

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE FUNCIONAL, GENÉTICA E ESTRUTURAL DE MICRO-
ORGANISMOS DO SOLO APÓS 13 ANOS DE APLICAÇÕES ANUAIS
DE LODO DE ESGOTO SOB CULTURA DE MILHO**

Amanda Aparecida de Oliveira Neves Viana
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Junho de 2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE FUNCIONAL, GENÉTICA E ESTRUTURAL DE MICRO-
ORGANISMOS DO SOLO APÓS 13 ANOS DE APLICAÇÕES ANUAIS
DE LODO DE ESGOTO SOB CULTURA DE MILHO**

Amanda Aparecida de Oliveira Neves Viana
Orientador: Prof. Dr. Wanderley José de Melo
Co-orientador: Pesq. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Ciência do Solo).

JABOTICABAL- SÃO PAULO - BRASIL
Junho de 2013

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

AMANDA APARECIDA DE OLIVEIRA NEVES VIANA – Filha de Armando Elvécio Avelar Neves e Shirley Regina de Oliveira Neves, natural de Sete Lagoas, MG, nascida no dia 15 de novembro de 1981. Casada com Luciano Viana Cota. Graduada em Agronomia pela Universidade de Alfenas (UNIFENAS) no ano de 2004 foi bolsista de iniciação científica durante o tempo de sua graduação. No período de junho de 2004 á fevereiro de 2005, foi bolsista do CNPq, categoria Apoio Técnico na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS). No ano de 2005 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras. Participou do projeto BiosBrasil, concluindo o mestrado em fevereiro de 2007. Em maio de 2007 iniciou como bolsista da FAPEMIG, categoria BAT II na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), na qual permaneceu até julho de 2009. Em agosto de 2009 iniciou o curso de Doutorado em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo, na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP, obtendo seu título em 14 de junho de 2013.

**“Cantarei para sempre as tuas misericórdias, ó Senhor; os meus lábios
proclamarão a todas as gerações a tua fidelidade.”**

Salmos: 89-1

A Deus, meu refúgio, baluarte e direcionador.

Ofereço

Ao amor da minha vida Luciano Viana Cota, meu marido, amigo, companheiro,
cúmplice e incentivador.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o meu refúgio e baluarte por sempre me permitir seguir em frente, mostrando-me o caminho e me direcionando para o cumprimento da sua vontade em minha vida. Obrigada Senhor pelo cumprimento das suas promessas em minha vida.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, em especial ao Programa de Pós-Graduação Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do curso.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Wanderley José de Melo pela orientação, apoio, ensinamentos, amizade e confiança durante o curso de doutorado.

Aos professores do Departamento de Ciência do Solo.

Ao Pesq. Dr. Ivanildo Evódio Marriel pela co-orientação, pelo direcionamento, apoio, amizade, confiança e consideração.

Ao Pesq. Dr. Francisco Adriano de Souza pelo aconselhamento, orientação e boa vontade.

Aos membros da banca examinadora, Pesq. Dr. Francisco Adriano de Souza, Prof. Dra. Dora Inés Kozusny-Andreani, Prof. Dr. João Antonio Galbiatti, Prof. Dr. Jorge de Lucas Júnior e Prof. Dr. Wanderley José de Melo.

A Prof. Dra. Eliana Gertrudes e sua orientada Elisângela pela disponibilização do programa Bionumerics e ajuda na análise dos dados moleculares.

Aos funcionários do Laboratório de Biogeoquímica Sueli A. S. Leite, Roberto A. Chelli, Rodrigo e Alex pela disponibilidade e ajuda na execução deste trabalho e aos funcionários da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção, que contribuíram na instalação do experimento de campo.

A Beatriz de Almeida Barros (Bia) pela ajuda, ensinamentos, disponibilidade e boa vontade na realização das análises moleculares.

Aos amigos da EMBRAPA Milho e Sorgo, laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo e NBA, Patrícia Gomes, Dra. Christiane, Dra. Simone, Dra. Dagma, Soraya, Bianca, Maycon, Daiane, Vitória, Crísia, Tábata, Melissa, Eveline,

Lucas, Gabriel, Marina, Paula, Célio e Sirlene, que estiveram presentes durante este tempo.

A Tatiana de Oliveira Ramos (Tati Ramos) e Anarlete Ursulino Alves, por toda amizade. Em especial á Tati Ramos o meu muito obrigada!

Aos amigos que fiz em Jaboticabal, Ivanir, Marcos, Mônica, Edson, Mariluci, Rafael, Paulo, Elisângela, Gustavo e aos pimpolhos, Sara, Ivan, Kauã e Camila.

Aos amigos da Igreja Pentecostal Desperta Débora/ SL pelas orações.

A Luciano Viana Cota por ser muito mais que meu marido, por ser meu amor, amigo, companheiro, apoiador, incentivador, cúmplice, meu alicerce, minha vida... Você é o melhor de mim! Obrigada pelo seu amor incondicional e abnegação.

Aos meus pais Armando e Shirley, meus irmãos Júnia e Philip e meu cunhado Bruno pelo apoio, carinho e presença. Vocês são essenciais em minha vida!

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.
Muito Obrigada!

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMO..... | iii |
| SUMMARY..... | v |
| CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 1 |
| 1 Introdução..... | 1 |
| 2 Resíduos Orgânicos..... | 3 |
| 3 Lodo de Esgoto..... | 4 |
| 3.1 Uso Agrícola do Lodo de Esgoto..... | 5 |
| 3.2 Efeito do Lodo de Esgoto na Comunidade Microbiana..... | 7 |
| 3.3 Indicadores Microbiológicos..... | 8 |
| 4 Referências..... | 11 |
| CAPÍTULO 2 BIOTA DO SOLO APÓS APLICAÇÃO DE LODO DE ESGOTO POR 13 ANOS CONSECUTIVOS..... | 18 |
| 1 Introdução..... | 22 |
| 2 Material e Métodos..... | 24 |
| 2.1 Caracterização das Áreas Experimentais..... | 24 |
| 2.2 Caracterização Química do Solo e Lodo de Esgoto..... | 25 |
| 2.3 Instalação e Condução dos Experimentos..... | 27 |
| 2.4 Análise Quantitativa da População Microbiana do Solo..... | 28 |
| 2.5 Diversidade Metabólica..... | 29 |
| 3 Resultados..... | 30 |
| 3.1 Análise Quantitativa da População Microbiana do Solo..... | 30 |
| 3.2 Diversidade Metabólica..... | 34 |
| 4 Discussão..... | 38 |
| 5 Conclusões..... | 43 |
| 6 Referências..... | 44 |
| CAPÍTULO 3. EFEITO DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LODO DE ESGOTO (LE) POR TREZE ANOS SOBRE A COMUNIDADE DE FUNGOS..... | 53 |
| 1 Introdução..... | 57 |
| 2 Material e Métodos..... | 60 |

| | |
|---|----|
| 2.1 Caracterização das Áreas Experimentais..... | 60 |
| 2.2 Caracterização Química do Solo e Lodo de Esgoto..... | 62 |
| 2.3 Instalação e Condução dos Experimentos..... | 64 |
| 2.4 Diversidade Genética da População de Fungos do Solo Através de Eletroforese em Gel de Gradiente (DGGE)..... | 65 |
| 2.4.1 Clonagem do Gene Ribossomal de Fungos Presentes no Solo..... | 67 |
| 2.4.2 Extração do DNA Plasmidial..... | 68 |
| 2.4.3 Seleção de Clones Via PCR-DGGE e Sequenciamento..... | 68 |
| 3 Resultados..... | 70 |
| 3.1 Diversidade Genética da População de Fungos do Solo Através de Eletroforese em Gel de Gradiente (DGGE)..... | 70 |
| 4 Discussão..... | 73 |
| 5 Conclusões..... | 78 |
| 6 Referências..... | 79 |

DIVERSIDADE FUNCIONAL, GENÉTICA E ESTRUTURAL DE MICRO-ORGANISMOS DO SOLO APÓS 13 ANOS DE APLICAÇÕES ANUAIS DE LODO DE ESGOTO SOB CULTURA DE MILHO

RESUMO - As estações de tratamento de esgoto geram milhões de toneladas de resíduos em diferentes municípios brasileiros. Dentre as possíveis formas de utilização do lodo de esgoto destaca-se a sua utilização agrícola. Este estudo objetivou avaliar o efeito da aplicação de lodo de esgoto (LE) na comunidade microbiana de solos tratados com este resíduo por 13 anos em condições brasileiras. Os experimentos de campo foram conduzidos em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (LVef) e em LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (LVd). Os tratamentos (doses de lodo de esgoto acumuladas ao longo dos 13 anos) foram: T₁= 0,0 t ha⁻¹ (adubação mineral); T₂= 65 t ha⁻¹; T₃= 160 t ha⁻¹ e T₄= 207,5 t ha⁻¹. As amostras de solo foram coletadas aos 65 dias após semeadura do milho. Foram quantificadas nas amostras de solo a população microbiana e sua diversidade metabólica. Métodos moleculares independentes de cultivo PCR-DGGE, clonagem e sequenciamento também foram utilizados. A aplicação de lodo de esgoto resultou em baixo efeito sobre as populações microbianas do solo (fungos, bactérias, actinomicetos) em LVef e LVd. As maiores densidades bacterianas foram observadas em LVef solo não rizosférico (SN), já as maiores densidades fúngicas foram em solo rizosférico (SR). Em LVd SN o tratamento com 20 t ha⁻¹ apresentou a maior densidade fúngica, enquanto as maiores densidades bacterianas foram observadas nos tratamentos com 0, 5 e 20 t ha⁻¹. O número de substratos utilizados em LVef foi maior em SR. Em LVd ocorreram diferenças em SR (10 e 20 t ha⁻¹) e SN (0, 5 e 10 t ha⁻¹). A soma da atividade de utilização dos substratos variou conforme o tempo de incubação, dose de LE aplicada e tipo de solo. Quanto aos valores de diversidade metabólica (índice de Shannon, H), número de substratos utilizados, equitabilidade (E), e atividade total da população microbiana foram detectadas diferenças apenas para alguns tratamentos. Alguns amplicons estavam presentes na maioria dos tratamentos. Com base nos perfis de DGGE grupos foram formados a partir de 47% de similaridade estendendo-se até a formação de 1 grupo com 100% de similaridade. Quanto aos valores de diversidade, riqueza e

equitabilidade, gerados de acordo com padrão de amplicons de cada amostra foram detectadas diferenças para as variáveis em LVd somente em SN. Não foi observada diferença em LVef para as variáveis analisadas. Adição de LE promove a diversidade funcional da população microbiana do solo em LVef e LVd. A utilização de lodo de esgoto não influenciou negativamente a comunidade fúngica nos solos estudados após 13 anos de aplicação. A técnica da PCR-DGGE foi eficiente na identificação da estrutura de comunidades fúngicas.

Palavras - chave: micro-organismos do solo, diversidade, bioindicadores, ecologia microbiana, DNA.

FUNCTIONAL DIVERSITY, GENETICS AND STRUCTURAL OF MICRO-ORGANISMS SOIL AFTER 13 YEARS OF ANNUAL APPLICATIONS OF SEWAGE SLUDGE TO MAIZE

SUMMARY - Sewage treatment plants generate millions of tons of sewage sludge in different municipalities. Among the possible ways of using sewage sludge highlights the agriculture. This study aimed to evaluate the effect of sewage sludge (SS) on the microbial community of a soil treated with this residue for 13 years under Brazilian conditions. Field experiments were conducted in two soils type, Eutruxox (LVef) and Typic Hapludox (LVd). Treatments (doses of sewage sludge accumulated over 13 years) were: T1 = 0.0 t ha⁻¹ (chemical fertilizer), T2 = 65 t ha⁻¹, T3 = 160 t ha⁻¹ and T4 = 207.5 t ha⁻¹ (dry basis). Soil samples were collected at 65 days after maize sowing. Soils samples were quantified for microbial populations and their metabolic diversity. Culture independent molecular methods PCR-DGGE, cloning and sequencing were also used. Sewage sludge caused little effect on soil microbial populations (fungi, bacteria, actinomycetes) in the two soils. The highest bacterial densities were observed in LVef non-rhizosphere soil (NRS) and the greatest fungal densities was observed in rhizosphere soil (RS)). In LVd the treatment that received 207.5 t ha⁻¹ sewage sludge showed the highest fungal density in NRS, while the highest bacterial densities was observed in the treatments that receive 0, 5 and 20 t ha⁻¹. The number of substrates used by microorganisms in LVef was higher in RS. In LVd differences occurred in SR (10 e 20 t ha⁻¹) and SN (0, 5 e 10 t ha⁻¹). The sum of substrate usage activity varied according to the incubation time, dose of SS and soil type. Only some treatments differed in relation to metabolic diversity (Shannon index, H), number of used substrates, evenness (E), and total activity of the microbial population. Some amplicons were present in most treatments. The visualization of amplicons in different positions in DGGE profiles is indicative of new OTUs (operational taxonomic units) and groups were formed with 47% of similarity or even 100% of similarity in one group. Differences in relation to of diversity, richness and evenness according to the standard amplicons generated for each sample were found only in LVd for NRS samples while no differences were observed in LVef. The addition of SS promoted the functional diversity of soil microbial population in LVef

and LVd but did not affect the fungal community after 13 years of annual application of the residue. The PCR-DGGE analysis was effective in identifying the structure of fungal communities.

Keywords: soil microorganisms, diversity, bioindicators, microbial ecology, DNA.

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A utilização de Lodo de esgoto (LE) proveniente de Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) em solos agrícolas e/ou florestais vem aumentando consideravelmente nos últimos tempos, tanto como uma forma de disposição destes materiais, como uma maneira de se reciclar uma importante fonte de nutrientes, principalmente N e P. Desta forma, o lodo de esgoto (biossólido) vem sendo usado em uma grande variedade de culturas, como o milho, o trigo, a cana-de-açúcar e o arroz, dando bons resultados na produtividade quando comparados com os fertilizantes minerais.

Os micro-organismos do solo são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Eles são responsáveis pela ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica, auxiliam as plantas na solubilização e absorção de nutrientes, são responsáveis pela fixação biológica de nutrientes (N), entre outras funções. O lodo de esgoto é uma fonte importante de nutrientes para os micro-organismos do solo. No entanto, o lodo de esgoto pode conter metais pesados passíveis de ocasionar a contaminação do solo. Alguns metais, apesar de micronutrientes essenciais para plantas e micro-organismos, podem ser tóxicos em altas concentrações. Sendo assim, é necessário avaliar o efeito da adição de lodo de esgoto e possíveis metais pesados na comunidade microbiana do solo.

Efeitos adversos de metais pesados nos micro-organismos do solo podem alterar a qualidade do solo, principalmente no que se refere à ciclagem de nutrientes. Estudos recentes reportam sobre os efeitos da aplicação de lodo de esgoto (biossólidos) nas atividades microbianas básicas, principalmente sobre a mineralização de C e N. Os resultados gerados são, normalmente, contraditórios ou até mesmo discrepantes, em virtude de condições ambientais e tipo de solo. O que

indica a necessidade de realização de novos estudos principalmente com solos em condições tropicais como as brasileiras.

A contaminação do solo por metais ocasiona uma alteração na comunidade microbiana, selecionando organismos tolerantes. Algumas espécies podem ser eliminadas, enquanto outras aumentam em abundância. Esta substituição de espécies nem sempre reflete alterações nas funções bioquímicas ou biomassa microbiana do solo. Assim, torna-se necessário estabelecer indicadores confiáveis que sejam sensíveis a estresses ambientais. Os indicadores microbiológicos regulam os processos ecológicos do solo e refletem as condições de manejo atuais. Desta maneira, são úteis para determinação dos efeitos positivos ou negativos sobre a qualidade do solo e a sustentabilidade das práticas agrícolas.

O impacto da aplicação de lodo de esgoto em solos agrícolas pode ser melhor compreendido, também, com a determinação de alterações na diversidade metabólica dos micro-organismos. Poucos são os dados sobre alterações da diversidade metabólica dos micro-organismos dos solos brasileiros, mas, aliados a outras variáveis, podem ser úteis para avaliar o impacto causado pela utilização agrícola de lodos de esgoto de ETEs. Tanto análises de tamanho e atividade, quanto de estrutura das comunidades microbianas, podem trazer grande contribuição para a geração de índices de qualidade biológica de solos, que podem ser utilizados para o monitoramento da aplicação agrícola de bio sólidos.

No presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de bio sólidos na comunidade microbiana de solos tratados com lodo de esgoto em um período de 13 anos em condições brasileiras, buscando informações para o estabelecimento da legislação para a regulamentação do uso deste resíduo na agricultura, obtendo-se informações importantes sobre os processos ecológicos e a sustentabilidade deste sistema.

2. RESÍDUOS ORGÂNICOS

Resíduo orgânico é todo produto proveniente de origem vegetal, animal, urbano ou industrial que apresente elevados teores de componentes orgânicos. Os resíduos orgânicos são constituídos por três principais grupos de componentes, água, matéria orgânica e matéria mineral, também denominada matéria inorgânica (KIEHL, 1985). A incorporação de resíduos orgânicos ao solo pode trazer benefícios à planta pela melhoria das propriedades químicas e físicas do solo pelo fornecimento de nutrientes, aumento da capacidade de troca de cátions e aumento do poder tampão do solo (COSTA, 1994). Dentre os resíduos orgânicos adicionados ao solo como fonte de nutrientes para as plantas, destaca-se a vinhaça, resíduos de curtume, resíduos petroquímicos, lodos de estações de tratamentos de efluentes, compostos de lixo urbano, esterco de animais, farinha e tortas de origem vegetal (MEURER, 2000). A decomposição dos resíduos orgânicos libera C orgânico e elementos essenciais como N, P, Ca, Mg, entre outros. A utilização de resíduos orgânicos provenientes de estações de tratamentos de efluentes e compostos de lixo urbano aumenta a população microbiana e taxa de mineralização de N no solo (TIAN ET AL., 2008). Porém, um fator agravante diz respeito ao seu descarte, que muitas vezes é feito diretamente nos cursos d'água e no solo, sem o mínimo cuidado. Tal situação tem sido motivo de preocupação, tendo em vista a incapacidade do meio em absorvê-los. Por esse motivo, é crescente o interesse na utilização do solo como meio alternativo para auxiliar no controle da poluição ambiental causada pelo descarte inadequado. Essa prática é viável devido à capacidade dos micro-organismos juntamente com os coloides do solo em decompor compostos e resíduos orgânicos e inativar diversos íons e compostos orgânicos do solo por adsorção, complexação ou precipitação (MEURER, 2000).

3. LODO DE ESGOTO

O lodo proveniente das estações de tratamento de esgoto quando processado de modo a permitir seu uso agrícola de forma segura e adequada passa a se chamar biossólido (TSUTIYA, 2000). A composição química do lodo de esgoto é bastante variável, pois depende de muitos fatores, entre os quais a sua origem, o local e a época do ano de sua coleta, além do tipo de tratamento ao qual foi submetido (MELO & MARQUES, 2000).

Os biossólidos contêm matéria orgânica, macro e micronutrientes que exercem um papel fundamental na manutenção da fertilidade do solo também provocando impacto direto no desenvolvimento e rendimento das plantas, sendo geralmente sua aplicação altamente benéfica. Além disso, a elevada quantidade de matéria orgânica contida no biossólido pode aumentar o conteúdo de húmus que melhora a capacidade de armazenamento e de infiltração da água no solo, aumentando a resistência dos agregados e reduzindo a erosão, facilitando a penetração das raízes e a vida microbiana. A matéria orgânica fornece nutrientes para a planta e para os organismos do solo e atua como condicionador do solo, melhorando suas características físicas, químicas e biológicas que em geral afeta positivamente o desenvolvimento das plantas. A presença destes elementos nos lodos depende do esgoto que lhe deu origem e do processo de tratamento de esgoto e do lodo (MELFI & MONTES, 2001; TSUTIYA, 2001).

A utilização agrícola de biossólidos é uma tecnologia aceitável, tanto como disposição de resíduos como de enriquecimento do solo. A aplicação de biossólidos no solo geralmente promove um aumento na fertilidade, devido à mineralização da matéria orgânica, estimula a atividade microbiana e ainda ocasiona uma melhoria nas características físicas ao reduzir a densidade, aumentar a porosidade e estabilizar os agregados (BETTIOL & CAMARGO, 2001).

A definição de critérios seguros para a implementação da aplicação de bio sólidos no solo, se refere principalmente à lixiviação de nitrato (BUCHANAM & GLISSMAN, 1991) e a mobilidade dos metais pesados. Os metais pesados contidos nos bio sólidos podem alcançar níveis tóxicos no solo e ser transferidos para a cadeia trófica. No solo, reações de adsorção, complexação, oxidação-redução e precipitação controlam a disponibilidade e solubilidade dos metais. A disponibilidade destes elementos, na forma catiônica, depende do pH do solo. Os bio sólidos são uma das maiores fontes de metais em solos agrícolas. Apesar de essenciais para as atividades microbianas, em concentrações excessivas podem causar toxicidade, inibindo atividades enzimáticas essenciais, e alterar a estrutura das comunidades microbianas (TORSVIK ET AL., 1998; LEITA ET AL., 2004; VAL MORAES ET AL., 2011; BORJESSON ET AL., 2012).

3.1 USO AGRÍCOLA DO LODO DE ESGOTO

Os solos brasileiros são na sua maioria ácidos e distróficos, apresentam baixos níveis de matéria orgânica do solo (MOS), que tendem a diminuir mais ainda em função da intensiva exploração agrícola. Logo, a recuperação da fertilidade dos solos tropicais está intrinsecamente associada à elevação dos teores da MOS. Nesse sentido, novas práticas de manejo agrícola que visam aumentar os teores de MOS têm sido difundidas, contribuindo para a melhoria dos atributos físicos, químicos e biológicos de solos e dos agroecossistemas a eles associados. Características químicas e biodegradabilidade da matéria orgânica (MO) lábil, principalmente derivada da biomassa microbiana e de produtos da biodegradação de resíduos orgânicos são bons indicadores da qualidade do solo (MACDONALD ET AL., 2007).

O uso agrícola de lodos de esgoto como bio sólidos reduziu em cerca de 25% o custo relacionado ao destino final desse material, em relação a disposição em

aterros sanitários (TAVARES, 2003). A disposição em aterros sanitários ou exclusivos, bem como a incineração, requer tecnologias sofisticadas e podem apresentar alto custo por tonelada tratada (GONÇALVES & LUDUVICE, 2000). Além de representar benefício econômico, o uso agrícola de biossólidos representa benefício ecológico, pelo retorno ao campo de parte da MO, nutrientes e energia, exportados para os centros urbanos (POGGIANI ET AL., 2000), e benefício social pela possibilidade de aumento da produtividade das culturas e menor impacto negativo sobre o meio, esta última em comparação às outras opções de descarte do resíduo. Em solos tropicais muito intemperizados, onde a capacidade de troca catiônica (CTC) é extremamente dependente da MO, o uso agrícola de biossólidos é ainda mais atrativo (MELO ET AL., 1994).

Em áreas agrícolas, a utilização de lodo de esgoto tem sido amplamente recomendada, tanto como fonte de nutrientes quanto como condicionador de solos, proporcionando aumento nos teores de MOS, CTC, pH, aumento na capacidade de retenção de água e estabilidade de agregados do solo e incremento na produção de grãos de milho (PAUL & CLARCK, 1996; KHAN & SCULLION, 2000; DIAS ET AL., 2007; MELO ET AL., 2007; BORJESSON ET AL., 2012; YANG ET AL., 2012;). O LE apresenta em sua composição diversos poluentes, como metais pesados e organismos patogênicos ao homem (BETTIOL & CAMARGO, 2001). No entanto, a disponibilidade de metais pesados no solo e seu efeito sobre a microbiota, dependem tanto da quantidade quanto da qualidade da matéria orgânica adicionada (BANERJEE ET AL., 1997). Em estudos realizados em solos brasileiros, a aplicação de LE não afetou o teor de Ni no solo, mas houve acúmulo de Ni em folhas e colmos e não nos grãos (NOGUEIRA ET AL., 2009).

A MO do lodo e a do solo podem atuar na complexação de metais, reduzindo a sua disponibilidade em curto prazo e, conseqüentemente, a sua toxicidade (LO ET AL., 1992). A ausência de efeitos prejudiciais da aplicação de lodo contendo metais pesados, em curto prazo, não é garantia de que efeitos prejudiciais sobre as

atividades e comunidades microbianas não venham a ocorrer posteriormente (WITTER ET AL., 1994; BUENO ET AL., 2011; GE E ZHANG, 2011; PAN E YU, 2011; FRANCO-OTERO, 2012).

Assim, a utilização de LE em solos agrícolas deve ser continuamente monitorada e planejada adequadamente. Isso se torna ainda mais premente nas áreas que recebem por longo tempo aplicações elevadas de lodo, em razão de esse resíduo conter moléculas orgânicas de grande persistência no ambiente, que podem ser prejudiciais aos micro-organismos do solo. A utilização de altas doses de biossólidos pode aumentar o potencial de impacto ambiental, devido à presença de espécies químicas tóxicas, implicando em modificações na diversidade biológica do solo e alterações de sua funcionalidade (WITTER ET AL., 1994; KHALIL ET AL., 2011). A diminuição da diversidade microbiana no solo pode, resultar em diminuição da ciclagem de nutrientes e crescimento de plantas, muito embora a maioria das atividades microbianas apresente alto grau de redundância funcional.

3.2 EFEITO DO LODO DE ESGOTO NA COMUNIDADE MICROBIANA

O lodo de esgoto, quando aplicado ao solo, causa alterações na estrutura e no funcionamento do agroecossistema, sendo a comunidade microbiana um dos componentes mais sensíveis, podendo ser utilizada como indicador da qualidade dos solos (DICK, 1994; GILLER ET AL., 1998; KHALIL ET AL., 2011). A aplicação de LE pode tanto estimular, devido ao aumento de carbono e nutrientes disponíveis, como inibir, devido à presença de metais pesados e outros poluentes, a atividade microbiana do solo (BAATH, 1989; GILLER ET AL., 2009; VAL MORAES ET AL., 2011). Assim a aplicação de LE contendo Zn afetou negativamente a população de rizóbio indígena de trevo branco (CHAUDRI ET AL., 2008). O comportamento da população microbiana depende da qualidade e da quantidade dos resíduos que estão sendo adicionados ao solo. Em alguns trabalhos a aplicação de LE aumentou

a atividade microbiana no solo (FERNANDES ET AL., 2005; MELO ET AL., 2007; ANTONIOUS, 2009; KIZILKAYA, 2009; BORJESSON ET AL., 2012; YANG ET AL., 2012). Dessa forma, é indispensável em estudos sobre o uso agrícola do lodo de esgoto o conhecimento sobre as alterações nas comunidades e nas atividades microbianas do solo, uma vez que os micro-organismos têm vital importância e assumem diversas funções, como por exemplo, a de biorremediadores, na degradação de agentes poluidores.

3.3 INDICADORES MICROBIOLÓGICOS

As espécies da comunidade microbiana do solo respondem de modo distinto a eventos como a adição de matéria orgânica, revolvimento, cobertura do solo com palhada, compactação e aplicação de insumos, que estressam ou estimulam os microrganismos. Sendo assim a capacidade produtiva de um solo não depende unicamente de suas características físico-químicas, mas também da interação entre diversos fatores no sistema solo-planta-microbiota. O acompanhamento da qualidade do solo por meio de índices biológicos é de extrema ajuda para a gestão e sustentabilidade de solos que receberam a aplicação de lodo de esgoto (FERNANDES ET AL., 2005; GILLER ET AL., 2009).

Os micro-organismos estão diretamente envolvidos nos ciclos dos nutrientes no solo e a quantificação de grupos importantes dá a indicação de como os processos estão ocorrendo (MOREIRA ET AL., 2010). Tem sido considerado um fator importante na sustentabilidade de ecossistemas a diversidade microbiana do solo. Tal diversidade pode ser definida como a variabilidade entre organismos vivos e geralmente é atribuída à diversidade de espécies; no entanto pode ser medida em vários níveis taxonômicos (família, gênero, intraespécies, etc.) ou ainda, em termos de características funcionais, metabólicas e genéticas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O funcionamento do ecossistema solo é largamente governado pela dinâmica da microbiota. O componente biológico é responsável pela formação do húmus, ciclagem de nutrientes, estrutura física e por muitas outras funções (LYNCH & BRAGG, 1985). A microbiota tem uma função essencial na decomposição da matéria orgânica. Reduções na sua diversidade ou abundância podem afetar a ciclagem de nutrientes (GILLER ET AL., 1998; MOREIRA ET AL., 2010).

Os processos de mineralização do C e N-orgânico apresentam alto grau de redundância, isto é, diferentes populações de microrganismos podem, em diferentes condições ambientais, realizar esses processos. Assim a diminuição da atividade de uma população de microrganismos por alteração das condições ambientais poderá ser compensada pelo aumento da atividade de outra população, sem alteração significativa da atividade total da comunidade. Atividades apresentando alto grau de redundância dificilmente se correlacionam com alterações da qualidade do solo, embora esses parâmetros sejam úteis na determinação das taxas de degradação de materiais orgânicos no solo, como biossólidos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Reduções da diversidade metabólica de comunidades microbianas do solo têm sido frequentemente observadas após a adição de biossólidos de estações de tratamento de esgotos (ETEs) contaminados com metais pesados (BANERJEE ET AL., 1997; BUENO ET AL., 2011; GE & ZHANG, 2011; PAU E YU, 2011).

A diversidade funcional microbiana compreende números, tipos, atividades e taxa de micro-organismos, que metabolizam diferentes fontes de carbono, constituindo-se num *fingerprint* característico das comunidades microbianas presentes no ambiente (GARLAND & MILLS, 1991).

Métodos moleculares têm sido empregados com sucesso na obtenção de dados sobre diversidade da microbiota do solo, dentre eles temos a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) (MUYZER & SMALLA, 1998). Esta técnica permite identificar polimorfismo nos fragmentos de DNA obtidos a partir de amostras de DNA da microbiota do solo amplificadas pela reação de PCR (Reação de

Polimerização em Cadeia) (MUYZER ET AL., 1993). Moléculas de DNA que se diferem em apenas uma única base podem ser separados em bandas distintas no gel de poliacrilamida. Diferentemente dos géis de agarose que separam as bandas de acordo com os tamanhos dos fragmentos, o DGGE separa pela diferença na sequência do DNA genômico (MUYZER ET AL., 1993).

Devido a habilidade em identificar polimorfismo no rDNA de amostras de DNA amplificadas via PCR com primers específicos, a técnica DGGE vem sendo utilizada nos estudos de diversidade genética entre diferentes comunidades de solo sob variadas condições. Efeito da adição de LE, incluindo lodos ricos em cádmio, cobre e zinco foram observados na composição da comunidade de fungos do solo usando-se rDNA e rRNA em perfil de DGGE (ANDERSON, 2008). A adição do LE alterou os padrões de bandeamento em DGGE, no entanto não houve efeito adicional de aumento de concentrações de metais pesados no solo. Solos com adição de metais pesados podem ser caracterizados por uma comunidade diferente em riqueza e estrutura de populações de micro-organismos dominantes de um solo por meio da técnica PCR-DGGE (KOZDRKOJ & ELSAS, 2001).

A caracterização da estrutura e função da microbiota de um solo tratado com LE pode contribuir gerando informações importantes sobre os processos ecológicos e a sustentabilidade deste sistema.

4 REFERÊNCIAS

ANDERSON, I. C.; PARKIN, P. I.; CAMPBELL, C. D. **DNA- and RNA-derived assessments of fungal community composition in soil amended with sewage sludge rich in cadmium, copper and zinc.** Soil Biology & Biochemistry. V. 40, p. 2358–2365, 2008.

ANTONIOUS, G. F. **Enzyme activities and heavy metals concentration in soil amended with sewage sludge.** Journal of Environmental Science and Health Part A. V. 44, p. 1019–1024, 2009.

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

BANERJEE, M.R.; BURTON, D.L.; DEPOE, S. **Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics.** Agriculture, Ecosystems and Environment, Amsterdam, v.66, n.3, p.241-249, Dec. 1997.

BETTIOL, W. & CAMARGO, O.A. **Reciclagem de lodo de esgoto na agricultura.** In: MELO, I.S.; SILVA, C.; SCRAMIN, S. & SPESSOTO, A., eds. Biodegradação. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2001. p.93-113.

BÖRJESSON, G.; MENICHETTI, L.; KIRCHMANN, H. & KÄTTERE, T. **Soil microbial community structure affected by 53 years of nitrogen fertilisation and different organic amendments.** Biol. Fert. Soils., 48:245–257, 2012.

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

BUENO, J.R.P.; BERTON, R.S.; SILVEIRA, A.P.D.; CHIBA, M.K.; ANDRADE, C.A. & DE MARIA, I.C. **Chemical and microbiological attributes of an oxisol treated with successive applications of sewage sludge.** R. Bras. Ci. Solo, 35:1461-1470, 2011.

CHAUDRI, A.; GRATH, E. M.; GIBBS, P.; CHAMBERS, B.; CARLTON-SMITH, C.; BACON, J.; CAMPBELL, C.; AITKEN, M. **Population size of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: Effects of zinc, copper and cadmium.** Soil Biology & Biochemistry, V. 40, p. 1670–1680, 2008.

COSTA, M.B.B. **Adubação Orgânica: nova síntese e novo caminho para a agricultura.** São Paulo: Ícone, 1994.

DIAS, B.O.; SILVA, C.A.; SOARES, E.M.B.; BETTIOL, W. **Estoque de carbono e quantificação de substância húmicas em latossolo submetido à aplicação contínua de lodo de esgoto.** R. Bras. Ci. Solo, 31:701-711, 2007.

DICK, R.P. **Soil enzyme assays as indicators of soil quality.** In: DORAN, J.W.L.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Ed.). Defining soil quality for a sustainable environment. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124. (Soil Science Society of America Special Publication, 35).

FERNANDES, S. A. P.; BETTIOL, W.; CERRI, C. C. **Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity.** Applied Soil Ecology, V. 30, p.65–77, 2005.

FRANCO-OTERO, V.G.; SOLER-ROVIRA, P.; HERNÁNDEZ, D.; LÓPEZ-DE-SÁ, E.G. & PLAZA, C. **Short-term effects of organic municipal wastes on wheat yield, microbial biomass, microbial activity, and chemical properties of soil.** *Biol. Fert. Soils*, 48:205–216, 2012.

GARLAND, J.; MILLS, A. **Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization.** *Appl. Environ. Microbiol.* 57, pp. 2351–2359, 1991.

GE, C.R. & ZHANG, Q.C. **Microbial Community Structure and Enzyme Activities in a Sequence of Copper-Polluted Soils.** *Pedosphere*, 21:164–169, 2011.

GILLER, K.E.; WITTER, E.; McGRATH, S.P. **Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, p. 1389-1414, 1998.

GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. **Heavy metals and soil microbes.** *Soil Biology & Biochemistry*, V. 41, p. 2031–2037, 2009.

GONÇALVES, J.L.M.; STAPE, J.L.; BENEDETTI, V.; FESSEL, V.A.G.; GAVA, J.L. **Reflexos do cultivo mínimo e intensidade do solo em sua fertilidade e na nutrição das árvores.** In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. (Ed.). *Nutrição e fertilização florestal*. Piracicaba: IPEF, 2000. cap.1, p.1-57.

KHALIL, A. I.; HASSOUNA, M. S.; EL-ASHQAR, H. M. A. & FAWZI, M. **Changes in physical, chemical and microbial parameters during the composting of municipal sewage sludge.** *World J. Microb. Biot.*, 27:2359–2369, 2011.

KHAN, M.; SCULLION, J. **Effect of soil on microbial responses to metal contamination.** Environmental Pollution, v.110, n.1, p.115-125, 2000.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos.** Piracicaba: Ceres, 1985.

KIZILKAYA , R.; BAYRAKLI, B. **Effects of N-enriched sewage sludge on soil enzyme activities.** Applied Soil Ecology, V. 30, p. 192–202, 2009.

KOZDRKOJ, J.; VAN ELSAS, J. D. **Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling.** Applied Soil Ecology, V. 17, p. 31–42, 2001.

LEITA, L.; DENOBILI, M.; MUHLBACHOVA, G.; MONDINI, C.; MARCHIOL, L.; LI, O., ALLEN, H.L., WOLLUM, A.G. **Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control** Soil Biol. Biochem., V. 36, Issue 4, April 2004, Pages 571-579.

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

LYNCH, J.M.; BRAGG, E. **Microrganism and soil aggregate stability.** Advances in Soil Science, v.2, p. 133-171, 1985.

MACDONALD, C.A.; SINGH, B.K.; PECK, J.A.; VAN SCHAİK, A.P.; HUNTER, L.C.; HORSWELL, J.; CAMPBELL, C.D.; SPEIR, T.W. **Long-term exposure to Zn-spiked sewage sludge alters soil community structure.** Soil Biology & Biochemistry, V. 39, p. 2576–2586, 2007.

MELFI, A.J.; MONTES, C.R. **Impacto dos biossólidos sobre o solo.** In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P.C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. (Ed.). Biossólidos na agricultura. São Paulo: SABESP, 2001. cap.9, p.243-272.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O. **Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas.** In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. (Ed.). Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna: EMBRAPACNPMA, 2000. p.109-141.

MELO, V. P.; BEUTLER, A. N.; SOUZA, Z. M.; CENTURION, J. F. & MELO, W. J. **Atributos físicos de Latossolos adubados durante cinco anos com biossólido.** Pesq. Agropecu. Bras., 39:67-72, 2004.

MELO, W. J.; AGUIAR, P. S.; MELO, G. M. P.; MELO, V. P. **Nickel in a tropical soil treated with sewage sludge and cropped with maize in a long-term field study.** Soil Biology & Biochemistry, V. 39, p. 1341–1347, 2007.

MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo.** Porto Alegre: Gênese, 2000.

MOREIRA, F.M.S.; HUISING, E.J.; BIGNELL, D.E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade.** Lavras: Ufla, 2010.

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

MUYZER G, SMALLA K. **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.73, p.127–141, 1998.

MUYZER, G., DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. **Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.** *Appl Environ Microbiol.* v. 59, p. 695-700, 1993.

NOGUEIRA, T. A. R.; MELO, W. J.; OLIVEIRA, L. R.; FONSECA, I. M.; MELO, G. M. P.; MARCUSSI, S. A.; MARQUES, M. O. **Nickel in soil and maize plants grown on an oxisol treated over a long time with sewage sludge.** *Chemical Speciation and Bioavailability.* v, 21, p. 165-173, 2009.

PAN, J. & YU, L. **Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure.** *Ecological Engineering* 37 (2011) 1889– 1894.

PAUL E.A.; CLARCK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry.** San Diego: Academy, 1996. 436p.

POGGIANI, F.; GUEDES, M.C.; BENEDETTI, V. **Aplicabilidade do biossólido em plantações florestais: 1-Reflexos no ciclo de nutrientes.** In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. (Ed.). *Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto.* Jaguariúna: Embrapa, 2000. p.163-178.

TAVARES, D. **Lodo que vira adubo.** *Globo Rural*, n.210, p.58-61, 2003.

TIAN, G.; GRANATO, T.C.; DINELLI, F.D.; COX, A. E. **Effectiveness of biosolids in enhancing soil microbial populations and N mineralization in golf course putting greens.** Applied Soil Ecology, V. 40, p. 381 – 386, 2008.

TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A; OVEREAS, L. **Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments.** Journal of Biotechnology, v. 64, p. 53-62, 1998.

TSUTIYA, M. T. **Alternativas de disposição final de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgotos.** In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna: Embrapa, 2000.

VAL-MORAES, S.P.; MARCONDES, J.; ALVES, L.M.C. & LEMOS, E.G.M. **Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis.** World J. Microb. Biot., 27:1997–2003, 2011.

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

YANG, Y.; WANG, X.; SHI, J. & LI, J. **The influence of the discharging sewage on microbial diversity in sludge from Dongting Lake.** World J Microb. Biot., 28:421–430, 2012.

CAPÍTULO 2. BIOTA DO SOLO APÓS APLICAÇÃO DE LODO DE ESGOTO POR 13 ANOS CONSECUTIVOS

RESUMO - As estações de tratamento de esgoto geram milhões de toneladas de resíduos em diferentes municípios brasileiros. Um dos grandes desafios é a utilização do resíduo gerado de forma que seja econômica e não cause prejuízos ao meio ambiente. Dentre as possíveis formas de utilização do lodo de esgoto destaca-se a sua utilização agrícola como substituto de fertilizantes químicos. Objetivou-se neste trabalho avaliar a diversidade estrutural e funcional de micro-organismos do solo no 13º ano de cultivo de milho em área tratada com lodo de esgoto. Os experimentos de campo foram conduzidos em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico e em LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico. Os tratamentos (doses de lodo de esgoto acumuladas ao longo dos 13 anos) foram: $T_1 = 0,0 \text{ t ha}^{-1}$ (adubação mineral); $T_2 = 65 \text{ t ha}^{-1}$; $T_3 = 160 \text{ t ha}^{-1}$ e $T_4 = 207,5 \text{ t ha}^{-1}$. As amostras de solo foram coletadas aos 65 dias após a semeadura do milho. Foram quantificadas nas amostras de solo a população microbiana e sua diversidade metabólica. A aplicação de lodo de esgoto resultou em baixo efeito sobre as populações microbianas do solo (fungos, bactérias, actinomicetos) em LVef e LVd. Foram encontradas diferenças apenas para as comunidades fungicas e bacterianas. Em LVef as maiores densidades bacterianas foram em SN (solo não rizosferico nas doses 5, 10 e 20 t ha^{-1}), já as maiores densidades fungicas foram encontradas em SR (solo rizosferico 0, 5 e 20 t ha^{-1}). Em LVd solo SN o tratamento que recebeu a dose de 20 t ha^{-1} apresentou a maior densidade fungica, enquanto as maiores densidades bacterianas foram observadas nos tratamentos que receberam 0,5 e 20 t ha^{-1} . Quanto ao efeito SN ou SR na população microbiana não se detectou efeito significativo. O número de substratos utilizados em LVef foi maior em solo rizosferico com 20 t ha^{-1} . Já em LVd ocorreram diferenças em solo rizosferico (0, 5 e 10 t ha^{-1}) e não rizosferico (10 e 20 t ha^{-1}). A soma da atividade de utilização dos substratos

variou conforme o tempo de incubação, dose de LE aplicada e tipo de solo amostrado. Não houve diferenças em LVef, SN. Diferenças foram observadas em LVef nos tratamentos que receberam a dose de 20 t ha⁻¹ em SR. Para soma da atividade de utilização dos substratos em LVd, a maior atividade em SN foi observada nos tratamentos que receberam a dose de 10 t ha⁻¹. O SR apresentou menores diferenças entre os tratamentos em comparação ao SN. Quanto aos valores de diversidade metabólica (índice de Shannon, H), número de substratos utilizados, equitabilidade (E), e atividade total da população microbiana de amostras de solo quantificada após 72h de incubação foram detectadas diferenças significativas apenas para alguns tratamentos. Adição de LE promove a diversidade funcional da população microbiana do solo em LVef (SR 20 t ha⁻¹) e LVd (SR 0, 5 e 10 t ha⁻¹ e SN 10 e 20 t ha⁻¹).

Palavras chave: micro-organismos do solo, diversidade, qualidade do solo, *Zea mays*.

BIOTA SOIL AFTER APPLICATION OF SEWAGE SLUDGE IN 13 YEARS CONSECUTIVE

SUMMARY - Sewage treatment plants generate millions of tons of sewage sludge in different municipalities. A major challenge is the use that residues so that it does not cause economic and environmental damage. Among the possible ways of using sewage sludge highlights the agriculture. This study aimed to evaluate the effect of sewage sludge on the microbial structural and functional diversity of a soil treated with this residue for 13 years under Brazilian conditions. Field experiments were conducted in two soils type, Eutruxox (LVef) and Typic Hapludox (LVd). Treatments (doses of sewage sludge accumulated over 13 years) were: T1 = 0.0 t ha⁻¹ (chemical fertilizer), T2 = 65 t ha⁻¹, T3 = 160 t ha⁻¹ and T4 = 207.5 t ha⁻¹. Soil samples were collected at 65 days after maize sowing. Soils samples were quantified for microbial populations and their metabolic diversity. Sewage sludge caused little effect on soil microbial populations (fungi, bacteria, actinomycetes) in the two soils. Differences were found only for fungal and bacterial communities. In LVef the bacterial densities were higher in NRS (non rhizosphere soil in doses 5, 10 and 20 t ha⁻¹), since the highest densities were found in fungal RS (rhizosphere soil 0, 5 and 20 t ha⁻¹). In NRS LVd soil treatment that received the dose of 20 t ha⁻¹ showed the highest fungal density, while the highest bacterial densities was observed in treatments with 0, 5 and 20 t ha⁻¹. The number of substrates used in LVef was highest in RS soil with 20 t ha⁻¹. Already in LVd differences occurred in the RS (0, 5 and 10 t ha⁻¹) and NRS (10 and 20 t ha⁻¹). The sum of substrates usage activity varied according to the incubation time, dose of SS and soil types. In NRS there was no differences in LVef soil. In RS differences were observed in the treatments that received a dose of 20 t ha⁻¹. Total activity of the microbial was highest NRS on treatments that received the dose of 10 t ha⁻¹ on LVd soil. The RS showed little differences between treatments in comparison to the NRS. The values of metabolic

diversity (Shannon index, H), number of substrates, evenness (E), and total activity of the microbial population of soil samples quantified after 72h incubation significant differences were detected only for some treatments. Adding SS promotes functional diversity of soil microbial population in LVef (SR 20 t ha⁻¹) and LVd (NRS 0, 5 and 10 t ha⁻¹ and NRS 10 e 20 t ha⁻¹).

Keywords: soil microorganisms, diversity, soil quality, *Zea mays*.

1. INTRODUÇÃO

O uso agrícola do lodo de esgoto (LE) como adubo orgânico é considerado uma alternativa promissora para disposição final deste resíduo. Além de representar benefício econômico seu uso representa benefício ambiental e social pela possibilidade de aumento da produtividade de culturas e menor impacto negativo sobre o ambiente (POGGIANI ET AL., 2000). Em solos tropicais muito intemperizados, onde a capacidade de troca catiônica (CTC) é extremamente dependente da matéria orgânica, o uso agrícola do LE é ainda mais atrativo (MELO ET AL., 1994). Um LE típico apresenta em torno de 40% de matéria orgânica (MO), 4% de N, 2% de P e demais macro e micronutrientes (MELO ET AL., 2004). Em áreas agrícolas, a utilização de LE tem sido amplamente recomendada, tanto como fonte de nutrientes quanto como condicionador de solos.

Por este fato a obtenção de mais informações se faz necessária para que se tenha conhecimento a respeito dos impactos oriundos da utilização do LE e dos seus efeitos sobre a estrutura das comunidades microbianas dos solos e sua capacidade metabólica. O LE apresenta em sua composição diversos poluentes, como metais pesados e organismos contaminantes ao homem (BETTIOL & CAMARGO, 2001). No entanto, a disponibilidade de metais pesados no solo e seu efeito sobre a microbiota, dependem tanto da quantidade quanto da qualidade da matéria orgânica adicionada (BANERJEE ET AL., 1997). Altas e baixas concentrações de metais pesados para micro-organismos e processos microbianos, tanto em ensaios de laboratório quanto de campo, podem ser discrepantes. Altas concentrações de metal podem não ser passíveis de ocasionar efeitos deletérios sobre as atividades microbianas e, inversamente, baixas concentrações podem causar efeitos negativos (BAATH, 1989). Deste modo, a adição do LE pode provocar alterações na comunidade microbiana do solo e, com isso, afetar a funcionalidade do agroecossistema.

A composição e a diversidade de comunidades microbianas refletem exatamente a atual situação de um ecossistema e a que condições este foi submetido. Assim, os micro-organismos do solo são verdadeiramente indicadores da sustentabilidade do manejo e uso da terra, pois respondem rapidamente às mudanças ambientais (HERRICK, 2000). A diversidade funcional compreende a diversidade das atividades microbianas no solo, sendo esta de grande importância em avaliações de micro-organismos dentro do ecossistema, sobretudo porque se conhece muito pouco sobre a relação entre diversidade estrutural e funcional desses micro-organismos (KENNEDY, 1999). Portanto, existe um consenso de que a diversidade microbiana está diretamente relacionada à estabilidade do ecossistema.

Os micro-organismos do solo podem ser classificados em grupos funcionais de acordo com suas atuações nos processos biológicos do ecossistema (TORSVIK & ØVREÅS, 2002). Quanto ao metabolismo microbiano, o padrão de resposta no ecossistema, é que a diversidade funcional em uma área sem vegetação, inicialmente seja baixo, e à medida que a vegetação se estabelece, a diversidade metabólica microbiana cresce rapidamente. Porém, em estágios de sucessão vegetal mais avançado, a abundância relativa das atividades metabólicas dos micro-organismos se reduz, mantendo-se estáveis (TORSVIK & ØVREÅS, 2002).

Atualmente, existem diversas ferramentas metodológicas que permitem avaliar parte da estrutura funcional e estrutural das comunidades microbianas dos solos. Um método associado ao estudo da estrutura funcional de micro-organismos do solo, é a avaliação do perfil metabólico das comunidades por meio do sistema EcoPlate, que mede a intensidade de utilização de diferentes fontes de carbono (GARLAND & MILLS, 1991). Estudos mostraram que é possível observar, com este método, diferenças significativas no perfil metabólico de comunidades oriundas de amostras de solo distintas (ZAK ET AL., 1994; OLIVEIRA ET AL., 2009; SOUZA ET AL.; 2012). O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade estrutural e funcional

de micro-organismos do solo no 13^o ano de cultivo de milho em área tratada com lodo de esgoto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS EXPERIMENTAIS

As áreas experimentais localizam-se na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - Campus de Jaboticabal – SP. Os experimentos 1 e 2 foram inicialmente instalados em novembro de 1997, adotando-se o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com quatro tratamentos e cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais de 60 m² (6 m x 10 m) cada, com área útil de 12 m². Os tratamentos utilizados foram testemunha com fertilização química convencional (0 t ha⁻¹ de LE), 5 t ha⁻¹ de LE , 10 t ha⁻¹ de LE e 20 t ha⁻¹ de LE , base seca. Estes tratamentos foram estabelecidos de modo a fornecer 0, 100, 200 e 400% de todo o nitrogênio exigido pela cultura do milho, admitindo-se que 1/3 do nitrogênio contido no LE se encontrava disponível para as plantas. As doses totais acumuladas de LE foram obtidas considerando-se 13 anos de plantio: 5 t ha⁻¹: 65,0 t ha⁻¹ de LE (13 anos x 5 t ha⁻¹ de LE, base seca); 10 t ha⁻¹: 130,0 t ha⁻¹ de LE (13 anos x 10 t ha⁻¹ de LE, base seca); 20 t ha⁻¹: 207,5 t ha⁻¹ de LE (3 anos x 2,5 t ha⁻¹ de LE + 10 anos x 20 t ha⁻¹ de LE, base seca).

O experimento 1 foi conduzido em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (LVef), textura argilosa, a moderado caulínico-oxídico, altitude 550 m, latitude 21° 14' 46,81" S e longitude 48° 17' 07,85" W; e o experimento 2 em LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (LVd), textura média, A moderado caulínico (EMBRAPA, 2006), localizado a uma altitude de 620 m, latitude 21° 13' 57,96" S e

longitude 48° 17' 06,18" W. O clima na região é classificado, segundo Köppen, como subtropical de inverno seco (Aw) (VOLPE; CUNHA, 2008).

Tabela 1 Valores médios da composição granulométrica de amostras de solo coletadas em diferentes camadas de LATOSSOLO VERMELHO eutroférico argiloso (LVef) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico textura média (LVd).

| Fração | LATOSSOLO VERMELHO eutroférico (LVef) | | | LATOSSOLO VERMELHO distrófico (LVd) | | |
|--------------|---------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|----------|----------|
| | 0-0,1m | 0,1-0,2m | 0,2-0,3m | 0-0,1m | 0,1-0,2m | 0,2-0,3m |
| | -----g kg ⁻¹ ----- | | | | | |
| Argila | 485 | 508 | 525 | 245 | 278 | 285 |
| Silte | 297 | 281 | 273 | 68 | 62 | 63 |
| Areia total | 219 | 212 | 202 | 678 | 661 | 652 |
| Areia grossa | 90 | 86 | 77 | 388 | 349 | 356 |
| Areia fina | 129 | 126 | 125 | 299 | 312 | 296 |

Fonte: Melo et al. (2004)

2.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO E LODO DE ESGOTO

Foram colhidas amostras compostas dos dois solos (0 a 0,20 m de profundidade) para fins de caracterização dos atributos químicos. Os solos foram secos à sombra e ao ar, destorroados, tamisados em peneira de malha 2 mm (TFSA) e acondicionados em sacos plásticos. As análises químicas de fertilidade dos solos foram realizadas pelo Departamento de Solos e Adubos, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, o qual está ligado ao Programa de Qualidade de Análise de Solo do Sistema IAC – Instituto Agrônomo de Campinas, segundo os métodos de Raij et al (2001). A adubação e dose de calcário foram calculadas considerando saturação por bases de 70% para todas as parcelas. Foram aplicadas doses de calcário (PRNT = 90%) que variaram de 2,5 a 4,0 t ha⁻¹ em LVef e de 1,2 a 2,7 t ha⁻¹

em LVd, de acordo com as recomendações de Raij e Cantarella (1997). A aplicação de calcário para fins corretivos foi feita anualmente no período de 13 anos.

O LE utilizado nos experimentos foi obtido junto à Estação de Tratamento de Esgoto da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (ETE-Sabesp), localizada no município de Barueri. O LE foi proveniente dos esgotos da grande São Paulo e é constituído por uma mistura de esgotos domiciliares e industriais. Após o recebimento e acondicionamento do LE em local impermeabilizado, foi realizado o procedimento de amostragem conforme orientações estabelecidas pelo anexo A da norma NBR 10.007 (ASSOCIAÇÃO, 2004). A amostra obtida foi dividida em duas partes, sendo a primeira parte da amostra do LE seca em estufa a 105°C até atingir massa constante. Após a secagem, foi determinada a umidade, permitindo-se dimensionar as quantidades do LE úmido a serem distribuídas em cada tratamento. A segunda parte foi seca em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C até atingir massa constante. A amostra de LE foi desagregada com auxílio de almofariz e pistilo de porcelana, peneirada em peneira de 0,42 mm e homogeneizada, sendo então acondicionada em frasco hermeticamente fechado (ABREU ET AL., 2009). Análises físico-químicas (Tabela 2) foram realizadas para caracterizar os atributos do potencial agrônomo do LE, conforme anexo II da resolução 375 (CONAMA, 2006).

Tabela 2 Atributos do potencial agronômico do lodo de esgoto (base seca) aplicado no período de 2009/2010.

| Atributos | Concentrações |
|-------------------------|---------------------------|
| Carbono Orgânico | 246,75 g kg ⁻¹ |
| P total | 20,36 g kg ⁻¹ |
| N Kjeldahl | 24,8 g kg ⁻¹ |
| pH em água | 5,80 |
| pH em CaCl ₂ | 5,54 |
| K total | 2,38 g kg ⁻¹ |
| Na total | 1,08 g kg ⁻¹ |
| Ca total | 15,87 g kg ⁻¹ |
| Mg total | 4,23 g kg ⁻¹ |
| Umidade | 81,3 % |

2.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos no ano agrícola 2009/2010. A incorporação do LE ao solo foi feita em dezembro de 2009, considerando-se a umidade residual do material. O LE foi aplicado a lanço, distribuído uniformemente por toda a área da parcela e incorporado ao solo com auxílio de grade leve. Após a incorporação do LE procedeu-se a semeadura do milho (híbrido simples AG 5020), em espaçamento de 0,9 m entre linhas e densidade de 7 a 8 plantas por metro linear. As parcelas receberam complementação das doses de P e K exigidas pela cultura (RAIJ; CANTARELLA, 1997), de acordo com análise química dos solos e LE (Tabela 3). A adubação de cobertura para N e K, deu-se aos 25 e 40 dias após a emergência das plântulas. A testemunha (0 t ha⁻¹ LE) recebeu adubação com N (Uréia) e os demais tratamentos receberam a aplicação K (cloreto de potássio) (NOGUEIRA, 2008).

Tabela 3 Atributos químicos do LATOSSOLO VERMELHO eutroférico (LVef) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico (LVd) após 13 anos de aplicação de LE.

| LE | pH CaCl ₂ | MO | P resina | K | Ca | Mg | H+Al | SB | CTC | V |
|--|-------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------------|------|-----|------|-------|--------|------|
| t ha ⁻¹ | | g dm ⁻³ | mg dm ⁻³ | -----mmolc dm ⁻³ ----- | | | | | | % |
| LATOSSOLO VERMELHO eutroférico LVef | | | | | | | | | | |
| 0 | 4,62 | 21,4 | 31,0 | 3,66 | 22,6 | 7,2 | 50,4 | 33,46 | 83,86 | 39,8 |
| 5 | 4,60 | 24,0 | 34,8 | 3,42 | 24,8 | 7,6 | 56,4 | 35,88 | 92,22 | 39,2 |
| 10 | 4,74 | 26,0 | 80,8 | 4,16 | 32,2 | 9,0 | 54,8 | 45,36 | 100,16 | 45,2 |
| 20 | 4,40 | 26,2 | 86,0 | 2,98 | 22,4 | 5,8 | 70,4 | 31,18 | 101,58 | 30,6 |
| LATOSSOLO VERMELHO distrófico LVd | | | | | | | | | | |
| 0 | 4,66 | 19,4 | 47,8 | 2,14 | 18,6 | 4,8 | 39,0 | 25,54 | 64,54 | 40,0 |
| 5 | 4,98 | 19,8 | 55,2 | 2,46 | 24,6 | 6,8 | 32,2 | 33,86 | 66,06 | 51,2 |
| 10 | 4,84 | 21,2 | 95,6 | 2,50 | 26,2 | 6,2 | 40,0 | 34,90 | 74,90 | 47,0 |
| 20 | 4,50 | 20,2 | 94,0 | 2,00 | 19,2 | 4,6 | 49,8 | 25,8 | 75,60 | 35,2 |

LE: Lodo de esgoto MO: matéria orgânica; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca de cátions; V: saturação por bases.

2.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA POPULAÇÃO MICROBIANA DO SOLO

Foram realizadas coletas de solo rizosférico e não rizosférico para quantificação da população microbiana. A coleta das amostras de solo foi realizada no período de florescimento da cultura do milho (65 dias após semeadura). Foram coletados os sistemas radiculares de quatro plantas por parcela. As amostras do solo rizosférico foram constituídas somente do solo aderido às raízes das plantas e as amostras de solo não rizosférico foram constituídas de quatro pontos amostrados aleatoriamente entre as linhas em cada parcela. As amostras de solo foram peneiradas em peneira de 2 mesh, acondicionadas em sacos plásticos e microtubos. Parte do material foi armazenado sob refrigeração (4°C) e parte congelado (análises moleculares).

Para quantificação da população microbiana, cinco gramas de solo foram dispersos em 45 ml de solução salina esterilizada (0,85%) e agitadas por 60 minutos

em agitador orbital. Foram utilizadas diluições seriadas de 10^{-4} e 10^{-5} para bactérias, 10^{-3} e 10^{-4} para actinomicetos e 10^{-2} e 10^{-3} para fungos. Alíquotas de 100 μ l de cada diluição, em duplicata, foram plaqueadas em meios específicos. O número de células viáveis (unidade formadora de colônia, UFC) de bactérias, actinomicetos e fungos, foi determinado em meio ágar-batata (WOLLUM, 1982), L-asparagina (Agar – amido) e Martin (MARTIN, 1950), respectivamente. As contagens de unidades formadoras de colônias foram realizadas quatro, oito e dozes dias após o plaqueamento para bactérias, fungos e actinomicetos, respectivamente. Os dados de população microbiana foram utilizados para se estimar o efeito rizosférico (R/S) nos tratamentos avaliados; R representa o número de micro-organismos (UFC g^{-1} solo) na rizosfera, e S o número de micro-organismos no solo controle (solo não rizosférico - NR).

2.5 DIVERSIDADE METABÓLICA

A diversidade metabólica da comunidade microbiana das amostras de solo rizosférico e não rizosférico foi medida utilizando-se BIOLOG microplates (Biolog Inc.). Foram utilizadas microplacas com 96 poços que correspondem a 31 fontes de carbono (ácidos carboxílicos, carboidratos, polímeros, aminoácidos, aminas) e um controle sem fonte de carbono e três repetições. Foram aplicados 120 μ L de suspensão de solo, diluída a 10^{-2} , em cada poço das microplacas que foram mantidas a 28°C (GOVAERTS ET AL., 2007). Foram realizadas, a cada 24 horas, as leituras das microplacas por meio da medida da cor desenvolvida pela oxidação de substratos durante a respiração dos micro-organismos em espectrofotômetro leitor de microplacas (LABSYSTEMS, MULTSKAN, MS, EUA), a 590 nm, nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A leitura de 72 horas foi utilizada para cálculos dos componentes da diversidade funcional por representar o tempo médio entre as leituras realizadas.

Os valores de absorvência de cada cavidade foram diminuídos do controle. Para minimizar possíveis efeitos de diferença de inóculo entre as amostras, os dados obtidos de cada microplaca foram normalizados pela divisão dos valores brutos de absorvência de cada poço pelo AWCD (AVERAGE WELL COLOUR DEVELOPMENT). Os valores de AWCD foram calculados por meio da divisão da atividade de utilização dos substratos em cada cavidade pelo valor médio da leitura da placa inteira (GARLAND & MILLS, 1991). Os valores corrigidos acima de zero foram considerados como reação positiva, e evidenciam a utilização de substratos e os valores negativos, a ausência de uso de substratos. Os componentes da diversidade funcional, diversidade metabólica, equitabilidade e atividade total foram estimados de acordo com Zak et al. (1994). A diversidade metabólica foi estimada a partir do índice de Shannon (H) que compreende tanto a riqueza de substrato (S) como a intensidade com que são usados pela microbiota. A equitabilidade ou índice de similaridade (E) indica o grau de uniformidade de utilização de um substrato em relação ao número de substratos utilizados pela microbiota (ZAK ET AL., 1994). Os dados foram submetidos à análise de variância e quando houve significância as médias dos tratamentos foram comparadas utilizando-se o teste diferença mínima significativa (Fisher LSD, $\alpha=0,05$) utilizando-se o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2002).

3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DA POPULAÇÃO MICROBIANA DO SOLO

A aplicação de lodo de esgoto resultou em baixo efeito sobre as populações microbianas do solo (fungos, bactérias, actinomicetos) em LVef e LVd (Figuras 1 e 2). Análises de tamanho, atividade e estrutura das comunidades microbianas, trazem grande contribuição para a geração de índices de qualidade biológica de solos,

sendo utilizados para o monitoramento da aplicação agrícola de bioossólidos. Foram observadas diferenças apenas para a comunidade fúngica e bacteriana em LVef e LVd (Figura 2). A aplicação de 5, 10 e 20 t ha⁻¹ de LE em solo não rizosférico apresentaram os maiores valores médios para densidade bacteriana (8,00, 8,07 e 7,91 log UFC g⁻¹, respectivamente) e aplicação de 0, 5 e 20 t ha⁻¹ de LE em solo rizosférico apresentaram os maiores valores médios para densidade de fungos (5,48, 5,60 e 5,83 log UFC g⁻¹, respectivamente) em LVef.

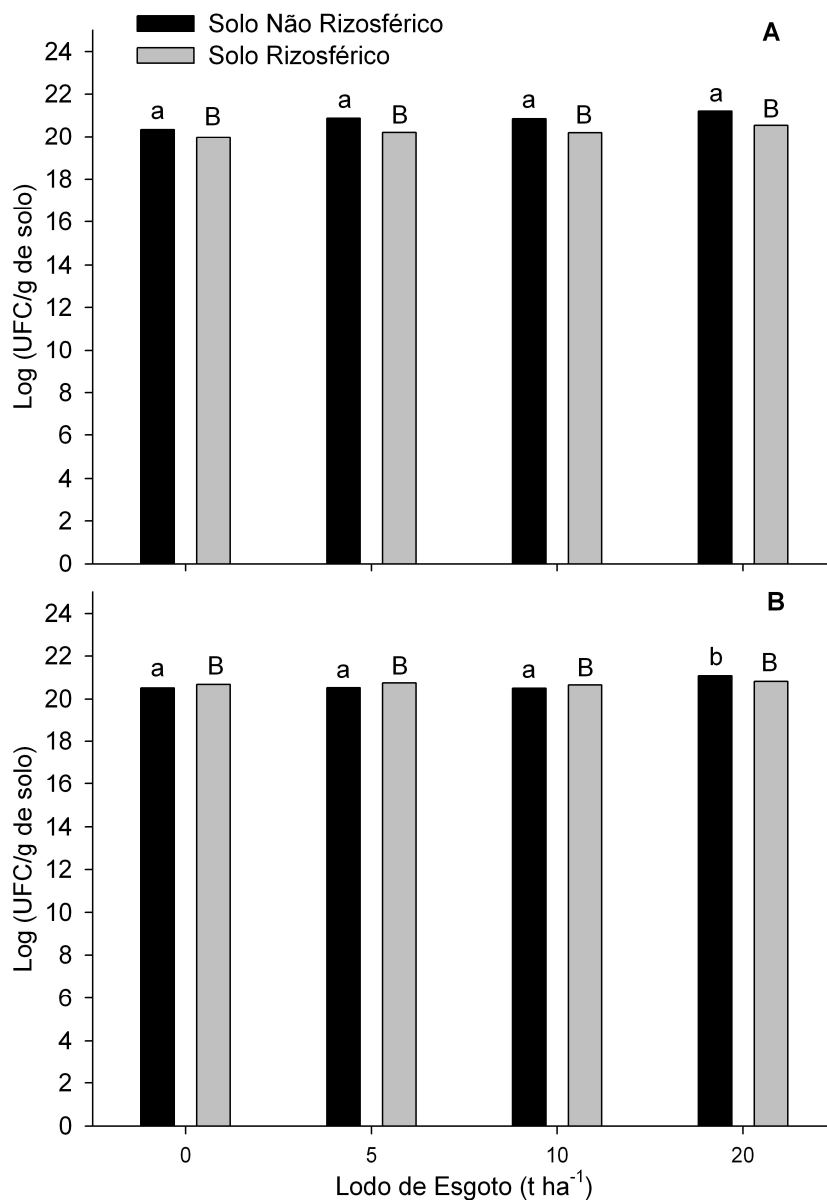


Figura 1. Contagem total de micro-organismos de amostras de solo não rizosférico e rizosférico tratados com diferentes doses de lodo de esgoto por um período de 13 anos no cultivo de milho em dois experimentos conduzidos em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (A) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (B). Para cada experimento e tipo de solo, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste diferença mínima significativa (Fisher LSD, $\alpha=0,05$).

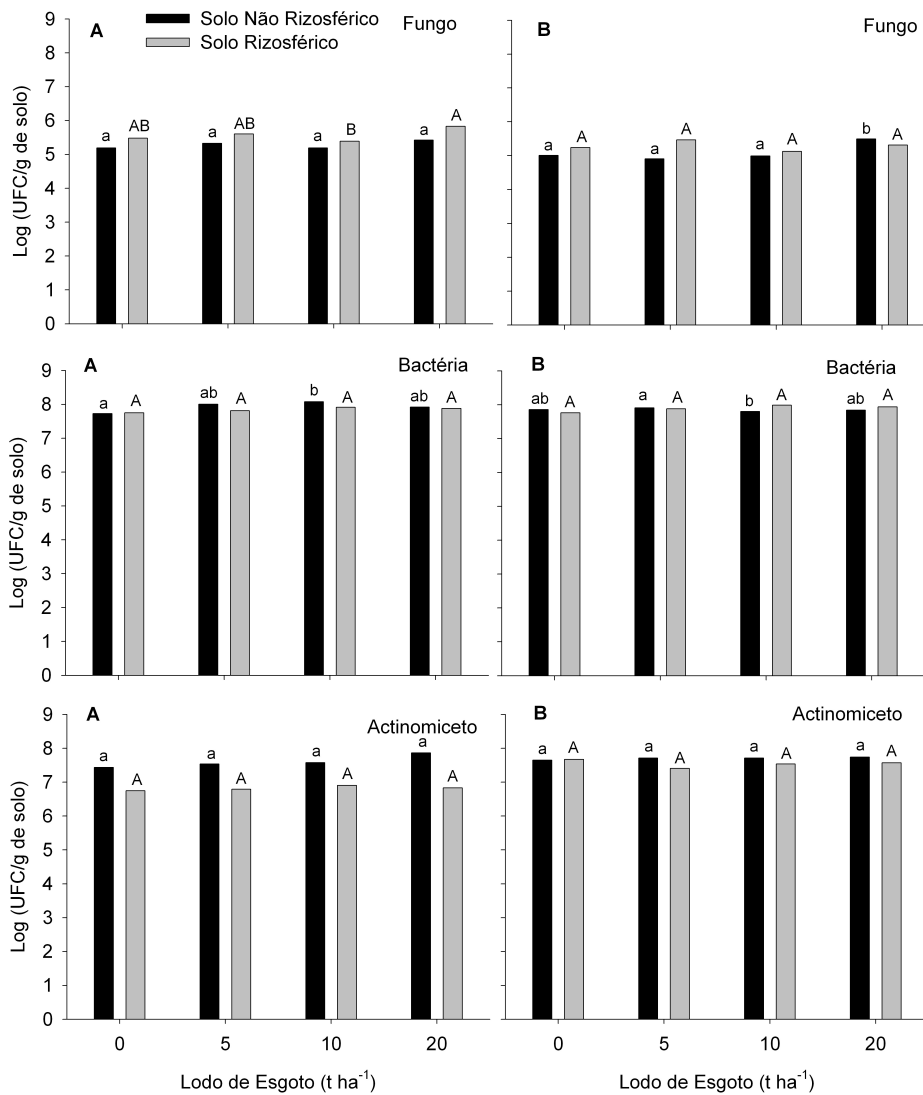


Figura 2. Contagem total de fungos, bactérias e actinomicetos de amostras de solo não rizosférico e rizosférico tratados com diferentes doses de lodo de esgoto por um período de 13 anos no cultivo de milho em dois experimentos conduzidos em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (A) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (B). Para cada experimento, tipo de solo e grupo funcional, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste diferença mínima significativa (Fisher LSD, $\alpha=0,05$).

Em LVd o tratamento 20 t ha^{-1} , em solo não rizosférico, apresentou o maior valor médio de densidade fúngica ($5,49 \text{ log UFC g}^{-1}$). Neste mesmo solo foram encontradas densidades bacterianas de 7,85, 7,90 e 7,84 nos tratamentos 0, 5 e 20 respectivamente. Para a população de actinomiceto, não foram observadas diferenças significativas para as doses de lodo esgoto aplicadas nos dois solos cultivados com milho.

Quando foi considerada a população microbiana total (fungo, bactéria e actinomiceto) não foi detectado efeito da aplicação de lodo de esgoto sobre os microrganismos do solo nos experimentos em LVef e LVd (Figura 1).

Quando se analisou o efeito do solo não rizosférico (SN) ou rizosférico (SR) na população microbiana não se detectou efeito significativo ($P=0,584$ e $P=0,9858$, para LVef e LVd, respectivamente).

3.2 DIVERSIDADE METABÓLICA

O número de substratos utilizados variou conforme o tempo de incubação, dose de LE aplicada e tipo de solo amostrado (Figura 3). A partir de 48 horas apareceram diferenças entre os extratos microbianos não rizosférico (SN) e rizosférico (SR) nos dois solos em estudo. Em LVef houve diferença entre o número de substratos utilizados apenas para o solo rizosférico (Figura 3), apresentando o tratamento com 20 t ha^{-1} o maior número de substratos utilizados. Para o solo LVd houve diferença no número de substratos utilizados para o solo não rizosférico (10 e 20 t ha^{-1}) e rizosférico ($0, 5$ e 10 t ha^{-1}) (Figura 3).

A soma de atividade para a utilização dos substratos, medida pelo desenvolvimento de cor (AWCD), variou conforme o tratamento aplicado e o tipo de solo (Figura 4). Assim como para o número de substratos utilizados, não houve diferença na soma de atividade para o solo não rizosférico para o experimento conduzido em LVef (Figura 4). Em LVef, solo rizosférico, a soma de atividade foi

maior para o tratamento com 20 t ha⁻¹ de LE (Figura 4). No solo não rizosférico, LVd, a soma de atividade foi maior no tratamento com 10 t ha⁻¹ LE. Para o solo rizosférico as diferenças entre os tratamentos foram menores (Figura 4).

Quanto aos valores de diversidade metabólica (índice de Shannon, H), número de substratos utilizados, equitabilidade (E), e atividade total da população microbiana de amostras de solo quantificadas após 72h de incubação foram detectadas diferenças apenas para alguns tratamentos (Tabela 4). Para o solo não rizosférico houve diferença apenas para a equitabilidade no solo LVd. Para o solo rizosférico houve diferenças para o número de substratos utilizados e equitabilidade em LVef, e Shannon, número de substratos utilizados, equitabilidade e atividade total em LVd.

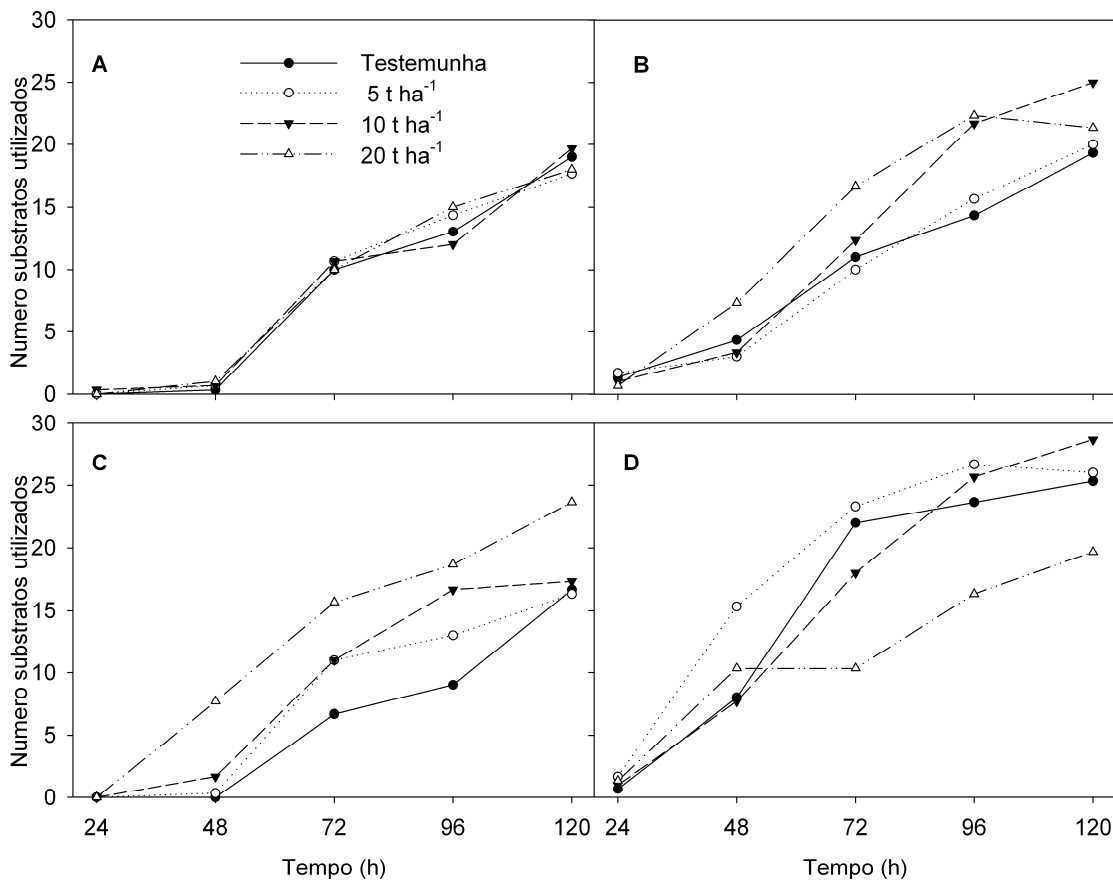


Figura 3. Utilização de fontes de carbono do extrato microbiano em amostras de solo não rizosférico (A e B) e rizosférico (C e D) tratados com diferentes doses de lodo de esgoto por um período de 13 anos no cultivo de milho em dois experimentos conduzidos em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (A e C) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (B e D).

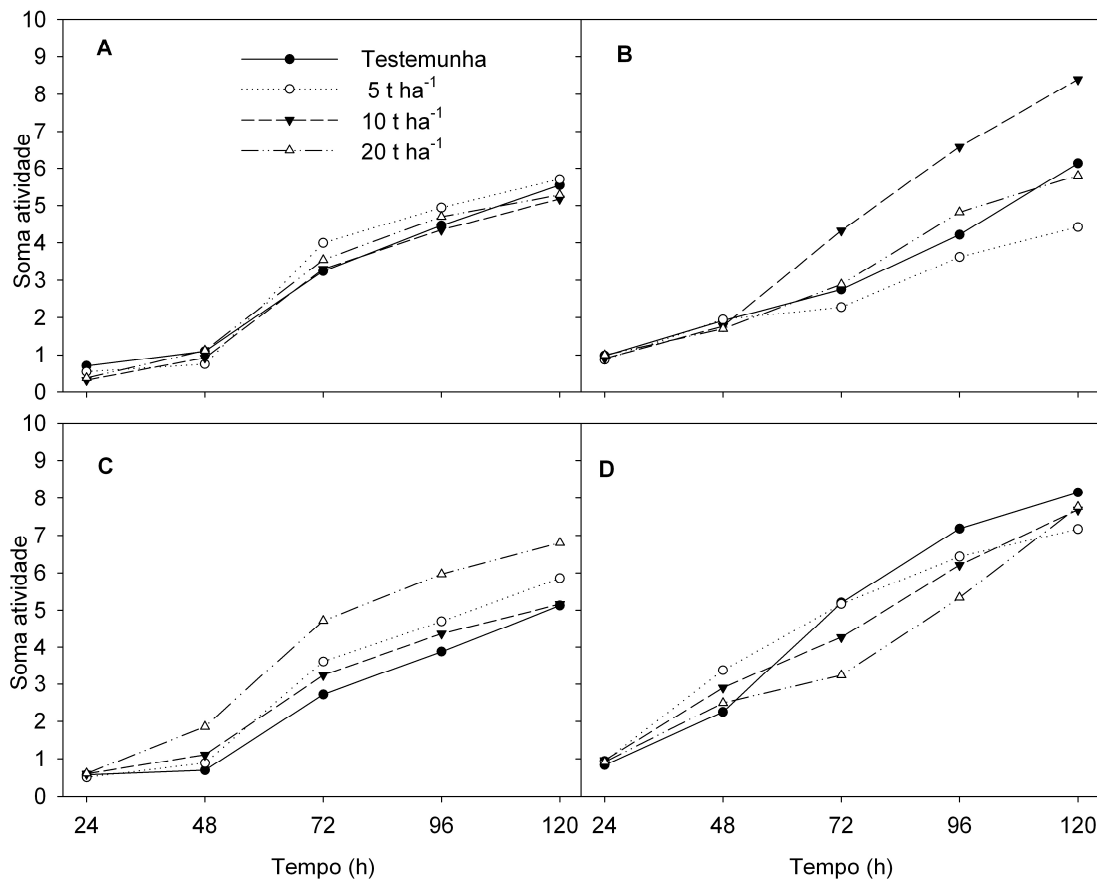


Figura 4. Soma da atividade total (AWCD) de utilização de fontes de carbono do extrato microbiano em cada amostra de solo não rizosférico (A e B) e rizosférico (C e D) tratados com diferentes doses de lodo de esgoto por um período de 13 anos no cultivo de milho em dois experimentos conduzidos em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (A e C) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (B e D).

Tabela 4. Diversidade metabólica (índice de Shannon, H), número de substratos utilizados, equitabilidade (E), e atividade total da população microbiana de amostras de solo não rizosférico (SN) e solo rizosférico (SR) tratados com diferentes doses de lodo de esgoto por um período de 13 anos no cultivo de milho em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (LVef) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (LVd).

| LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (LVef) | | | | | | | | |
|--|-------------|-------|-----------------------|---------|--------|-------|-----------------|--------|
| Tratamento | Shannon(H) | | Substratos utilizados | | E | | Atividade total | |
| | SN | SR | SN | SR | SN | SR | SN | SR |
| 0 t ha ⁻¹ | 1,92a | 3,03a | 11,0a | 22,00ab | 1,90a | 2,25b | 2,74a | 5,19a |
| 5 t ha ⁻¹ | 2,70a | 3,06a | 10,00a | 23,33a | 2,97a | 2,24b | 2,27a | 5,16a |
| 10 t ha ⁻¹ | 3,09a | 2,93a | 12,33a | 18,00b | 2,89a | 2,33b | 4,32a | 4,27a |
| 20 t ha ⁻¹ | 2,70a | 2,87a | 16,16a | 10,33c | 2,22a | 3,01a | 2,88a | 3,23a |
| LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (LVd) | | | | | | | | |
| Tratamento | Shannon (H) | | Substratos utilizados | | E | | Atividade total | |
| | SN | SR | SN | SR | SN | SR | SN | SR |
| 0 t ha ⁻¹ | 2,79a | 2,30c | 10,00a | 6,66c | 1,21 a | 1,22a | 3,23 a | 2,72b |
| 5 t ha ⁻¹ | 2,70a | 2,59b | 10,66a | 11,00b | 1,14ab | 1,08b | 3,99 a | 3,60ab |
| 10 t ha ⁻¹ | 2,55a | 2,64b | 10,66a | 11,00b | 1,08b | 1,10b | 3,29 a | 3,23ab |
| 20 t ha ⁻¹ | 2,67a | 2,80a | 10,00a | 15,66a | 1,16ab | 1,01b | 3,54 a | 4,71a |

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si.

4. DISCUSSÃO

A aplicação de lodo de esgoto não influenciou a população total de micro-organismos nos solos estudados. Análises de tamanho, atividade e estrutura das comunidades microbianas, trazem grande contribuição para a geração de índices de qualidade biológica de solos, sendo utilizados para o monitoramento da aplicação agrícola de biossólidos. Diferentes estudos demonstraram os efeitos prejudiciais da contaminação do solo por metais pesados e a influencia desta contaminação sobre a comunidade microbiana (GILLER ET AL., 1998; BUENO ET AL., 2011; PAN & YU,

2011; SHI, 2011). A toxicidade dos metais que os biossólidos contêm, podem chegar a altos níveis no sistema a que são inseridos e podem, portanto ser transferidos para a cadeia trófica.

Reber (1992), em estudo de diversidade bacteriana e capacidade das bactérias do solo em utilizar substâncias aromáticas como fonte de carbono em solos contaminados com metais, verificou que, a diversidade metabólica decresceu em três dos cinco bioensaios realizados. Porém nenhuma alteração ou maior diversidade nos solos contaminados com metais foi observada em dois experimentos. Concentrações excessivas de metais são potenciais causadoras de toxicidade, podendo causar a inibição de atividades enzimáticas essenciais e alterações significativas da estrutura das comunidades microbianas.

Efeitos em curto prazo da adição de dejetos orgânicos na produção de trigo demonstram que a adição de resíduos sólidos e líquidos não afetou significativamente a biomassa microbiana, quando comparado á fertilização mineral (FRANCO-OTERO, 2012). No entanto a atividade microbiana foi maior em solo manejado organicamente. Santos et al., (2011) e Odlare et al., (2011) encontraram resultados semelhantes em que a aplicação de lodo não afetou negativamente os micro-organismos do solo e suas atividades. A MO contida no LE juntamente com a existente no solo podem contribuir com a complexação de metais, podendo reduzir a sua disponibilidade e toxicidade. Relatos sobre a influência e incremento causada pelo lodo de esgoto na estrutura da comunidade microbiana são descritos com grande relevância (BORJESSON ET AL., 2012; YANG ET AL., 2012). A aplicação do LE no solo é considerado também como agente estimulador da comunidade microbiana devido ao aumento nos teores de carbono e nutrientes existentes no solo. A estrutura da comunidade microbiana pode variar de acordo com as doses de lodo de esgoto aplicadas ao solo (VAL-MORAES ET AL., 2011). Em doses menores do resíduo pode haver o favorecimento da comunidade microbiana enquanto doses maiores podem a inibir. Alguns tratamentos em que o lodo de esgoto é tratado

(pirólise) observou-se melhoria em suas características e promoveram incremento da atividade microbiana quando o resíduo foi adicionado ao solo (PAZ-FERREIRO ET AL., 2012). Tal fato pode ser explicado pelo elevado pH, o qual pode ter indisponibilizado os metais, ou à seleção de estirpes de crescimento lento.

Variações na diversidade microbiana podem ser relacionadas a algumas peculiaridades da área cultivada como características químicas (pH e teores de nutrientes) e físicas (porosidade, estabilidade de agregados e estrutura) de cada solo (GRAYSTON ET AL., 2004). Também diferenças na sensibilidade dos micro-organismos ou processos microbianos aos metais são relevantes para tais variações (KHALIL ET AL., 2011). No solo, reações de adsorção, complexação, oxidação-redução e precipitação controlam a disponibilidade e solubilidade dos metais. A disponibilidade destes elementos, na forma catiônica, depende do pH do solo.

Alguns métodos e técnicas clássicas são aplicados ao estudo de diversidade microbiana. Tais técnicas como o cultivo, análise morfológica, análise fisiológica e propriedades bioquímicas permitem o isolamento e a identificação de micro-organismos de ambientes naturais (PROSSER, 2002) e trazem informações de grande relevância sobre o balanço da diversidade microbiana do solo. É importante ressaltar que a utilização de um método dependente de cultivo, apresenta limitações, pois não considera micro-organismos que não podem ser cultivados (ROS ET AL., 2008). Além disso, qualquer meio de cultura tende a ser seletivo, em maior ou menor grau, para determinados grupos de micro-organismos. Stenberg (1999) enfatiza que nenhum indicador individualmente conseguirá descrever e quantificar todos os aspectos da qualidade do solo. Desta forma ressalta-se a importância de se examinar e comparar os vários métodos que envolvem o estudo da diversidade microbiana do solo (KIRK ET AL., 2004). Todavia houve grande evolução nos métodos utilizados para medir a dinâmica microbiana no último século (STOCKDALE & BROOKES, 2006). Por meio de comparações metodologias para avaliar as características biológicas de solos contaminados com pesticidas, Wildmer

et al., (2001) encontraram diferenças significativas na capacidade de utilização de substratos de C. No entanto, estes autores ponderam que estas diferenças não podem ser totalmente atribuídas às espécies ou composição da comunidade, já que o método se baseia na fração cultivável da comunidade microbiana inoculada nas microplacas.

Modificações e alterações na matéria orgânica e nos parâmetros microbiológicos do solo podem ocorrer afetando a qualidade de solos contaminados com biossólidos (STAMATIADIS ET AL., 1999), mas mesmo se a matéria orgânica e os parâmetros microbiológicos do solo apresentarem padrões alterados, os indicadores físico-químicos podem permanecer inalterados. Parâmetros biológicos como o número de micro-organismos e atividade metabólica deveriam ser utilizados para avaliar a fertilidade do solo (WAKSMAN, 1927). Valores de AWCD, riqueza (R), Shannon (H) superiores em solo tratado com lodo de esgoto em comparação a outros tratamentos foram encontrados por Frac et al., (2012). Épocas diferentes de amostragem (CASTILHOS, 2000) podem se traduzir em um aumento gradual e significativo da população de bactérias coletadas em tratamento com a aplicação isolada de lodo. Selbach et al., (1991), também observaram um incremento no número de bactérias de acordo com o tempo de aplicação de lodo de curtume no solo. Tais resultados enfatizam a ausência de efeitos tóxicos do lodo incorporado e a resposta desses microrganismos à adição de carbono orgânico ao solo, com a aplicação deste resíduo. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os resultados descritos por Selbach et al., (1991), em que a população de bactérias foi superior a população de fungos e actinomicetos respectivamente em solos onde houve a adição deste resíduo. O incremento de lodo composto (1:1 lodo de esgoto e resíduo de madeira) no solo após dois meses de incubação provocou aumento na respiração do solo micro-organismos e no número de bactérias. A população de fungos não foi afetada pelos tratamentos (ARAÚJO & MONTEIRO, 2006).

Han & Scullion (2000), relatam que semanas após a adição do bio sólido no solo, houve um aparente incremento na proporção de fungos na biomassa microbiana, particularmente em solos com altas taxas de metais. Os tratamentos contendo lodo não causaram efeito inibitório do crescimento de fungos. A ausência de efeitos prejudiciais sobre os micro-organismos também foi observada por Hattori (1992), Jahnel (1997) e Fortes Neto (2000), que estudaram o efeito de metais pesados sobre a decomposição da matéria orgânica e sobre a microbiota do solo, observando aumento no número de fungos em amostra de solo tratado com diferentes doses de lodo de esgoto.

Considerando a natureza heterotrófica dos fungos, alguns gêneros apresentam maior crescimento nos períodos iniciais de decomposição do resíduo aplicado, havendo posterior declínio. Contudo, outros gêneros como *Aspergillus* e *Penicillium*, de alta capacidade de esporulação, são prontamente estimulados com a introdução de substrato orgânico, determinando um alto número de colônias nas contagens, após longo período da incorporação (ALEXANDER, 1980).

De modo geral, com a aplicação de lodo de esgoto tem-se uma tendência de aumento nas comunidades de alguns gêneros de bactéria e fungos (BETTIOL & FERNANDES, 2004). Os autores ainda ressaltam como importante observação à tendência de aumento da comunidade microbiana ao longo do tempo, indicando uma adaptação dos micro-organismos às alterações causadas pelo lodo de esgoto.

A presença ou ausência de algumas espécies de micro-organismos em um habitat, como o solo, por exemplo, parece não ser tão importante quanto à manutenção da diversidade deles. Isso porque a abundância de uma espécie reflete de forma mais imediata à flutuação microbiana de curto prazo, e a diversidade revela o equilíbrio entre os diversos organismos e os domínios funcionais no solo durante o passar do tempo (LAVELLE, 2000).

5. CONCLUSÕES

A adição de LE não altera a população microbiana total do solo (fungos, bactérias e actinomicetos) em solo rizosférico e não rizosférico, mas promove a diversidade funcional da população em LVef (solo rizosférico 20 t ha⁻¹) e LVd (solo rizosférico 0, 5 e 10 t ha⁻¹ e solo não rizosférico 10 e 20 t ha⁻¹).

6. REFERÊNCIAS

ABREU, M. F.; ABREU JUNIOR, C. H.; SILVA, F. C.; SANTOS, G. C. G.; GOMES, T. F.; COSCIONE, A. R. & ANDRADE, C. A. **Análises químicas de fertilizantes orgânicos (urbanos)** In: SILVA, F. C. (Ed.) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, DF, Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 2. ed. rev. Ampl. p. 399-486.

ALEXANDER, M. **Introducción a la Microbiología del suelo**. México:Libros y Editoriales, 1980, 491p.

ARAÚJO, A.S.F.& MONTEIRO, R.T.R. **Microbial biomass and activity in a Brazilian soil amended with untreated and composted textile sludge**. Chemosphere, 64: 1043–1046, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **NBR-10.007: amostragem de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, RJ, 2. Ed, 2004.

BAATH, E. **Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations: a Review** Water Air. Soil. Poll., 47:335-379, 1989.

BANERJEE, M.R.; BURTON, D.L.& DEPOE, S. **Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics**. Agric. Ecosyst. Envir., 66:241-249, 1997.

BETTIOL, W. & CAMARGO, O.A. **Reciclagem de lodo de esgoto na agricultura**. In: MELO, I.S.; SILVA, C.; SCRAMIN, S. & SPESSOTO, A., eds. Biodegradação. Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, 2001. p.93-113.

BETTIOL, W. & FERNANDES, S.A.P. **Efeito do Lodo de Esgoto na Comunidade Microbiana e Atributos Químicos do Solo**, Jaguariúna, Embrapa, 2004. 6 p.(Comunicado Técnico 24)

BÖRJESSON, G.; MENICHETTI, L.; KIRCHMANN, H. & KÄTTERE, T. **Soil microbial community structure affected by 53 years of nitrogen fertilisation and different organic amendments**. *Biol. Fert. Soils.*, 48:245–257, 2012.

BUENO, J.R.P.; BERTON, R.S.; SILVEIRA, A.P.D.; CHIBA, M.K.; ANDRADE, C.A. & DE MARIA, I.C. **Chemical and microbiological attributes of an oxisol treated with successive applications of sewage sludge**. *R. Bras. Ci. Solo*, 35:1461-1470, 2011.

CASTILHOS, D.D.; VIDOR, C. & CASTILHOS, R.M.V. **Atividade microbiana em solo suprido com lodo de curtume e cromo hexavalente**. *R. Bras. Agrocência*, 6:71-76, 2000.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução 375, **Critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados**. Diário Oficial da União, Brasília. 29 de ago. 2006. 32 p.

EMBRAPA, **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Serviço de Produção de Informação**, Brasília: Embrapa, 2006. 306 p.

FORTES NETO, P. **Degradação de biossólido incorporado ao solo avaliada através de medidas microbiológicas.** Piracicaba, SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2000, 113p (Tese Doutorado)

FRAÇ, M.; OSZUST, K. & LIPIEC, J. **Community Level Physiological Profiles (CLPP), characterization and microbial activity of soil amended with dairy sewage sludge.** *Sensors*, 12: 3253-3268, 2012.

FRANCO-OTERO, V.G.; SOLER-ROVIRA, P.; HERNÁNDEZ, D.; LÓPEZ-DE-SÁ, E.G. & PLAZA, C. **Short-term effects of organic municipal wastes on wheat yield, microbial biomass, microbial activity, and chemical properties of soil.** *Biol. Fert. Soils*, 48:205–216, 2012.

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.** *Appl. Environ. Microb.*, 57:2351-2359, 1991.

GE, C.R. & ZHANG, Q.C. **Microbial Community Structure and Enzyme Activities in a Sequence of Copper-Polluted Soils.** *Pedosphere*, 21:164–169, 2011.

GOVAERTS, B.; MEZALAMA, M.; UNNO, Y.; SAYRE, K.D.; LUNA -GUIDO, M.; VANHERCK, K.; DENDOVEN, L. & DECKERS, J. **Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity.** *Appl. Soil Ecol.*, 37:18-30, 2007.

GRAYSTON, S.J.; AMPBELL, C.D.; BARDGETT, R.D.; MAWDSLEY, J.L.; CLEGG, C.D.; RITZ, K.; GRIFFITHS, B.S.; RODWELL, J.S.; EDWARDS, S.J.; DAVIES, W.J.; ELSTON, D.J. & MILLARD, P. **Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands differing in management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques.** Appl. Soil Ecol., 25:63-84, 2004.

HERRICK, J.E. **Soil quality: an indicator of sustainable land management?** Appl. Soil Ecol., 15: 75-83, 2000.

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

HAN, M. & SCULLION, J. **Effect of soil on microbial responses to metal contamination.** Environ. Pollut., 110:115-125, 2000.

KHALIL, A. I.; HASSOUNA, M. S.; EL-ASHQAR, H. M. A. & FAWZI, M. **Changes in physical, chemical and microbial parameters during the composting of municipal sewage sludge.** World J. Microb. Biot., 27:2359–2369, 2011.

KENNEDY, A. C. **Bacterial diversity in agro ecosystems.** Agr. Ecosyst. Environ., 74: 65-76, 1999.

KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H. & TREVORS, J.T. **Methods of studying soil microbial diversity.** J. Microbiol. Meth., 58:169–188, 2004.

LAVELLE, P. **Ecological challenges for soil science.** Soil Sci., 165:73-86, 2000.

MARTIN, J. P. **Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi.** Soil Sci., 69: 215-232, 1950.

MELO, E.F.R.Q. **Alterações nas características químicas do solo de uma área degradada em recuperação.** In: Balensiefer, M.; Araújo, A.J.; Rossot, N.C. In: Simpósio Sul Americano. 1 e Simpósio Nacional Sobre Recuperação de Áreas Degradadas, 2, Curitiba. Anais... Curitiba: FUPEF, 1994. p.371- 81.

MELO, V. P.; BEUTLER, A. N.; SOUZA, Z. M.; CENTURION, J. F. & MELO, W. J. **Atributos físicos de Latossolos adubados durante cinco anos com biossólido.** Pesq. Agropecu. Bras., 39:67-72, 2004.

NOGUEIRA, T. A. R.; OLIVEIRA, L. R.; MELO, W. J.; FONSECA, I. M.; MELO, G. M. P.; MELO, V. P. & MARQUES, M. O. **Cádmio, cromo, chumbo e zinco em plantas de milho e em Latossolo após nove aplicações anuais de lodo de esgoto.** R. Bras. Ci. Solo, 32:2195-2207, 2008.

ODLARE, M.; ARTHURSON, V.; PELL, M.; SVENSSON, K.; NEHRENHEIM, E. & ABUBAKER, J. **Land application of organic waste – Effects on the soil ecosystem.** Appl. Energ., 88:2210–2218, 2011.

OLIVEIRA, C.A.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; LANA, U.G.P.; SCOTTI, M.R. & ALVES, V.M.C. **Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo.** Pesq. Agropecu. Bras., 44:1473-1482, 2009.

PAN, J. & YU, L. **Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure.** Ecological Engineering 37 (2011) 1889– 1894.

PAZ-FERREIRO, J.; GASCÓ, G.; GUTIÉRREZ, B. & MÉNDEZ, A. **Soil biochemical activities and the geometric mean of enzyme activities after application of sewage sludge and sewage sludge biochar to soil.** Biol. Fert. Soils, 48:511–517, 2012.

POGGIANI, F.; GUEDES, M.C. & BENEDETTI, V. **Aplicabilidade do biossólido em plantações florestais: 1-Reflexos no ciclo de nutrientes.** In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. (Ed.). Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna, Embrapa, 2000. p.163-178.

PROSSER, J.I. **Molecular and functional diversity in soil micro-organisms.** Plant Soil, 244: 9–17, 2002.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H. Milho. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. & FURLANI, A. M. C. **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo.** 2. ed. Campinas, Instituto Agrônômico, 1997, p.56 – 59.(Boletim Técnico 100).

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

REBER, H.H. **Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities.** Biol. Fert. Soils, 13:181-186, 1992.

ROS, M.; GOBERNA, M.; PASCUAL, J.A.; KLAMMER, S.& INSAM, H. **16S rDNA analysis reveals low microbial diversity community level physiological profile assays.** J. Microbiol. Meth., 72:221-226, 2008.

SANTOS, J.A.; NUNES, L.A.P.L.; MELO, W.J. & ARAÚJO, A.S.F. **Tannery sludge compost amendment rates on soil microbial biomass of two different soils.** Eur. J. Soil Biol., 47:146-151, 2011.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics.** Version 9.1. Cary: SAS Institute, 2002.

SELBACH, P.; TEDESCO M.J. & GIANELLO, C. ET AL. **Descarte e biodegradação de lodo de curtume no solo.** Ver. Couro, v. jul-ago:51-62, 1991.

SHI, S.; ZHANG, L.; WU, Z.; ZHANG, W.; DENG, Y.; ZHONG, F.; LI, J. **Analysis of the fungi community in multiple- and single-grains Zaopei from a Luzhou-flavor liquor distillery in western China.** World J Microbiol Biotechnol, 27:1869-1874, 2011.

SOUZA, L.M.; SCHLEMMER, F.; ALENCAR, P. M.; LOPES, A.A.C.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; FERNANDES, M.F.; MENDES, I.C. & JUNIOR, F.B.R. **Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos.** Pesq. Agropecu. Bras., 47:269-276, 2012.

STAMATIADIS S.; DORAN, J.W. & KETTLER, T. **Field and laboratory evaluation of soil quality changes resulting from injection of liquid sewage sludge.** Appl. Soil Ecol., 12:263-272, 1999.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. *Acta Agr. Scand. B-S. P.*, 49:1-24, 1999.

STOCKDALE, E. A. & BROOKES, P. C. **Detection and quantification of the soil microbial biomass – impacts on the management of agricultural soils.** *J. Agr. Sci.*, 144: 285–302, 2006.

TORSVIK, V. & ØVREÅS, L. **Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems.** *Curr. Opin. Microbiol.*, 5:240–245, 2002.

VAL-MORAES, S.P.; MARCONDES, J.; ALVES, L.M.C. & LEMOS, E.G.M. **Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis.** *World J. Microb. Biot.*, 27:1997–2003, 2011.

VOLPE, C. A. & CUNHA, A. R. **Dados meteorológicos de Jaboticabal no período de 1971-2000.** In: FÓRUM DE ESTUDOS DOS PROBLEMAS REFERENTES ÀS MUDANÇAS MESOCLIMÁTICAS NO MUNICÍPIO DE JABOTICABAL, 1., Jaboticabal, 2008. Relatório final. Jaboticabal, Comissão de Assuntos Relevantes da Câmara Municipal de Jaboticabal, 2008. CD-ROM.

WAKSMAN, S.A. **Principles of soil microbiology.** Baltimore: The Williams and Wilkins, 1927. 897 p.

WILDMER, F.; FLIEßBACH, A.; LACZKÓ, E.; SCHULZE-AURICH, J. & ZEYER, J. **Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-PLFA and biology analysis.** *Soil Biol. Biochem.*, 33:1029- 1036, 2001.

WOLLUM, A. G. **Cultural methods for soil microorganisms.** In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. *Methods of soil analysis.* Madison: Wisconsin, 1982, p781- 802.

YANG, Y.; WANG, X.; SHI, J. & LI, J. **The influence of the discharging sewage on microbial diversity in sludge from Dongting Lake.** *World J Microb. Biot.*, 28:421–430, 2012.

ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MORRHEAD, D.L. & WILDMAN, H.G. **Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach.** *Soil Biol. Biochem.*, 26:1101-1108, 1994.

CAPÍTULO 3. EFEITO DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE LODO DE ESGOTO (LE) POR TREZE ANOS SOBRE A COMUNIDADE DE FUNGOS

RESUMO - Dentre os micro-organismos que compõem a microbiota do solo, os fungos merecem destaque por se tratar do principal grupo decompositor da matéria orgânica complexa. Essenciais, atuam em processos ecológicos globais e se mostram como fontes de novos compostos bioativos. Suas propriedades permitem seu uso como agentes de controle biológico e na biorremediação. São considerados indicadores da qualidade do solo e de mudanças nos níveis de matéria orgânica. Este trabalho teve como objetivo analisar, variações na estrutura da comunidade de fungos em solo tratado com lodo de esgoto sob a cultura do milho por eletroforese em gel com gradiente desnaturante e avaliar o impacto da adição de doses crescentes deste resíduo em um período de 13 anos sobre a comunidade de fungos. Os experimentos de campo foram conduzidos em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico e em LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico. Os tratamentos (doses de lodo de esgoto acumuladas ao longo dos 13 anos) foram: $T_1 = 0,0 \text{ t ha}^{-1}$ (adubação química); $T_2 = 65 \text{ t ha}^{-1}$; $T_3 = 160 \text{ t ha}^{-1}$ e $T_4 = 207,5 \text{ t ha}^{-1}$. As amostras de solo foram coletadas aos 65 dias do plantio de milho. Foram utilizados métodos moleculares independentes de cultivo PCR-DGGE, clonagem e sequenciamento para a análise da diversidade e estrutura das comunidades de fungos do solo. Alguns amplicons (bandas) estão presentes na maioria dos tratamentos, sugerindo a presença de UTOs, que independentemente da dose de lodo esgoto aplicado, encontram-se estabelecidos naquele ambiente. Além disso, amplicons em diferentes posições indica UTOs (indivíduos e/ou comunidades) diferentes. A partir da matriz de similaridade, gerada pelo coeficiente de Jaccard, foi determinado o percentual de similaridade de cada tratamento (0, 5, 10 e 20 t ha^{-1}). Foram formados grupos a partir de 47% de similaridade estendendo-se até a formação de 1 grupo com amostras idênticas possuindo este 100% de similaridade. A maioria dos grupos

formados compreendeu a faixa entre 80 e 100% de similaridade, e foi composta pelas repetições de um mesmo tratamento, tipo de solo e origem do solo (não rizosférico e rizosférico). Quanto aos valores de diversidade (Shannon), riqueza (UTOs) e equitabilidade (J), gerados de acordo com padrão de amplicons de cada amostra a partir da eletroforese em DGGE, foram detectadas diferenças para estas variáveis em LVd somente no efeito da origem do solo não rizosférico/NR. Os tratamentos com 0 e 5 t ha⁻¹ apresentaram os maiores valores de diversidade (5,72 e 5,82 respectivamente). Já o tratamento 0 t ha⁻¹, se destacou entre os demais apresentando os maiores valores para riqueza e equitabilidade respectivamente (15,5 e 2,09). Não foi observada diferença em LVef para as variáveis analisadas. A utilização de lodo de esgoto não influenciou negativamente a comunidade fúngica nos solos estudados após 13 anos de aplicação. Sua utilização na agricultura é segura do ponto de vista ambiental utilizando-se fungos do solo como bioindicadores. A técnica da PCR-DGGE foi eficiente ferramenta utilizada na identificação de mudanças ocorridas na estrutura de comunidades fúngicas.

Palavras-chave: Xenobióticos, DNA, sequenciamento, clonagem, *Zea mays*, ecologia microbiana.

EFFECT OF APPLICATION OF DIFFERENT DOSES OF SEWAGE SLUDGE FOR THIRTEEN YEARS ON THE COMMUNITY OF FUNGI

SUMMARY- Among the micro-organisms of the soil microbes, fungi noteworthy for being the main decomposer group of complex organic matter. Essential ecological processes operating in global and show themselves as sources of new bioactive compounds. Its properties allow their use as biological control agents and bioremediation. Are considered indicators of soil quality and changes in the levels of organic matter. This study aimed to analyze variations in the community structure of fungi in soil treated with sewage sludge under maize by electrophoresis in denaturing gradient gel and evaluate the impact of the addition of increasing doses of this residue on a 13-year period on the fungal community. Field experiments were conducted in two soils type, Eustrtox (LVef) and Typic Hapludox (LVd). Treatments (doses of sewage sludge accumulated over 13 years) were: T1 = 0.0 t ha⁻¹ (chemical fertilizer), T2 = 65 t ha⁻¹, T3 = 160 t ha⁻¹ and T4 = 207.5 t ha⁻¹ (dry basis). Soil samples were collected at 65 days after maize sowing. Molecular methods were used for cultivation independent PCR-DGGE, cloning and sequencing for analysis of the community structure and diversity of soil fungi. Some amplicons were present in most treatments. The visualization of amplicons in different positions in DGGE profiles is indicative of new OTUs (operational taxonomic units) and groups were formed with 47% of similarity or even 100% of similarity in one group. Differences in relation to of diversity, richness and evenness according to the standard amplicons generated for each sample were found only in LVd for NRS samples while no differences were observed in LVef. Most groups formed understood the range between 80 and 100% similarity, and was composed of repetitions of the same treatment, soil type and origin of the soil (RS and NRS). The values of diversity (Shannon), OTUs and evenness (J), generated according to standard amplicons of each sample from the DGGE electrophoresis, differences were found for these variables in LVd only in the

NRS. Treatments with 0 and 5 t ha⁻¹ showed the highest diversity values (5.72 and 5.82 respectively). The treatment 0 t ha⁻¹, stood out among the others showed larger values for richness and evenness respectively (2.09 and 15.5). No difference was observed in L_{Vef} for the variables analyzed. The use of sewage sludge did not influence the fungal community in soils after 13 years of application. Their use in agriculture is safe environmentally using soil fungi as bioindicators. The PCR-DGGE was efficient tool used to identify changes in the structure of fungal communities.

Keywords: Xenobiotics, DNA sequencing, cloning, *Zea mays*, microbial ecology.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da biodiversidade do solo e o papel que a microbiota edáfica desempenha são fundamentais para a manutenção da funcionalidade quando se deseja um sistema sustentável, quer sejam sistemas naturais ou agrícolas. Os micro-organismos do solo constituem importantes peças em processos fundamentais, como mineralização e decomposição (GOMES ET AL., 2003; GARBEVA ET AL., 2004).

Dentro da vasta biodiversidade do solo, em especial se destacam os fungos, por estarem entre os mais abundantes em termos de biomassa, atividade fisiológica (BILLS ET AL., 2004) e biodiversidade sendo crucialmente determinantes para a sobrevivência de outros organismos. Sendo organismos eucarióticos, possuem núcleos dispersos em um micélio (conjunto de hifas) contínuos ou septados. A absorção é a forma pela qual sua nutrição é obtida e pigmentos fotossintéticos e plastos são ausentes neste organismo. São caracterizados como saprófitos parasíticos facultativos ou biotróficos. Apresentam uma gama de aplicações, em diferentes áreas (saúde, nutrição, agricultura, energia e meio ambiente) atuando em processos ecológicos globais e podendo ainda ser fontes de novos compostos bioativos, o que os fazem peculiarmente especiais (HAWKSWORTH, 2001). São determinantes para que ocorra a decomposição de resíduos vegetais e a ciclagem de nutrientes no solo. Promovem o crescimento e incremento na nutrição vegetal pela colaboração na absorção de nutrientes. Podem ser usados como agentes de controle biológico, funcionando como supressores de doenças de plantas e ainda promovendo a degradação de xenobióticos, sendo frequentemente considerados como bioindicadores da qualidade do solo e de mudanças nos níveis de matéria orgânica (KASCHUK et al., 2010). Existem, cerca de 70.000 espécies descritas e conservadas através de armazenamento e coleções no mundo inteiro. No entanto estima-se que, somente 1% das espécies de fungos seja conhecida, o que prediz

que, mesmo com espécies úteis descritas, existem ainda muitas outras a serem descobertas, gerando significativos avanços científicos.

Sendo o solo um meio complexo, heterogêneo e dinâmico, com múltiplos componentes bióticos e abióticos, consiste da origem ou propicia a formação de vários microambientes. Por isso os vários nichos existentes no solo são ocupados pelos micro-organismos e por sua fauna (BILLS ET AL., 2004). Alterações causadas pelo homem, particularmente cultivos agrícolas, erosão e contaminação alteram diretamente esse ambiente, produzindo impactos na diversidade da biota do solo.

Informações sobre a diversidade e o funcionamento das comunidades de fungos no solo permanecem relativamente escassas, comparando-se às comunidades bacterianas (HATTORI ET AL., 1997; OGRAM, 2000; KENT & TRIPLETT, 2002; DAGHINO ET AL., 2012). Assim se faz necessário o conhecimento dos organismos constituintes do solo, pois informações desta relevância são importantes para o desenvolvimento de estratégias de conservação e sustentabilidade mais eficientes.

A ocorrência e permanência de uma população no ecossistema estão diretamente condicionadas à sua habilidade de adaptação e de resposta às características ambientais (PERSIANI & CASADO, 1998; GRAYSTON & PRESCOTT, 2005). Logo, a atividade decompositora depende diretamente da quantidade e qualidade de matéria orgânica do solo, e esta é determinante sobre a distribuição desses micro-organismos (RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2004; CHAUVAT ET AL., 2007; COSTA ET AL., 2012).

É possível estimar a diversidade de fungos presentes no solo (CARVALHO, 2012), esta estimativa é totalmente depende do método utilizado para sua identificação, pois o número de isolados de fungos (unidades formadoras de colônias - UFCs) ou de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) obtido varia em função da metodologia adotada (GAMS, 2007). Com os métodos baseados em cultivo é possível estimar apenas uma pequena parte da comunidade total de

fungos, pois uma parcela considerável desta comunidade não cresce ou não produz esporos em meio de cultura (O'BRIEN ET AL., 2005). Recentemente, técnicas moleculares baseadas na extração DNA de amostras ambientais e seguidas de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) têm proporcionado uma nova visão da diversidade microbiana, permitindo a caracterização de comunidades microbianas complexas, que não dependem do cultivo de micro-organismos (O'BRIEN ET AL., 2005). Vários métodos de separação de amplicons podem ser utilizados para estudo da estrutura das comunidades de fungos do solo e permitem a identificação de modificações nas populações ao longo do tempo, ou em diferentes áreas, ou sob diferentes tratamentos. Dentre tais métodos, os mais utilizados são o Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição terminal (T-RFLP), a Análise automatizada do espaço intergênico ribossomal (ARISA), o Polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) e a Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (MUYZER ET AL., 1993; AVANISS-AGHAJANI ET AL., 1994; FISCHER ET AL., 1998).

Técnicas moleculares como a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), representa uma boa alternativa em estudos de comunidades microbianas por apresentar alta sensibilidade, reprodutibilidade, de baixo custo e permitir uma comparação rápida da estrutura das comunidades fúngicas do solo (COSTA ET AL., 2012; DAGHINO, ET AL., 2012). Esta técnica se destaca, entre as mais utilizadas para análises de comunidades de fungos e bactérias do solo. MUYZER ET AL., (1993) foi pioneiro na utilização do DGGE em estudos de ecologia microbiana avaliando a estrutura de comunidades bacterianas. A técnica do DGGE mostra-se eficiente em detectar e acompanhar alterações na composição da comunidade fúngica (COSTA ET AL., 2012), estando esta, sob a influência de práticas agrícolas e/ou impactos naturais ou antropógenos.

Por proporcionar a identificação do polimorfismo no rDNA de amostras de DNA amplificadas via PCR com primers específicos, o DGGE é utilizada em estudos de

diversidade genética em diversas comunidades de solo sob diferentes condições (BEAUREGARD, ET AL., 2013). O efeito da adição de lodo de esgoto, incluindo lodos ricos em cádmio, cobre e zinco foram observados na composição da comunidade de fungos do solo usando-se rDNA e rRNA em perfil de DGGE (ANDERSON, 2008).

A adição do lodo de esgoto alterou os padrões de bandeamento em DGGE (KOZDRKOJ, 2001), no entanto não houve efeito adicional de aumento de concentrações de metais pesados no solo. Solos com adição de metais pesados podem ser caracterizados por uma comunidade diferente em riqueza e estrutura de populações de micro-organismos dominantes através da técnica PCR-DGGE (KOZDRKOJ, 2001).

Técnicas moleculares de *fingerprinting*, clonagem e seqüenciamento são cada vez mais utilizadas para a avaliação de comunidades de fungos (TIAN, ET AL., 2013). Na última década, o sequenciamento de DNA forneceu novas alternativas para análise filogenética dos fungos.

A caracterização da estrutura e função da microbiota de um solo tratado com lodo de esgoto pode contribuir gerando informações importantes sobre os processos ecológicos e a sustentabilidade deste sistema.

Neste trabalho objetivou-se analisar variações na estrutura da comunidade de fungos em solo tratado com lodo de esgoto sob a cultura do milho por eletroforese em gel com gradiente desnaturante e avaliar o impacto da adição de doses crescentes de lodo de esgoto após um período de 13 anos sobre a comunidade de fungos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS EXPERIMENTAIS

As áreas experimentais localizam-se na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - Campus de Jaboticabal – SP. Os experimentos foram inicialmente instalados em novembro de 1997, adotando-se o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com quatro tratamentos e cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais de 60 m² (6 m x 10 m) cada, com área útil de 12 m². Os tratamentos utilizados foram testemunha com fertilização convencional (0 t ha⁻¹ de LE), 5 t ha⁻¹ de LE, 10 t ha⁻¹ de LE e 20 t ha⁻¹ de LE, base seca. Estes tratamentos foram estabelecidos de modo a fornecer 0, 100, 200 e 400% de todo o nitrogênio exigido pela cultura do milho, admitindo-se que 1/3 do nitrogênio contido no LE se encontrava disponível para as plantas. As doses totais acumuladas de LE foram obtidas considerando-se 13 anos de plantio: 5 t ha⁻¹: 65,0 t ha⁻¹ de LE (13 anos x 5 t ha⁻¹ de LE, base seca); 10 t ha⁻¹: 130,0 t ha⁻¹ de LE (13 anos x 10 t ha⁻¹ de LE, base seca); 20 t ha⁻¹: 207,5 t ha⁻¹ de LE (3 anos x 2,5 t ha⁻¹ de LE + 10 anos x 20 t ha⁻¹ de LE, base seca).

O experimento 1 foi conduzido em LATOSSOLO VERMELHO eutrófico típico (LVef), textura argilosa, a moderado caulínico-oxídico, altitude 550 m, latitude 21° 14' 46,81" S e longitude 48° 17' 07,85" W; e o experimento 2 em LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (LVd), textura média, A moderado caulínico (EMBRAPA, 2006), localizado a uma altitude de 620 m, latitude 21° 13' 57,96" S e longitude 48° 17' 06,18" W. O clima na região é classificado, segundo Köppen, como subtropical de inverno seco (Aw) (VOLPE; CUNHA, 2008).

Tabela 1 Valores médios da composição granulométrica de amostras de solo coletadas em diferentes camadas de LATOSSOLO VERMELHO eutroférico argiloso (LVef) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico textura média (LVd).

| Fração | LATOSSOLO VERMELHO eutroférico (LVef) | | | LATOSSOLO VERMELHO distrófico (LVd) | | |
|--------------|---------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|----------|----------|
| | 0-0,1m | 0,1-0,2m | 0,2-0,3m | 0-0,1m | 0,1-0,2m | 0,2-0,3m |
| | -----g kg ⁻¹ ----- | | | | | |
| Argila | 485 | 508 | 525 | 245 | 278 | 285 |
| Silte | 297 | 281 | 273 | 68 | 62 | 63 |
| Areia total | 219 | 212 | 202 | 678 | 661 | 652 |
| Areia grossa | 90 | 86 | 77 | 388 | 349 | 356 |
| Areia fina | 129 | 126 | 125 | 299 | 312 | 296 |

Fonte: Melo et al. (2004)

2.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO E LODO DE ESGOTO

Foram colhidas amostras compostas dos dois solos (0 a 0,20 m de profundidade) para fins de caracterização dos atributos químicos. Os solos foram secos à sombra e ao ar, destorroados, tamisados em peneira de malha 2 mm (TFSA) e acondicionados em sacos plásticos. As análises químicas de fertilidade dos solos foram realizadas pelo Departamento de Solos e Adubos, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, o qual está ligado ao Programa de Qualidade de Análise de Solo do Sistema IAC – Instituto Agrônômico de Campinas, segundo os métodos de Raij et al (2001). A adubação e dose de calcário foram calculadas considerando saturação por bases de 70% para todas as parcelas. Foram aplicadas doses de calcário (PRNT = 90%) que variaram de 2,5 a 4,0 t ha⁻¹ em LVef e de 1,2 a 2,7 t ha⁻¹ em LVd, de acordo com as recomendações de Raij e Cantarella (1997). A aplicação de calcário para fins corretivos foi feita anualmente no período de 13 anos.

O LE utilizado nos experimentos foi obtido junto à Estação de Tratamento de Esgoto da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (ETE-Sabesp), localizada no município de Barueri. O LE foi proveniente dos esgotos da

grande São Paulo e é constituído por uma mistura de esgotos domiciliares e industriais. Após o recebimento e acondicionamento do LE em local impermeabilizado, foi realizado o procedimento de amostragem conforme orientações estabelecidas pelo anexo A da norma NBR 10.007 (ASSOCIAÇÃO, 2004). A amostra obtida foi dividida em duas partes, sendo a primeira parte da amostra do LE seca em estufa a 105°C até atingir massa constante. Após a secagem, foi determinada a umidade, permitindo-se dimensionar as quantidades do LE úmido a serem distribuídas em cada tratamento. A segunda parte foi seca em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C até atingir massa constante. A amostra de LE foi desagregada com auxílio de almofariz e pistilo de porcelana, peneirada em peneira de 0,42 mm e homogeneizada, sendo então acondicionada em frasco hermeticamente fechado (ABREU ET AL., 2009). Análises físico-químicas (Tabela 2) foram realizadas para caracterizar os atributos do potencial agrônômico do LE, conforme anexo II da resolução 375 (CONAMA, 2006).

Tabela 2 Atributos do potencial agrônômico do lodo de esgoto (base seca) aplicado no período de 2009/2010.

| Atributos | Concentrações |
|-------------------------|---------------------------|
| Carbono Orgânico | 246,75 g kg ⁻¹ |
| P total | 20,36 g kg ⁻¹ |
| N Kjeldahl | 24,8 g kg ⁻¹ |
| pH em água | 5,80 |
| pH em CaCl ₂ | 5,54 |
| K total | 2,38 g kg ⁻¹ |
| Na total | 1,08 g kg ⁻¹ |
| Ca total | 15,87 g kg ⁻¹ |
| Mg total | 4,23 g kg ⁻¹ |
| Umidade | 81,3 % |

2.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos em LVef e LVd foram conduzidos no ano agrícola 2009/2010. A incorporação do LE ao solo foi feita em dezembro de 2009, considerando-se a umidade residual do material. O LE foi aplicado a lanço, distribuído uniformemente por toda a área da parcela e incorporado ao solo com auxílio de grade leve. Após a incorporação do LE procedeu-se a semeadura do milho (híbrido simples AG 5020), em espaçamento de 0,9 m entre linhas e densidade de 7 a 8 plantas por metro linear. As parcelas receberam complementação das doses de P e K exigidas pela cultura (RAIJ; CANTARELLA, 1997), de acordo com análise química dos solos e LE (Tabela 3). A adubação de cobertura para N e K, deu-se aos 25 e 40 dias após a emergência das plântulas. A testemunha (0 t ha⁻¹ LE) recebeu adubação com N (Uréia) e os demais tratamentos receberam a aplicação K (cloreto de potássio) (NOGUEIRA, 2008).

Tabela 3 Atributos químicos do LATOSSOLO VERMELHO eutroférico (LVef) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico (LVd).

| LE | pH | MO | P resina | K | Ca | Mg | H+Al | SB | CTC | V |
|-------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------------|------|-----|------|-------|--------|------|
| t ha ⁻¹ | CaCl ₂ | g dm ⁻³ | mg dm ⁻³ | -----mmolc dm ⁻³ ----- | | | | | | % |
| LATOSSOLO VERMELHO eutroférico LVef | | | | | | | | | | |
| 0 | 4,62 | 21,4 | 31,0 | 3,66 | 22,6 | 7,2 | 50,4 | 33,46 | 83,86 | 39,8 |
| 5 | 4,60 | 24,0 | 34,8 | 3,42 | 24,8 | 7,6 | 56,4 | 35,88 | 92,22 | 39,2 |
| 10 | 4,74 | 26,0 | 80,8 | 4,16 | 32,2 | 9,0 | 54,8 | 45,36 | 100,16 | 45,2 |
| 20 | 4,40 | 26,2 | 86,0 | 2,98 | 22,4 | 5,8 | 70,4 | 31,18 | 101,58 | 30,6 |
| LATOSSOLO VERMELHO distrófico LVd | | | | | | | | | | |
| 0 | 4,66 | 19,4 | 47,8 | 2,14 | 18,6 | 4,8 | 39,0 | 25,54 | 64,54 | 40,0 |
| 5 | 4,98 | 19,8 | 55,2 | 2,46 | 24,6 | 6,8 | 32,2 | 33,86 | 66,06 | 51,2 |
| 10 | 4,84 | 21,2 | 95,6 | 2,50 | 26,2 | 6,2 | 40,0 | 34,90 | 74,90 | 47,0 |
| 20 | 4,50 | 20,2 | 94,0 | 2,00 | 19,2 | 4,6 | 49,8 | 25,8 | 75,60 | 35,2 |

LE: Lodo de esgoto MO: matéria orgânica; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca de cátions; V: saturação por bases.

2.4 DIVERSIDADE GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE FUNGOS DO SOLO ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE (DGGE)

A população total de micro-organismos do solo foi avaliada através da extração de DNA total de amostras de 500 mg de solo, utilizando-se o protocolo descrito pelo “Fast Kit DNA for soil”, BIO101. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotometro *nanodrop* (NANODROP TECHNOLOGIES, USA) e posteriormente diluído para a concentração de 20ng. A amplificação por PCR foi realizada com iniciadores universais NS1 e FR1GC (VAINIO E HANTULA, 2000) do RNA ribossomal de fungos respectivamente com uma sequência “grampo” de CG na extremidade 5’ do “primer” forward. Os fragmentos amplificados e as sequências dos iniciadores utilizados nesse estudo estão indicados na tabela 4.

Tabela 4 Sequências dos iniciadores utilizados, fragmento esperado e grupo alvo utilizadas para PCR feita em amostra de solo não rizosférico e rizosférico tratados com diferentes doses de lodo de esgoto no cultivo de milho em dois experimentos conduzidos em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (LVef) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (LVd) .

| Iniciador | Sequência | Fragmento esperado (bp) | Grupo alvo |
|-----------|------------------------------|-------------------------|------------|
| *FR1GC | AI CCA TTA AAT CGG TAI T | – | Fungos |
| NS1 | GTA GTC ATA TGC TTG TCT C | 1650 | Fungos |

*GC- CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GCG GGG GCA CGG GCC G

Para teste de eficiência dos iniciadores foram usados como controle o DNA de espécies de fungos previamente conhecidas *Aspergillus sp.*, *Trichoderma*

koningii, *Trichoderma reesei*, *Colletotrichum sublineolum*, *Colletotrichum graminicola* e *Phaeosphaeria*.

Para os pares de iniciadores FR1GC e NS1, foi utilizado na reação um volume final de 50µl, com aproximadamente 20ng de DNA molde, sendo o “mix” composto de 0,4µM de cada iniciador, 25 µM de cada dNTP, 1,0mM de MgCl₂, BSA 0,1% (Soro albumina bovina - 3 mg/mL), formamida 1% (v/v) e 2,5 unidade de Taq DNA Polimerase Long PCR Enzyme Mix (FERMENTAS LIFE SCIENCES). O tampão de reação foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as PCR desse trabalho foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well thermal cycler (Applied Biosystems). As reações seguiram os passos: 95°C por 2 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s; 47°C por 45 s; 68°C por 2 min; com um passo final de extensão a 68°C por 10 minutos.

A eletroforese foi realizada em uma unidade de DGGE da Biorad (RICHMOND,USA). Os gradientes com concentração de desnaturantes de 18% a 43% foram formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (7,5%).

Os produtos de PCR foram padronizados de acordo com sua quantificação em espectrofotometro *nanodrop* (NanoDrop Technologies, USA), considerando-se a menor concentração e aplicados em gel contendo 7,5% de poliacrilamida, usando uma solução desnaturante 100% (7M uréia e 40% formamida) e uma solução 0% (sem uréia e formamida). As condições de eletroforese foram de 18h a 60°C e 180V em tampão TAE 1X (VAINIO E HANTULA, 2000). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de gel red e fotografado em fotodocumentador Eagle Eye Gel Logic 200 Imaging System. Os perfis obtidos no gel de poliacrilamida foram analisados através do programa” BioNumerics” (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica) para construção de relações filogenéticas (dendrogramas), pelo método do agrupamento de UPGMA (UNWEIGHTED PAIR-GROUP METHOD WITH ARITHMETIC MEANS, SNEATH & SOKAL, 1973) e coeficiente de JACCARD.

Os dados obtidos com o auxílio do programa “BioNumerics”, foram utilizados para calcular a riqueza, o índice de diversidade Shannon, e a equitabilidade. A riqueza representa o número de bandas no gel do PCR-DGGE, que se refere às unidades taxonômicas operacionais (operational taxonomic units – UTO). O índice de diversidade (Shannon) foi obtido de conforme: $H = -\sum ni/N * \ln (ni/N)$, onde ni é a intensidade da banda de DNA e N a soma da intensidade de todas as bandas de DNA. A equitabilidade foi expressa usando-se o índice de Pielou: $J' = H'(\text{observado})/H'(\text{máximo})$, onde $H'(\text{máximo}) = \ln S$ e $S =$ número total de espécies.

2.4.1 CLONAGEM DO GENE RIBOSSOMAL DE FUNGOS PRESENTES NO SOLO

Com o intuito de identificar as espécies de fungos presentes no solo tratado com lodo de esgoto foi realizada a amplificação do DNA total das amostras de solo tratadas com lodo de esgoto, utilizando os iniciadores FR1 e NS1, seguindo as condições 95°C por 2 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s; 47°C por 45 s; 68°C por 2 min; com um passo final de extensão a 68°C por 10 minutos.

Foram adicionados 500µL do meio de cultura CircleGrow ao microtubo de 1,5mL que ficou sob agitação a temperatura constante de 37°C por 1 hora. Após este período 100µL do produto foram plaqueados em meio CircleGrow, contendo ampicilina (100µg/ml), IPTG (0,5mMol) e X-Gal (80µg/ml) seguido de incubação à temperatura de 37°C por 16h.

As colônias positivas foram individualizadas em novas placas contendo meio CircleGrow com ampicilina (50µg/ml) utilizando ponteiras de 10µL, previamente esterilizadas em autoclave. O período de incubação se deu a temperatura constante de 37°C por 16h.

2.4.2 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

A extração do DNA plasmidial foi feita de acordo com Sambrook e Russell, (2001). As colônias de *E. coli* contendo plamídios foram inoculadas em 5mL de meio de cultura CircleGrow contendo ampicilina (100µg/ml) e foram incubadas por 16h a 37°C.

O volume da cultura foi distribuído em microtubos e centrifugou-se a 7000 rpm por 1 mim. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 250 µL de tampão de extração. Também foram adicionados 250 µL da solução de lise alcalina com posterior inversão dos microtubos por 3 vezes. Incubou-se as amostras em gelo por 5 mim. Em seguida adicionou-se 300 µL de solução de acetato de potássio 5M gelada procedendo-se a inversão dos tubos. As amostras foram novamente incubadas em gelo por 5 mim.

Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 3 mim á 12000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Foram adicionados á amostra 500 µL de isopropanol e as amostras foram mantidas á temperatura ambiente por 30 mim. Procedeu-se nova centrifugação e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Uma vez lavado o precipitado fez-se nova centrifugação e após este procedimento o precipitado foi ressuspendido em 50 µL de TE adicionando-se 1 µL de RNase (40 µg/mL). Incubou-se as amostras contendo RNase por 30 mim á 37°C.

O DNA plasmidial ressolubilizado foi quantificado em gel de agarose e espectrofotômetro *nanodrop* (NanoDrop Technologies, USA) e armazenado a -20° C.

2.4.3 SELEÇÃO DE CLONES VIA PCR-DGGE E SEQUENCIAMENTO

Os clones a serem sequenciados foram selecionados previamente por PCR-DGGE. O DNA plasmidial teve sua concentração padronizada para 100ng diluindo-o em água ultrapura autoclavada e utilizando-se como “molde” para a PCR que utilizou

os iniciadores FR1GC/ NS1, conforme as condições descritas acima. A seleção dos clones foi baseada na posição das bandas apresentadas no DGGE, através dos grupamentos formados em dendrograma, sendo selecionados aqueles que migraram para posições diferentes no gel de acrilamida, de modo a representar a diversidade do rDNA da comunidade fúngica.

As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se 100ng de DNA plasmidial, 2µL de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2µL de tampão 5X (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1µL do iniciador FR1, NS1 e água ultrapura, com volume final de 10µL. As reações foram submetidas a 96°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos, repetidos por 30 ciclos.

Ao término da reação, foram adicionados ao produto 40µL de isopropanol 75% (v/v), seguido de homogeneização e incubação no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos.

Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 45 minutos. O isopropanol foi retirado, vertendo-se diretamente as placas. Foram adicionados 10µL de etanol gelado 70% (v/v) e centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos. Retirou-se o etanol, vertendo novamente a placa e deixando o *pellet* secar em estufa a 65° C por 3 minutos. Por último, adicionou-se ao *pellet* 10µL de formamida HI-DI que foi submetido à desnaturação no termociclador a 95° por 5 minutos. O sequenciamento está sendo realizado em sequenciador capilar automático ABI 3100 (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante.

3 RESULTADOS

3.1 DIVERSIDADE GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE FUNGOS DO SOLO ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE (DGGE)

Alguns amplicons (bandas) estão presentes na maioria dos tratamentos, sugerindo a presença de UTOs, que independentemente do tratamento aplicado, encontram-se estabelecidos naquele ambiente. Estas UTOs possivelmente já se encontravam estabelecidas neste ambiente anteriormente a aplicação do lodo de esgoto do décimo terceiro ano. Tal estabelecimento destas UTOs pode ser atribuído a uma condição de resiliência adquirida por elas ao longo de sucessivos cultivos que receberam o lodo de esgoto em doses crescentes determinadas pelos tratamentos de 0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹. Comunidades de micro-organismos pré-estabelecidas em um ambiente não podem ser consideradas como bioindicadores de qualidade do solo, pois não refletem a ocorrência de impactos gerados pela aplicação do lodo de esgoto. No entanto, a visualização de amplicons em diferentes posições em perfis de DGGE é indicativo de novas UTOs (indivíduos e/ou comunidades) estando estas diretamente relacionadas ao tipo de manejo realizado no ambiente, por exemplo, a adição de resíduos como o lodo de esgoto. A estrutura da comunidade de fungos do solo é um indicativo direto sobre a atual situação deste ambiente, isto é, se a adição de lodo de esgoto ao longo de 13 anos consecutivos ocasionou impactos ou incremento sobre esta população. Neste trabalho pode-se observar uma diferenciação no posicionamento de alguns amplicons, em função do solo e tratamento aplicado (Figura 1). Esta diferenciação pode ser atribuída à existência de UTOs diferentes nas amostras do presente estudo e pode ter sido decorrente do efeito direto das doses crescentes de lodo de esgoto ao longo de 13 anos de aplicação, uma vez que este resíduo pode influenciar diretamente a comunidade fúngica em um ambiente, tanto para o incremento de sua diversidade como também

selecionando indivíduos e/ou comunidades. Resíduos sólidos como o LE podem atuar sobre determinados organismos, podendo apresentar efeito residual sobre outros micro-organismos, promovendo alterações sobre a estrutura da comunidade de fungos do solo.

A partir da matriz de similaridade, gerada pelo coeficiente de Jaccard, foi determinado o percentual de similaridade de cada tratamento (0, 5, 10 e 20 t ha⁻¹). Foram formados grupos a partir de 47% de similaridade estendendo-se até a formação de 1 grupo com amostras idênticas possuindo este 100% de similaridade. A maioria dos grupos formados compreendeu a faixa entre 80 e 100% de similaridade, e foi composta pelas repetições de um mesmo tratamento e tipo de solo e efeito quanto à origem do solo.

É possível observar a ramificação dos braços ancestrais da árvore, formando 4 grupos distintos. Porém cada grupo foi formado pelas amostras representantes do mesmo tipo de solo (LVef ou LVd) e pelo mesmo efeito (não rizosférico/NR ou rizosférico/ SR).

Quanto aos valores de diversidade (Shannon), riqueza (UTOs) e equitabilidade (J), gerados de acordo com padrão de amplicons de cada amostra a partir da eletroforese em DGGE, foram detectadas diferenças para estas variáveis em LVd somente no efeito não rizosférico/NR (Tabela 4). Os tratamentos com 0 e 5 t ha⁻¹ apresentaram os maiores valores de diversidade (5,72 e 5,82 respectivamente). Já o tratamento 0 t ha⁻¹, se destacou entre os demais apresentando os maiores valores para riqueza e equitabilidade respectivamente (15,5 e 2,09). Não foi observada diferença em LVef para as variáveis analisadas.

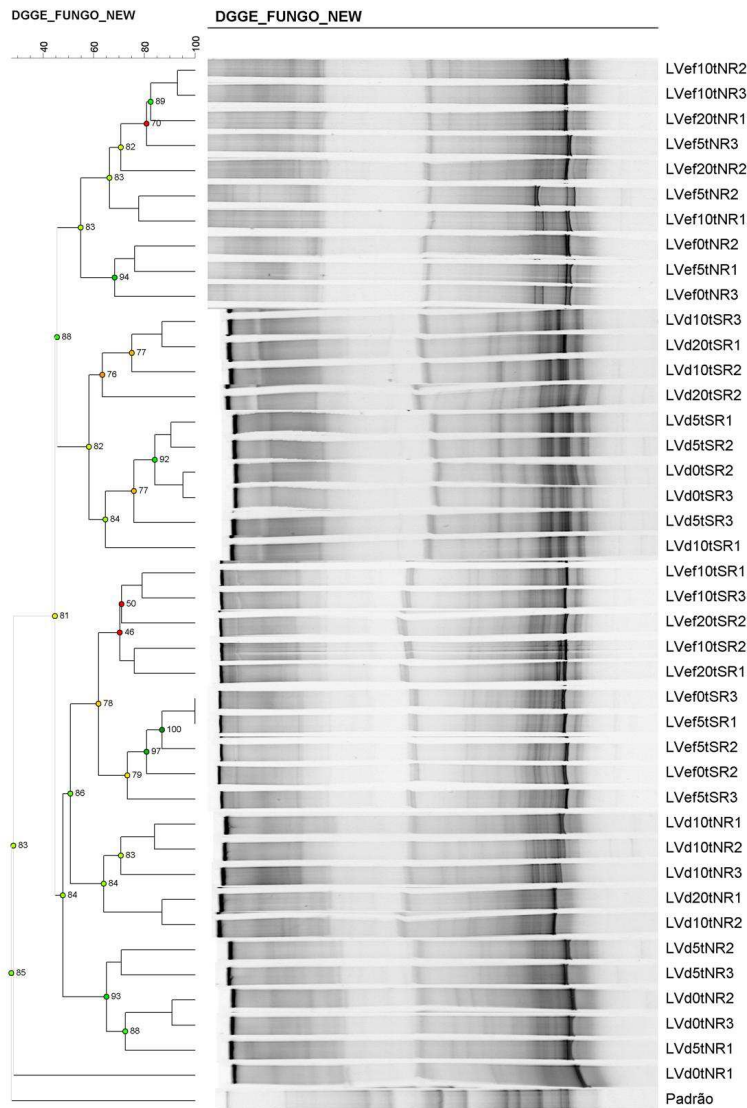


Figura 1 Dendrograma representando a distância e o padrão de amplicons correspondentes ao gene 18S rDNA obtido pela técnica PCR-DGGE em cada amostra de solo não rizosférico (NR) e rizosférico (SR) tratados com diferentes doses de lodo de esgoto no cultivo de milho em dois experimentos conduzidos em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (LVer) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (LVd).

Tabela 5. Diversidade (índice de Shannon), Riqueza e equitabilidade (J), da população de fungos de amostras de solo não rizosférico (SN) e solo rizosférico (SR) tratados com diferentes doses de lodo de esgoto no cultivo de milho em LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (LVef) e LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (LVd).

| LATOSSOLO VERMELHO eutroférico típico (LVef) | | | | | | |
|--|-------------|-------|---------|--------|--------------------|-------|
| Tratamento | Shannon | | Riqueza | | Equitabilidade (J) | |
| | SN | SR | SN | SR | SN | SR |
| 0 t ha ⁻¹ | 5,72b | 5,64a | 15,50b | 21,50a | 2,09a | 1,84a |
| 5 t ha ⁻¹ | 5,82ba | 5,59a | 24,00a | 21,66a | 1,83b | 1,82a |
| 10 t ha ⁻¹ | 5,92a | 5,67a | 26,33a | 21,66a | 1,81b | 1,84a |
| 20 t ha ⁻¹ | 5,96a | 5,67a | 23,50a | 22,00a | 1,89b | 1,83a |
| LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (LVd) | | | | | | |
| Tratamento | Shannon (H) | | Riqueza | | Equitabilidade (J) | |
| | SN | SR | SN | SR | SN | SR |
| 0 t ha ⁻¹ | 5,84a | 5,75a | 17,66a | 20,05a | 2,09a | 1,90a |
| 5 t ha ⁻¹ | 5,78a | 5,82a | 20,33a | 20,00a | 1,92a | 1,94a |
| 10 t ha ⁻¹ | 5,72a | 5,78a | 24,33a | 22,66a | 1,79a | 1,85a |
| 20 t ha ⁻¹ | 5,83a | 5,78a | 22,00a | 20,50a | 1,88a | 1,91a |

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si.

4 DISCUSSÃO

A recomendação da aplicação de lodo de esgoto em áreas agrícolas tem sido amplamente difundida, pois possui propriedades tanto como fonte de nutrientes quanto como condicionador de solos, proporcionando aumento nos teores de MOS, CTC, pH, aumento na capacidade de retenção de água e estabilidade de agregados do solo e incremento na produção de grãos de milho (PAUL & CLARCK, 1996; HAN & SCULLION, 2000; DIAS ET AL. 2007; MELO ET AL., 2007). O lodo de esgoto apresenta em sua composição em média 40% de matéria orgânica (MO), 4% de N, 2% de P e demais macro e micronutrientes mais também diversos poluentes, como metais pesados e organismos patogênicos ao homem (BETTIOL & CAMARGO, 2001; MELO ET AL., 2004). Porém, a disponibilidade destes metais pesados no solo

e seu efeito sobre a microbiota, dependem tanto da quantidade quanto da qualidade da matéria orgânica adicionada (BANERJEE ET AL., 1997). Nogueira et al., (2009), em estudos realizados em solos brasileiros relatou que a aplicação de lodo de esgoto não afetou o teor de Ni no solo, mas houve acúmulo de Ni em folhas e colmos e não nos grãos.

A MO proveniente do lodo de esgoto e a MO do solo podem atuar na complexação de metais, reduzindo a sua disponibilidade em curto prazo e, conseqüentemente, a sua toxicidade (LO ET AL., 1992). Não há garantias que por não haver efeitos prejudiciais da aplicação de lodo contendo metais pesados, em curto prazo, não possa ocorrer efeitos prejudiciais sobre as atividades e comunidades microbianas posteriormente (WITTER ET AL., 1994). Desta forma, a utilização de lodo de esgoto em solos agrícolas deve ser continuamente assistida e planejada cuidadosamente. Isso se torna ainda mais presente nas áreas que recebem por longo tempo aplicações elevadas de lodo, em razão de esse resíduo conter moléculas orgânicas de grande persistência no ambiente, que podem ser nocivas aos micro-organismos do solo. A utilização de altas doses de bio-sólidos pode aumentar o potencial de impacto ambiental, devido à presença de espécies químicas tóxicas, implicando em modificações na diversidade biológica do solo e alterações de sua funcionalidade (WITTER ET AL., 1994). A diminuição da diversidade microbiana no solo pode, em última análise, resultar em diminuição da ciclagem de nutrientes e crescimento de plantas, muito embora a maioria das atividades microbianas apresente alto grau de redundância funcional.

A aplicação de lodo de esgoto resultou em incremento na comunidade e estrutura de fungos nos dois solos avaliados. A técnica da PCR-DGGE permitiu a identificação de variações na diversidade e estrutura de comunidades fungicas em solo tratado com lodo de esgoto. Os resultados obtidos corroboram os obtidos por outros autores (MUYZER ET AL., 1993; CARVALHO, 2012; COSTA ET AL., 2012; DAGHINO ET AL., 2012; POULSEN ET AL., 2013).

O efeito da adição de lodo de esgoto, incluindo lodos ricos em cádmio, cobre e zinco foi observado na composição da comunidade de fungos do solo usando-se rDNA e rRNA em perfil de DGGE (ANDERSON, 2008). A ausência de efeito negativo do lodo de esgoto sobre a comunidade de fungos do solo pode ter ocorrido porque ao longo dos treze anos não houve acúmulo de metais pesados no solo (LIMA, 2011). A adição de lodo de esgoto alterou os padrões de bandamento em DGGE, no entanto não houve efeito adicional de aumento de concentrações de metais pesados no solo. De acordo com KozdrKoj, 2001 solos com adição de metais pesados podem ser caracterizados por uma comunidade diferente em riqueza e estrutura de populações de micro-organismos dominantes de um solo através da técnica PCR-DGGE, o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho.

No presente estudo diferenças de diversidade e riqueza foram encontradas apenas em LVef, nas menores doses de lodo (0 e 5) em solo não rizosferico. Val-Moraes et al., (2011), relata que estrutura da comunidade microbiana pode variar de acordo com as doses de lodo de esgoto aplicadas ao solo. Os autores descrevem que em doses menores do resíduo aplicado pode haver o favorecimento da comunidade microbiana enquanto doses maiores podem a inibir.

Fungos são particularmente adaptados em degradar substâncias complexas, como exemplo, substâncias contidas em lodo de esgoto. Este fato favorece a resiliência da comunidade de fungos de solos que receberam a adição de resíduos como o lodo de esgoto, fato ocorrido neste estudo. A habilidade dos fungos em degradar substratos complexos de origem vegetal representa até 90% da produtividade primária na maioria dos ecossistemas terrestres. O equilíbrio dinâmico das populações na comunidade de fungos do solo pode sofrer modificações influenciadas pelas interações benéficas e/ou antagônicas dos micro-organismos, determinando a composição qualitativa e quantitativa da comunidade (RAVERKAR & KONDE, 1988), o que também justifica o aparecimento de amplicons (UTOS) diferentes, nos perfis de DGGE de cada amostra dos solos estudados.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o uso de lodo de esgoto não influencia negativamente a comunidade de fungos nos solos tratados ao longo de 13 anos. No entanto, na literatura existem relatos de efeitos positivos e negativos da aplicação de lodo de esgoto. Quando aplicado ao solo, causa alterações na estrutura e no funcionamento do agroecossistema, sendo a comunidade microbiana um dos componentes mais sensíveis, podendo ser utilizada como indicador da qualidade dos solos (DICK, 1994; GILLER ET AL., 1998). A aplicação de lodo de esgoto pode tanto estimular, devido ao aumento de carbono e nutrientes disponíveis, como inibir, devido à presença de metais pesados e outros poluentes, a atividade microbiana do solo (BAATH, 1989; GILLER ET AL., 2009; MACDONALD ET AL., 2011). A aplicação de lodo de esgoto contendo Zn afetou negativamente a população de rizóbio indígena de trevo branco (CHAUDRI ET AL., 2008). O comportamento da população microbiana depende da qualidade e da quantidade dos resíduos que estão sendo adicionados ao solo. Alguns trabalhos descrevem que a aplicação de lodo de esgoto aumentou a atividade microbiana no solo (FERMANDES, 2005; MELO ET AL., 2007; ANTONIOUS, 2009; VAL-MORAES ET AL., 2011). Dessa forma, é indispensável em estudos sobre o uso agrícola do lodo de esgoto o conhecimento sobre as alterações nas comunidades e nas atividades microbianas do solo, uma vez que os micro-organismos têm vital importância e assumem a função de biorremediadores, na degradação de agentes poluidores. Muitos avanços ocorreram no que diz respeito à avaliação ecotoxicológica de metais pesados e seus efeitos sobre organismos do solo, mas grandes lacunas permanecem no que diz respeito à forma de como os micro-organismos são expostos e respondem a adição de metais pesados em solos (GILLER, 2009). Neste trabalho os metais pesados presentes no lodo de esgoto não resultaram em efeitos negativos sobre as comunidades fúngicas dos solos estudados.

A diversidade de fungos em amostras ambientais vem sendo estudada detalhadamente (VAINIO E HANTULA, 2000; HIBBETT ET AL., 2009; CARVALHO,

2012). A técnica do DGGE é uma das mais indicadas em estudos que requerem a avaliação da distribuição temporal e espacial de populações de fungos do solo, tornando também possível conhecer a sua diversidade e estrutura (COSTA ET AL., 2012). É amplamente utilizada em estudos de microbiologia ambiental e ecologia microbiana (MUYZER, 1999). Se torna uma prática muito adequada quando o objetivo é comparar duas ou mais amostras. Se o padrão de amplicons (bandeamento) apresentado for diferente, então, certamente as comunidades microbianas apresentam diferenças, caso o padrão de amplicons seja o mesmo, então as diferenças podem estar representadas pelas mesmas comunidades microbianas (MUYZER, 1993). Os perfis obtidos refletem a composição dominante da microbiota, formando um padrão entre as amostras analisadas. Outra forma de interpretação dos géis pode ser em relação à intensidade das bandas presentes nos perfis, onde a intensidade estaria diretamente ligada à densidade populacional de bactérias presentes na amostra (FROMIN et al., 2002). A diversidade das populações de fungos amostradas nos diferentes tratamentos não sofreu efeito negativo da aplicação de lodo de esgoto o que indica que o uso destes resíduos é seguro sobre o ponto de vista ambiental e que o metal pesado acumulado no solo não atingiu nível de toxidez para os fungos presentes no solo.

Exemplos de estudos envolvendo diversidade de fungos, como o proposto neste estudo, são os conduzidos por O'Brien et al., (2005), Buée et al., (2009) e Lim et al., (2010). Estes autores descrevem a identificação de variadas sequencias de fungos, onde algumas UTOS eram de única ocorrência e algumas UTOS eram grupos taxionômicos das amostras de solos estudados.

O levantamento de fungos no solo tem sido eficaz para ampliar o conhecimento sobre a diversidade desses micro-organismos, permitindo que novas espécies sejam conhecidas e novos registros sejam feitos, o que abre a possibilidade de sua posterior utilização em diversos fins (MARQUES ET AL., 2008; CARVALHO, 2012; COSTA ET AL., 2012).

Um importante resultado para complementar os resultados obtidos neste trabalho é o sequenciamento das amostras decorrentes das clonagens e identificação das espécies fúngicas predominantes nas amostras. Estes dados serão importantes para indicar se espécies ou comunidades fúngicas presentes nos solos que receberam lodo de esgoto sofreram efeito específico da aplicação deste resíduo.

5 CONCLUSÕES

A utilização de lodo de esgoto não influenciou negativamente a comunidade fúngica nos solos estudados após 13 anos de aplicação.

A utilização de lodo de esgoto promove o incremento de fungos e/ou comunidades fúngicas em LVef e LVd.

A técnica da PCR-DGGE foi eficiente ferramenta utilizada na identificação de mudanças ocorridas na estrutura de comunidades fúngicas.

6 REFERÊNCIAS

ABREU, M. F.; ABREU JUNIOR, C. H.; SILVA, F. C.; SANTOS, G. C. G.; GOMES, T. F.; COSCIONE, A. R.; ANDRADE, C. A. **Análises químicas de fertilizantes orgânicos (urbanos)** In: SILVA, F. C. (Ed.) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

ANDERSON, I. C.; PARKIN, P. I.; CAMPBELL, C. D. **DNA- and RNA-derived assessments of fungal community composition in soil amended with sewage sludge rich in cadmium, copper and zinc.** Soil Biology & Biochemistry. V. 40, p. 2358–2365, 2008.

ANTONIOUS, G. F. **Enzyme activities and heavy metals concentration in soil amended with sewage sludge.** Journal of Environmental Science and Health Part A. V. 44, p. 1019–1024, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **NBR-10.007: amostragem de resíduos sólidos.** 2. ed. Rio de Janeiro, 2004.

AVANISS-AGHAJANI, E.; JONES, K.; CHAPMAN, D.; BRUNK, C. **A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences.** BioTechniques, New York, v. 17, p. 144-149, 1994.

BAATH, E. **Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations: a Review** Water Air. Soil. Poll., 47:335-379, 1989.

BANERJEE, M.R.; BURTON, D.L.& DEPOE, S. **Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics.** Agric. Ecosyst. Envir., 66:241-249, 1997.

BEAUREGARD, M.S.; GAUTHIER, M.P.; HAMEL, C.; ZHANG, T.; WELACKY, T.; TAN, C.S.; ST-ARNAUD, M. **Various forms of organic and inorganic P fertilizers did not negatively affect soil- and root-inhabiting AM fungi in a maize–soybean rotation system.** *Mycorrhiza* (2013) 23:143–154.

BETTIOL, W. & CAMARGO, O.A. **Reciclagem de lodo de esgoto na agricultura.** In: MELO, I.S.; SILVA, C.; SCRAMIN, S. & SPESSOTO, A., eds. *Biodegradação*. Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, 2001. p.93-113.

BILLS, G.F.; CHRISTENSEN, M.; POWELL, M.; THORN, G. Saprobiic soil fungi. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. (Ed.). **Biodiversity of fungi.** Inventory and monitoring methods. Amsterdam: Elsevier, 2004. p. 271-302.

BUÉE, M.; REICH, M.; MURAT, C.; MORIN, E.; NILSSON, R.H.; UROZ, S.; MARTIN, F. 454 **Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity.** *New Phytologist*, Oxford, v. 184, p. 449-456, 2009.

CARVALHO, V.G. **Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica.** Piracicaba, SP, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Esalq, 2012. 204p. (Tese Doutorado)

CHAUDRI, A.; GRATH, E. M.; GIBBS, P.; CHAMBERS, B.; CARLTON-SMITH, C.; BACON, J.; CAMPBELL, C.; AITKEN, M. **Population size of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: Effects of zinc, copper and cadmium.** *Soil Biology & Biochemistry*, V. 40, p. 1670–1680, 2008.

CHAUVAT, M.; PONGE, J.F.; WOLTERS, V. **Humus structure during a spruce forest rotation: quantitative changes and relationship to soil biota.** European Journal of Soil Science, Oxford, v. 58, p. 625–631, 2007.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução 375, Critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados.** Diário Oficial da União, Brasília. 29 de ago. 2006. 32 p.

COSTA, P.M.O.; SOUZA-MOTTA, C.M.; MALOSSO, E. **Diversity of filamentous fungi in different systems of land use.** Agroforest Syst.v. 85, p.195–203, 2012.

DAGHINO, S.; MURAT, C.; SIZZANO, E.; GIRLANDA, M.; PEROTTO, S. **Fungal Diversity Is Not Determined by Mineral and Chemical Differences in Serpentine Substrates.** Volume 7, September 2012.

DIAS, B.O.; SILVA, C.A.; SOARES, E.M.B.; BETTIOL, W. **Estoque de carbono e quantificação de substância húmicas em latossolo submetido à aplicação contínua de lodo de esgoto.** R. Bras. Ci. Solo, 31:701-711, 2007.

DICK, R.P. **Soil enzyme assays as indicators of soil quality.** In: DORAN, J.W.L.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Ed.). Defining soil quality for a sustainable environment. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124. (Soil Science Society of America Special Publication, 35).

EMBRAPA, **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.** Serviço de Produção de Informação, Brasília: Embrapa, 2006. 306 p.

FERNANDES, S. A. P.; BETTIOL, W.; CERRI, C. C. **Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity.** *Applied Soil Ecology*, V. 30, p.65–77, 2005.

FISCHER, M.M.; TRIPLETT, E. **Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, p. 4630-4636, 1999.

FROMIN, N.; HAMELIN, J.; TARNAWSKI, S.; ROESTI, D.; JOURDAINMISEREZ, K.; FORESTIER, N.; TEYSSIER-CUVELLE, S.; GILLET, F.; ARAGNO, M.; ROSSI, P. **Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns.** *Environmental Microbiology*, Oxford, v. 4, n.11, p. 634-643, Nov. 2002.

GAMS, W. **Biodiversity of soil-inhabiting fungi.** *Biodiversity and Conservation*, London, v. 16, p. 69-72, 2007.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. **Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness.** *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, 2004.

GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. **Heavy metals and soil microbes.** *Soil Biology & Biochemistry*, V. 41, p. 2031–2037, 2009.

GILLER, K.E.; WITTER, E.; McGRATH, S.P. **Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, p. 1389-1414, 1998.

GOMES, N. C. M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R.; RUMJANEK, N. G.; BUCHNER, A.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. **Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 69, n. 7, p. 3758-3766, July 2003.

GRAYSTON, S.J.; PRESCOTT, C.E. **Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia.** Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 37, p. 1157-1167, 2005.

HAN, M. & SCULLION, J. **Effect of soil on microbial responses to metal contamination.** Environ. Pollut., 110:115-125, 2000.

HATTORI, T.; MITSUI, H.; HAGA, H.; WAKAO, N.; SHIKANO, S.; GORLACH, K.; KASAHARA, Y.; EL-BELTAGY, A.; HATTORI, R. **Advances in soil microbial ecology and biodiversity.** Antonie Van Leeuwenhoek, Wageningen, v. 71, p. 21–28, 1997.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, New York, v. 105, n. 4, p. 1422-1432, Apr. 2001.

HIBBETT, D.S.; OHMAN, A., KIRK, P.M. Fungal ecology catches fire. New Phytologist, Oxford, v. 184, p. 279-282, 2009.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. **Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability.** Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 42, p. 1-13, 2010.

KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W. **Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems**. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 56, p. 211–236, 2002.

KOZDRKOJ, J.; VAN ELSAS, J. D. **Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling**. Applied Soil Ecology, V. 17, p. 31–42, 2001.

LIM, Y.W.; KIM, B.K.; KIM, C.; JUM, H.S.; KIM, B-S.; LEE, J-H.; CHUN, J. Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 48, n. 3, p. 284-289, 2010.

LIMA, A.S.T. **Variabilidade espacial de cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco em um latossolo tratado com lodo de esgoto por treze anos consecutivos** Jaboticabal, SP, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp - Câmpus de Jaboticabal, 2011. 66p. (Tese Doutorado).

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

MACDONALD, C.A., CLARK, I.M., ZHAO, F.J., HIRSCH, P.R., SINGH, B.K., MCGRATH, S.P. **Long-term impacts of zinc and copper enriched sewage sludge additions on bacterial, archaeal and fungal communities in arable and grassland soils**. Soil Biology & Biochemistry 43:932-941. 2011.

MARQUES, M.F.O.; GUSMÃO, L.F.P.; MAIA, L.C. **Riqueza de espécies de fungos conidiais em duas áreas de Mata Atlântica no Morro da Pioneira, Serra da Jibóia, BA, Brasil**. Acta Botanica Brasilica, Porto Alegre, v. 22, p. 954-961, 2008.

MELO, V. P.; BEUTLER, A. N.; SOUZA, Z. M.; CENTURION, J. F.; MELO, W. J. **Atributos físicos de Latossolos adubados durante cinco anos com biossólido.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.39, p.67-72. 2004.

MELO, W. J.; AGUIAR, P. S.; MELO, G. M. P.; MELO, V. P. **Nickel in a tropical soil treated with sewage sludge and cropped with maize in a long-term field study.** Soil Biology & Biochemistry, V. 39, p. 1341–1347, 2007.

MUYZER, G. **DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems.** Current Opinion in Microbiology. V.2, p.317-322, 1999.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. **Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar. 1993.

NOGUEIRA, T. A. R.; MELO, W. J.; OLIVEIRA, L. R.; FONSECA, I. M.; MELO, G. M. P.; MARCUSSI, S. A.; MARQUES, M. O. **Nickel in soil and maize plants grown on an oxisol treated over a long time with sewage sludge.** Chemical Speciation and Bioavailability, v.21, p. 165-173, 2009.

NOGUEIRA, T. A. R.; OLIVEIRA, L. R.; MELO, W. J.; FONSECA, I. M.; MELO, G. M. P.; MELO, V. P.; MARQUES, M. O. **Cádmio, cromo, chumbo e zinco em plantas de milho e em Latossolo após nove aplicações anuais de lodo de esgoto.** R. Bras. Ci. Solo, v.32, p.2195-2207, 2008.

O'BRIEN, H.E.; PARRENT, J.L.; JACKSON, J.A.; MONCALVO, J.M.; VILGALYS, R. **Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 71, n. 9, p. 5544-5550, 2005.

OGRAM, A. **Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future.** Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 32, p. 1499–1504, 2000.

PAUL E.A.; CLARCK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry.** San Diego: Academy, 1996. 436p.

PERSIANI, A.M.; CASADO, M.A. **Diversity and variability in soil fungi from a disturbed tropical rain forest.** Mycologia, New York, v. 90, n. 2, p. 206-214, 1998.

POULSEN, P.H.B., MAGID, J., LUXHØI, J., NEERGAARD, A. Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial - Waste imprint on soil microbial activity. Soil Biology & Biochemistry 57: 794-802. 2013.

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

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H. Milho. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo.** 2. ed. Campinas: Instituto Agronômico, p. 56 – 59. 1997. (Boletim Técnico 100).

RAVERKAR, K.P.; KONDE, B.K. **Effect of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on the nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars.** Plant and Soil, V. 106, p.249–252, 1988.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins.** São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SAMBROOK, J.J.; RUSSELL, D.D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** CSHL Press, Vol. 2, Science - 2001. 2344 pages.

TIAN, H.; DRIJBER, R.A.; ZHANG, J.L.; LI, X.L. **Impact of long-term nitrogen fertilization and rotation with soybean on the diversity and phosphorus metabolism of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi within the roots of maize (*Zea mays* L.).** Agriculture, Ecosystems and Environment 164 (2013) 53– 61.

VAINIO, E.J.; HANTULA, J. **Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA.** Mycol. Res. **104** (8): 927-936 (August 2000).

VAL-MORAES, S.P., MARCONDES, J., ALVES, L.M.C., LEMOS, E.G.M. **Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis.** World J Microbiol Biotechnol 27:1997–2003. 2011.

VOLPE, C. A.; CUNHA, A. R. **Dados meteorológicos de Jaboticabal no período de 1971-2000.** In: FÓRUM DE ESTUDOS DOS PROBLEMAS REFERENTES ÀS MUDANÇAS MESOCLIMÁTICAS NO MUNICÍPIO DE JABOTICABAL, 1., Jaboticabal, 2008. Relatório final. Jaboticabal, Comissão de Assuntos Relevantes da Câmara Municipal de Jaboticabal, 2008. CD-ROM.

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