irrigadas com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado [0 (controle), 25, 50 e 100% de excesso] e para a área de pastagem não irrigada (NE), no município de Lins, SP, Brasil ($** P < 0,001$)

Tratamentos	Estatística R
0, 25	0,177
0, 50	0,292
0, 100	0,406
0, NE	1,000**
25, 50	-0,031
25, 100	-0,067
25, NE	1,000**
50, 100	-0,146
50, NE	1,000**
100, NE	1,000**

A correlação dos parâmetros cinéticos com os atributos químicos do solo e com o material adicionado via efluente mostrou algumas relações significativas (Tabela 12). O

nível de consumo de substrato (K) correlacionou-se positivamente com o carbono particulado total (CPT) e nitrogênio particulado total (NPT) adicionado via efluente. A baixa relação C:N (C:N) do efluente foi provavelmente o principal fator que estimulou o aumento no nível de consumo de substrato.

Tabela 12 - Correlação de Pearson entre os parâmetros cinéticos (K= potencial de substrato utilizado, R = taxa de crescimento exponencial e S = tempo necessário para alcançar o ponto médio exponencial) do ajuste ao metabolismo heterotrófico médio com os atributos químicos do solo [acidez ativa (pH), alumínio trocável (Al), capacidade de troca catiônica (CTC), sódio trocável (Na), carbono (CT) e nitrogênio total (NT)], carbono particulado total (CPT) e nitrogênio particulado total (NPT) adicionados via efluente

	pH	CTC	Na	CT	NT	CPT	NPT
K	0,290	-0,010	0,226	0,103	0,127	0,480	0,480
R	0,840**	0,499*	0,803**	0,546*	0,587**	0,643**	0,643**
S	-0,841**	-0,339	-0,940**	-0,608**	-0,661**	-0,818**	-0,818**

Coeficientes com *, significativos a 5% e com ** significativos a 1%

A taxa de crescimento exponencial dos microrganismos (R) apresentou correlação positiva com todos os atributos. A aplicação de efluente promoveu aumento no pH do solo (média das 4 lâminas de irrigação = 5,5) em comparação a área de pastagem não irrigada (4,8), fato que, em conjunto com o aumento da capacidade de troca catiônica, tendem a estimular o crescimento microbiano. A adição de carbono e nitrogênio via efluente (CPT e NPT), assim como o aumento do CT e NT e o Na trocável também se relacionaram com o aumento da taxa de crescimento exponencial dos microrganismos.

A análise de correlação entre os atributos químicos do solo e do efluente com o tempo necessário para alcançar o ponto médio de crescimento exponencial (S) teve um comportamento oposto ao apresentado pela taxa de crescimento exponencial (R), o que reflete a relação inversa entre esses dois parâmetros, ou seja, uma maior taxa de crescimento exponencial corresponde a um menor tempo para alcançar o ponto médio de crescimento microbiano.

Com relação aos diferentes grupos de substrato, os parâmetros cinéticos dos ajustes obtidos apresentaram comportamento variado para as áreas irrigadas com lâminas excedentes e para a área de pastagem não irrigada. Os grupos de substratos que indicaram as maiores diferenças entre os tratamentos foram: as aminas e as

miscelâneas, para os parâmetros K e R, e também os carboidratos, para o parâmetro S. Os maiores valores de K foram observados para o grupo amina, onde apenas a lâmina com 25% de excesso diferiu das demais e, os menores para o grupo de miscelâneas, com a lâmina controle diferindo apenas da área de pastagem não irrigada com efluente (Tabela 13).

Os valores da taxa de crescimento exponencial (R) dentro de cada grupo de substrato foram influenciados pelas lâminas de irrigação com efluente, exceto o grupo dos aminoácidos. A maior variação entre os tratamentos ocorreu no grupo das miscelâneas, que também apresentou as menores taxas de utilização de substratos (K).

O parâmetro S, que representa o tempo necessário para alcançar o ponto médio exponencial, variou significativamente em função das lâminas de efluente aplicadas para os grupos: carboidratos, aminas e miscelâneas, com os maiores valores observados para o grupo dos carboidratos e os menores para o grupo das miscelâneas.

Tabela 13 - Parâmetros cinéticos da curva de ajuste (K: potencial de substrato utilizado, R: taxa de crescimento exponencial e S: tempo necessário para alcançar o ponto médio exponencial) dos grupos de substratos (AAS: aminoácidos, CHO: carboidratos, COOH: ácidos carboxílicos, -NH₂: aminas, POL: polímeros e MISC: miscelâneas), para área de pastagem irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por 18 meses [0 (controle), 25, 50 e 100% de excesso] e área de pastagem sem irrigação com efluente (NE), no município de Lins, SP, Brasil

Tratamentos	AAS	CHO	COOH	-NH ₂	POL	MISC
K						
0%	1,170a	1,121a	1,002a	1,130a	0,993a	0,896a
25%	1,177a	1,058ab	0,944a	0,940 b	0,997a	0,796ab
50%	1,062a	0,915 b	0,972a	1,137a	0,933a	0,632ab
100%	1,050a	1,101ab	0,942a	1,175a	1,073a	0,577ab
NE	1,054a	1,252 a	0,912a	1,183a	1,071a	0,465 b
R						
0%	0,868a	1,076 bc	1,076 bc	0,627 bc	1,352a	0,768 bc
25%	1,018a	0,941 bc	0,941 bc	1,434a	0,971ab	1,132 abc
50%	0,960a	0,789 c	0,789 c	0,795 b	1,394a	1,393 ab
100%	1,651a	1,243 ab	1,243ab	0,601bc	0,355 b	1,707 a
NE	1,338a	1,473 a	1,473a	0,408 c	0,333 b	0,669 c
S						
0%	1,431a	1,342ab	0,949a	0,823 bc	1,065a	0,749a
25%	1,360a	0,966ab	1,105a	0,393 c	0,905a	0,511 b
50%	0,986a	0,714 b	0,849a	0,727 b	0,852a	0,710a
100%	0,900a	1,312ab	0,972a	0,692 b	1,145a	0,376 c
NE	1,022a	1,612a	0,850a	1,058a	1,186a	0,409 bc

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste LSD ($P < 0,05$)

Diferente do observado neste trabalho, Bossio e Scow (1995), avaliando o efeito do aumento do teor de água no solo e da adição de palha de arroz como resíduo orgânico, verificaram maior utilização de carboidratos associado com a adição de resíduos orgânicos e uma menor utilização de carboidratos e ácidos carboxílicos com o aumento no teor de água no solo. Para o grau de consumo de substrato ou parâmetro K, observou-se que a aplicação de lâminas de efluente promoveu diferenças apenas na utilização do grupo de miscelâneas de substratos, em relação à área de pastagem não irrigada, diferença que também se manteve nos demais parâmetros cinéticos avaliados. Este resultado indica uma possível relação com os compostos orgânicos adicionados via efluente com os compostos que representam o grupo de miscelânias, como os polímeros (tween 40 e tween 80), favorecendo o consumo desses compostos pela comunidade microbiana presente nas áreas irrigadas.

Na avaliação da diversidade funcional da comunidade microbiana heterotrófica, baseada na capacidade de utilização dos diferentes substratos, constatou-se que a

disposição de efluente de esgoto teve efeito significativo sobre a riqueza de substratos (Ss) e a diversidade de consumo de substratos, estimada pelo índice de diversidade de Shannon (H). A riqueza de substratos foi maior para as áreas irrigadas do que para a área de pastagem não irrigada, a partir das 48 horas de incubação (Figura 21a), com maior Ss consumidos nas áreas irrigadas com efluente, destacando-se a lâmina com 25% de excesso após 120 horas de incubação.

Já para o índice H, observou-se efeito significativo a partir das 12 horas de avaliação até o período de 96 horas de incubação (Figura 21b), com os maiores valores para as áreas irrigadas (3,22) com efluente e o menor valor para a área não irrigada (2,43). Apenas na avaliação realizada após 144 horas de incubação a área não irrigada com efluente apresentou H maior que as demais áreas.

O solo é reconhecido como um ambiente oligotrófico, ou seja, um meio com disponibilidade restrita de substratos para os organismos que nele habitam (LAVELLE; SPAIN, 2005). A incubação de suspensões de solo em meios ricos em substratos de fácil degradação, como na avaliação do consumo de substratos com placas Ecoplate, favorece o crescimento de microrganismos copiotróficos, capazes de crescer rapidamente (BUYER; ROBERTS; RUSSEK-COHEN, 2002) em detrimento aos oligotróficos, que consomem substratos mais complexos e apresentam uma taxa de crescimento mais lenta.

Esse conceito pode estar relacionado com os aumentos observados no índice H, para a área de pastagem não irrigada, em relação às áreas irrigadas com lâminas excedentes de efluente. O favorecimento dos microrganismos copiotróficos ficou mais evidente nas áreas irrigadas, que apresentaram uma taxa de crescimento exponencial significativamente maior que a área de pastagem não irrigada (Tabela 10). Este rápido crescimento pode ter resultado no esgotamento dos substratos mais disponíveis nas amostras das áreas irrigadas com efluente, o que provavelmente não ocorreu para a área de pastagem não irrigada.

Figura 21 - a) Riqueza (Ss) e b) Índice de diversidade de Shannon (H) das áreas de pastagem irrigadas com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado [0 (controle), 25, 50 e 100% de excesso] e para a área de pastagem não irrigada (NE), no município de Lins, SP, Brasil ($P < 0,001$)

O uso de placas Ecoplate em estudos da comunidade microbiana tem sido pouco explorado na avaliação do impacto da irrigação com efluentes (GELSOMINO et al. 2006; ZHANG et al. 2008). O potencial funcional da comunidade microbiana, avaliado

com Ecoplates, tem sido considerado rápido e útil para a obtenção de informações sobre a dinâmica fisiológica de microrganismos em diferentes solos (CLASSEN et al., 2003; GOBERNA et al., 2005), em solos sob diferentes condições de manejo (GOVAERTS et al., 2007) e sob o impacto de potenciais contaminantes do solo (ROS et al. 2006).

Em estudo avaliando o efeito de recorrentes inundações de áreas agrícolas com efluentes sobre a comunidade microbiana, Gelsomino et al. (2006) utilizaram a análise do perfil fisiológico da comunidade com placas Ecoplate, além de um conjunto de técnicas moleculares (DGGE, ARDRA). Estes autores verificaram que, conforme o observado neste trabalho, a avaliação da comunidade com as placas Ecoplate foi capaz de discriminar as áreas sob recorrente inundação daquelas áreas não-inundadas.

Neste trabalho, a avaliação do metabolismo heterotrófico médio possibilitou observar que a aplicação de efluente modificou a resposta fisiológica da comunidade microbiana em comparação à área de pastagem não irrigada, resultado diretamente ligado ao carbono e nitrogênio adicionado via efluente nessas áreas. Este fato também foi observado por Zhang et al. (2008). Estes autores verificaram que a irrigação com efluente proporcionou aumento significativo na utilização de fontes de carbono, avaliada por placas Ecoplate, em comparação com áreas irrigadas com água subterrânea, entretanto, não observaram diferença significativa entre as áreas para o índice de diversidade de Shannon, embora a área irrigada tenha apresentado um maior valor (3,15) em comparação à área irrigada com água subterrânea (2,85).

O comportamento observado para o metabolismo heterotrófico médio se refletiu nas análises em escala multidimensional e de similaridade, baseadas nos parâmetros cinéticos. Na avaliação da diversidade funcional, estimada pela riqueza de substratos e pelo índice de diversidade de Shannon, também se constatou o efeito da irrigação com efluente, onde não só a quantidade de carbono adicionado, como também a qualidade desse material pode ter contribuído para o efeito significativo nestes parâmetros.

O uso da análise em escala multidimensional (NMDS), seguida da análise de similaridade (ANOSIM) possibilitaram constatar diferenças significativas entre as áreas irrigadas com efluente e a área de pastagem não irrigada. A NMDS empenha-se em posicionar os dados em uma representação gráfica em duas dimensões, combinando

as similaridades calculadas a partir de uma matriz triangular de similaridade, para cada par de amostras (MANLY, 2005). De forma diferente da análise de componentes principais (ACP), que permite observar as associações entre as áreas em estudo e uma ou mais variáveis, esta análise apresenta a vantagem da aplicação do teste estatístico Pairwise, que calcula a estatística R e compara os pares de tratamentos, fornecendo a significância da relação entre os mesmos.

O aumento no pH do solo observado após 18 meses de aplicação de efluente está de acordo com o observado por Fonseca et al. (2007a). Esse fato que pode estar relacionado com o alto pH do efluente e com o estímulo à atividade de mineralização, proporcionada pelas condições favoráveis de umidade e de disponibilidade de substrato no solo. Entretanto, a ausência de efeito também pode ser observada (RUSAN et al., 2007), devido ao poder tampão do solo. Esta prática também promoveu aumento na capacidade de troca catiônica e diminuição do alumínio trocável, em comparação com a área de pastagem não irrigada (dados não apresentados), corroborando com as observações anteriores em áreas irrigadas com efluente (FONSECA et al., 2007a, 2007b).

A correlação positiva do Na^+ com a taxa de crescimento exponencial dos microrganismos é um resultado conflitante com o que é relatado na literatura (RIETZ; HAYNES, 2003). Esses autores verificaram efeito negativo do aumento dos níveis de Na^+ trocável sobre a atividade dos microrganismos, avaliada pela taxa de amonificação e da hidrólise do diacetato de fluoresceína. Esse fato está possivelmente relacionado a um efeito de 'confundimento' com o efeito observado tanto para o NT, como para o nitrogênio particulado total (NPT), adicionado via efluente. Esses dois parâmetros apresentaram correlação positiva altamente significativa (0,77 para NT e 0,87 para NPT) com o Na^+ . Dessa forma, o efeito positivo observado sobre a taxa de crescimento exponencial dos microrganismos não pode ser considerado um efeito real, pois o Na^+ é adicionado ao solo na mesma proporção que o nitrogênio particulado total.

A pesquisa sobre prática de irrigação com efluente de esgoto tratado tem ganhado estímulo em face da crescente preocupação com a disponibilidade de recursos hídricos para a agricultura (MARRIS, 2008) e, além de fatores relacionados aos atributos químicos (RUSAN et al., 2007) e físicos do solo (WARRINGTON et al.

2007), o estudo do impacto dessa atividade sobre a comunidade microbiana e seu potencial fisiológico tende a somar informações que podem futuramente fornecer parâmetros como diretrizes do potencial de reuso agrícola de efluentes de esgoto tratado.

O interesse agrícola nessa atividade de reuso é consequência dos ganhos econômicos com o suprimento parcial de nutrientes através da irrigação com efluentes (FONSECA et al., 2007b), mas esta atividade também representa uma ação de interesse ambiental, pois tende a aliviar a pressão sobre os recursos hídricos disponíveis, por ser o efluente de esgoto tratado uma fonte de água de reuso constante, podendo inclusive, ser considerada na determinação do valor de mercado do produto final (TOZE, 2006).

As avaliações das mudanças nos atributos do solo, em curtos períodos de condução de um determinado manejo, como a irrigação com águas residuárias, é crucial para determinar a viabilidade desta atividade e, a escolha das variáveis a serem avaliadas deve levar em consideração não só atributos relacionados com a fertilidade do solo e com a sua estrutura, mas também apresentar uma capacidade de rápida resposta a mudanças de uso no solo, como os parâmetros microbiológicos (BENDING et al., 2004). Todavia, o acompanhamento da prática de irrigação com águas de reuso deve ser executado em longo prazo, a fim de avaliar a capacidade de suporte do sistema solo-planta-ambiente. Áreas bem manejadas e monitoradas demonstram a viabilidade do reuso agrícola (RUSAN et al., 2007) e estimulam o desenvolvimento de modelos e ferramentas que auxiliem na tomada de decisão (HIDALGO et al., 2007), sem deixar de considerar os riscos que esta prática envolve, concernentes com a saúde humana (SALGOT et al., 2006).

3.6 Diversidade genética de bactérias oxidantes de amônio

Os produtos da amplificação do gene *amoA*, de DNA de amostras de solo das áreas de pastagem irrigadas com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado: 0, 25, 50 e 100% de excesso, foram separados na análise de DGGE. Uma vez que o

padrão de bandas obtido para as repetições de cada tratamento foi bastante similar, apenas uma amostra representativa de cada tratamento foi utilizada na análise. A partir desse gel, foram cortadas as bandas selecionadas para posterior seqüenciamento (Figura 22).

A análise do gel de DGGE mostra que o padrão de bandas obtido para as amostras das áreas de pastagem irrigadas com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado foram similares para a lâmina com 25 (número 8) e com 50% (número 11) de excesso de irrigação. Um padrão de banda diferente foi observado na amostra do tratamento controle (número 2), com 0% de excesso de irrigação (Figura 22).

Figura 22 - DGGE de amplicons do gene *amoA* de amostras de solo de área de pastagem irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado; marcador (M); *Nitrosospira multiformis* (controle positivo); 15: 100% de excesso; 11: 50% de excesso; 8: 25% de excesso; 2: 0% de excesso de efluente de esgoto tratado

As seqüências de DNA do gene *amoA* das bandas selecionadas foram alinhadas com seqüências de bactérias oxidantes de amônio pertencentes ao gênero *Nitrosospira* sp., sendo construídas as árvores filogenéticas para “*Neighbour-joining*” (Figura 23), “*Minimum evolution*” (Figura 24) e “*Maximum parsimony*” (Figura 25).

Figura 23 - Árvore filogenética baseada na seqüência do gene *amoA* de amostras de solo irrigado com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado (bandas 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e isolados disponíveis no GenBank, construída pelo método “Neighbour-joining”, árvore consenso de *bootstraps*, utilizando 1000 replicações

Figura 24 - Árvore filogenética baseada na seqüência do gene *amoA* de amostras de solo irrigado com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado (bandas 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e isolados disponíveis no GenBank, construída pelo método “Minimum evolution”, árvore consenso de *bootstraps*, utilizando 1000 replicações

Figura 25 - Árvore filogenética baseada na sequência do gene *amoA* de amostras de solo irrigado com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado (bandas 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e isolados disponíveis no GenBank, construída pelo método “*Maximum parsimony*”, árvore consenso de *bootstraps*, utilizando 1000 replicações

A análise das seqüências revelou que as bandas 2 e 6, que se encontravam na mesma posição no gel de DGGE, referentes as áreas irrigadas com 0 e com 100% de excesso, foram filogeneticamente associadas (94% de similaridade) com o clone AP-54, seqüenciado por Dell et al. (2006), isolado de área de capim-Bermuda (*Cynodon dactylon* × *transvalensis*) (Figura 23).

Essas duas bandas também se relacionaram, com 80% de similaridade, com a banda 1, da lâmina com 0% de excesso de irrigação (Figura 23). As demais bandas (3, 4 e 5), referentes a área com 25% de excesso de irrigação com efluente, formaram um grupo separado, com 86% de similaridade (Figura 23) com o grupo das bandas 1, 2 e 6. As amostras das áreas de pastagem irrigada com efluente de esgoto tratado apresentaram 79% de similaridade com o isolado *Nitrosospira* sp., obtido por Aakra et al. (2001), em um solo de textura médio-arenosa no Zâmbia, África.

As seqüências obtidas neste estudo estão relacionadas filogeneticamente com bactérias do gênero *Nitrosospira*, conhecido como o mais comum entre as bactérias oxidantes de amônio encontradas no solo (OVED et al., 2001). Dentre os fatores que

determinam a estrutura das populações de bactérias oxidantes de amônio destacam-se o pH e a concentração de sais no ambiente. Diferentes espécies de *Nitrosospira* têm sido encontradas em solos neutros e ácidos (STEPHEN et al., 1998; STEPHEN et al., 1996).

Diferente do observado neste trabalho, no qual todas as amostras das áreas irrigadas com efluente apresentaram similaridade com espécies de *Nitrosospira*, Oved et al. (2001) encontraram dominância do gênero *Nitrosomonas* em solos cultivados com milho e irrigados com efluente por um ano, enquanto o gênero *Nitrosospira* foi dominante nos solos irrigados e com adição de fertilizante mineral.

Em estudo avaliando a irrigação de campos de golfe cultivados com *Cynodon dactylon* e *Lolium perenne* com diferentes fontes de água (água de poço, efluente de tratamento terciário de esgoto e água do rio Colorado), na Califórnia, constatou-se que a atividade e a diversidade de bactérias oxidantes de amônio foram reduzidas pela salinidade da água utilizada na irrigação, durante um período de mais de 10 anos (CANTERA; JORDAN; STEIN, 2006). Os autores afirmaram que a reduzida diversidade desse grupo de bactérias indica o seu potencial como parâmetro sensível para avaliação do efeito da salinidade e recomendam o efluente de esgoto tratado como fonte de irrigação menos prejudicial, dentre as fontes disponíveis, a esse grupo e a sua atividade no solo.

3.7 Síntese dos resultados

A avaliação durante o período de 18 meses da prática de irrigação com efluente de esgoto tratado, aplicando lâminas excedentes em até 100% da capacidade de água disponível para a pastagem, buscou informações a respeito do impacto dessa prática na comunidade microbiana, em especial nos grupos funcionais de microrganismos ligados ao ciclo do nitrogênio, bem como o potencial metabólico dessa comunidade, estudado com as placas Biolog.

Quando comparados os tratamentos neste curto período de avaliação, a aplicação da lâmina excedente acima de 25% de excesso de irrigação promoveu

redução na densidade populacional de bactérias amonificantes e estimulou o crescimento de bactérias desnitrificantes. Uma vez mantido esse cenário, este resultado implica em um monitoramento das funções relacionadas a esses grupos: a amonificação e a desnitrificação, a fim de avaliar o impacto dessas práticas nessas funções e possíveis efeitos adversos ocasionados por esse manejo.

As mudanças nos atributos químicos e microbiológicos do solo, promovidos pela aplicação das lâminas excedentes de irrigação com efluente, também influenciaram na densidade de grupos funcionais de microrganismos. A aplicação de lâminas excedentes de efluente no período de 18 meses estimulou a capacidade metabólica da comunidade microbiana, avaliada pelas placas Biolog.

4 CONCLUSÕES

A irrigação da área de pastagem de capim Tifton 85 com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado durante 18 meses promoveu alterações nas características químicas, na atividade microbiana, na capacidade metabólica e na densidade de grupos funcionais de microrganismos.

Com relação aos atributos químicos, a aplicação das lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado, avaliada em conjunto com o efeito promovido pela precipitação, diminuiu a acidez ativa do solo e aumentou os teores de cálcio e sódio trocáveis, ainda reduziu os teores de magnésio e potássio trocáveis na maior lâmina de irrigação.

A análise de curva de resposta principal possibilitou constatar que os grupos funcionais dos amonificantes e desnitrificantes foram os mais influenciados pela aplicação das lâminas excedentes de efluente, sendo a lâmina com 25% de excesso a que apresentou as menores variações na densidade dos grupos funcionais, em comparação à lâmina controle.

Os atributos químicos: pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e Na^+ , os atributos microbiológicos: carbono microbiano, respiração induzida por substrato e quociente microbiano

contribuíram para a variabilidade da densidade de grupos funcionais de microrganismos de áreas de pastagem irrigadas com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado.

A irrigação com efluente promoveu um estímulo na densidade populacional dos grupos funcionais de microrganismos, comparada com a área de pastagem não irrigada.

O potencial metabólico, avaliado pela cinética de consumo de substrato, foi estimulado pela irrigação da área de pastagem com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado, comparado com o potencial da área de pastagem não irrigada. Entretanto, as lâminas excedentes não apresentaram diferença no potencial metabólico.

Não existem indícios de mudanças na estrutura das populações de bactérias oxidantes de amônio do solo de área de pastagem de capim Tifton 85, irrigado com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por 18 meses, com dominância de bactérias do gênero *Nitrosospira*.

A colonização micorrízica do capim Tifton 85 não foi afetada pela aplicação de lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por 18 meses.

Analisando os resultados como um todo, concluiu-se que a aplicação de lâminas excedentes de irrigação com efluente em até 25% não promove grandes alterações na comunidade microbiana do solo e lâminas acima desse valor, podem promover acúmulo de sódio no solo, estimular o crescimento de bactérias desnitrificantes e inibir o crescimento de bactérias amonificantes, para solos com características semelhantes.

Considerações Finais

Nas condições estudadas, a irrigação com efluente de esgoto tratado, excedente em até 25% da lâmina de irrigação recomendada para o capim Tifton 85 pode ser considerada adequada para suprir a demanda hídrica da cultura sem ocasionar variações significativas nos atributos microbiológicos e químicos avaliados. Entretanto, a definição da aplicação de uma lâmina de irrigação excedente com efluente de esgoto tratado, para uma determinada cultura, deve levar em consideração não só a avaliação dos atributos químicos e microbiológicos da camada superficial do solo, mas também

um estudo em longo prazo dos atributos químicos e físicos, ao longo do perfil do solo, o monitoramento do lençol freático da área, bem como a produtividade da cultura que se pretende irrigar. Dessa forma, após uma análise conjunta de todos esses parâmetros é possível partir-se para um posicionamento sobre viabilidade econômica e ambiental dessa prática.

REFERÊNCIAS

- AAKRA, A.; UTÅKER, J.B.; NES, I.F. Comparative phylogeny of the ammonia monooxygenase subunit α and 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 205, n. 2, p. 237-242, Nov., 2001
- ACEA, M.J.; CARBALLAS, T. Microbial fluctuations after soil heating and organic amendment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 67, n. 1, p. 65-71, 1999.
- AL-NAKSHABANDI, G.A.; SAQQAR, M.M.; SHATANAWI, M.R.; FAYYAD, M.; AL-HORANI, H. Some environmental problems associated with the use of treated wastewater for irrigation in Jordan. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v.34, n. 1, p.81-94, 1997.
- ALVAREZ, C.R.; ALVAREZ, R.; GRIGERA, M.S.; LAVADO, R.S. Associations between organic matter fractions and the active soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 767-773, 1998.
- ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F.; VERNEQUE, R.S.; BOTREL, M.A. Resposta do Tifton 68 a doses de nitrogênio e intervalos de cortes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.9, p.1875-1882, 2000.
- AMERICAM PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) – AMERICAM WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA). 20th ed. **Standard methods for examination for water and wastewater**. Washington, 1999, 1220p.
- ANA. Superintendência de conservação de água e solo. **Agricultura irrigada e o uso racional da água**. Brasília, 2004. 30p.
- ANDERSON, J.P.E. Soil respiration. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of Soil Analysis**. Madison: ASA/SSSA, 1982. chap 7, pt 2, p. 837-871.
- ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.10, n. 3, p. 215-221, 1978.
- ANDERSON, T-H; DOMSCH, K.H. Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial populations under *in situ* conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 197-203, 1985.
- ANDERSON, T.-H. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 285-293, 2003.

ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, K.H. Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial opulations under *in situ* conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 197-203, 1985.

ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, K.H., The metabolic quotient for 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 and Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.

ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 799-804, 2003.

ASANO, T.; MAEDA, M.; TAKAKI, M. Wastewater reclamation and reuse in Japan: overview and implementation examples. **Water Science and Technology**, Oxford, v.34, n. 1, p.219-226, 1996.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**: fundamentals and applications. 4th ed. Califórnia: Benjamim/Cummings, 1997. 694p.

AYERS, R.S.; WESTCOT, D.S. Water quality for agriculture. Rome: FAO, 1985. 174p. (Irrigation and Drainage Paper, 29)

BALKS, M.R.; BOND, W.J.; SMITH, C.J. Effects of sodium accumulation on soil physical properties under an effluent-irrigated plantation. **Australian Journal of Soil Research**. Melbourne, v.36, n. 5, p.821-830, 1998.

BAGARELLO, V.; IOVINO, M.; PALAZZOLO, E.; PANNO, M.; REYNOLDS, W.; Field and laboratory approaches for determining sodicity effects on saturated soil hydraulic conductivity. **Geoderma**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 1–13, 2006.

BARETTA, D. **Fauna do solo e outros atributos edáficos como indicadores da qualidade ambiental em áreas com *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. 2007. 158p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.10, p.2043-2050, 2000.

BARTON, L.; SCHIPPER, L.A.; SMITH, C.T.; McLAY, C.D.A. Denitrification enzyme activity is limited by soil aeration in a wastewater-irrigated forest soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 32, n. 5, p. 385-389, 2000.

BANNING, N.C.; GRANT, C.D.; JONES, D.L.; MURPHY, D.V. Recovery of soil organic matter, organic matter turnover and nitrogen cycling in a post-mining forest rehabilitation

chronosequence. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 2021–2031, 2008.

BENDING, G.D.; TURNER, M.K.; RAYNS, F.; MARX, M.C.; WOOD, M. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1785-1792, 2004.

BHATTACHARYYA, P.; TRIPATHY, S.; CHAKRABARTI, K.; CHAKRABORTY, A.; BANIK, P. Fractionation and bioavailability of metals and their impacts on microbial properties in sewage irrigated soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, n. 4, p. 543–550, 2008.

BILGO, A.; MASSE, D.; SALL, S.; SERPANTIÉ, G.; CHOTTE, J-L.; HIEN, V. Chemical and microbial properties of semiarid tropical soils of short-term fallows in Burkina Faso, West Africa. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 43, n. 3, p. 313–320, 2007.

BISSANI, C.A.; MEURER, E.J.; BOHNEN, H. Solos ácidos e solos afetados por sais. In: MEURER, E.J. Ed. **Fundamentos de química do solo**. 2 ed. Porto Alegre: Genesis, 2004. cap. 6, p. 181-206.

BOND, W.J. Effluent irrigation - an environmental challenge for soil science. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v.36, n. 4, p.543-555, 1998.

BRIONES, A.M.; OKABE, S.; UMEMIYA, Y.; RAMSING, N-B.; REICHARDT, W.; OKUYAMA, H. Influence of Different Cultivars on Populations of Ammonia-Oxidizing Bacteria in the Root Environment of Rice. . **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 6, p. 3067–3075, 2002.

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

BRUNDRETT, M. Mycorrhizas in natural ecosystems. In: MACFAYDEN, A.; BEGON, M.; FITTER, A.H. (Ed). **Advances in ecological research**, London: Academic Press, 1991. p.171-313.

BUOL, S.W; HOLE, F.D; McCracken, R.J. **Soil Genesis and Classification**. Ames: Iowa State University Press, 1973. 360 p.

BOUWER, H.; CHANEY, R.L. Land treatment of wastewater. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 26, p.133-176, 1974.

BURATTI, J.V.; LIBARDONI, J.B.; BATTAGLIN, R.F.; QUADROS, V.J.; FERNANDES, S.B.V; BERTO, J.L. Associação de fungos micorrízicos nativos em Tifton 85 sob diferentes situações de fertilidade. In:CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO

SOLO, 31., Conquistas e Desafios da Ciência do Solo Brasileira, 2007, Gramado.
Resumos... Gramado: SBCS, 2007. p. 95.

BUCHANAM, M.; GLIESSMAN, S. How compost fertilization affects soil nitrogen and crop yield. **Biocycle**, Emmaus, v. 12, p.2-7, 1991.

BUYER, J.S.; ROBERTS, D.P.; RUSSEK-COHEN, E. Soil land plant effects on microbial community structure. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 11, p. 955–964, 2002.

CALBRIX, R.; LAVAL, K.; BARRAY, S. Analysis of the potential functional diversity of the bacterial community in soil: a reproducible procedure using sole-carbon-source utilization profiles. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam, v. 41, n. 1-2, p.11-20, 2005.

CANDELA, L.; FABREGAT, S.; JOSA, A.; SURIOL, J.; VIGUÉS, N.; MAS, J. Assessment of soil and groundwater impacts by treated urban wastewater reuse. A case study: application on a golf course (Girona, Spain). **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 374, n. 1, p. 26-35, 2007.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; BARROS, N. F. de, FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p.375-470.

CAMERON, K.C.; DI, H.J.; McLAREN, R.G. Is soil an appropriate dumping ground for our wastes? **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v.35, n. 5, p.995-1035, 1997.

CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p.

CHU, J.; CHEN, J.; WANG, C.; FU, P. Wastewater reuse potential analysis: implications for China's water resources management. **Water Research**, Amsterdam, v. 38, n. 11, p. 2746–2756, 2004.

CIIAGRO/Instituto agrônômico. **Monitoramento climático**. Disponível em: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/>. Acesso em: 10 Ago. 2007.

CLASSEN, A.T.; BOYLE, S.I.; HASKINS, K.E.; OVERBY, S.T.; HART, S.C. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p.319-328, 2003.

COLODRO, G.; ESPÍNOLA, C.R.; CASSIOLATO, A.M.R.; ALVES, M.C. Atividade microbiana em um Latossolo degradado tratado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.11, n.2, p.195-198, 2007.

CRECCHIO, C.; GELSOMINO, A.; AMBROSOLI, R.; MINATI, J.L.; RUGGIERO, P. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.36, n. 11, p. 1873–1883, 2004.

DELL, E.; BOWMAN, D.; RUFTY, T.; SHI, W. Intensive Management Affects Composition of Betaproteobacterial Ammonia Oxidizers in Turfgrass Systems. **Microbial Ecology**, New York, v. 56, n. 1, p. 178–190, 2008.

DOMSCH, K.H.; JAGNOW, G.; ANDERSON, K.-H. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. **Residue Reviews**, New York, v. 86, n. 1, p. 65–105, 1983.

ESPINDOLA, J. A. A.; ALMEIDA, D. J.; GUERRA, J. G. M.; SILVA, E. M. R. Flutuação sazonal da biomassa microbiana e teores de nitrato e amônio de solo coberto com *paspalum nontatum* em um agroecossistema. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 8, n.1, p.104-113, 2001.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automater sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; JONES, C.A. **Growth and mineral nutrition of field crops**. 2nd.ed. New York: Marcel Dekker, 1997. 624p.

FEIGIN, A.; RAVINA, I.; SHALHEVET, J. **Irrigation with treated sewage effluent: management for environmental protection**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. 224p.

FILIP, Z.; KANAZAWA, S.; BERTHELIN, J. Characterization of effects of a long-term wastewater irrigation on soil quality by microbiological and biochemical parameters. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tokyo, v. 162, n. 4, p. 409-413, 1999.

FILIP, Z.; KANAZAWA, S.; BERTHELIN, J. Distribution of microorganisms, biomass ATP, and enzyme activities in organic and mineral particles of a long-term wastewater irrigated soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tokyo, n. 163, n. 1, p. 143-150, 2000.

FIRME, L.P. **Efeito da irrigação com efluente de esgoto tratado no sistema solo-planta em Latossolo cultivado com cana-de-açúcar**. 2007. 109p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

FONSECA, A.F. **Viabilidade agrônomo-ambiental da disposição de efluente de esgoto tratado em um sistema solo-pastagem**. 2005. 190p. Tese (Doutorado em

Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FONSECA, A.F.; MELFI, A.J.; MONTES, C.R. Maize growth and changes in soil fertility after irrigation with treated sewage effluent. II. Soil acidity, exchangeable cations, and sulfur, boron and heavy metals availability. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v.36, n. 15/16, p.1983-2003, 2005.

FONSECA, A.F., MELFI, A.J., MONTEIRO, F.A.; MONTES, C.R.; ALMEIDA, V.V.; HERPIN, U. Treated sewage effluent as a source of water and nitrogen for Tifton 85 bermudagrass. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 87, n. 3, p. 328-336, 2007a.

FONSECA, A.F.; HERPIN, U.; PAULA, A.M.; VICTORIA, R.L.; MELFI, A.J. Agricultural use of treated sewage effluents: agronomic and environmental implications and perspectives for Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 1, p.194-209, 2007b.

FRIEDEL, J.K.; LANGER, T.; SIEBE, C.; STAHR, K. Effects of long-term waste water irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and its activities in central Mexico. **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v.31, n. 5, p.414-421, 2000.

GALVAGNO, M.A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia de fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos**: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004. cap. 4, p.125-172.

GARCÍA, I.V.; MENDONZA, R.E. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant symbiosis in a saline-sodic soil. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 17, n. 3, p.167-174, 2007.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, n. 8, p.2351-2359, 1991.

GELSOMINO, A.; BADALUCCOB, L.; AMBROSOLIC, R.; CRECCHIOD, C.; PUGLISIE, E.; MELI, S.M. Changes in chemical and biological soil properties as induced by anthropogenic disturbance: A case study of an agricultural soil under recurrent flooding by wastewaters. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 8, p. 2069-2080, 2006.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 46, n. 1, p. 235-246, 1963.

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

GLOAGUEN, T.V.; FORTI, M.C.; LUCAS, Y.; MONTES, C.R.; GONÇALVES, R.A.B.; HERPIN, U.; MELFI, A.J. Soil solution chemistry of a Brazilian Oxisol irrigated with treated sewage effluent. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v.88, n. 1/2, p.119-131, 2007.

GOBERNA, M.; INSAM, H.; KLAMMER, S.; PASCUAL, J.A.; SÁNCHE, J. Microbial community structure at different depths in disturbed and undisturbed semiarid Mediterranean forest soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 50, n. 3, p. 315-326, 2005.

GOVAERTS, B.; MEZZALAMA, M.; UNNO, Y.; SAYRE, K.D.; LUNA-GUIDO, M.; VANHERCK, K.; DENDOOVEN, L.; DECKERS, J. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p.18-30, 2007.

GRAHAM, J.H. Citrus mycorrhizae: potential benefits and interactions with pathogens. **HortScience**, St. Joseph, v. 21, n. 6, p.1302–1306, 1986.

GRATTAN, S.R.; GRIEVE, C.M.; POSS, J.A.; ROBINSON, P.H.; SUAREZ, D.L.; BENES, S.E. Evaluation of salt-tolerant forages for sequential water reuse systems. I. Biomass production. **Agricultural Water Management**, Amsterdam v.70, n. 2, p.109-120, 2004.

GRIEVE, C.M.; POSS, J.A.; GRATTAN, S.R.; SUAREZ, D.L.; BENES, S.E.; ROBINSON, P.H. Evaluation of salt-tolerant forages for sequential water reuse systems. II. Plant-ion relations. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v.70, n. 2, p.121-135, 2004.

HALL, S.J.; MATSON, P.A. Nitrogen oxide emissions after additions in tropical forests. **Nature**, London, v.400, p.152-155, 1999.

HART, S.C.; STARK, J.M.; DAVIDSON, E.C.; FIRESTONE, M.K.. Nitrogen Mineralization, Immobilization, and Nitrification. In: Page, A.L **Methods of soil analysis**, Madison: SSSA Book Series, 1994. Pt 2 - Microbiological and biochemical properties, 5. p. 985-1018.

HE, Z. L.; WU, J.; O'DONNELL, A. G.; SYERS, J. K. Seasonal responses in microbial biomass carbon, phosphorus and sulphur in soils under pasture **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v. 24, n. 4, p.421–428, 1997.

HEIDARPOUR, M.; MOSTAFAZADEH-FARD, B.; KOUPAI, J.A.; MALEKIAN, R. The effects of treated wastewater on soil chemical properties using subsurface and surface irrigation methods. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v.90, n. 1/2, p.87-94, 2007.

HERPIN, U.; GLOAGUEN, T.V; DA FONSECA, A.F.; MONTES, C.R.; MENDONÇA, F.C.; PIVELI, R.P.; BREULMANN, G.; FORTI, M.C.; MELFI, A.J. Chemical effects on the soil–plant system in a secondary treated wastewater irrigated coffee plantation—A pilot field study in Brazil. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v.89, n. 1/2, p.105-115, 2007.

HIDALGO, D.; IRUSTRA, R.; MARTINEZ, L.; FATTA, D.; PAPADOPOULOS, A. Development of a multi-function software decision support tool for the promotion of the safe reuse of treated urban wastewater. **Desalination**, Amsterdam, v. 215, n. 1/3, p. 90-103, 2007.

HOBEN, W.E.; HARRIS, D. DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 4, n. 5, p. 627-631, 1995.

HORNEK, R.; POMMERENING-RÖSER, A.; KOOPS, H.; FARNLEITNER, A.H.; KREUZINGER, N.; KIRSCHNER, A.; MACH, R.L. Primers containing universal bases reduce multiple *amoA* gene specific DGGE band patterns when analyzing the diversity of beta-ammonia oxidizers in the environment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, n. 1, p.147–155, 2006.

HUANG, Y.; TAO, S.; CHEN, Y.J. The role of arbuscular mycorrhiza on change of heavy metal speciation in rhizosphere of maize in wastewater irrigated agriculture soil. **Journal of Environmental Sciences**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 276-280, 2005.

HUMERES, E. A chuva que não queremos. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 62, p. 63-65, 1992.

IBEKWE, A.M.; GRIEVE, C.M. AND LYON, S.R. Characterization of Microbial Communities and Composition in Constructed Dairy Wetland Wastewater Effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, n. 9, p. 5060–5069, 2003.

INSAM, H.; AMOR, K.; RENNER, M.; CREPAZ, C. Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. **Microbial Ecology**, New York, v. 31, n. 1, p.77-87, 1996.

JAHNEL, M.C.; CARDOSO, E.J.B.N.; DIAS, C.T.S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, n. 3, p.553-559, 1999.

JEAN E.T. MCLAIN, J.E.T.; MARTENS, D.A. N₂O production by heterotrophic N transformations in a semiarid soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p.253–263, 2006.

JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N. Eds. **Soil Biochemistry**, New York, v.5, p.415-471, 1981.

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

KANDELER, E. Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. In: PAUL, E.A. **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. chap. 3. p. 53-84.

KARLEN, D.L.; MAUSBACH, M.J.; DORAN, J.W.; CLINE, R.G.; HARRIS, R.F.; SCHUMAN, G.E. Soil quality: A concept, definition, and framework for evaluation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, n. 1, p. 4-10, 1997.

KAUR, J.; CHOUDHARY, O.P.; BIJAY-SINGH. Microbial biomass carbon and some soil properties as influenced by long-term sodic-water irrigation, gypsum, and organic amendments. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 46, n. 1, p. 141–151, 2008

KERN, J.; IDLER, C. Treatment of domestic and agricultural wastewater by reed bed systems. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v.12, n. 1, p.13–25, 1999.

KLOTZ, M.G.; NORTON, J.M. Sequence of an ammonia monooxygenase subunit A-encoding gene from *Nitrosospira* sp. NpAV. **Gene**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 159–160, 1995.

LAVELLE, P.; SPAIN, A.V. **Soil Ecology**. 2nd ed. Netherlands: Springer, 2005. 688p.

LEAL, R.M.P. **Efeito da irrigação com efluente de esgoto tratado em propriedades químicas de um latossolo cultivado com cana-de-açúcar**. 2007. 109p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas). - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007

LEPŠ, J.; ŠMILAUER, P. **Multivariate analysis of ecological data using CANOCO**. Cambrigde: Cambrigde University Press, 2003. 269p.

LEUNG, H.M.; YE, Z.H.; WONG, M.H. Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 66, n. 5, p. 905–915, 2007.

LINDISTRÖM, E.S.; VEDRE, K.; LESKINEN, E. Response of a member of the *Verucomicrobia*, among the dominant bacteria in a hipolimnion, to increase phosphorus availability. **Journal of Plankton Reseach**, New York, v. 26, n. 2, p.241-246, 2004.

LINS, C.E.L.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.M.T.; SAMPAIO, E.V.S.B. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de *Leucaena leucocephala* (Lam.)

de Wit. em solos de caatinga sob impacto de mineração de cobre. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 355-363, 2007.

LOVELL, R.D.; HATCH, D.J. Stimulation and microbial activity following spring applications of nitrogen. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.26, n. 1, p.28-30, 1998.

MALUCHE-BARETTA, C.R.D.; AMARANTE, C.V.T.; KLAUBERG-FILHO, O. Análise multivariada de atributos do solo em sistemas convencional e orgânico de produção de maçã. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n. 10, p. 1531-1539, 2006.

MANCINO, C.F.; PEPPER, I.L. Irrigation of turfgrass with secondary sewage effluent: soil quality. **Agronomy Journal**, Madison, v. 84, n. 4, p.650-654, 1992.

MANLY, B.F.J. **Multivariate Statistical Methods - A primer**, 3rd ed. Florida: Chapman & Hall/CRC, 2005. 214p.

MANTIS, I.; VOUTSA, D.; SAMARA, C. Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 397–407, 2005.

MARRIS, E. More crop per drop. **Nature**, London, n. 452, p. 273-277, 2008.

MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal, and estreptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 69, n. 1, p. 215 – 232, 1950.

MCLAIN, J.E.T.; MARTENS, D.A. Moisture controls on trace gas fluxes in semiarid riparian soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, n. 2, p. 367–377, 2006.

MEKKI, A.; DHOUIB, A.; SAYADI, S. Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 161, n. 2, p. 93-101, 2006.

MELI, S.; PORTO, M.; BELLIGNO, A.; BUFO, S. A.; MAZZATURA, A.; SCOPA, A. Influence of irrigation with lagooned urban wastewater on chemical and microbiological soil parameter in citrus orchard under Mediterranean condition. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.285, n. 1, p.69-77, 2002.

MOHAMMAD, M.J.; MAZAHREH, N. Changes in soil fertility parameters in response to irrigation of forage crops with secondary treated wastewater. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.34, n. 9-10, p. 1281-1294, 2003.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

- MORENO-ESPÍNDOLA, I.P.; RIVERA-BECERRIL, F.; FERRARA-GUERRERO, M.J.; LEÓN-GONZÁLEZ, F. Role of root-hairs and hyphae in adhesion of sand particles. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 2520–2526, 2007.
- MORRIS, S.J.; BLACKWOOD, C.B. The ecology of soil organisms. . In: PAUL, E.A. **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. chap. 8. p.195-226.
- NAKATSU, C.H., TORSVIK, V., ØVREÅS, L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, n. 4, p.1382–1388, 2000.
- NICOLAISEN, M. H.; RAMSING, N.B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p.189–203, 2002.
- NOGUEIRA, S. F.; CARMO, J. B.; MONTES, C. R.; VICTORIA, R. L. Indicadores eco-fisiológicos da qualidade de um solo irrigado com esgoto tratado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, suplemento, p.138-142, 2005.
- NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAN, M.P.; RAMPAZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment** , Amsterdam, v. 115, n. 3-4, p. 237–247, 2006.
- NOGUEIRA, S.F. **Efeitos da irrigação com esgoto tratado e fertilização nitrogenada na ciclagem de carbono e nitrogênio e no metabolismo microbiano de um solo cultivado com capim-Bermuda Tifton 85**. 2008. 138p. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- NURK, K.; TRUU, J.; TRUU, M.; MANDER, Ü. Microbial characteristics and nitrogen transformation in planted soil filter for domestic wastewater treatment. **Journal of Environmental Science and Health Part A - Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, New York, v. 40, n. 6/7, p. 1201-1214, 2005.
- ODUM, E.P. **Fundamentals of ecology**. Philadelphia: Saunders, 1959. 546 p.
- ORTEGA-LARROCEA, M.P.; SIEBE, C.; ESTRADA, A.; WEBSTER, R. Mycorrhizal inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi in soils irrigated with wastewater for

various lengths of time, as affected by heavy metals and available P. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 37, n. 1/2, p. 129-138, 2007.

ORTEGA-LARROCEA, M.P.; SIEBE, C.; BÉCARD, G.; MÉNDEZ, I.; WEBSTER, R. Impact of a century of wastewater irrigation on the abundance of arbuscular mycorrhizal spores in the soil of the Mezquital Valley of Mexico. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 16, n.2, p. 149-157, 2001.

OVED, T.; SHAVIV, A.; GOLDRATH, T.; MANDELBAUM, R.T.; MINZ, D. Influence of Effluent Irrigation on Community Composition and Function of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil. **Applied and environmental microbiology**, Baltimore, v.4, n. 7, p. 3426–3433, 2002.

PAULA, A.M.; SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 2, p. 448-455, 2006.

PESCOD, M.B. Wastewater treatment and use in agriculture. Rome: FAO, 1992. 125p. (Irrigation and Drainage Paper, 47)

PESQUISA FAPESP. Aumentaram as terras degradadas. São Paulo: Plural Editora e Gráfica, n. 150, ago. 2008. p. 40.

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

POLGLASE, P.J.; TOMPKINS, D.; STEWART, L.G.; FALKINER, R.A. Mineralization and leaching of nitrogen in an effluent-irrigated pine plantation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.24, sep./oct., p. 911-920, 1995.

POLLICE, A.; LOPEZ, A.; LAERA, G.; RUBINO, P.; LONIGRO, A. Tertiary filtered municipal wastewater as alternative water source in agriculture: a field investigation in Southern Italy. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.324, n. 1-3, p.201-210, 2004.

PRAMER, D.; SCHMIDT, E.L. **Experimental Soil Microbiology**. Minneapolis: Burgess Publ. 1965. 130p.

PREMAZZI, L.M.; MONTEIRO, F.A.; CORRENTE, J.E. Tillering of Tifton 85 Bermudagrass in response to nitrogen rates and time of application after cutting. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.60, n. 3, p.565-571, 2003.

PRESTON-MAFHAM, J.; BODDY, L.; RANDERSON, P.F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 1-14, 2002.

PRIMER 5 for WINDOWS. Versão 5.2.6, Primer-E . 2001.

PROSSER, J. I. Autotrophic nitrification in bacteria. **Advances in Microbial Physiology**. London, v. 30, p. 125–181, 1989.

RABARY, B.; SALL, S.; LETOURMY, P.; HUSSON, O.; RALAMBOFETRA, E.; MOUSSA, N.; CHOTTE, J.-L. Effects of living mulches or residue amendments on soil microbial properties in direct seeded cropping systems of Madagascar. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 236-243, 2008.

RAIJ, B. van; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H.; ANDRADE, J.C. **Análise química para avaliação da fertilidade de solo tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 284p.

RAMIREZ-FUENTES, E.; LUCHO-CONSTANTINO, C.; ESCAMILLA-SILVA, E.; DENDOOVEN, L. Characteristics, and carbon and nitrogen dynamics in soil irrigated with wastewater for different lengths of time. **Bioresource Technology**, Essex, v.85, n. 2, p.179-187, 2002.

RICE, C.W.; TIEDJE, J.M. Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soils and isolated soil microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.21, n. 4, p.597-602, 1989.

RIETZ, D.N.; HAYNES, R.J. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 845-854, 2003.

ROBERTSON, G.P; GROFFMAN, P.M. Nitrogen transformations. In: PAUL, E.A. **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. chap. 13. p. 341-364.

ROBERTSON, G.P. Denitrification. In: SUMMER, M.E. (Ed.). **Handbook of soil science**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. C181-C190.

ROS, M.; GOBERNA, M.; MORENO, J.L.; HERNANDEZ, T.; GARCÍA, C.; INSAM, H.; PASCUAL, J.A. Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, n. 2/3, p. 93-102, 2006.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F.M.; MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B.; SANTOS, J.C.F.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana do solo: fração mais ativa da matéria orgânica. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F.M.; SALTON, J.C. **Dinâmica da matéria orgânica do**

solo em sistemas conservacionista. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. cap 7. 163-198p.

ROPER, M.M.; OPHEL-KELLER, K.M. Soil microflora as bioindicators of soil health. In: PANKHURST, C.E.; DOUBE, B.M.; GUPTA V.V.S.R. (Ed.). **Biological Indicators of Soil Health**. Oxford: CAB International, 1997. chap. 7, p. 157–177.

RORUZICKA, J.; HANSEN, E.H. **Flow injection analysis**. New York: Wiley Interscience, 1981. 395p.

ROTTHAUWE, J.-H.; WITZEL, K.-P.; LIESACK, W. The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. **Applied and environmental microbiology**, Baltimore, v. 63, n. 12, p. 4704–4712, 1997.

RUIZ-LOZANO, J.M.; AZCÓN, R. Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 10, n. 3, p.137–143, 2000.

RUSAN, M.J.M.; HINNAWI, S.; ROUSAN, L. Long term effect of wastewater irrigation of forage crops on soil and plant quality parameters. **Desalination**, Amsterdam, v. 215, n. 1/3, p.143-152, 2007.

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**, Berlin, v. 15, n. 1, p.21-27, 1993.

SABATTI, J. A.; SOUZA JUNIOR, I. G.; COSTA, A. C. S.; TORMENA, C. A. Estimativa da acidez potencial pelo método do ph smp em solos da formação caiua - noroeste do Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, p.257-264, 2003.

SALGOT, M.; HUERTAS, E.; WEBER, S.; DOTT, W.; HOLLENDER, J. Wastewater reuse and risk: definition of key objectives. **Desalination**, Amsterdam, v. 187, n. 1, p. 29-40, 2006.

SANOMIYA, L.T; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações de compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 825-842, 2003.

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**, Dordrecht, v. 50, n. 1/3, p. 99-111, 1978.

SAS SYSTEM. SAS Institute Inc. Release 8.02. Cary: The SAS Institute Inc. 2002.

SCHIPPER, L.A.; WILLIAMSON, J.C.; KETTLES, H.A; SPEIR, T.W. Impact of land-applied tertiary-treated effluent on soil biochemical properties. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 25, Sep./Oct., p. 1073-1077, 1996.

SCHMIDT, C.S.; HULTMAN, K.A.; ROBINSON, D.; KILLHAM, K.; PROSSER, J.I. PCR profiling of ammonia-oxidizer communities in acidic soils subjected to nitrogen and sulphur deposition. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 305–316, 2007.

SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; LERMAN, L.S.; MYERS, R.M. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 1, p. 232–236, 1989.

SIEBE, C. Nutrient inputs to soils and their uptake by alfalfa through long-term irrigation with untreated sewage effluent in Mexico. **Soil Use and Management**, New York, v. 14, n. 2, p. 119–122, 1998.

SILVA, M.B.; KLIEMANN, H.J.; SILVEIRA, P.M.; LANNA, A.C. Atributos biológicos do solo sob influência da cobertura vegetal e do sistema de manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.12, p.1755-1761, 2007.

SILVEIRA, R.B.; MELLONI, R.; PEREIRA, E.G. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, no sul de Minas Gerais. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, Curitiba, v.2, n.2, p. 21-29, abr./jun. 2004.

SIMON, C.; DEFRIES, R.S. Uma Terra um Futuro, Mudanças Ambientais. São Paulo: Makron Books, 1992. 189p.

SMITH, E.S.; READ, J.D. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1997. 605p.

SPARLING, G.P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 30, n. 2, p. 195-207, 1992.

SPEIR, T.W. Soil biochemical properties as indices of performance and sustainability of effluent irrigation systems in New Zealand—a review. **Journal of The Royal Society of New Zealand**, Wellington, v. 32, n. 4, p 535–553, 2002.

SNOW, V.O.; SMITH, C.J.; POLGLASE, P.J.; PROBERT, M.E. Nitrogen dynamics in a eucalypt plantation irrigated with sewage effluent or bore water. **Australian Journal of Soil Research**, Wellington, v. 37, n. 3, p. 527-544, 1999.

STOCKING, M. Soil erosion and land degradation. 2nd Ed. In: **Environmental Science for Environmental Management**, Harlow: Pearson Education, 2000. chap. 11, p.288-321.

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

STEPHEN, J. R.; MCCAIG, A. E.; SMITH, Z.; PROSSER, J. I.; EMBLEY, T. M. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, n. 11, p. 4147–4154, 1996.

STEPHEN, J.R.; KOWALCHUK, G.A.; BRUNS, M. A.; MCCAIG, A. E.; PHILLIPS, C. J.; EMBLEY, T. M.; PROSSER, J. I. Analysis of beta-subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, n. 8, p. 2958–2965, 1998.

SU, J-J.; YEH, K-S.; TSENG, P-W. A Strain of *Pseudomonas* sp. Isolated from Piggery Wastewater Treatment Systems with Heterotrophic Nitrification Capability in Taiwan. **Current microbiology**, New York, v. 53, n. 1, p. 77–81, 2006.

SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. **Principles and applications of soil microbiology**. 2nd Ed. New Jersey: PERSON Prentice Hall, 2005. 640p.

TAM, N.F.Y. Effects of wastewater discharge on microbial populations and enzyme activities in mangrove soils. **Environmental Pollution**, London, v. 102, n. 2/3, p. 233-242, 1998.

ter BRAAK, C.J.F.; ŠMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to canoco for windows. Software for canonical community ordination (version 4)**. Ithaca: MicroComputer Power, 1998. 352p.

THIES, J.E. Molecular methods for studying soil ecology. In: PAUL, E.A. **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. chap. 4. p. 85-118.

TIEDJE, J. M. Denitrification. In: Page, A.L. (Ed.),. **Methods of soil analysis**, part 2. Madison: ASA-SSSA, 1982. p. 1011-1026.

TIEDJE, J.M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: ZEHNDER, A.J.B. **Biology of anaerobic microorganisms**. New York: Wiley, 1988. p. 179-244.

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

TOZE, S. Reuse of effluent water—benefits and risks. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 80, n. 1/3, p. 147–159, 2006.

TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M.C.; SEOANE, S.; GIL-SOTRES, F. Biochemical properties of soils under crop rotation. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.39, n. 2, p. 133-143, 2008.

VAN BRUGGEN, A.H.C.; SEMEOV, A.M. In search of biological indicators for soil heath and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 13-24, 2000.

Van den BRINK, P.J.; Ter BRAAK, C.J.F. Principal response curves: analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 18, n. 2, p. 138–148, 1999.

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

VIEIRA, R.F.; SILVA, C.M.M.S.; SILVEIRA, A.P.D. Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 300, n. 1/2, p. 95-103, 2007.

VON SPERLING, M. **Lagoas de estabilização**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 134p.

WALKER, C; LIN, H.S. Soil property changes after four decades of wastewater irrigation: A landscape perspective. **Catena**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 63-74, 2007.

WANG, Z.; CHANG, A.C.; WU, L.; CROWLEY, D. Assessing the soil quality of long-term reclaimed wastewater-irrigated cropland. **Geoderma**, Amsterdam, v.114, n. 3/4, p.261-278, 2003.

WARDLE, D.A.; GHANI, A. Why is the strength of relationships between pairs of methods for estimating soil microbial biomass often so variable? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 821-828, 1995.

WARDLE, D.A. Controls of temporal variability of soil microbial biomass: a global-scale synthesis. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 13, p. 1627-1637, 1997.

WARRINGTON, D.N.; GOLDSTEIN, D.; LEVY, G.J. Clay translocation within the soil profile as affected by intensive irrigation with treated wastewater. **Soil Science**, Baltimore, v. 172, n. 9, p. 692-700, 2007.

WERNER, J.C.; PAULINO, V.T.; CANTARELLA, H.; ANDRADE, N.O.; QUAGGIO, J.A. Forrageiras. In: RAIJ, B.van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo** 2.ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. p.263-273. (Boletim Técnico, 100).

WESTCOT, D.W. Quality control of wastewater for irrigated crop production. ., Rome:Food and Agriculture Organization, 1997. 97p.(Water Reports, n. 10)

WICHERN, J.; WICHERN, F.; JOERGENSEN, R.G. Impact of salinity on soil microbial communities and the decomposition of maize in acidic soils. **Geoderma**, Amsterdam, v. 137, n. 1/2, p. 100–108, 2006.

WHO. **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater: Wastewater use in agriculture**. Geneva, 2006. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241546824_eng.pdf. Acesso em: 20 maio 2008.

ZAK ,J.C.; WILLIG, M.R.; MOOREHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 111-129, 1999.

ZHANG, Y.L.; DAIB, J.L.; WANGA, R.Q.; ZHANG, J. Effects of long-term sewage irrigation on agricultural soil microbial structural and functional characterizations in Shandong, China. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 44, n. 1, p. 84-91, 2008.

ANEXOS

ANEXO A - Equações de regressão múltipla para as variáveis do solo de área de pastagem de capim Tifton 85 irrigada com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado por 18 meses, no município de Lins, SP (LA = lâmina acumulada; PA = precipitação acumulada).

Equações de regressão	R ²
Parâmetros químicos	
pH = $5,12 + 0,00034*LA + 0,00072*PA - 0,00000033*LA^2 - 0,00000041*PA^2$	0,581
Ca = $11,22 + 0,00201199*LA - 0,00016062*PA - 0,00000040*PA*LA$	0,543
Mg = $7,03 + 0,0014*LA - 0,00503*PA + 0,000001073*PA^2$	0,445
K = $2,69 - 0,000000383*LA^2 - 0,001010871*PA + 0,000000589*PA^2$	0,281
Na = $9,03 - 0,0072*PA + 0,0017*LA + 0,000001591*PA*LA + 0,000001362*PA^2 - 0,000001477*LA^2$	0,506
C:N = $12,13 + 0,00617*LA - 0,0000035*LA^2 + 0,0000248*LA*PA - 0,00000103*PA^2$	0,643
Parâmetros microbiológicos	
Cmic = $122,35 - 0,099*LA + 0,295*PA + 0,000102*LA*PA - 0,0001296*PA^2$	0,431
Grupos funcionais de microrganismos	
NIT-NH ₄ = $2,31 + 0,002*LA - 0,00001533*LA^2 + 0,000001358*LA*PA - 0,000000654*PA^2$	0,566
NIT-NO ₂ = $2,33 + 0,0019*LA - 0,000001598*LA^2 + 0,000001378*LA*PA - 0,000000654*PA^2$	0,533