



Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Programa Interunidades

unesp 

Mestrado

Engenharia Civil e Ambiental

LÍVIA RODRIGUES DIAS MACHADO

**DESENVOLVIMENTO INICIAL DE LEGUMINOSA FORRAGEIRA
EM SIMBIOSE COM *RHIZOBIUM* EM SUBSTRATO TRATADO COM
BIOSSÓLIDO DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS**



Bauru
2014

LÍVIA RODRIGUES DIAS MACHADO

**DESENVOLVIMENTO INICIAL DE LEGUMINOSA FORRAGEIRA EM
SIMBIOSE COM *RHIZOBIUM* EM SUBSTRATO TRATADO COM
BIOSSÓLIDO DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Área de Concentração Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Donnini Mancini

Co-orientadora: Profa. Dra. Isabel C. de Barros Trannin

Bauru
2014



Machado, Livia Rodrigues Dias.

Desenvolvimento inicial de leguminosa forrageira em simbiose com *rhizobium* em substrato tratado com biossólido da indústria de laticínios / Livia Rodrigues Dias Machado, 2014.

73 f. il.

Orientador: Sandro Donnini Mancini


Coorientadora: Isabel Cristina de Barros Trannin

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia, Bauru, 2014.

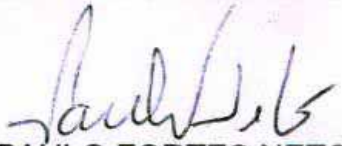
1. Resíduos Industriais 2. Biossólidos 3. Nutrição de Plantas 4. Leguminosas 5. Rizóbio 6. Fixação de Nitrogênio. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LÍVIA RODRIGUES DIAS MACHADO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL, DO(A) FACULDADE DE ENGENHARIA DE BAURU.

Aos 07 dias do mês de agosto do ano de 2014, às 15:00 horas, no(a) Campus de Guaratinguetá - DEC-FEG/Sala de eventos, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. ISABEL CRISTINA DE BARROS TRANNIN do(a) Departamento de Engenharia Civil / Faculdade de Engenharia de Guaratingueta, Prof. Dr. JOAO ANDRADE DE CARVALHO JR do(a) Departamento de Energia / Faculdade de Engenharia de Guaratingueta, Prof. Dr. PAULO FORTES NETO do(a) Departamento de Ciências Agrárias / Universidade de Taubaté, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LÍVIA RODRIGUES DIAS MACHADO, intitulada "DESENVOLVIMENTO INICIAL DE LEGUMINOSA FORRAGEIRA EM SIMBIOSE COM RHIZOBIUM EM SUBSTRATO TRATADO COM BLOSSÓLIDO DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. ISABEL CRISTINA DE BARROS TRANNIN


Prof. Dr. JOAO ANDRADE DE CARVALHO JR


Prof. Dr. PAULO FORTES NETO

*Dedico este trabalho à minha família,
Joaquim, Maria Helena e Larissa; meu eterno porto seguro.
Esta vitória não teria o mesmo sabor se não fossem vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo, a Deus, por ser presença constante em minha vida e ter me presenteado com o dom da vida e com as pessoas maravilhosas que encontro pelos caminhos que eu trilho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da UNESP, ao Departamento de Engenharia Civil da UNESP de Guaratinguetá.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Prof^ª. Dr^ª. Isabel Cristina de Barros Trannin, que de co-orientadora, se transformou em orientadora, parceira, amiga. Sua fé em mim e no potencial deste trabalho o tornou realidade. Minha eterna gratidão pelos conhecimentos e ensinamentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Sandro Donnini Mancini, pela sua compreensão e colaboração, ainda que de longe, porém fundamental à concretização deste trabalho.

À Cooperativa de Laticínios de Guaratinguetá – SERRAMAR por fornecer o biossólido para realização do estudo, em especial ao Sr. José Eduardo Prado de Moura, por compreender a importância deste trabalho.

Ao Sérgio, por compreender a importância deste trabalho para mim e me apoiar sempre. Seu amor e apoio fazem toda a diferença.

Às amigas conquistadas durante o programa de Pós-Graduação; Juliana Chaves, Fernanda Grossi, Leandro Bettoni, Rodolfo Cordeiro, Marcos Henrique, Alessandra Branco.

Ao Msc. Bruno Pavanelli Zanella, Renivaldo Paulino e David Drezza por toda a ajuda e parceria durante a instalação e manutenção dos experimentos, além de todo o divertimento!

Ao Guilherme Coelho Neves, por toda a ajuda na interpretação dos resultados.

Às amigas de longa data que sempre torceram pelo sucesso deste trabalho Josiane e Paula, e em especial à Anne Caroline e Ana Luiza, que estiveram presentes na fase de coleta dos dados dos experimentos.

Às queridas amigas da graduação Kamila e Maíra, pelos momentos maravilhosos que compartilhamos, e principalmente Kássia, que possibilitou meu ingresso na pós-graduação.

À Vanessa e Erika, obrigada pela compreensão e toda a ajuda que me deram.

Aos meus pais Joaquim e Maria Helena, por fazerem sempre o possível e impossível pelas suas filhas, pelo amor, educação e valores que me transmitiram.

Agradeço a toda minha família pelo incentivo à conclusão desta etapa, principalmente à minha irmã Larissa, minha tia Elza e meu tio Antônio Augusto, pois sei do orgulho que sentem ao compartilhar minha vitória.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente passaram por minha vida, me ensinaram e me transformaram, de forma que hoje levo um pouco de cada um e espero que tenham levado um pouco de mim também.

A todos, o meu muito obrigada!!!

“O RIO E O OCEANO

Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme
de medo.

Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas,
o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos
povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar
nele nada mais é do que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar.
Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência.

Você pode apenas ir em frente.

O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.

E somente quando ele entra no oceano é que o medo
desaparece.

Porque apenas então o rio saberá que não se trata de
desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano.

Por um lado é desaparecimento e por outro lado é
renascimento.

Assim somos nós.

Só podemos ir em frente e arriscar.

Coragem! Avance firme e torne-se Oceano!!!”

Osho

RESUMO

MACHADO, Livia Rodrigues Dias. **Desenvolvimento inicial de leguminosa forrageira em simbiose com *Rhizobium* em substrato tratado com biossólido da indústria de laticínios.** Bauru: UNESP, 2014. 71 p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental).

Neste trabalho, foi avaliado o desenvolvimento inicial da leguminosa forrageira *Canavalia ensiformis* em interação com microrganismos capazes de estabelecer relações simbióticas, os denominados rizóbios, em substrato tratado com biossólido oriundo de indústria de laticínios. O substrato foi constituído por turfa (23%) e Cambissolo Háptico (77%), coletado na porção superior da bacia do ribeirão Guaratinguetá-SP, área degradada com risco de erosão, que apresenta relevo acentuado e solo exposto. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação e dividido em dois blocos: Inoculado e Não inoculado. Cada bloco contou com 6 tratamentos de adubação, constituídos por: ausência de adubação; doses de biossólido em base seca equivalentes à 25%, 50%, 75% e 100% da exigência nutricional da planta; e 100% da exigência nutricional da planta em adubação mineral. A *Canavalia ensiformis* não possui exigência nutricional em nitrogênio, portanto os cálculos das doses de adubação foram feitos com base na exigência em fósforo. Avaliou-se o efeito da aplicação de biossólido no crescimento inicial da leguminosa, na nodulação e fixação do nitrogênio. Observou-se que com o aumento das doses de biossólido, as plantas não inoculadas apresentaram resposta crescente no rendimento de MSPA e MSR, enquanto as plantas inoculadas obtiveram respostas decrescentes nos mesmos parâmetros avaliados. A adição de biossólido até a dose de 1.150 mg dm⁻³ favoreceu o desenvolvimento da relação simbiótica entre a *Canavalia ensiformis* e rizóbio, porém mesmo nas doses mais elevadas, de 1.720 mg dm⁻³ e 2.300 mg dm⁻³, o nitrogênio fornecido não inibiu a nodulação e a FBN. A adubação mineral, realizada com base na exigência da *Canavalia ensiformis* em fósforo favoreceu o estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa.

PALAVRAS-CHAVE: *resíduos industriais, biossólidos, nutrição de plantas, leguminosas, rizóbio, fixação de nitrogênio.*

ABSTRACT

MACHADO, Livia Rodrigues Dias. **Initial development of forage legume in symbiosis with *Rhizobium* in substrate treated with biosolids of the dairy industry.** Bauru: UNESP, 2014, 71p. (Dissertation - Master in Civil and Environmental Engineering).

In this study, the initial development of forage legume *Canavalia ensiformis* was evaluated in interaction with microorganisms capable of establishing symbiotic relationships, called rhizobia, and substrate treated with sewage sludge from the dairy industry. The substrate consisted of peat (23%) and Cambisol (77%), collected in the upper portion of the stream Guaratinguetá-SP, degraded watershed area at risk of erosion, which features sharp relief and exposed soil. The experiment was conducted in greenhouse and divided into two blocks: Inoculated and Non-inoculated. Each block had six fertilization treatments, consisting of: absence of fertilization; biosolid doses equivalent to 25% dry basis, 50%, 75% and 100% of the nutritional requirements of the plant; and 100% of the nutritional requirement of the plant in mineral fertilizer. The *Canavalia ensiformis* has no nutritional requirement in nitrogen, so the calculations of doses of fertilizers were made based on the requirement for phosphorus. The effect of sewage sludge application on the growth of legume nodulation and nitrogen fixation was evaluated. It was observed that with increasing doses of sewage sludge, non-inoculated plants showed increased response in the MSPA and MSR yield, while decreasing responses inoculated plants had the same parameters. The addition of biosolids to the dose of 1,150 mg dm⁻³ favored the development of the symbiotic relationship between rhizobia and *Canavalia ensiformis*, but even at the highest doses of 1,720 mg dm⁻³ and 2,300 mg dm⁻³, nitrogen supplied did not inhibit nodulation and biological nitrogen fixation. The mineral fertilizer made based on the requirement of *Canavalia ensiformis* phosphorus favored the establishment of rhizobia-legume symbiosis.

KEYWORDS: industrial waste, biosolids, plant nutrition, leguminous, rhizobium, nitrogen fixation.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 –FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO PELA SIMBIOSE LEGUMINOSA- RIZÓBIO.....	12
FIGURA 2 - ESQUEMA DO PROCESSO DE INFECÇÃO DE RIZÓBIO EM PELOS RADICULARES POR MEIO DE CORDÕES DE INFECÇÃO (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).....	15
FIGURA 3 - MAPA DE USO E OCUPAÇÃO DO SOLO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIBEIRÃO GUARATINGUETÁ-SP (TNC, 2006).....	24
FIGURA 4 - MAPA PEDOLÓGICO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIBEIRÃO GUARATINGUETÁ-SP (FERREIRA ET AL., 2011).....	25
FIGURA 5 - PROCESSO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS DA SERRAMAR. 1) REATOR AERÓBICO; 2) DIGESTOR DE LODO AERÓBICO E 3) LEITOS DE SECAGEM.....	26
FIGURA 6 - ACONDICIONAMENTO COMPONENTES DO SUBSTRATO (SOLO E TURFA) EM PANELA DE ALUMÍNIO PARA O PROCESSO DE AUTOCLAVAGEM À TEMPERATURA DE 121°C DURANTE 50 MINUTOS.....	27
FIGURA 7 – PESAGEM E PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO E VASOS CONSTITUÍDOS POR TUBOS DE PVC DE 6" DE DIÂMETRO E 20 CM DE ALTURA, CONTENDO EM SEU INTERIOR 1DM ⁻³ DO SUBSTRATO UTILIZADO PARA AVALIAR O DESENVOLVIMENTO INICIAL E A NODULAÇÃO DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> INOCULADAS COM RIZÓBIO ESPECÍFICO.....	28
FIGURA 8 - PREPARAÇÃO DOS INOCULANTES, POR MEIO DA MULTIPLICAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO YEM, CONTENDO ESTIRPES DE RIZÓBIO ESPECÍFICAS PARA LEGUMINOSAS, FORNECIDAS PELA EMBRAPA AGROBIOLOGIA/SEROPÉDICA (RJ).....	28
FIGURA 9 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL CONTANDO COM 6 TRATAMENTOS (T) E 4 REPETIÇÕES (R), NOS BLOCOS INOCULADO E NÃO INOCULADO.....	30
FIGURA 10- VASOS COM O SUBSTRATO, CONTENDO SEMENTES GERMINADAS (10 DIAS APÓS O PLANTIO) INOCULADAS E NÃO INOCULADAS (RESPECTIVAMENTE), TRATADAS COM DOSES CRESCENTES DE BIOSSÓLIDO E ADUBAÇÃO MINERAL.....	31
FIGURA 11 - ANÁLISE DE MEDIÇÃO DA ALTURA DAS PLANTAS UTILIZANDO TRENA.....	31
FIGURA 12 - SEPARAÇÃO SOLO/RAÍZES (1); LAVAGEM DAS RAÍZES, COM O AUXÍLIO DE PENEIRA FINA (2) E SEPARAÇÃO DOS NÓDULOS RADICULARES (3).	32
FIGURA 13 - GERMINAÇÃO DA <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> AOS 8 DIAS APÓS A SEMEADURA: À ESQUERDA PLANTAS NÃO INOCULADAS, E À DIREITA PLANTAS INOCULADAS, AMBAS ADUBADAS COM 1.150 MG DM ⁻³ DE BIOSSÓLIDO (T3).	37
FIGURA 14 - PLANTAS DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> INOCULADAS (À ESQUERDA) E NÃO INOCULADAS (À DIREITA) AOS 30, 60 E 90 DIAS DE EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	38
FIGURA 15 - A) DIÂMETRO DO CAULE (CM) E B) ALTURA DAS PLANTAS (CM) DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> INOCULADAS E NÃO INOCULADAS COM RIZÓBIO ESPECÍFICO, EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE BIOSSÓLIDO.....	41
FIGURA 16 - A) MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA (MSPA) (G) E B) MATÉRIA SECA RADICULAR (MSR) (G) DAS PLANTAS DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> INOCULADAS E NÃO INOCULADAS EM RESPOSTA AS DOSES DE BIOSSÓLIDO.	43
FIGURA 17 - PESO E NÚMERO DE NÓDULOS OBTIDOS EM MUDAS DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> EM RESPOSTA AOS DIFERENTES TRATAMENTOS: T1 = CONTROLE (SEM ADUBAÇÃO); T2 = 570 MG DM ⁻³ DE BIOSSÓLIDO; T3 = 1.150 MG DM ⁻³ DE BIOSSÓLIDO; T4 = 1.720 MG DM ⁻³ DE BIOSSÓLIDO; T5 = 2.300 MG DM ⁻³ DE BIOSSÓLIDO E T6 = 20 MG DM ⁻³ DE P ₂ O ₅ (ADUBAÇÃO MINERAL).....	46
FIGURA 18 – EM DESTAQUE, COLORAÇÃO RÓSEA DOS NÓDULOS RADICULARES, OBSERVADA EM MUDAS DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> , EM TODOS OS TRATAMENTOS, INDICANDO A OCORRÊNCIA DE NÓDULOS EFETIVOS. 47	47

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – TECNOLOGIAS EMPREGADAS NO BRASIL PARA A DISPOSIÇÃO DE BIOSSÓLIDOS E SUAS RESPECTIVAS VANTAGENS E DESVANTAGENS	7
TABELA 2 - ATRIBUTOS QUÍMICOS E FÍSICOS DO CAMBISSOLO HÁPLICO DISTRÓFICO COLETADO NA CAMADA DE 0-20 CM DE PROFUNDIDADE	25
TABELA 3 - TRATAMENTOS APLICADOS A SEMENTES DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> INOCULADAS E NÃO INOCULADAS.	29
TABELA 4 - PARÂMETROS FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO BIOSSÓLIDO EM BASE SECA, GERADO PELA COOPERATIVA DE LEITE DE GUARATINGUETÁ – SERRAMAR E AS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES TÍPICAS E AS MÁXIMAS ESTABELECIDAS PELA RESOLUÇÃO CONAMA 375/2006.....	33
TABELA 5 - DIÂMETRO DO CAULE E ALTURA DAS MUDAS DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> NOS DIFERENTES TRATAMENTOS AOS 90 DIAS APÓS A SEMEADURA	39
TABELA 6 - DIÂMETRO DO CAULE DA <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> INOCULADA E NÃO INOCULADA NOS DIFERENTES TRATAMENTOS ¹	39
TABELA 7 – MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA (MSPA) E MATÉRIA SECA RADICULAR (MSR) DAS MUDAS DE <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i> NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, AOS 90 DIAS APÓS A SEMEADURA	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- CAESB – Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do estado de São Paulo
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CSIRO - Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization
- CTC - Capacidade de Troca Catiônica
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ETE - Estação de Tratamento de Esgoto
- FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio
- g kg^{-1} – grama por quilograma
- IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná
- kg ha^{-1} – quilograma por hectare
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- mg dm^{-3} – miligrama por decímetro cúbico
- mg ha^{-1} – miligrama por tonelada
- mg kg^{-1} – miligrama por quilograma
- MO – Matéria Orgânica
- MOS - Matéria Orgânica do Solo
- MSPA - Matéria Seca da Parte Aérea
- MSR - Matéria Seca Radicular
- NMP – Número Mais Provável
- PNRS - Política Nacional dos Resíduos Sólidos
- SABESP – Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
- SANEPAR – Companhia de Saneamento do Paraná
- ST – Sólidos Totais
- t ha^{-1} – tonelada por hectare
- $\text{t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ – tonelada por hectare por ano
- UNESP - Universidade Estadual Paulista
- USEPA - United States Environmental Protection Agency
- VMP – Valor Máximo Permitido

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XIII
SUMÁRIO	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
3.1 LODOS DE ESGOTO – BIOSSÓLIDOS.....	4
3.2 LEGISLAÇÃO PARA O USO AGRÍCOLA DE BIOSSÓLIDOS	7
3.3 BENEFÍCIOS DO USO DE BIOSSÓLIDOS.....	9
3.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	11
3.5 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO POR LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS	13
3.6 <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i>	16
3.7 UTILIZAÇÃO DE SIMBIOSSES RIZÓBIO-LEGUMINOSAS EM RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS	18
3.8 INTERAÇÕES ENTRE BIOSSÓLIDOS E SIMBIOSSES RIZÓBIO-LEGUMINOSAS	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 SOLO.....	23
4.2 BIOSSÓLIDO	26
4.3 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO	27
4.4 MULTIPLICAÇÃO DO RIZÓBIO	28
4.5 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.6 DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSÓLIDO	33
5.2 CRESCIMENTO INICIAL DA <i>CANAVALIA ENSIFORMIS</i>	36
5.2.1 <i>Altura e diâmetro do caule</i>	39
5.2.2 <i>Produção de matéria seca</i>	41

5.2.3	<i>Formação de nódulos radiculares</i>	44
6	CONCLUSÕES	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável de uma sociedade requer, dentre várias ações, alternativas para a disposição final dos resíduos por ela produzidos. De fato, esforços têm sido feitos, em âmbito mundial, no sentido de agregar valor aos rejeitos, transformando-os em subprodutos de modo que, ao mesmo tempo em que estes passem a ter aplicações e valor econômico, isto contribua para proteger a atividade econômica, a saúde pública e o ambiente, transformando resíduos em recursos. Neste aspecto, foi aprovada no Brasil, a Lei nº 12.305/2010, que instituiu a Política Nacional dos Resíduos Sólidos (PNRS). Esta lei trouxe como princípios, dentre outros, o desenvolvimento sustentável, o reconhecimento do resíduo sólido reutilizável e reciclagem como um bem econômico e a visão sistêmica na gestão dos resíduos sólidos, considerando todas as variáveis socioambientais. Dentre os objetivos está a reutilização dos resíduos sólidos, bem como disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos. Os lodos de esgoto ou biossólidos são resíduos gerados por meio de diferentes processos de tratamento de esgotos, de origem domiciliar ou industrial, visando à diminuição de seu potencial poluente e os riscos à saúde pública e ao ambiente. A composição de biossólidos domiciliares é de aproximadamente 400 g kg⁻¹ de matéria orgânica, 40 g kg⁻¹ de nitrogênio, 20 g kg⁻¹ de fósforo e 4 g kg⁻¹ de potássio e demais macro e micro nutrientes e elementos com potencial tóxico em proporções variáveis (BETTIOL; CAMARGO, 2003). Os biossólidos de origem industrial possuem características extremamente diversas, em função das matérias primas, do processo industrial e do sistema de tratamento de esgoto utilizado (FERREIRA et al. 1999, TRANNIN, 2004).

Como forma de dispor adequadamente e de agregar valor ao biossólido, o uso agrícola como fertilizante orgânico devido a sua composição, ganhou destaque e vem sendo utilizado com frequência (BOEIRA et al. 2002). Além de fertilizante o biossólido pode ser utilizado como condicionador de solos (BERTON; NOGUEIRA, 2010). Sua oferta para a agricultura vem sendo ampliada, devido à necessidade de se tratar o esgoto para reduzir a poluição dos corpos hídricos e a economia com fertilizantes e corretivos de solo.

Apesar do incentivo das instituições de pesquisa brasileiras como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a Companhia de Saneamento de São Paulo (CETESB) e outros para o uso agrícola de biossólidos. E, para que não haja impactos ambientais, sociais e econômicos, a aplicação dos biossólidos deve ser realizada de forma segura e adequada, sendo necessária para isso, a

caracterização de suas propriedades físicas, químicas e biológicas, considerando suas especificidades. No Brasil, a Resolução CONAMA 375/2006 define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados. No entanto, grande parte do lodo produzido é disposta em rios, solo e utilizado como adubo na agricultura sem quaisquer critérios técnicos, colocando em risco a saúde pública e a qualidade dos recursos naturais e meio ambiente (ANDREOLI et al., 2007). Diante da realidade, a necessidade de estudos que visem reverter este quadro é evidente, buscando soluções tanto para a problemática da gestão dos resíduos quanto para instituir o conceito de sustentabilidade levantado pela PNRS.

Por se tratar de um ecossistema de grande complexidade e interações constantes entre as propriedades físicas, químicas e biológicas, não é tarefa simples determinar o potencial de aplicação de bio sólido ao solo (TRANNIN, 2004). Além disso, no ambiente agrícola, também precisam ser consideradas as interações entre as propriedades do solo e as espécies vegetais. Em condições favoráveis à mineralização da matéria orgânica, o bio sólido pode liberar grande quantidade de N mineral para o solo nos primeiros dias após a aplicação (BOEIRA, 2004), além de melhorar o estado de agregação das partículas do solo, diminuir sua densidade, aumentar a porosidade, a capacidade de retenção de água e capacidade de troca de cátions, aumentando o teor de matéria orgânica e disponibilizando macro e micronutrientes. E, como resultado, a aplicação de bio sólidos tem conduzido ao aumento na absorção de nutrientes pelas culturas, com reflexo na produtividade (MELO; MARQUES, 2000; BOEIRA et al. 2002; BOEIRA, 2004; TRANNIN, 2004; TRANNIN et al., 2008; BERTON; NOGUEIRA, 2010).

Neste aspecto, a aplicação de bio sólido em solos cultivados com leguminosas, que realizam simbiose com rizóbio, precisa ser avaliada para que os elevados teores de matéria orgânica e de nutrientes, especialmente o nitrogênio, e a presença de metais pesados e sais solúveis não tenham efeito inibitório sobre a fixação biológica de nitrogênio (GILLER et al., 1989), possibilitando a aplicação bem sucedida destas duas fontes de nitrogênio em solos de baixa fertilidade, característica da maioria dos solos brasileiros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o desenvolvimento inicial da leguminosa forrageira Feijão de Porco (*Canavalia ensiformis*) inoculada com estirpe de rizóbio específico e tratada com doses crescentes do biofóssido produzido pela SERRAMAR – Cooperativa de Laticínios de Guaratinguetá-SP e verificar a existência de interação entre estas duas fontes de nitrogênio no crescimento vegetativo e no processo de nodulação e fixação biológica de nitrogênio (FBN) desta espécie, utilizada como adubo verde e em projetos de recuperação de áreas degradadas.

2.2 Objetivos Específicos

Classificar o biofóssido da indústria de laticínios SERRAMAR, considerando a legislação federal CONAMA 375/2006, e do estado de São Paulo, CETESB P 4230;

Analisar o desenvolvimento inicial das mudas de feijão de porco por meio dos parâmetros matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca radicular (MSR), diâmetro e altura do caule;

Avaliar a nodulação de mudas de feijão de porco por meio dos parâmetros peso, números de nódulos e atividade da nitrogenase.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Lodos de Esgoto – Biossólidos

Devido às exigências para a melhoria no saneamento básico, estabelecidas pela Lei de Saneamento Básico nº 11.445/2007, o “Pacto pelo Saneamento Básico” e o “Compromisso pelo Meio Ambiente e Saneamento Básico”, têm aumentado o número de municípios que possuem Estações de Tratamento de Efluentes. O diagnóstico dos serviços de água e esgoto, elaborado pelo Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento apontou que os estados de São Paulo, Minas Gerais e o Distrito Federal possuem mais de 70% dos domicílios atendidos por rede coletora de esgoto. Na faixa entre 20% e 70% de atendimento por rede coletora de esgoto, se encontram 17 estados brasileiros, e no intervalo entre <10% até 20%, se encontram 7 estados (BRASIL, 2014).

Os esgotos podem ser classificados em dois grupos: sanitários e industriais. No primeiro caso, o esgoto é constituído por efluentes domésticos, águas pluviais e água de infiltração. Pode ocorrer, eventualmente, uma parcela de despejos industriais. Os geradores deste despejo são instalações onde ocorrem banheiros, cozinhas, lavanderias ou quaisquer outros dispositivos de utilização da água para fins domésticos. Estes despejos devem estar canalizados a uma rede coletora de esgoto, que os destinará a uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE).

O esgoto industrial é extremamente variável, em função do tipo de indústria onde é gerado, do processo industrial, das matérias primas utilizadas e do sistema de tratamento adotado pela indústria (FERREIRA et al., 1999). Este deve receber tratamento interno ou tratamento prévio para ser lançado em rede coletora de esgoto doméstico.

O tratamento destes efluentes ocorre nas ETEs e tanto o efluente tratado quanto os resíduos gerados no processo devem obedecer aos limites de concentração de substâncias orgânicas e inorgânicas preconizados pela legislação vigente. Dentre os resíduos gerados no processo de tratamento, destaca-se o lodo de esgoto. A fim de distanciar o termo “lodo de esgoto” do material e processo que o originou e amenizar o preconceito para seus potenciais usos, foi criado na década de 1980 o termo “biossólido”, que a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA - United States Environmental Protection Agency) define como o resíduo orgânico resultante dos tratamentos de esgoto que possua

características que permitam sua reciclagem de maneira racional e ambientalmente segura (USEPA, 1999; BARBOZA, 2007).

Existem discussões nos meios acadêmico e científico sobre a definição e o uso dos termos “lodo de esgoto” e “biossólido” e a mais aceita é a de Andreoli et al. (2001), que define biossólido como o resíduo originado do tratamento biológico de esgoto. Recentemente, também tem sido considerado o uso do termo biossólido para os lodos de esgoto que tenham potencial e atendam aos requisitos legais para aplicação na agricultura.

No Brasil, o aumento na produção de biossólidos acompanha a expansão dos serviços de coleta e tratamento dos esgotos sanitários (VAN HAANDEL; SOBRINHO, 2006). Segundo Tsutiya (2001), a produção de biossólidos representa de 1 a 2% do volume do esgoto tratado e ganha destaque por representar de 20 a 60% dos custos de operação de uma estação de tratamento.

Sobrinho (2001) estima que cada habitante tem a capacidade para gerar 190g de biossólido com 25% de sólidos por dia. Portanto, um município com 250 mil habitantes pode produzir cerca de 40 a 50 toneladas de biossólidos diariamente. Dados mais recentes estimam que no Brasil sejam produzidos cerca de 150 a 220 mil toneladas de biossólidos por ano (PEDROZA et al., 2010).

De acordo com Borrelly (1995), estes despejos são predominantemente orgânicos, compostos por 99,9% de água e 0,1% de sólidos, dos quais 70% são orgânicos (proteínas, carboidratos e gorduras) e 30% inorgânicos (detritos minerais pesados, sais e metais).

Este material recebe processos de tratamento que visam reduzir o teor de material orgânico biodegradável, a concentração de organismos patogênicos e o teor de água, para que se obtenha um material sólido e estabilizado, que não ofereça perigo para a saúde e que possa ser manipulado e transportado com facilidade e baixo custo (VAN HAANDEL; SOBRINHO, 2006). Condicionamento, adensamento, estabilização e desaguamento são processos de tratamento aplicados aos biossólidos.

O condicionamento visa melhorar as características de separação das fases sólida e líquida do resíduo, através de meios físicos ou químicos. O processo de condicionamento desestabiliza as forças químicas ou físicas que atuam sobre o material em suspensão do biossólido, permitindo que estas partículas se agrupem, formando flocos. A formação destes flocos beneficia os tratamentos posteriores, como o adensamento. São utilizados produtos químicos orgânicos como polímeros e químicos inorgânicos, como sais férricos, ferrosos, de alumínio e óxido ou hidróxido de cálcio.

A etapa de adensamento tem a finalidade é diminuir a quantidade de água presente no resíduo, reduzindo os custos das demais etapas do processo de tratamento do biossólido. São utilizados sistemas de adensamento por meio de gravidade, flotação com ar dissolvido, tambor rotativo, centrífuga.

A estabilização tem como objetivos a redução dos patógenos, a eliminação de maus odores e a inibição, redução ou eliminação de potencial de putrefação. Os meios para a obtenção de um material estável são a redução da fração biológica encontrada nos sólidos voláteis, oxidação química da matéria orgânica, aplicação de calor para desinfetar ou esterilizar o resíduo. As tecnologias mais utilizadas para a estabilização de biossólidos são a digestão anaeróbia, digestão aeróbia, estabilização com cal ou compostagem.

Desaguamento é um processo que objetiva reduzir o volume do resíduo por meio da redução do teor de água. São processos naturais de desaguamento os leitos de secagem e lagoas de secagem. Também são utilizados filtros prensa e centrífugas, como processos mecânicos de desaguamento (MIKI et al., 2006). Ao final destes processos, o resíduo estabilizado poderá ser encaminhado para disposição final empregando um baixo custo de transporte.

Para Gonçalves et al. (2001), o destino final adequado dos biossólidos é fundamental para o sucesso de um sistema de esgotamento sanitário.

Em geral, a composição dos biossólidos é, predominantemente, orgânica, porém é extremamente variável, principalmente, quando se tratam de biossólidos de origem industrial. No entanto, os biossólidos de origem doméstica também podem variar com o tipo de processo empregado no tratamento, com a localização geográfica das ETEs (reflete os hábitos alimentares), com o balanço de nutrientes dos alimentos consumidos, com a época do ano e com a possível descarga de resíduos industriais (VIDOR, 1999; TSUTIYA, 2001). A tabela 1 apresenta algumas das tecnologias empregadas na disposição de biossólidos.

Tabela 1 – Tecnologias empregadas no Brasil para a disposição de biossólidos e suas respectivas vantagens e desvantagens

Alternativa de disposição	Vantagens	Desvantagens
Reciclagem agrícola	- Solução a longo prazo	- Contaminação de alimentos com elementos do biossólido
	- Potencial como fertilizante	- Odores
Recuperação de áreas degradadas	- Elevadas taxas de aplicação	- Odores
	- Resultados positivos sobre a reconstrução do solo e flora	- Limitações de composição e uso
	- Grande disponibilidade de áreas	- Contaminação do lençol freático, fauna e flora
	- Efeitos positivos no solo	- Limitações de composição e taxas de aplicação
Descarga oceânica	- Baixo custo	- Poluição das águas, fauna e flora subterrânea
Incineração	- Redução do volume	- Custos elevados
		- Disposição das cinzas
		- Poluição atmosférica
		- Necessidade de grandes áreas
	- Esterilização	- Localização próxima à centros urbanos
		- Características especiais do solo
		- Isolamento ambiental
		- Dificuldade de reintegração da área após desativação
"Landfarming"	- Degradação microbiana de baixo custo	- Produção de gases e percolato
		- Acúmulo de metais pesados no solo
	- Disposição de grandes volumes por unidade de área	- Possibilidade de contaminação do nível freático
		- Liberação de odores e atração de vetores
		- Dificuldade de reintegração da área após desativação

Fonte: Adaptado de Andreoli *et al.* (2001)

3.2 Legislação para o uso agrícola de biossólidos

Devido a sua composição, predominantemente orgânica, os Estados Unidos e diversos países da Europa foram os precursores do uso de biossólidos na agricultura. De acordo com Kirkham (1982), os Estados Unidos já vinham utilizando o biossólido como fertilizante e condicionador de solos desde 1925, o que impulsionou a USEPA a organizar um estudo de caso com quarenta municípios norte americanos, apresentando as recomendações e necessidades de um programa de regulamentação (1983) e a desenvolver, em 1984, uma lista de 200 poluentes, dos quais 50 foram relacionados para estudos mais detalhados, entre 1985 e

1988, sobre as vias de risco, incluindo as vias de exposição, o risco individual e agregado, o nível de risco aceitável para os poluentes cancerígenos, os riscos na alimentação humana, o risco potencial no transporte, os conceitos e cenários. Em 1993, com base nestes estudos prévios, a USEPA publicou o Código Federal de Regulamentações, Título 40, Partes 257, 403 e 503 referindo-se aos “Critérios para a utilização e disposição de lodo de esgoto”. Esta legislação encorajou o uso racional do resíduo, excluindo o biossólido da regulamentação relativa a resíduos perigosos, porém assegurando a proteção à saúde humana e ao ambiente de qualquer efeito adverso previsto, em função da presença de poluentes nesses resíduos. Esta legislação abrange três categorias de disposição final do biossólido: 1) Aplicação no solo como insumo, 2) disposição no solo e 3) incineração do material.

Na Europa, foi aprovada em 1986, pelo Conselho Diretor da Comunidade Econômica Européia, a Diretiva 86/278/EEC visando à proteção do ambiente, em particular, do solo, em casos de aplicação do biossólido na agricultura (ZEITOUNI, 2005).

Os solos australianos são, geralmente, inférteis e demandam altos custos com fertilizantes. Em 1978 foi criada pela Divisão de Solos da CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), a Agência Nacional de Ciência australiana, que na década de 1990 começou a desenvolver no estado de New South Wales, um programa de pesquisa sobre o uso agrícola de biossólidos, coordenado pela agência de agricultura do estado (New South Wales Department of Primary Industries). Em 1997 o New South Wales foi o primeiro estado a publicar suas orientações para o uso agrícola do biossólido, norteando os demais estados na elaboração de seus próprios manuais de orientação.

Trannin (2004) relata que no Brasil, as questões ambientais passaram a receber maior atenção das autoridades e conquistaram espaço na mídia, após a “Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável”, a ECO 92 e a criação da Agenda 21. Em seu capítulo 21, esta Agenda trata do “manejo ambientalmente saudável dos resíduos sólidos e questões relacionadas aos esgotos”, contendo orientações básicas para a gestão de resíduos, a minimização da produção, o incentivo ao aproveitamento das tecnologias de reutilização e reciclagem e o tratamento e disposição ambientalmente saudáveis. Porém, somente em 2006, foi regulamentada a Resolução CONAMA nº 375, que instituiu as diretrizes federais para o uso agrícola de lodos de esgoto (biossólidos). Essa resolução estabelece critérios e procedimentos para o uso agrícola de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário. Antes desta resolução, alguns estados já haviam se adiantado, publicando critérios estaduais, de acordo com as realidades locais, baseados na norma 40 Part 503 da USEPA, aceita internacionalmente, a exemplo da CAESB no Distrito

Federal e a CETESB no estado de São Paulo. No estado do Paraná, a SANEPAR publicou um manual para o uso agrícola de biossólidos em 1997.

A Política Nacional dos Resíduos Sólidos, instituída em 2010 possui, dentre os objetivos a “reutilização dos resíduos sólidos, bem como disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos”. Nesta perspectiva, o biossólido, deixa de ser classificado como rejeito e ganha status de produto, podendo ter opções mais vantajosas de destinação final.

A NBR 10.004/2004 da ABNT classifica os resíduos sólidos quanto aos riscos potenciais ao meio ambiente e à saúde pública. De acordo com esta norma, os biossólidos podem ser classificados como resíduo Classe II-A (resíduo não perigoso e não inerte), apresentando propriedades como, biodegradabilidade, combustibilidade ou solubilidade em água.

A lei nº 6894/1980, aprovada pelo Decreto Federal nº 4954/2004 dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, destinados à agricultura. Ao utilizar o biossólido como fonte de nutrientes e matéria orgânica na agricultura, este passa a se enquadrar, nas formas da lei, como condicionador de solo e/ou fertilizante orgânico. Desta forma, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) incluiu os biossólidos na Instrução Normativa nº 27, de 05 de junho de 2006, em resposta ao Decreto nº 4954, que define os limites máximos de contaminantes que os fertilizantes orgânicos, incluindo os biossólidos, podem apresentar para serem registrados. Dessa maneira, para se obter o registro biossólido como fertilizante orgânico ou condicionador de solos junto ao MAPA, uma série de requisitos deve ser atendida quanto às garantias dos benefícios, como teor de nutrientes e quanto à presença de contaminantes, como teor de metais pesados.

3.3 Benefícios do Uso de Biossólidos

O uso de biossólidos tem apresentado resultados positivos na aplicação em diversas culturas, dentre elas o milho (TRANNIN, 2005), o feijão caupi (BARBOZA, 2007), braquiária, juá-bravo, beldroega, fedegoso e guiso-de-cascavel (MATOS et al., 2004), aroeira (NÓBREGA et al., 2007), eucalipto (VAZ; GONÇALVES, 2002; ROCHA, 2013), soja (LEMAINSKI; SILVA, 2006; LOBO et al., 2012). Além de atuar como fertilizante, o biossólido também possui efeitos sobre as propriedades físicas e químicas do solo. A matéria orgânica presente nos biossólidos é a principal responsável pela capacidade de troca catiônica

(CTC) com o solo e garante uma maior resistência na agregação das partículas do solo. Solos degradados possuem baixa capacidade de troca catiônica e disponibilidade restrita de nutrientes (GONÇALVES et al., 1997).

De acordo com Oliveira et al. (2002), ao aplicar bio sólidos a solos agrícolas tem-se, potencialmente, a capacidade de interferir na dinâmica da matéria orgânica, com consequências no estoque de carbono do solo e na densidade do solo tratado. O aumento do estoque de carbono pode estar relacionado a benefícios agrônômicos, como ao aumento da CTC, dependendo da qualidade da matéria orgânica adicionada e de sua transformação no solo. Estes autores afirmam que a aplicação de bio sólidos tem favorecido a elevação do pH e da condutividade elétrica. Fósforo, cálcio e magnésio também tiveram suas concentrações aumentadas com a aplicação do bio sólido em solo degradado (SOARES, 2003).

Em condições favoráveis à mineralização da matéria orgânica, o bio sólido pode liberar grande quantidade de N mineral para o solo nos primeiros dias após a aplicação (BOEIRA, 2004), além de melhorar o estado de agregação das partículas do solo, diminuir sua densidade, aumentar a porosidade, a capacidade de retenção de água e capacidade de troca de cátions, aumentando o teor de matéria orgânica e disponibilizando macro e micronutrientes. Como resultado, a aplicação de bio sólidos tem conduzido ao aumento na absorção de nutrientes pelas culturas, com reflexo na produtividade (MELO; MARQUES, 2000).

Segundo Tsutiya (2001), os bio sólidos possuem matéria orgânica, micro e macro nutrientes que exercem um papel fundamental na produção agrícola e na manutenção da fertilidade do solo. A matéria orgânica pode contribuir ainda com um aumento na infiltração de água no solo, diminuindo os processos erosivos.

Ao utilizar um bio sólido sanitário no processo de recuperação de um Latossolo degradado, Colodro et al. (2007) verificaram que o bio sólido promoveu um aumento na atividade microbiana, avaliada pelo carbono do CO₂ liberado, utilizado como indicador de qualidade da melhoria da área em recuperação e os níveis de carbono na biomassa microbiana não foram afetados pelo tratamento com o resíduo.

Ao aplicar bio sólidos em uma área em recuperação com o consórcio entre eucalipto e braquiária, Campos e Alves (2008) concluíram que o solo apresentou melhores condições por meio dos tratamentos com o bio sólido. Os melhores indicadores da recuperação do solo foram o crescimento vegetal, a densidade e porosidade do solo.

Kitamura et al. (2008) avaliaram a recuperação de um Latossolo Vermelho degradado, utilizando adubos verdes, bio sólido e o cultivo de uma espécie arbórea nativa. Os

tratamentos adotados indicaram uma melhoria na densidade do solo, e a presença de larva e besouro indica a melhoria da macrofauna do solo.

3.4 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio é um dos elementos essenciais existentes em maior quantidade na natureza, porém apenas 5% do nitrogênio disponível no solo se encontram na forma de amônio e nitrato (inorgânica), de rápida assimilação pelas plantas (BARBOZA, 2007).

De acordo com Peoples et al. (1995) a matéria orgânica do solo (MOS) constitui a principal fonte de N para as plantas. Entretanto, ela não consegue atender a alta demanda de N pelas culturas comerciais, principalmente em solos degradados, onde o baixo conteúdo de MOS torna a disponibilidade de N ainda menor. Por essa razão, a adição de fertilizantes nitrogenados minerais ou a utilização de leguminosas torna-se necessária para aumentar a disponibilidade de nitrogênio de agrossistemas.

Em geral, os solos brasileiros apresentam baixos níveis de nitrogênio mineral, além de serem muito intemperizados, ácidos e com baixa capacidade de troca catiônica (MELO; MARQUES, 2001). Solos com esta característica demandam aplicações de grandes quantidades de nitrogênio e a falta deste elemento é um dos fatores limitantes para o crescimento das plantas. Entretanto os custos com aplicação de fertilizantes nitrogenados são muito altos devido ao consumo de energias fósseis utilizados em sua fabricação (BARBOZA, 2007) e sua aplicação em grande escala tem gerado graves problemas de poluição.

De acordo com Hungria e Vargas (2000), os fixadores de nitrogênio existem em vários grupos ecológicos e fisiológicos e pertencem a vários táxons, como por exemplo, as bactérias livres, das quais se destacam as bactérias anaeróbias heterotróficas, as bactérias anaeróbias facultativas heterotróficas, as bactérias anaeróbias obrigatórias heterotróficas, bactérias quimioautotróficas e fotoautotróficas, as bactérias fixadoras associativas, as bactérias fixadoras endofíticas e as bactérias fixadoras simbióticas. O grupo das bactérias fixadoras simbióticas apresentam os gêneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* que são genericamente denominados de rizóbios e possuem considerável importância agrícola.

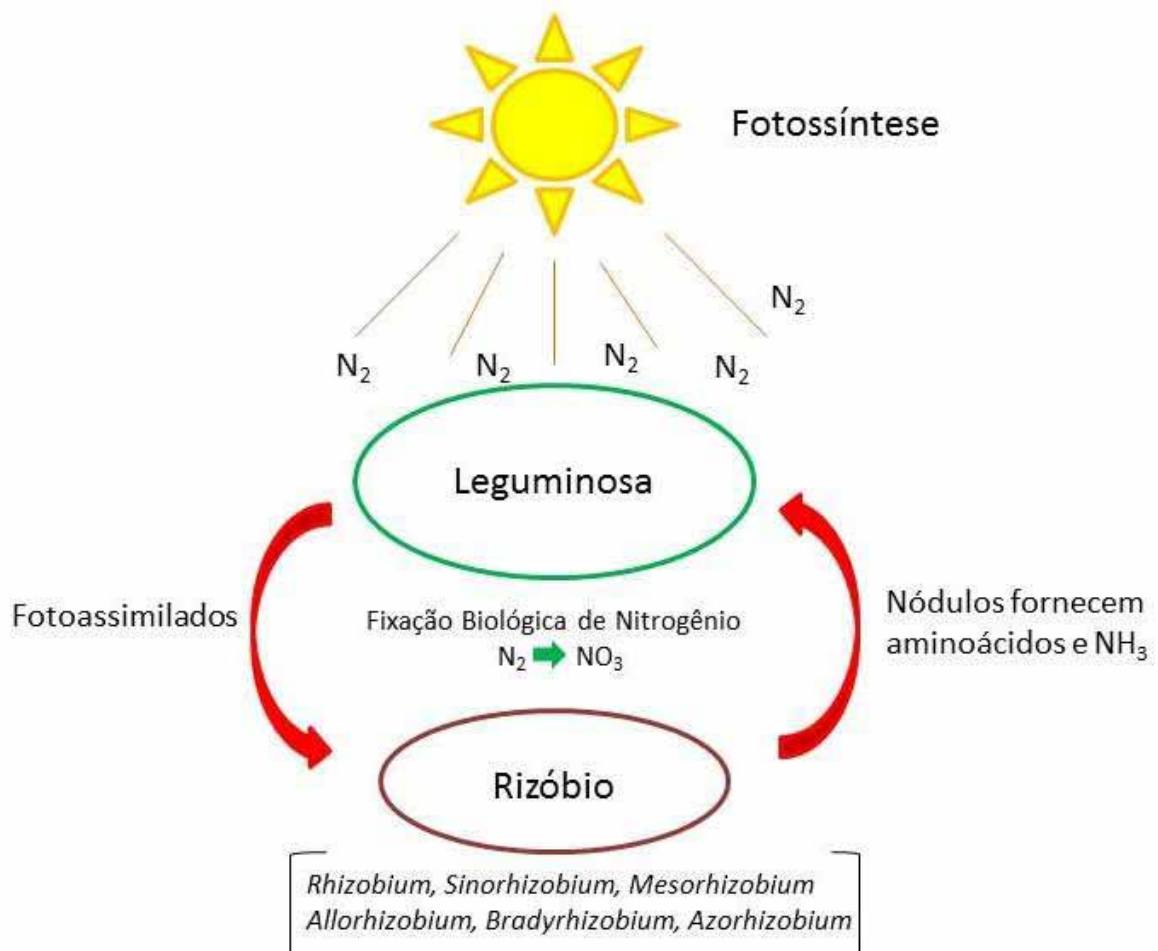


Figura 1 –Fixação biológica de nitrogênio pela simbiose leguminosa- rizóbio.

A nitrogenase é uma enzima utilizada por alguns organismos na fixação do nitrogênio atmosférico. Esta enzima atua em condições anaeróbicas e o contato com o oxigênio provoca desnaturação irreversível de seus componentes protéicos. Por consequência, os fixadores aeróbicos elaboram mecanismos para proteger a nitrogenase dos efeitos prejudiciais do oxigênio. A proteção fisiológica da nitrogenase em *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* é fraca. Por isto, somente em alguns casos, sob condições especiais, foi constatada a atividade da nitrogenase com rizóbios cultivados em meios de cultura, sem nitrogênio *in vitro*. Entretanto, na natureza, *Rhizobium* é protegido ecologicamente, sendo que a fixação de N ocorre somente nos nódulos radiculares das leguminosas hospedeiras onde a presença de leghemoglobina controla o fluxo e a pressão de oxigênio.

Leghemoglobinas (Lhbs) são proteínas hemo-constituintes, presentes nas células infectadas dos nódulos de leguminosas. As moléculas de leghemoglobina são um produto resultante da simbiose, sintetizado em resposta da infecção bacteriana (VERMA; LONG, 1983).

As bactérias do gênero *Azorhizobium* apresentam maior tolerância da nitrogenase ao O₂, permitindo taxas elevadas da fixação do nitrogênio *in vitro*.

Além das limitações da nitrogenase na presença do oxigênio atmosférico, os rizóbios são conhecidos como bactérias simbióticas que, de modo geral, revelam sua capacidade de fixar N somente quando em simbiose com plantas leguminosas e algumas não leguminosas. No entanto, os rizóbios são bactérias telúricas de vida livre e sobrevivem *in situ* às custas de compostos nitrogenados do solo, sendo que neste, os rizóbios continuam a carregar seu equipamento genético, permitindo-lhes fixar o nitrogênio, quando encontrar as plantas hospedeiras específicas (HUNGRIA; VARGAS, 2000).

Segundo Broadbent et al. (1982) *apud* Barboza (2007), o uso da técnica natural de fixação biológica de nitrogênio pode contribuir com um incremento anual de mais de 200 kg ha⁻¹ de nitrogênio nos solos.

3.5 Fixação Biológica de Nitrogênio por Leguminosas Forrageiras

As plantas da família Leguminosae possuem duas fontes de nitrogênio, o mineral, disponível nos solos ou pela adição de fertilizantes nitrogenados e o nitrogênio fixado biologicamente, por meio da relação simbiótica com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Mesorhizobium*, genericamente denominadas de rizóbio. Desta forma, o crescimento e a produção das leguminosas são, em parte, resultados da interação entre os cultivares das plantas, as estirpes de rizóbios e as condições ambientais em que a simbiose se desenvolve e que podem afetar a assimilação, distribuição e utilização do carbono e nitrogênio pelas plantas. O nitrogênio disponível para as sementes determina a produção e depende de uma fixação de nitrogênio que se prolongue até o enchimento dos grãos (NEVES; RUMJANEK, 1997).

Em condições de limitação de nitrogênio mineral no solo, o rizóbio forma nódulos nas raízes das leguminosas. Nestes nódulos, a bactéria converte o nitrogênio atmosférico em amônia, utilizado pela planta. A planta e os nódulos são interligados por meio de vasos xilemáticos e floemáticos, totalmente integrados hormonal e nutricionalmente. Esse processo

requer um suprimento contínuo de carboidratos da planta para o rizóbio, que os utilizam como fonte de energia para a redução do nitrogênio atmosférico e dos esqueletos de carbono necessários para assimilar a amônia produzida. Portanto, no processo de infecção e nodulação, a energia necessária às bactérias é fornecida pela oxidação dos carboidratos produzidos na parte aérea da planta hospedeira (SILVEIRA et al., 2001).

A simbiose de rizóbio com leguminosas é, geralmente, mutualista, quando os nódulos são eficientes na fixação de nitrogênio. No entanto, estas simbioses também podem ser parasíticas, quando há formação de nódulos inefetivos, nos quais a nitrogenase é inativa. Durante o processo de nodulação, há um estágio inicial parasítico transitório, quando a bactéria está recebendo fotossintatos da planta, sem ainda fixar nitrogênio ou transferi-lo para a planta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). De acordo com estes autores, os passos fundamentais para o estabelecimento da simbiose são: o reconhecimento dos simbioses e as interações entre as superfícies das bactérias e da planta, infecção da planta pela bactéria e formação do nódulo e por fim a fixação de nitrogênio. Todos estes passos dependem e podem variar com os genótipos da planta e da estirpe da bactéria envolvida, da qualidade do solo, assim como de fatores ambientais.

A maioria dos genes para nodulação e fixação de nitrogênio dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* se localiza no cromossomo, enquanto os gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* têm os genes localizados em plasmídeos de alto peso molecular, denominados de plasmídeos Sym.

Segundo Moreira e Siqueira (2006), além da localização dos genes responsáveis pela nodulação e fixação de nitrogênio, as estirpes de rizóbio e espécies de leguminosas podem variar de altamente específicas até altamente promíscuas, dependendo da sua capacidade de estabelecer simbiose com poucos parceiros ou com vários parceiros. De acordo com estes autores, o processo de infecção pode ocorrer por meio da epiderme, de feridas ou de pelos radiculares, sendo que nos dois primeiros, ocorre com ou sem cordões de infecção. A figura 2 ilustra o processo de infecção por meio de pelos radiculares por cordões de infecção, ocorrendo; 1) a multiplicação das células de rizóbio ao redor do pelo, 2) a ligação de rizóbio ao pêlo, 3) o encurvamento dos pelos, 4) a infecção seletiva do hospedeiro, 5) a formação e o crescimento do cordão de infecção e a liberação das bactérias nas células do córtex. A razão entre as células infectadas e as não infectadas pode variar e, além disso, estas podem ou não sofrer mitose. Finalmente, os nódulos assim formados podem ser de crescimento determinado (esféricos) ou indeterminado (em diferentes formas alongadas ramificadas ou não), dependendo da posição do meristema.

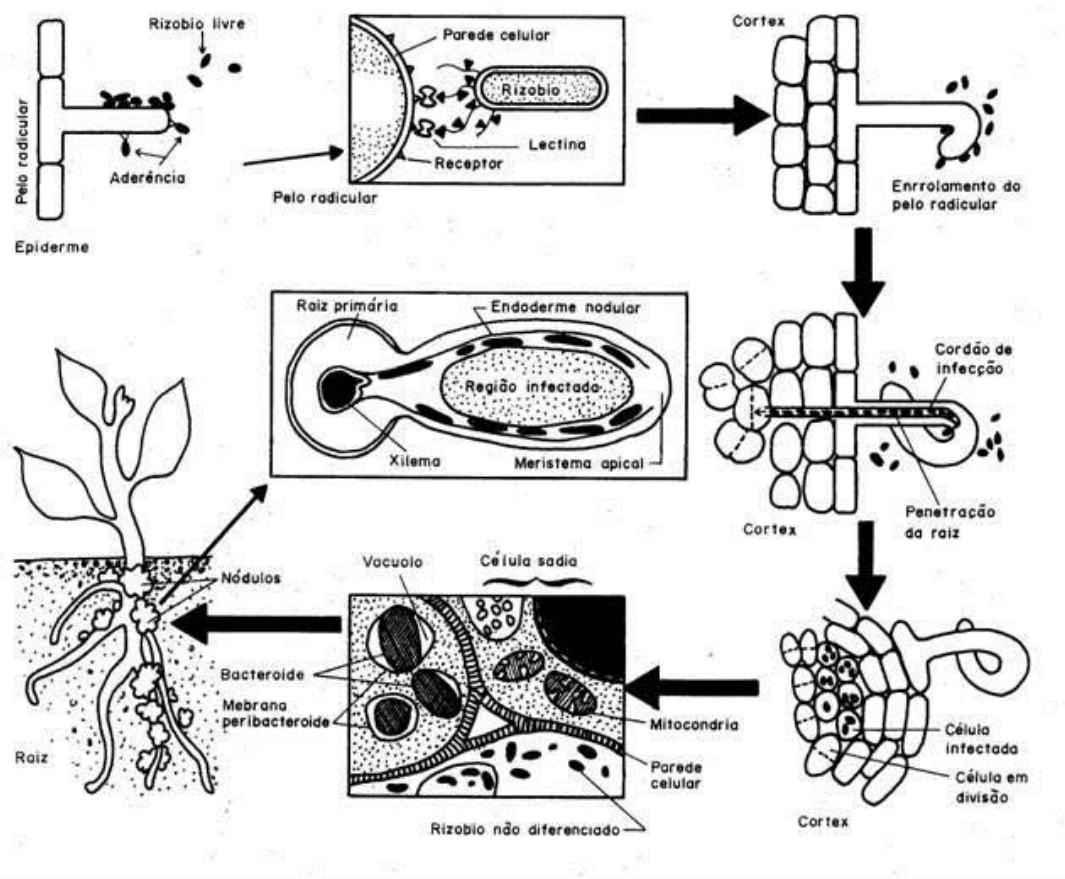


Figura 2 - Esquema do processo de infecção de rizóbio em pelos radiculares por meio de cordões de infecção (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006)

Os genes do hospedeiro, expressos durante o processo de nodulação e o funcionamento dos nódulos, são chamados de “genes de nodulinas” e se dividem em duas classes, os “genes precoces” e “os genes tardios”, correspondendo aos genes envolvidos na infecção e formação do nódulo e os envolvidos no funcionamento do nódulo, respectivamente. A expressão destes genes, por sua vez, leva à produção de nodulinas, proteínas vegetais que se acumulam nos nódulos e tem funções específicas no processo de fixação biológica de nitrogênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No último passo do estabelecimento da simbiose, ou seja, na fixação biológica de nitrogênio, estão envolvidas nodulinas mais conhecidas, como a leghemoglobina e enzimas envolvidas no processo de assimilação do nitrogênio fixado. A leghemoglobina tem a importante função de transportar oxigênio em taxas suficientes para o metabolismo aeróbio dos bacteróides, mas não em excesso, que possa inibir a atividade da nitrogenase.

Altas temperaturas, em regiões tropicais sem representado um dos principais fatores limitantes à FBN (HUNGRIA; VARGAS, 2000). Outros fatores limitantes foram descritos e agrupados em: características intrínsecas da espécie hospedeira; fatores edáficos; fatores

climáticos e fatores relativos à população nativa de rizóbio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No caso da característica intrínseca da espécie hospedeira de nodular, um método que pode ser empregado para verificar se uma espécie sem referências na literatura com relação a esta característica é capaz ou não de nodular é cultivá-la em substratos naturalmente férteis ou adubados, procedentes de diferentes plantios ou de ecossistemas naturais, onde predominem leguminosas nodulíferas, evitando adubação nitrogenada ou excesso de matéria orgânica, que podem inibir a nodulação. Realizar inoculação com mistura de várias estirpes oriundas de várias outras espécies também pode ser um meio de verificar sua capacidade de nodulação (MAGALHÃES et al., 1982; FARIA et al., 1984, 1987; MOREIRA et al., 1992).

Dentre os fatores edáficos e climatológicos, a acidez e a toxicidade de alumínio e manganês são comuns nos solos tropicais e podem afetar negativamente as simbioses de rizóbio com leguminosas (CARVALHO, 1978; MUNNS; FRANCO, 1981), mas este efeito varia, de acordo com a espécie vegetal e com a estirpe envolvida na simbiose. A deficiência de fósforo é o fator mais limitante a FBN em solos tropicais. Por ser um elemento essencial às plantas sua deficiência afeta, de modo generalizado, as simbioses de leguminosas com rizóbio, portanto para garantir uma melhor eficiência nas relações simbióticas é indispensável fornecer quantidades adequadas de fósforo (ISRAEL, 1987). No entanto, efeitos sinérgicos entre rizóbio e fungos micorrízicos, têm sido observados, evidenciando a importância desta simbiose tripla, rizóbio-leguminosa-fungos micorrízicos, em solos tropicais (JASPER et al., 1989; HERRERA et al., 1993).

3.6 *Canavalia ensiformis*

O feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* DC), também conhecido por feijão-bravo ou fava-brava, é uma leguminosa tropical, da família Fabaceae, e cultura anual, herbácea, de porte ereto e com crescimento determinado de 0,60 a 1,2m de altura. As folhas são grandes e alternadas, de cor verde escura e fornecem boa cobertura (EMBRAPA, 2000).

Esta espécie apresenta crescimento rápido e é muito utilizada como adubo verde, cultura de cobertura ou em consórcios com outras espécies, conhecida por tolerar uma ampla faixa de pH do solo, seca e outras situações ambientais estressantes. Esta espécie é também apresenta capacidade de associar com micorrizas e com bactérias fixadoras de nitrogênio e, portanto, seu uso também é interessante em processos de recuperação de áreas degradadas e solos contaminados com metais (ANDRADE et al., 2010).

O uso da *Canavalia ensiformis* como adubo verde é um dos mais comuns, principalmente em áreas muito impactadas e degradadas. A adubação verde é uma prática que visa melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos agrícolas e reduzir perdas de nutrientes por erosão, além de controlar a infestação de ervas daninhas, a lixiviação de nutrientes, as perdas de água e as flutuações de temperatura no solo, contribuindo para a recuperação de áreas degradadas. A produção de massa verde e massa seca da *Canavalia ensiformis*, que varia de 12 a 30 t ha⁻¹ ano⁻¹ e 2,7 a 7,0 t ha⁻¹ ano⁻¹, respectivamente, e as quantidades de nutrientes contidas na massa seca do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), 40,15 g.kg⁻¹ N, 2,2 g. kg⁻¹ P, 9,75 g.kg⁻¹ K, 29 g.kg⁻¹ Ca (adaptado de EMBRAPA, 2000), representam o potencial de contribuição dessa leguminosa à reciclagem de nutrientes no solo, especialmente de nitrogênio. Observa-se que a massa seca de feijão-de-porco equivale a uma aplicação razoável de nutrientes ao solo, especialmente de N, K e Ca. Entretanto, essas quantidades não são imediatamente disponíveis às culturas, visto que esses nutrientes estão na forma orgânica, tendo que ser transformados no solo para serem utilizados pelas plantas, principalmente o nitrogênio, pelas bactérias, que necessitam desse elemento como fonte de energia para o seu desenvolvimento, imobilizando-o temporariamente. Vale ressaltar que parte do nitrogênio pode ser perdido por volatilização. Por essa razão, a adubação verde deve ser considerada como um complemento da adubação mineral. O maior efeito agrônomico do manejo de solos com leguminosas deve ser considerado em relação ao aporte de matéria orgânica no solo, produzida pela sua biomassa, incorporada ou aplicada como cobertura morta. Além disso, apresenta potencial para realizar associações simbióticas com rizóbios, que atuam como fixadores biológicos de nitrogênio e esta associação ocorre naturalmente, resultando na formação de nódulos radiculares (LORENZI, 1995).

Alvarenga et al. (1995), avaliando as características de algumas espécies de adubos verdes, destacaram o feijão-de-porco como a espécie de mais rápido estabelecimento, apresentando uma cobertura do solo superior às demais espécies avaliadas. Aos 10 dias após a emergência, a *Canavalia ensiformis* recobria 35% do solo, o que do ponto de vista de controle de erosão, é bastante significativo.

Bonini e Alves (2011) utilizaram esta espécie e outras leguminosas em consórcio com braquiária em um projeto de recuperação de área degradada por um período de 17 anos e concluíram que em todos os tratamentos houve recuperação das propriedades do solo, sendo o feijão-de-porco superado em eficiência somente pela mucuna-preta, em termos de efeitos residuais, refletida no crescimento da gramínea.

3.7 Utilização de simbioses rizóbio-leguminosas em recuperação de áreas degradadas

O primeiro passo na revegetação de um ecossistema degradado consiste em fornecer meios de regeneração de sua biodiversidade, ciclagem de nutrientes e fluxo de energia, que constituem a base de sua sustentabilidade, permitindo que o processo sucessional volte a ocorrer naturalmente. Assim, a introdução de organismos selecionados (plantas e microrganismos), com suporte para seu estabelecimento, crescimento e reprodução, permite que outros organismos possam instalar-se na área. Dessa forma, a técnica de revegetação de áreas degradadas utilizando leguminosas em simbiose com rizóbio tem como fundamento o princípio das propriedades emergentes, que, em ecologia, entende-se pela “combinação de um ou mais componentes ou subconjuntos, para produzir sistemas funcionais com propriedades que não estavam presentes nos níveis hierárquicos inferiores, ou seja, nos subconjuntos separados” (SOUZA; SILVA, 1996).

Em ecossistemas degradados, geralmente, esses organismos ou subconjuntos separados não teriam capacidade para obter todos os recursos necessários a seu desenvolvimento, por outro lado, com base no que já foi exposto, quando uma leguminosa faz parte desse sistema funcional, em geral, apresenta propriedades que a tornam apta a colonizar áreas degradadas, com nível de exigência muito inferior ao de plantas não simbióticas. A grande diversidade de espécies da família Leguminosae, com características de crescimento em condições edafoclimáticas diversas, é outro fator que realça a importância dessas plantas na revegetação de áreas degradadas (FRANCO et al., 1992). Existem diversas espécies de leguminosas promissoras para uso em programas de recuperação de áreas e ecossistemas impactados, deve-se apenas priorizar as espécies locais, naturalmente adaptadas ao ambiente, e posteriormente espécies exóticas capazes de estabelecer-se de modo sustentado na área em processo de revegetação.

Várias pesquisas relacionadas à inoculação de espécies arbóreas (DAFT e EL-GIAHMI, 1975; HABTE e MANJUNATH, 1987), culturas anuais como *Phaseolus vulgaris* e *Arachis hypogea* (DAFT e EL-GIAHMI, 1974), *Glycine max* (CARLING et al., 1978; ASSIMI et al., 1980); *Vicia faba* (PAND e PAUL, 1980), forrageiras como *Stylosanthes* (MOSSE et al., 1976), *Medicago sativa* (BAREA, 1980), têm demonstrado benefícios decorrentes desta associação no crescimento inicial de mudas e aumentos significativos na nodulação, fixação do nitrogênio atmosférico e acúmulo de nutrientes, notadamente,

nitrogênio e fósforo. No entanto, a baixa competitividade de estirpes selecionadas ante a população nativa é um dos fatores que podem resultar na ausência de resposta à inoculação em condições de campo (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). É necessário, portanto, intensificar a seleção e inoculação conjunta de plantas e bactérias, para que a utilização desta biotecnologia seja realizada de forma bem sucedida em programas de revegetação de áreas degradadas.

A entrada de material formador de serrapilheira sob plantio de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá), em comparação com outros ambientes florestais, evidencia o potencial de utilização dessas espécies de leguminosas em programas de revegetação. O manto de serapilheira, acumulado na superfície, seis anos após o plantio de *Acacia mangium*, foi da ordem de 19.400 kg ha⁻¹, não considerando a fração que se decompõe e foi incorporada ao solo (COSTA et al., 1996). A alta taxa de aporte de serapilheira ao solo, por essa leguminosa, permite a formação de um reservatório de material orgânico e nutrientes, fundamental para o processo de revegetação.

Além do volume de material vegetal adicionado ao solo, suas características são de grande importância para a fertilidade do solo. As leguminosas são geralmente ricas em nitrogênio, apresentando baixa relação C/N. Dessa forma, a liberação de nutrientes do resíduo é geralmente mais rápida que de plantas com baixo teor de nitrogênio (alta relação C/N). Da mesma forma, a liberação de fósforo, potássio, enxofre, cálcio, magnésio e de micronutrientes, também varia com as espécies de leguminosas. A serapilheira produzida por leucena pode apresentar uma liberação anual de nitrogênio da ordem de 200 kg ha⁻¹ (SANDHU et al., 1990).

A utilização de leguminosa arbórea inoculada com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares no estudo de Coutinho et al. (2005) comprovou a capacidade da sesbânia (*Sesbania virgata*) em produzir, com rapidez, grande quantidade de fitomassa para o recobrimento do substrato degradados por extração de argila, independentemente da adição de adubos químicos ou orgânicos.

A aplicação prática deste recurso biotecnológico em programas de revegetação pode ser exemplificada por algumas experiências realizadas pela Embrapa Agrobiologia (RJ), em áreas erodidas ou susceptíveis à erosão, como encostas de morros e favelas, cortes de estradas, áreas que sofreram impacto ambiental, como área de mineração, de extração da camada superficial do solo e áreas agrícolas declivosas. A técnica usada nessas experiências consistiu em produzir mudas de leguminosas transplantadas para o campo com 20 a 30 cm de altura, sendo a inoculação do rizóbio feita com inoculante à base de turfa (FRANCO et al., 1992).

O maior efeito agrônômico do manejo de solos com leguminosas deve ser considerado em relação ao aporte de matéria orgânica no solo, produzida pela sua biomassa, incorporada ou aplicada como cobertura morta, possibilitando vantagens sob os aspectos: a) biológico: promove o desenvolvimento de microrganismos, ativação que se reflete no aumento da capacidade produtiva do solo; b) químico: aumenta a capacidade de troca de cátions - CTC; c) físico: atua na formação da estrutura do solo, regularizando a porosidade e aeração, permitindo maior permeabilidade e capacidade de retenção de água e de nutrientes. O uso consorciado da espécie de leguminosa forrageira *Canavalia ensiformis* na recuperação de um solo degradado surtiu resultados positivos quanto à presença de macrorganismos e a combinação de adubo verde (cobertura) e biossólido melhorou as propriedades físicas e químicas do horizonte A. (KITAMURA et al., 2008).

Nascimento e Silva (2004) observaram que o feijão-de-porco apresenta certa eficiência na absorção de minerais e que seu uso, nas condições do experimento, na região Nordeste do Brasil, onde ocorrem altas temperaturas e longos períodos sem precipitação pluviométrica, apresentou elevada quantidade de fitomassa.

A leguminosa feijão-de-porco, usada segundo as recomendações técnicas, dois meses após o plantio promove uma completa cobertura de solo, controlando a proliferação de plantas invasoras e o seu manejo, na floração incorpora ao solo, grandes quantidades de matéria orgânica e de nutrientes, mantendo ou elevando as propriedades físicas e químicas do solo (EMBRAPA, 2000).

3.8 Interações entre biossólidos e simbioses rizóbio-leguminosas

Entre os fatores que devem ser considerados na utilização agrícola de biossólidos, está a presença de metais pesados e sais solúveis que podem acumular no solo em níveis tóxicos para a população microbiana (GILLER et al., 1989). O processo de fixação biológica do nitrogênio pode ser utilizado como instrumento de avaliação dos possíveis distúrbios provocados pela aplicação de resíduos no solo. No entanto, a interação positiva entre biossólidos, microbiota do solo e na simbiose entre leguminosas e rizóbios não é um fenômeno geral e pode depender, em parte, do tipo de solo, do biossólido aplicado e da tecnologia utilizada para processamento de matéria-prima (ANTOLÍN et al., 2010a).

Chaudri et al. (2000) avaliaram o efeito de metais pesados na nodulação e desenvolvimento de ervilha e trevo branco e verificaram que estas duas leguminosas

nodularam em solos contaminados, contendo até 273 mg kg⁻¹ de zinco e que receberam doses de 100 mg ha⁻¹ de bio sólidos por um período de 10 anos. Em solos, onde a concentração de zinco foi superior, não foram encontrados nódulos e o percentual de nitrogênio foi inferior ao do tratamento controle, sem adubação. Reddy et al. (1983) verificaram que o potencial de nodulação da soja foi diminuído em solos tratados com doses crescentes de bio sólidos, em função da presença de metais pesados e sua disponibilidade durante a mineralização do bio sólido.

Lobo et al. (2012) ao avaliarem o crescimento inicial e a fixação biológica do nitrogênio de soja cultivada com doses de bio sólido compostado verificaram que os tratamentos sem inoculação com *Bradyrhizobium* e os tratamentos com inoculação e que receberam 30 e 40 t ha⁻¹ de bio sólido, apresentaram valores de concentração de N abaixo do adequado para a espécie cultivada. Para as sementes que não receberam a inoculação com *Bradyrhizobium* o aumento da dose de bio sólido compostado resultou em um decréscimo dos parâmetros avaliados.

Antolín et al. (2010a) verificaram que a aplicação de bio sólidos afetou negativamente a capacidade fotossintética da alfafa e a fixação do nitrogênio pelos nódulos. Esses autores atribuíram esse comportamento ao fato das leguminosas tratadas com bio sólido não dependerem exclusivamente da FBN, podendo utilizar o nitrogênio fornecido pelo bio sólido. Neste estudo a aplicação de bio sólido não afetou a capacidade de nodulação alfafa, mas diminuiu a atividade das enzimas envolvidas no processo de FBN. Sob condições de seca, a atividade da nitrogenase foi afetada significativamente nas plantas do tratamento controle, mas permaneceu inalterada nas plantas tratadas com bio sólido, indicando que os nódulos estavam mais protegidos durante o estresse hídrico (ANTOLÍN et al., 2010b).

Gurgel (2012) avaliou a interação entre a simbiose rizóbio e *Enterolobium contortisiliquum* (Timbaúba) e o uso de esgoto doméstico secundário e concluiu que a inoculação das sementes com rizóbio específico não foi afetada pelo uso de esgoto doméstico secundário como fonte alternativa de nutrientes.

Selivanovskaya et al. (2001), verificaram que a aplicação de três tipos de bio sólido compostado de origem doméstica em solos da Rússia aumentou em quatro vezes a biomassa microbiana e até 35 vezes a FBN, comparado ao tratamento controle, sem adubação.

Araújo (2003), em um primeiro experimento, avaliou o efeito de quatro anos de aplicação de dois bio sólidos provenientes das ETEs da SABESP em Franca-SP (despejos domésticos) e de Barueri-SP (despejos domésticos, porém possui grande representatividade de lançamentos industriais) na nutrição, nodulação e doenças da soja e concluiu que a maior dose

de biossólido aplicada, correspondendo a 8 vezes a quantidade de N requerida pela planta, proporcionou aumentos significativos no desenvolvimento da soja, sem prejuízo da nodulação. Devido ao maior aporte de N, oriundo da simbiose com o rizóbio e da mineralização no solo, todos os tratamentos que receberam biossólido tiveram número e massa nodular equivalentes. Em um segundo experimento avaliando o efeito de cinco anos da aplicação dos biossólidos, o autor verificou que o nitrogênio presente no solo não proporcionou o melhor desenvolvimento da soja, embora a planta tenha absorvido este elemento em concentração superior ao observado no experimento anterior. Este autor concluiu que a aplicação deste biossólido em uma mesma área por cinco anos consecutivos acumulou efeitos adversos ao desenvolvimento da soja, principalmente, devido à elevação das concentrações de zinco no solo.

Santos et al. (2011), ao aplicarem biossólido de curtume em solos arenosos e argilosos cultivados com feijão-caupi, verificaram que o comprimento da parte aérea e a concentração de N nesta leguminosa foram superiores no solo com aplicação de biossólido comparado ao solo sem fertilização. No solo arenoso, a massa dos nódulos aumentou com a aplicação do resíduo, enquanto no solo argiloso houve um decréscimo na massa nodular em doses superiores a $7,5 \text{ t ha}^{-1}$. Estes resultados sugerem que a resposta do feijão-caupi é influenciada pela dose de biossólido aplicada e pelo tipo de solo.

Teixeira et al. (2006) observaram um aumento significativo na matéria orgânica do solo com a adição das maiores doses de um biossólido gerado em um curtume no município de Teresina-PI. As doses foram calculadas com base no fornecimento de Cr e foram suplementadas com superfosfato simples e cloreto e potássio. As maiores doses afetaram negativamente a produção de massa seca dos nódulos do feijão-caupi. A maior dose de biossólido utilizada resultou em decréscimos significativos na massa nodular e no tamanho médio dos nódulos do feijão-caupi.

Vieira et al. (2005) avaliaram o efeito da aplicação de doses crescentes (0,5; 1,0 e 2,0 vezes o N recomendado para feijoeiro) de um biossólido gerado na ETE da SABESP em Barueri-SP, sobre as propriedades do solo, na nodulação e fixação de N, por estirpes nativas de rizóbio em associação com feijoeiro. Os autores concluíram que o tratamento que forneceu a maior dose de biossólido desfavoreceu a simbiose entre o feijoeiro e os rizóbios. Este resultado evidencia a necessidade de que o biossólido seja aplicado, considerando principalmente seus teores de N.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação, no Departamento de Engenharia Civil da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus “Júlio Mesquita Filho” em Guaratinguetá, no período de 06 de outubro de 2013 a 06 de janeiro de 2014, sob condições controladas de luminosidade, temperatura e irrigação.

A espécie de leguminosa forrageira *Canavalia ensiformis*, comumente denominada Feijão-de-Porco, foi utilizada neste estudo como planta hospedeira para as estirpes de rizóbio específicas (BR2003 e BR2811).

4.1 Solo

O solo utilizado neste estudo foi coletado na microbacia do ribeirão Gomerál, que constitui parte da porção superior da bacia hidrográfica do ribeirão Guaratinguetá, na Área de Proteção Ambiental (APA) da Serra da Mantiqueira. Geograficamente, esta bacia encontra-se no norte do município de Guaratinguetá (SP) e compreende, parcialmente, as cartas topográficas de Guaratinguetá (SF.23-Y-B-VI-4), Delfim Moreira (SF.23-Y-B-VI-1) e Lorena (SF.23-Y-B-VI-2), produzidas pelo IBGE, na escala 1:50.000. A bacia possui uma área de, aproximadamente, 164 km², o que corresponde a cerca de 22% da área do município de Guaratinguetá, que é de 734 km² (FERREIRA et al., 2011).

No mapa de uso e ocupação do solo desta bacia, apresentado na Figura 3, é possível verificar que as áreas de maior ação antrópica são representadas, principalmente, por pastagem e cultivos de várzea. Segundo Ferreira et al. (2011), a bacia hidrográfica do ribeirão Guaratinguetá apresenta classes de uso do solo bem distribuídas, sendo maiores as áreas ocupadas com pastagem (54%), onde grandes áreas não possuem qualquer prática de proteção do solo ou respeito às exigências e limitações impostas às áreas pelo Código Florestal, o que pode provocar a intensificação dos processos erosivos. Além disso, esta é uma região da bacia propícia a receber maiores volumes de precipitação em função do efeito orográfico da encosta da serra, o que condiciona a ocorrência de chuvas mais frequentes e intensas e, conseqüentemente, o escoamento superficial.

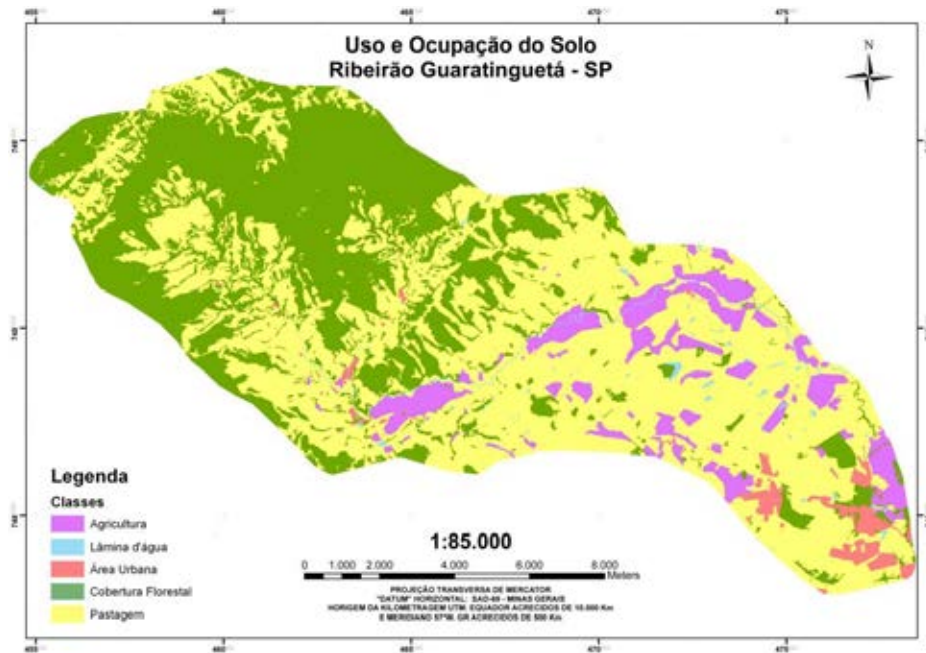


Figura 3 - Mapa de uso e ocupação do solo da bacia hidrográfica do ribeirão Guaratinguetá-SP (TNC, 2006)

Na região de cabeceira da bacia hidrográfica do ribeirão Guaratinguetá ocorrem as microbacias dos ribeirões Gomerl, Taquaral e do Sino, em altitudes elevadas de até 2.000 m na nascente do ribeirão do Sino, de relevo escarpado, montanhoso e forte ondulado da serra da Mantiqueira, possuindo solos com pouca profundidade, classificados de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos (EMBRAPA, 2006) como Cambissolos Háplicos e Cambissolos Húmicos, associados a afloramentos rochosos (Figura 4). Estes solos ocupam 58,3 km², o correspondente a 39,9% da área total da bacia e a baixa profundidade, aliada à fraca estabilidade estrutural e baixa fertilidade, características intrínsecas dos Cambissolos, tornam estas áreas da cabeceira da bacia hidrográfica do ribeirão Guaratinguetá extremamente suscetíveis às alterações antrópicas impostas pelo uso inadequado do solo, principalmente devido à substituição da cobertura florestal por pastagem, o que aumenta a ocorrência de processos erosivos e a predisposição a escorregamentos.

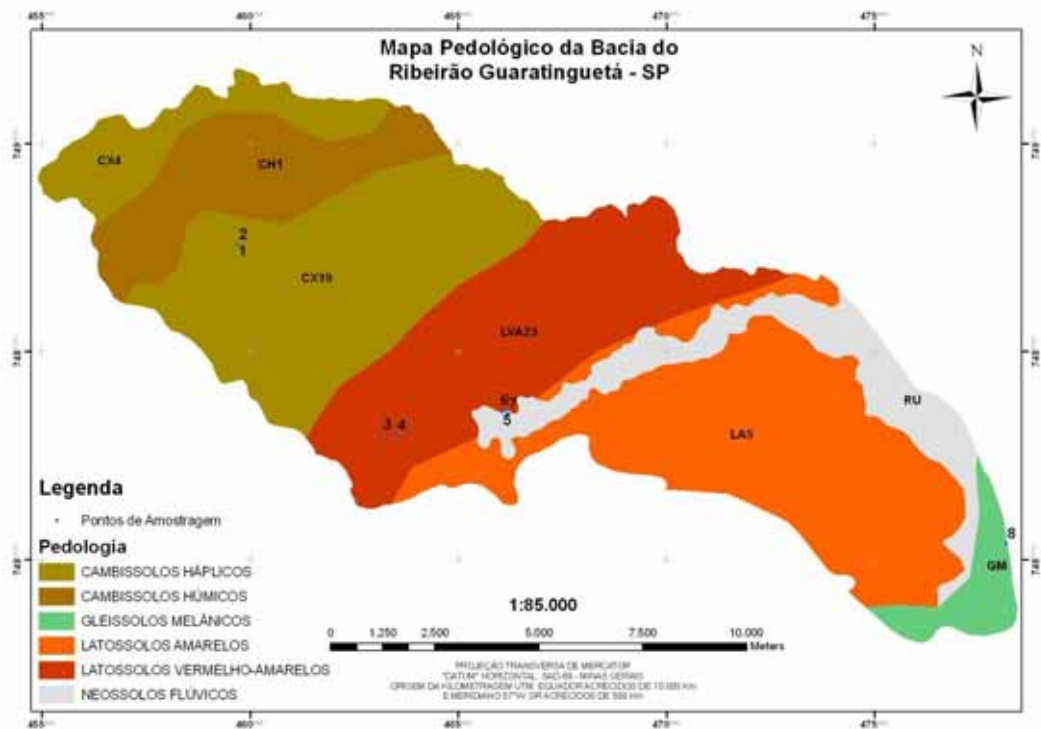


Figura 4 - Mapa pedológico da bacia hidrográfica do ribeirão Guaratinguetá-SP (FERREIRA et al., 2011)

No experimento realizado em condições controladas de casa de vegetação foram utilizadas amostras compostas de um Cambissolo Háplico, retiradas em dois pontos da microbacia do ribeirão Gomerál, na camada de 0-20 cm, que foram misturadas, homogeneizadas e analisadas quanto aos atributos físicos e químicos, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Atributos químicos e físicos do Cambissolo Háplico distrófico coletado na camada de 0-20 cm de profundidade

pH	Químicos													Físicos		
	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	V	S	Argila	Silte	Areia
	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	-----mmolc dm ⁻³ -----				-----mg dm ⁻³ -----				%	mmolc dm ⁻³	-----g kg ⁻¹ -----			
4,1	20	1	1,3	5	1	60	0,12	0,7	68	1	0,3	11	7,3	359	181	460

Métodos de extração: pH: Solução CaCl₂; Matéria orgânica (MO): Ácido Sulfúrico; P, K, Ca, Mg: Resina; H+Al- Acidez Potencial: SMP; Micronutrientes: DTPA.

4.2 Biossólido

O biossólido utilizado no estudo foi fornecido pela SERRAMAR - Cooperativa de Laticínios de Guaratinguetá (SP), que atualmente produz cerca de 65 milhões de litros de leite, segundo informações da Cooperativa, e realiza o processamento do leite para a produção de bebidas lácteas, manteiga e requeijão. O biossólido é gerado pelo tratamento dos efluentes industriais, oriundos de lavagens de pisos, tanques e maquinário, em reator e digestor aeróbico e, em seguida, transportado para leitos de secagem (Figura 5).



Figura 5 - Processo de tratamento de efluentes industriais da SERRAMAR. 1) Reator aeróbico; 2) Digestor de lodo aeróbico e 3) Leitos de Secagem.

Para a caracterização de parâmetros físicos, químicos e biológicos, seis amostras do biossólido foram retiradas de leitos de secagem previamente limpos, que receberam o resíduo nos dias 13/02, 15/02, 19/02, 27/02, 01/03 e 05/03 de 2013, sendo a coleta efetuada após nove dias de secagem.

Destas, foram retiradas duas amostras compostas que, após a homogeneização, foram enviadas ao Laboratório de Fertilizantes e Resíduos, do Instituto Agrônomo de Campinas, sendo os métodos de ensaio para metais: EPA-SW-846-3051a, com determinação por espectrometria atômica, de acordo com EPA-SW-846-6010c; para Nitrogênio total: método Kjeldahl; para nitrogênio amoniacal, nitrato e nitrito: destilação por arraste a vapor; para carbono orgânico: digestão com dicromato e determinação volumétrica; para umidade e sólidos voláteis: perda de massa a 60 e 500°C, respectivamente; para pH: determinação em extrato aquoso na proporção 1:10 (resíduo:água), segundo métodos descritos em Andrade e Abreu (2006) e para os biológicos, os métodos descritos em USEPA 1992 part 503.

Os parâmetros Ferro (Fe) e Manganês (Mn) foram analisados, conforme procedimentos adotados pela USEPA, SW-846 última versão on line (2007). Os resultados

dos parâmetros químicos e biológicos foram utilizados para a classificação do bio-sólido, conforme a NBR 10.004/2004 e a avaliação do potencial agrônomo, foi realizada considerando os critérios estabelecidos pela Resolução CONAMA 375/2006, que embora não se aplique a bio-sólido oriundos de processos industriais, estabelece limites que devem ser respeitados para o uso agrícola destes resíduos.

4.3 Preparação do substrato

O substrato utilizado constituiu de 77% de Cambissolo Háplico e 23% de turfa oilifílica, fornecida pela empresa ECOSORB. As amostras de Cambissolo Háplico e a turfa foram acondicionadas em panelas de alumínio, previamente lavadas com solução de limpeza e água deionizada, e separadamente foram esterilizadas em autoclave durante 50 minutos à temperatura de 121°C (Figura 6).



Figura 6 - Acondicionamento componentes do substrato (solo e turfa) em panela de alumínio para o processo de autoclavagem à temperatura de 121°C durante 50 minutos.

Os componentes do substrato (solo e turfa) foram pesados e acondicionados em sacos plásticos previamente lavados, para facilitar o manuseio, a homogeneização da mistura e a instalação do experimento, que contou com vasos constituídos por tubos de PVC de 6” de diâmetro e 20 cm de altura. Cada vaso recebeu 1 dm⁻³ de substrato (Figura 7).



Figura 7 – Pesagem e preparação do substrato e vasos constituídos por tubos de PVC de 6" de diâmetro e 20 cm de altura, contendo em seu interior 1dm^{-3} do substrato utilizado para avaliar o desenvolvimento inicial e a nodulação de *Canavalia ensiformis* inoculadas com rizóbio específico.

4.4 Multiplicação do Rizóbio

As estirpes de rizóbio específicas para a leguminosa utilizada (BR2003 e BR2811), fornecidas pela Embrapa Agrobiologia/Seropédica (RJ) foram multiplicadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Engenharia, do Departamento de Engenharia Civil da UNESP, campus de Guaratinguetá, aplicando a metodologia descrita no Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola da Embrapa (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994), conforme apresentado na figura 8.



Figura 8 - Preparação dos inoculantes, por meio da multiplicação em meio líquido YEM, contendo estirpes de rizóbio específicas para leguminosas, fornecidas pela EMBRAPA Agrobiologia/Seropédica (RJ).

4.5 Tratamentos e Delineamento Experimental

Por se tratar de uma espécie leguminosa, a planta não possui exigência nutricional para nitrogênio, uma vez que suas necessidades são supridas pela associação com rizóbio, portanto os 6 tratamentos (T) foram estabelecidos com base na exigência nutricional da leguminosa em fósforo (P_2O_5), segundo recomendações do Boletim Técnico nº100 (RAIJ et al., 1997). As doses de biofertilizante forneceram 0, 25, 50, 75 e 100% da exigência nutricional da espécie em fósforo (40 t ha^{-1}) o que corresponde, respectivamente à 0, 8,6; 17; 26; 35 mg dm^{-3} de N total. Para a adubação mineral foi utilizado KH_2PO_4 (Fosfato de Potássio p.a.). A tabela 3 apresenta as doses de biofertilizante utilizadas e o fornecimento nutricional correspondente.

Tabela 3 - Tratamentos aplicados a sementes de *Canavalia ensiformis* inoculadas e não inoculadas.

Tratamento	Aplicação de Biofertilizante			Fornecimento Nutricional (mg dm^{-3})		
	P_2O_5 (%)	mg dm^{-3}	t ha^{-1}	P_2O_5	K_2O	N total
T1	0	0	0	0	0	0
T2	25	570	0,114	5	3,75	8,6
T3	50	1150	2,3	10	7,5	17
T4	75	1720	3,44	15	11,25	26
T5	100	2300	4,6	20	15	35
T6	-	-	40	20	20	-

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial de 2 X 6, sendo constituído por dois blocos, com e sem inoculação com estirpes de rizóbios específicos e 6 tratamentos, sendo 5 deles com doses crescentes de biofertilizante, incluindo o tratamento controle (dose zero de biofertilizante) e 1 tratamento com adubação mineral (Tabela 3). Para cada tratamento foram feitas 4 repetições (vasos), totalizando 48 parcelas experimentais (vasos com 1 dm^{-3} de substrato, cada um contendo inicialmente, 9 sementes de *Canavalia ensiformis*) conforme figura 9.

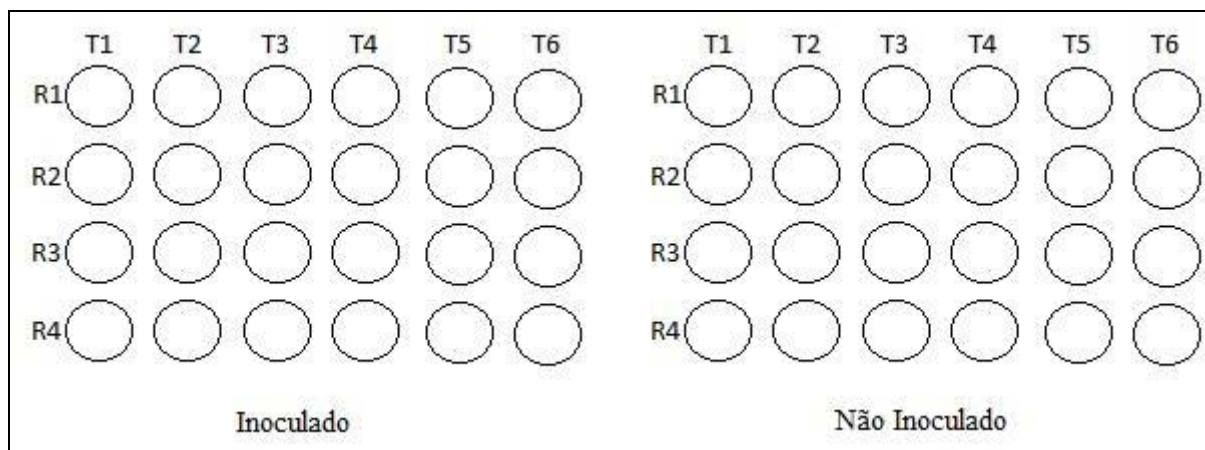


Figura 9 – Delineamento experimental contando com 6 tratamentos (T) e 4 repetições (R), nos blocos Inoculado e Não Inoculado

4.6 Desenvolvimento do Experimento

As sementes de *Canavalia ensiformis* foram submetidas à lavagem durante uma hora em água deionizada corrente e esterilização por imersão em álcool por 15 minutos e lavagem em água deionizada. A semeadura do experimento ocorreu no dia 06 de outubro de 2013, quando os vasos contendo a mistura esterilizada do substrato (Cambissolo Háplico e turfa) receberam as sementes da leguminosa com e sem inoculantes e os 6 tratamentos (Figura 9). Foram semeadas nove sementes por vaso, sendo mantidas apenas três plantas após o desbaste, realizado após a emergência de todas as plântulas, aos 25 dias após o plantio.

A semeadura do tratamento não inoculado foi realizada primeiro, para não haver risco de “contaminação” com rizóbio. A inoculação das sementes com estirpes de rizóbios específicos (concentração de 50% de BR2003 e 50% de BR2811) foi efetuada durante a semeadura, por meio da aplicação do meio líquido YEM (VINCENT, 1970), na diluição 10^{-7} (1.10^8 g^{-1} células de rizóbio).

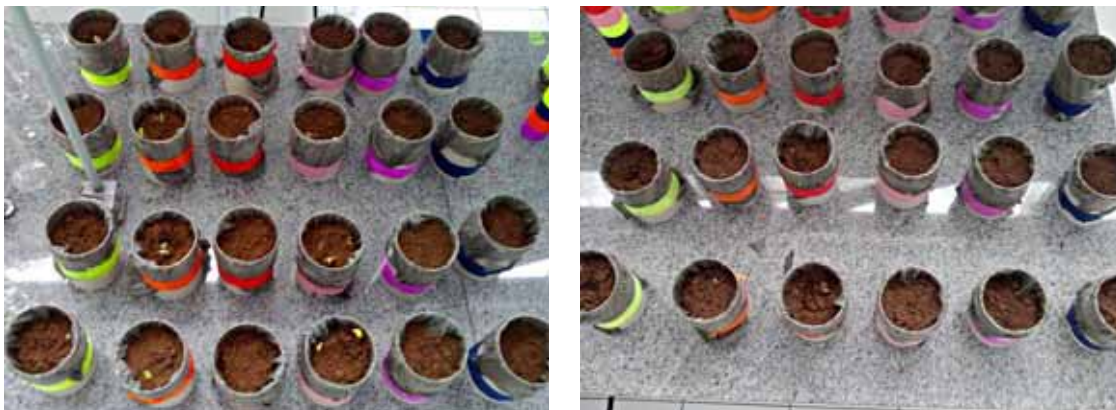


Figura 10- Vasos com o substrato, contendo sementes germinadas (10 dias após o plantio) inoculadas e não inoculadas (respectivamente), tratadas com doses crescentes de biossólido e adubação mineral

Após a semeadura da *Canavalia ensiformis* nos vasos, a umidade foi mantida próxima a 70% do volume total de poros (VTP), por meios de pesagens dos vasos e irrigação com água deionizada. As plantas foram coletadas 90 dias após a semeadura, quando se avaliaram a altura da planta, o diâmetro do caule, a massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), contagem de nódulos e a fixação biológica de nitrogênio.

A parte aérea da planta foi separada da raiz para a realização da medição do diâmetro do caule e da altura da planta. Para estas medições foram utilizadas trena e fita métrica. Após estas análises, as plantas foram secas em estufa a 100°C e posteriormente, submetidas à pesagem (Figura 11).



Figura 11 - Análise de medição da altura das plantas utilizando trena

As raízes foram retiradas do solo e lavadas em água corrente. As raízes dos tratamentos inoculados foram lavadas em água corrente com o auxílio de uma peneira fina, a fim de não perder nenhum nódulo (Figura 12). Posteriormente os nódulos foram separados

das raízes e acondicionados em placas Petri, para realizar a contagem e avaliar se a atividade da nitrogenase foi efetiva.



Figura 12 - Separação solo/raízes (1); Lavagem das raízes, com o auxílio de peneira fina (2) e Separação dos nódulos radiculares (3).

Para avaliar se a nodulação foi efetiva, os nódulos foram retirados, cortados e sua coloração foi verificada. A coloração rósea do nódulo indica a presença ativa da leghemoglobina, o que comprova que a fixação do N_2 está ocorrendo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias nos tratamentos que receberam a mesma dose de bio sólido. Foi efetuada análise de regressão para as doses de bio sólido separadamente para os tratamentos com e sem inoculação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Biossólido

Os resultados das análises químicas, físicas e biológicas do lote de biossólido utilizado neste estudo estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros físicos, químicos e biológicos do biossólido em base seca, gerado pela Cooperativa de Leite de Guaratinguetá – Serramar e as respectivas concentrações típicas e as máximas estabelecidas pela Resolução CONAMA 375/2006

Parâmetros físico-químicos				
	Unidade	Biossólido Base seca	Valores típicos ¹	CONAMA nº 375/2006 (VPM) ²
pH (em água 1:10)	---	6,8	Bioestabilizado=7,5	---
Umidade, a 60 - 65°C	% (m m ⁻¹)	33,9	>80	---
Sólidos Totais	% (m m ⁻¹)	64,6	---	---
Sólidos Voláteis	% (m m ⁻¹)	32,4	---	---
Carbono Orgânico	g kg ⁻¹	216	133 a 229	---
Nitrogênio Kjeldahl (N-total)	g kg ⁻¹	32,5	---	---
Nitrogênio Amoniacal	mg kg ⁻¹	68,0	---	---
Nitrogênio Nitrato + Nitrito	mg kg ⁻¹	379	---	---
Nitrogênio total	g kg ⁻¹	32,9	16 (variável)	---
C/N	---	6,5	11 (libera NH ₄ ⁺)	---
Fósforo	g kg ⁻¹	8,3	8 (>15 = alto)	---
Potássio	mg kg ⁻¹	1943	2g kg ⁻¹ (<5 = baixo)	---
Cálcio	g kg ⁻¹	24,3	16 (<15 = baixo)	---
Magnésio	g kg ⁻¹	1,8	6 (<6 = baixo)	---
Enxofre	g kg ⁻¹	8,2	2 (<2 = baixo)	---
Ferro	mg kg ⁻¹	5228	---	---
Manganês	mg kg ⁻¹	3858	---	---
Zinco	mg kg ⁻¹	366	900	2800
Cobre	mg kg ⁻¹	51,2	435	1500
Arsênio	mg kg ⁻¹	2,3	---	41
Cádmio	mg kg ⁻¹	1,4	11	39
Chumbo	mg kg ⁻¹	11,8	360	300
Mercúrio	mg kg ⁻¹	<1,0	---	17
Níquel	mg kg ⁻¹	19,3	362	420
Selênio	mg kg ⁻¹	<1,0	---	100
Sódio	mg kg ⁻¹	2092	---	---
Bário	mg kg ⁻¹	44,6	---	1300
Cromo	mg kg ⁻¹	34,4	---	1000
Molibdênio	mg kg ⁻¹	0,90	---	50
Parâmetros biológicos				
Ovos viáveis de Helminths ³	<0,25 ovos g ⁻¹ ST	0	---	<0,25 ovos g ⁻¹ ST
Coliformes termotolerantes ⁴	NMP g ⁻¹	13,62	---	<10 ³ NMP g ⁻¹ ST
<i>Salmonella</i> sp.	NMP 10g ⁻¹	Ausente	---	Ausência em 10g ST

Análises realizadas pelos Laboratórios do Instituto Agronômico de Campinas - Centro de P&D de Solos e Recursos Ambientais, acreditados pela CGCRE, de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob o número CRL 450. ¹ Conforme Raj et al. (1997) e Oliveira (2000); ² Valor Máximo Permitido; ³ Sólidos Totais e ⁴ Número Mais Provável.

Cada espécie vegetal tem suas necessidades e exigências nutricionais e cada estado brasileiro possui recomendações específicas de adubação. Porém, em condições favoráveis à

mineralização da matéria orgânica, o bio sólido pode liberar grande quantidade de N mineral para o solo nos primeiros dias após a aplicação (BOEIRA, 2004), além de melhorar o estado de agregação das partículas do solo, diminuir sua densidade, aumentar a porosidade, a capacidade de retenção de água e capacidade de troca de cátions, aumentando o teor de matéria orgânica e disponibilizando macro e micronutrientes (OLIVEIRA et al., 2002; SOARES, 2003; TRANNIN et al., 2008; BARBOZA, 2007; CAMPOS; ALVES, 2008; KITAMURA, 2008). Como resultado, a aplicação de bio sólidos tem conduzido ao aumento na absorção de nutrientes pelas culturas, refletindo no aumento de produtividade (MELO; MARQUES, 2000).

Considerando a NBR 10.004/2004 da ABNT e com base nestes resultados, o bio sólido foi classificado como resíduo não perigoso e não inerte – Classe II-A. Os resíduos desta classe não se enquadram como perigosos, porém podem apresentar características como biodegradabilidade, combustibilidade ou solubilidade em água. O resíduo analisado neste estudo apresentou boa biodegradabilidade, com uma elevada mineralização de N-orgânico, indicada pela relação C/N de 6,5. Segundo Raij et al. (1997), compostos orgânicos com relação C/N menor que 25 geralmente liberam a maior parte do N no primeiro ano de aplicação. A relação C/N encontrada em bio sólidos, geralmente, é muito baixa, da ordem de 12 a 5, mineralizando o N-orgânico em NH_4^+ rapidamente. Por meio do processo de nitrificação, o NH_4^+ presente no bio sólido, somado ao que derivou do N-orgânico, é oxidado a nitrito (NO_2^-) e rapidamente a nitrato (NO_3^-), que pode tornar-se um fator limitante à aplicação de bio sólidos em solos agrícolas, devido à possibilidade de lixiviação e poluição de corpos hídricos por meio de sua alta mobilidade no solo (TRANNIN et al, 2008).

A resolução CONAMA 375/2006 define duas classes de bio sólido em função da concentração de agentes patogênicos, classe A, para bio sólidos que apresentem concentrações baixas de agentes patogênicos e classe B, para concentrações mais elevadas de agentes patogênicos presentes no lodo.

Segundo esta resolução, o bio sólido caracterizado neste trabalho se enquadra na Classe A. Bastos et al. (2009) apontaram sérias restrições estabelecidas pela legislação para o uso do bio sólido como, por exemplo, a proibição do uso de bio sólidos de classe B. Segundo os autores, esta proibição é uma medida desnecessariamente rigorosa; seu uso parece defensável, desde que acompanhado de medidas adequadas de proteção à saúde, com especial atenção à saúde ocupacional (risco do trabalhador), que apontou riscos mais elevados decorrentes do uso de bio sólidos, Classes A e B, do que à saúde do consumidor. Este trabalho ainda sugere que o padrão para ovos de helmintos para a Classe A ($< 0,25$ ovo / g

ST) possa ser muito restrito, mas que, por outro lado, que o padrão Classe B (< 10 ovos / g ST) seja por demais permissivo, acarretando risco elevado ao trabalhador.

O biossólido industrial da SERRAMAR apresentou um valor de pH próximo à neutralidade e, portanto, não apresenta grande potencial de uso como corretivo da acidez do solo, mas pode aumentar o pH de solos muito ácidos, característica da maioria dos solos brasileiros, altamente intemperizados e de baixa fertilidade. De acordo com Boeira (2004), pode haver um aumento inicial no pH em solos tratados com biossólidos contendo pH neutro a alcalino, devido às reações de degradação da carga orgânica do resíduo. No entanto, este efeito pode ser seguido por processos de acidificação do solo.

A baixa umidade do biossólido (33,9%) favorece o transporte do material a longas distâncias, diminuindo os custos com frete. Em uma análise de custos e benefícios, a umidade deste material pode ser um ponto favorável à sua aplicação.

Trannin et al. (2008) verificaram que o elevado teor de sódio ($3.633 \text{ mg Na kg}^{-1}$) de um biossólido da indústria de resina PET não limitou a utilização agrícola deste resíduo até a dose de 24 t ha^{-1} para o cultivo de milho. Araújo et al. (2007) observaram que a adição do biossólido industrial oriundo de uma empresa alimentícia, contendo baixos teores de K e elevados teores de Ca, P e N, quando aplicado na proporção de 10% do substrato, proporcionou melhor desenvolvimento na produção de mudas de tomate, berinjela, almeirão e alface, enquanto a adição em proporções superiores, aumentou a disponibilidade de Ca e o pH do substrato e diminuiu os teores de K, tendo influência negativa na emergência destas espécies.

Os teores de todos os metais pesados presentes no biossólido da SERRAMAR foram inferiores aos limites permitidos pela legislação e aos teores típicos dos biossólidos. A presença de metais pesados é um fator limitante à aplicação agrícola de biossólidos, que quando absorvidos pelas plantas podem entrar na cadeia alimentar, uma vez que estes possuem efeito cumulativo. Segundo Barboza (2007), os metais pesados mais encontrados em biossólidos são o Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Fe, Co, Mn, Mo, Hg, Sn e Zn que, em elevadas concentrações no solo podem limitar o crescimento e o desenvolvimento da vegetação, além de serem acumulados em quantidades tóxicas, inibindo os processos fisiológicos, como transpiração, respiração e fotossíntese (RASKIN et al., 1994). Andrade e Mattiazzo (2000) verificaram que, após 360 dias de aplicação do biossólido em solos florestais, não houve lixiviação dos metais Cd, Cr, Cu e Ni no solo, até a profundidade de 90cm e somente o Zn movimentou no perfil do solo, na camada de 30-60cm.

Vários estudos evidenciaram as vantagens do uso de biossólidos na agricultura para diferentes culturas, dentre elas o milho (TRANNIN et al., 2008), eucalipto (VAZ; GONÇALVES, 2002; ROCHA et al., 2013), leguminosas (LEMAINSKI; SILVA, 2006; BARBOZA, 2007, NÓBREGA et al., 2007 e LOBO et al., 2012) e gramíneas (BACKES et al., 2013).

A Resolução CONAMA 375/2006 não estabelece limites para N, P e K, porém estes macronutrientes presentes no biossólido apresentaram concentrações muito próximas às encontradas no biossólido doméstico caracterizado por Backes (2013), sendo maiores que as observadas por Trannin (2004) em um biossólido industrial de uma indústria de resina PET e menores que as concentrações do biossólido industrial de empresa de laticínios, caracterizado por Trannin et al. (2013). A concentração de Fe no biossólido é inferior às concentrações dos biossólidos estudados por Trannin (2004) e Backes (2013) e ambos obtiveram resultados positivos com a aplicação do biossólido no solo, não observando efeitos negativos quanto aos teores de Fe. Já o teor de Mn é maior do que nos outros estudos, porém há espécies vegetais exigentes neste micronutriente. Os teores de micronutrientes, metais pesados e de parâmetros biológicos foram inferiores aos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 375/2006, apresentando potencial de uso agrícola.

As concentrações de N, P e K tipicamente encontradas nos biossólidos apresentam a relação de 2:1:0,25 e a relação do biossólido industrial da SERRAMAR apresentou a relação de aproximadamente 4:1:0,25, sendo elevado o potencial de uso como fertilizante nitrogenado. Além disso, o biossólido utilizado neste trabalho não apresentou teores de metais pesados acima do limite máximo permitido pela Resolução CONAMA 375/2006. Embora as regulamentações federal (Resolução CONAMA 375/2006) e do estado de São Paulo (P 4230 – CETESB) tenham sido criadas para o uso de biossólidos de origem doméstica, todos os parâmetros analisados neste biossólido atendem às limitações destas regulamentações legais.

5.2 Crescimento inicial da *Canavalia ensiformis*

A germinação da *Canavalia ensiformis* ocorreu aos oito dias após a semeadura. As plantas inoculadas tiveram o crescimento inicial mais rápido do que as plantas não inoculadas, sendo este comportamento mais acentuado no T3 (1.150 mg dm⁻³ de biossólido), quando aos dez dias, já haviam germinado dez do total de sementes inoculadas, enquanto apenas uma semente deste tratamento, sem inoculação, germinou (Figura 13).



Figura 13 - Germinação da *Canavalia ensiformis* aos 8 dias após a semeadura: à esquerda plantas não inoculadas, e à direita plantas inoculadas, ambas adubadas com 1.150 mg dm^{-3} de bio sólido (T3).

Este resultado pode ser explicado pela comunicação através de sinais químicos entre a planta hospedeira e o rizóbio. Através dessa comunicação, células do córtex radicular da leguminosa começam a se dividir rapidamente para formar uma estrutura para abrigar as bactérias, resultado em um desenvolvimento mais rápido (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Também foram observadas diferenças na produção de massa foliar e na cobertura do solo ao longo do tempo, sendo verificado no tratamento inoculado melhor cobertura do solo aos 60 e 90 dias após a semeadura e maior produção de massa foliar, principalmente aos 30 dias após a semeadura, como ilustra a figura 14.



Figura 14 - Plantas de *Canavalia ensiformis* inoculadas (à esquerda) e não inoculadas (à direita) aos 30, 60 e 90 dias de experimento em casa de vegetação.

A coloração verde escuro da folhagem das plantas evidencia a presença de N no solo, podendo ter sido fornecido via biossólido ou via fixação biológica de nitrogênio. Aos 90 dias foi realizada a coleta das plantas para a avaliação da ocorrência ou não de nódulos efetivos, o dimensionamento da parte radicular e da parte aérea das plantas. Estas avaliações possibilitaram verificar a resposta das mudas da leguminosa quanto à interação da inoculação com rizóbio específico e à adição de diferentes doses de biossólido.

5.2.1 Altura e diâmetro do caule

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros de desenvolvimento inicial das mudas de *Canavalia ensiformis* nos diferentes tratamentos, aos 90 dias após a semeadura.

Tabela 5 - Diâmetro do caule e altura das mudas de *Canavalia ensiformis* nos diferentes tratamentos aos 90 dias após a semeadura

Tratamentos ¹	Diâmetro do Caule (cm)		Altura (cm)	
	Inoculado	Não Inoculado	Inoculado	Não Inoculado
T1	2,42	2,32	86	82,44
T2	2,33	2,37	80,62	86,58
T3	2,38	2,28	85,12	87
T4	2,25	2,27	80,91	92,14
T5	2,33	2,25	69,92	77,17
T6	2,27	2,36	67,29	71,58

¹ Tratamentos: T1 = controle (sem adubação); T2 = 570 mg dm⁻³ de biossólido; T3 = 1.150 mg dm⁻³ de biossólido; T4 = 1.720 mg dm⁻³ de biossólido; T5 = 2.300 mg dm⁻³ de biossólido e T6 = 20 mg dm⁻³ de P₂O₅ (adubação mineral).

Os dados obtidos em todos os tratamentos apresentados na tabela 5 foram submetidos à análise de variância e como não apresentaram diferenças significativas não foi aplicado o teste de comparação entre as médias. Este resultado indica que a nutrição fornecida pelo biossólido industrial da SERRAMAR foi benéfica à *Canavalia ensiformis* e não diferiu da adubação mineral, justificando sua aplicação visando o fornecimento de nutrientes, a redução de custos com adubação e a melhoria de atributos físicos, químicos e biológicos do solo.

No entanto, houve diferença significativa quando foram analisados apenas os tratamentos contendo as doses crescentes de biossólido, sendo aplicado o teste de comparação entre as médias (Tukey $p < 0,05$) e a análise de regressão, apresentados na tabela 6 e na figura 15, respectivamente.

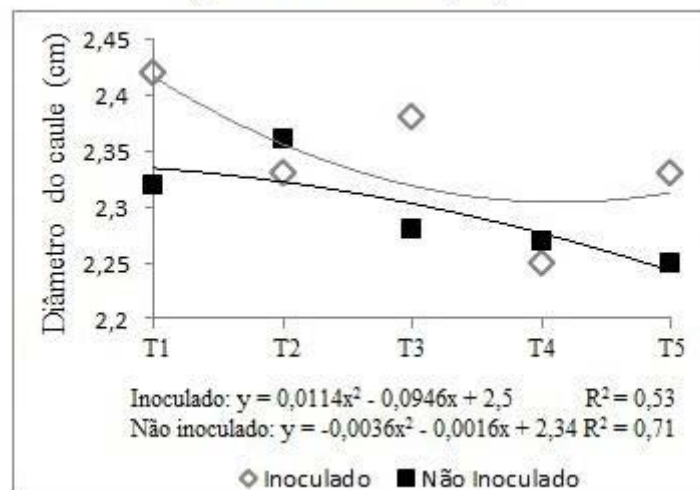
Tabela 6 - Diâmetro do caule da *Canavalia ensiformis* inoculada e não inoculada nos diferentes tratamentos¹

Diâmetro do Caule (cm) ²									
Inoculado					Não Inoculado				
T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
2,42 a	2,33 ab	2,38 ab	2,25 b	2,33 ab	2,32 ab	2,36 ab	2,28 ab	2,27 ab	2,25 b

¹ Tratamentos: T1 = controle (sem adubação); T2 = 570 mg dm⁻³ de biossólido; T3 = 1.150 mg dm⁻³ de biossólido; T4 = 1.720 mg dm⁻³ de biossólido e T5 = 2.300 mg dm⁻³ de biossólido. ² Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Tukey, $p < 0,05$).

Os tratamentos, T4 (inoculado) e T5 (não inoculado), que correspondem respectivamente as doses de 1.720 e 2.300 mg dm⁻³ diminuíram significativamente o diâmetro do caule da *Canavalia ensiformis* em comparação ao T1 (inoculado). O maior diâmetro do caule no T1 (controle, sem adubação e inoculado) indica que houve interação entre rizóbio e *Canavalia ensiformis* e a ocorrência efetiva da fixação biológica de nitrogênio, auxiliando no processo de crescimento da plântula (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; BARBOZA, 2007). Em contrapartida o T1 (controle, sem adubação e não inoculado), apesar de apresentar um valor relativamente alto para o diâmetro do caule, não foi significativamente diferente quando comparado com os demais tratamentos, indicando que a falta de adubação não impediu o crescimento das plântulas, porém não apresentou vantagens em comparação aos demais tratamentos com biofóssido.

A) Diâmetro do caule (cm)



B) Altura das plantas (cm)

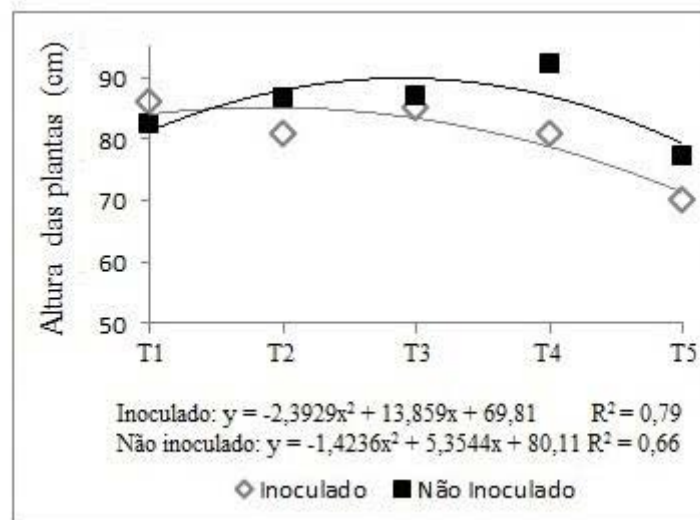


Figura 15 - A) Diâmetro do caule (cm) e B) Altura das plantas (cm) de *Canavalia ensiformis* inoculadas e não inoculadas com rizóbio específico, em resposta à aplicação de doses crescentes de biossólido.

Verificou-se um decréscimo no diâmetro do caule das plantas com o aumento das doses de biossólido. No entanto, as plantas inoculadas apresentaram valores médios mais elevados do que as plantas não inoculadas. Observou-se na figura 16 um decréscimo na altura das plantas inoculadas em resposta ao aumento das doses de biossólido, a partir do tratamento T3 (1.150 mg dm⁻³ de biossólido), enquanto as plantas não inoculadas apresentaram aumento da altura até o T4 (1.720 mg dm⁻³ de biossólido). As plantas inoculadas apresentaram diâmetro do caule maior que as plantas não inoculadas sendo que o inverso foi observado para a altura das plantas. Pode-se atribuir a isto o fato do estabelecimento da simbiose entre rizóbio-leguminosa, consumindo o N disponível em quantidades mais adequadas do que as fornecidas nas plantas não inoculadas. A adubação nitrogenada, quando fornecida em excesso, provoca o estiolamento da planta, tornando-a mais suscetível ao tombamento. O estiolamento não depende exclusivamente da nutrição vegetal, como também da luminosidade e espaçamento entre as mudas (GRIGOLETTI-JUNIOR et al., 2001).

Isto ocorreu mesmo com a elevada concentração de N nos solos que receberam biossólido, no início do desenvolvimento da cultura, embora seja conhecido que elevados conteúdos de N mineral no solo geralmente têm um efeito negativo sobre o processo simbiótico (VIEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2006; LOBO et al., 2012).

Almeida et al. (2008) avaliaram o desenvolvimento da *Canavalia ensiformis* inoculada e não inoculada, na presença de Pb. As plantas não inoculadas se desenvolveram melhor do que as plantas inoculadas. As plantas não inoculadas receberam dose extra de nitrogênio, e na presença de Pb não houve nodulação das plantas inoculadas, portanto esta parcela do experimento teve menor quantidade de nitrogênio disponível, devido a inibição do rizóbio pelo Pb. Contudo esta falta de nitrogênio não limitou o crescimento e desenvolvimento das plantas de *Canavalia ensiformis*.

5.2.2 Produção de matéria seca

A tabela 7 apresenta os resultados obtidos para a produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e de matéria seca do sistema radicular (MSR) das plantas de *Canavalia ensiformis* em resposta aos tratamentos com biossólido industrial e adubação mineral.

Tabela 7 – Matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca radicular (MSR) das mudas de *Canavalia ensiformis* nos diferentes tratamentos, aos 90 dias após a semeadura.

Tratamentos ¹	MSPA (g)		MSR (g)	
	Inoculado	Não Inoculado	Inoculado	Não Inoculado
T1	4,17	4,19	0,4	0,29
T2	4,04	4,11	0,53	0,27
T3	4,18	4,09	0,36	0,36
T4	3,7	4,21	0,32	0,45
T5	3,65	4,46	0,3	0,43
T6	4,15	3,47	0,36	0,29

¹T1 = controle (sem adubação); T2 = 570 mg dm⁻³ de biofósforo; T3 = 1.150 mg dm⁻³ de biofósforo; T4 = 1.720 mg dm⁻³ de biofósforo; T5 = 2.300 mg dm⁻³ de biofósforo e T6 = 20 mg dm⁻³ de P₂O₅ (adubação mineral).

Os dados obtidos para MSPA e MSR foram submetidos a análises de variância, porém não apresentaram diferenças significativas para a aplicação de teste de comparação entre as médias. Os resultados obtidos com a aplicação de doses crescentes de biofósforo foram submetidos à análise de regressão e são apresentados na figura 16.

Pode-se observar a resposta das mudas de *Canavalia ensiformis* inoculadas e não inoculadas nas variáveis analisadas em resposta às crescentes doses de biofósforo aplicadas ao solo.

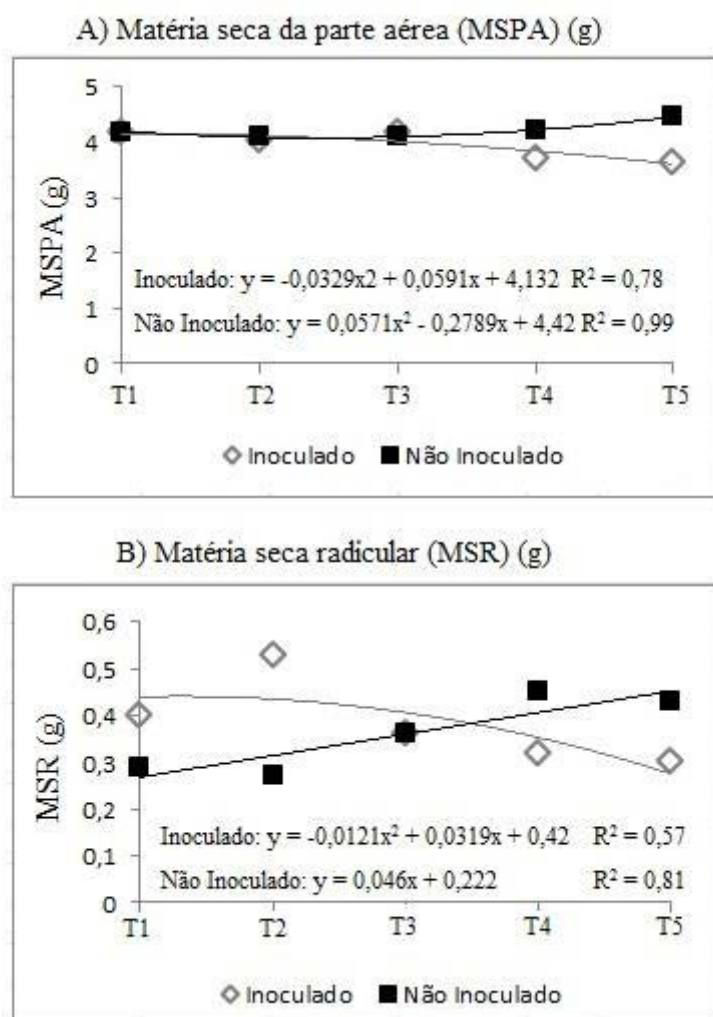


Figura 16 - A) Matéria seca da parte aérea (MSPA) (g) e B) Matéria seca radicular (MSR) (g) das plantas de *Canavalia ensiformis* inoculadas e não inoculadas em resposta as doses de biofertilizante.

Verificou-se que no tratamento T3 (1.150 mg dm⁻³ de biofertilizante), as plantas de *Canavalia ensiformis* apresentaram a mesma produção de MSPA e MSR. As mudas não inoculadas apresentaram valores mais elevados de MSPA e MSR nos tratamentos T4 e T5, que receberam 1.720 e 2.300 mg dm⁻³ de biofertilizante, respectivamente. Esse resultado evidencia que houve influência negativa do nitrogênio fornecido via biofertilizante sobre a FBN realizada por rizóbio. Ao comparar os resultados obtidos com a aplicação de biofertilizante (T2, T3, T4 e T5) e com a adubação mineral (T6) verificou-se que nas plantas não inoculadas, todos os tratamentos com biofertilizante apresentaram resultados melhores do que a adubação mineral, e nas plantas inoculadas, os resultados obtidos com adubação mineral apresentaram valores próximos aos obtidos no tratamento com a adição da dose intermediária de biofertilizante (T3). Portanto, a produção de matéria seca das plantas não inoculadas foi superior com a

aplicação das doses crescentes de biofósido. Desta forma, as mudas inoculadas apresentaram menor desenvolvimento inicial devido à inibição da FBN, causada pelo nitrogênio presente nas doses mais elevadas de biofósido. Resultado semelhante foi obtido por Lobo et al. (2012), que verificaram que o aumento das doses de um biofósido domiciliar compostado elevou a produção de massa seca das plantas de soja não inoculadas, enquanto nas inoculadas, o rendimento aumentou até a dose de 26 t ha⁻¹ havendo decréscimo em doses superiores. Quanto à nodulação, nas plantas inoculadas observou-se um aumento no número de nódulos até a dose de 19 t ha⁻¹ e acima desta dose houve um decréscimo.

Vieira et al. (2005) observaram que ao aplicar doses de biofósido doméstico gerado pela SABESP de Barueri-SP equivalentes à 14,8 t ha⁻¹, 29,6 t ha⁻¹ e 59,2 t ha⁻¹ houve uma tendência de aumento nos teores de N e na produção de massa seca da parte aérea durante o crescimento inicial do feijoeiro nas doses de 14,8 t ha⁻¹ e 29,6 t ha⁻¹. Por outro lado, na dose de 59,2 t ha⁻¹ foi observado maior teor de N na parte aérea, não apresentando maior produção de massa seca no crescimento inicial.

No presente estudo, verificou-se que até a dose de 1.150 mg dm⁻³ do biofósido produzido pela SERRAMAR, as plantas de *Canavalia ensiformis* inoculadas e não inoculadas apresentaram respostas semelhantes quanto a produção de MSPA, havendo interação sinérgica entre as fontes de N fornecidas para as plantas inoculadas. Acima desta dose foi observado o decréscimo da MSPA nas plantas inoculadas e aumento da MSPA nas plantas não inoculadas, indicando uma possível inibição da FBN pelo biofósido.

A maior produção de MSR das plantas de *Canavalia ensiformis* inoculadas foi obtida com a aplicação da dose de 570 mg dm⁻³, em doses superiores de biofósido houve decréscimo. Nas plantas não inoculadas o aumento da produção de MSR foi crescente com o aumento das doses de biofósido.

5.2.3 Formação de nódulos radiculares

A figura 17 apresenta o número e o peso de nódulos obtidos em mudas de *Canavalia ensiformis* inoculadas, submetidas aos diferentes tratamentos. A nodulação ocorreu em todos os tratamentos, sendo observada maior quantidade de nódulos no tratamento T3, que recebeu 1.150 mg dm⁻³ de biofósido, em doses superiores ocorreu a diminuição do número de nódulos, fortalecendo as observações feitas para a produção de MSPA e MSR.

O tratamento com adubação mineral apresentou a mesma quantidade de nódulos que o tratamento controle, no entanto, nódulos com maior peso foram obtidos no tratamento com adubação mineral. O fornecimento de fósforo (P_2O_5) no T6 pode ter influenciado positivamente o estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa, contribuindo com a formação de nódulos maiores e mais pesados, enquanto no T1, a simbiose se estabeleceu sem o fornecimento de nutrientes.

Antolín et al. (2010a) relataram que a aplicação de biossólido não afetou a capacidade de nodulação mas inibiu a fixação do nitrogênio pelos nódulos, e justificaram que as plantas tratadas com biossólido não dependem exclusivamente da fixação de nitrogênio e podem utilizar o nitrogênio do solo, fornecido via lodo.

Vieira et al. (2005) forneceram doses crescentes de biossólido ao cultivo de feijão e observaram que o tratamento que forneceu a maior dose de biossólido desfavoreceu a eficiência simbiótica entre o feijoeiro e os rizóbios, reafirmando a necessidade de considerar os teores de N do resíduo para as recomendações das doses a serem aplicadas.

Teixeira et al. (2006) obtiveram respostas semelhantes ao avaliar a interação entre biossólido de curtume na nodulação do caupi. O tratamento com a maior dose de biossólido ($46.500 \text{ kg ha}^{-1}$) apresentou menor número de nódulos do que o tratamento controle, enquanto doses intermediárias (11.625 e $23.250 \text{ kg ha}^{-1}$) de biossólido resultaram em maior número de nódulos, corroborando com os resultados obtidos no atual estudo (Figura 18).

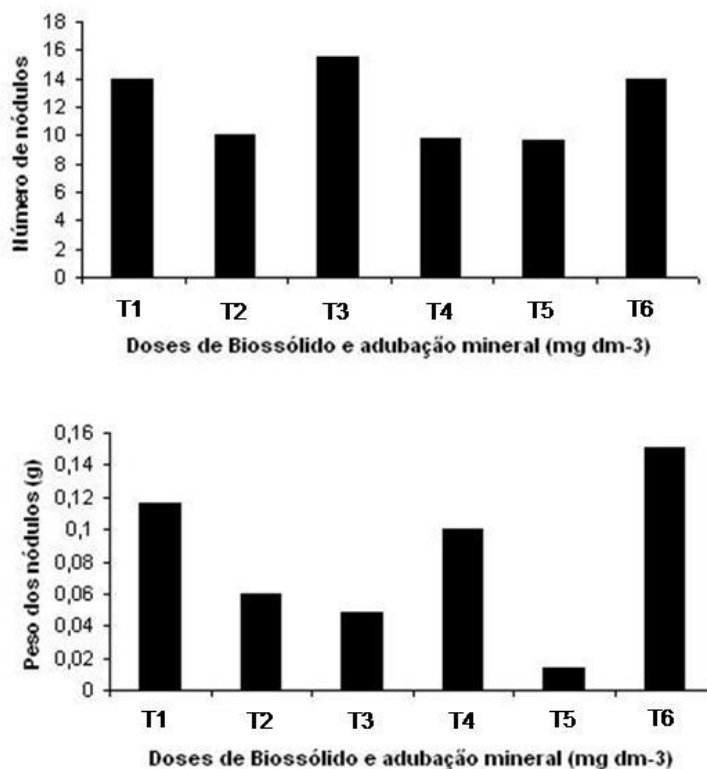


Figura 17 - Peso e número de nódulos obtidos em mudas de *Canavalia ensiformis* em resposta aos diferentes tratamentos: T1 = controle (sem adubação); T2 = 570 mg dm⁻³ de biossólido; T3 = 1.150 mg dm⁻³ de biossólido; T4 = 1.720 mg dm⁻³ de biossólido; T5 = 2.300 mg dm⁻³ de biossólido e T6 = 20 mg dm⁻³ de P₂O₅ (adubação mineral).

Vieira et al. (2004), adicionaram diferentes doses de biossólido para atender a exigência da soja em fósforo e verificaram que as quantidades de N e P presentes nas doses de biossólido, aparentemente não afetaram o processo de FBN. Pode-se afirmar que no presente estudo não foi possível fazer a mesma observação quanto ao N, em decorrência da relação de ordem entre os macronutrientes N, P e K ser de aproximadamente 4:1:0,25. No presente estudo, o número de nódulos decresceu com o aumento das doses de biossólido e o tratamento com adubação mineral apresentou o mesmo número de nódulos do tratamento controle, ambos sem aplicação de N. Entretanto, no T3, com dose de 1.150 mg dm⁻³ de biossólido, foi observado o maior número de nódulos. Esta dose representa 50% da exigência nutricional da *Canavalia ensiformis* em fósforo, podendo-se concluir que até esta dose de biossólido, houve um favorecimento da relação simbiótica entre planta e rizóbio. Pelegrini et al. (2009) constataram que, com o aumento das doses de N no feijoeiro, ocorreu uma diminuição da nodulação, comprovando que o excesso de nitrogênio pode causar inibição no processo de nodulação.

Na figura 18 observa-se a coloração rósea do interior dos nódulos encontrados nas mudas de *Canavalia ensiformis*, em todos os tratamentos, indicando a ocorrência de nódulos efetivos na fixação biológica de N.



Figura 18 – Em destaque, coloração rósea dos nódulos radiculares, observada em mudas de *Canavalia ensiformis*, em todos os tratamentos, indicando a ocorrência de nódulos efetivos.

Esta coloração indica a presença da nodulina leghemoglobina. As moléculas de leghemoglobina são proteínas hemo-constituíntes, presentes nas células infectadas dos nódulos de leguminosas. As moléculas de leghemoglobina são resultantes da simbiose, sendo sintetizadas em resposta da infecção bacteriana (VERMA; LONG, 1983).

Em todos os tratamentos foram encontrados nódulos efetivos, podendo concluir que, mesmo com aplicação das doses mais elevadas de biofósforo, o fornecimento de N não inibiu a fixação de nitrogênio por meio da associação rizóbio-leguminosa, o que corroborou com Vieira et al. (2004; 2005). Por outro lado, Behling et al. (2009) verificaram a presença de nódulos inefetivos, de coloração marrom-clara ou verde, superfície externa rugosa e consistência mais mole, em resposta ao aumento das doses de biofósforo industrial.

Com base na caracterização e nos resultados obtidos em condições controladas, o biossólido da SERRAMAR pode ser aplicado como fertilizante orgânico, em solos de baixa fertilidade e pouco estruturados, inclusive em leguminosas, como fonte de nitrogênio e fósforo, sem a necessidade do uso de inoculantes. No entanto, recomenda-se a avaliação da aplicação deste biossólido em condições de campo, utilizando outras espécies vegetais, como culturas anuais, florestais e pastagens e, principalmente, espécies utilizadas em projetos de recuperação de áreas degradadas, como as encontradas na bacia hidrográfica do ribeirão Guaratinguetá.

6 CONCLUSÕES

- O biossólido industrial gerado pela SERRAMAR – Cooperativa de Laticínios de Guaratinguetá atendeu a todos os limites estabelecidos pelas legislações, Federal (a Resolução CONAMA 375/2006) e do estado de São Paulo (P 4230 – CETESB), podendo ser utilizado na como fertilizante orgânico e condicionador de solos de baixa fertilidade e pouco estruturados.
- A emergência e o crescimento inicial das mudas de *Canavalia ensiformis* em simbiose com rizóbio específico foram mais rápidos e apresentaram maior cobertura do solo do que as mudas não inoculadas, aos 60 e 90 dias após a semeadura.
- A adição de biossólido até a dose de 1.150 mg dm^{-3} ($2,3 \text{ t ha}^{-1}$) favoreceu o desenvolvimento da relação simbiótica entre a *Canavalia ensiformis* e rizóbio, porém mesmo nas doses mais elevadas, de 1.720 mg dm^{-3} e 2.300 mg dm^{-3} , o nitrogênio fornecido não inibiu a nodulação e a FBN.
- O crescimento inicial de *Canavalia ensiformis* inoculada e não inoculada tratada com doses crescentes do biossólido da SERRAMAR não diferiu do tratamento com adubação mineral, concluindo-se que a aplicação do biossólido pode ser vantajosa, devido ao efeito nutricional, à diminuição dos custos com adubação mineral e pela melhoria dos atributos físicos, químicos e biológicos de solos de baixa fertilidade e pouco estruturados, como o Cambissolo Háplico, utilizado neste estudo.
- A utilização do biossólido da SERRAMAR foi mais eficiente na produção de matéria seca da parte aérea e radicular das mudas de *Canavalia ensiformes* do que a adição de inoculante.
- A adubação mineral, realizada com base na exigência em fósforo da *Canavalia ensiformis* favoreceu o estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E. L. D.; MARCOS, F. C. C.; SCHIAVINATO, M. A.; LAGÔA, A. M. M. A.; ABREU, M. F. Crescimento de feijão-de-porco na presença de chumbo. *Bragantia*, 67:569-576, 2008.
- ALVARENGA, R. C.; COSTA, L. M.; FILHO, W. M.; REGAZZI, A. J. Características de alguns adubos verdes de interesse para a conservação e recuperação de solos. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 30, n. 2, p. 175-185, fev, 1995.
- ANDRADE, J. C; ABREU, M. F. (eds) *Análise Química de Resíduos Sólidos para Monitoramento e Estudos Agroambientais*, Editora IAC, Campinas, 2006, 178p.
- ANDRADE, S. A.; GRATAO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; SILVEIRA, A. P.; SCHIAVINATO, M. A; MAZZAFERA, P. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and experimental botany*, v. 68, n. 2, p. 198-207, 2010.
- ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F.. *Lodo de esgoto: Tratamento e disposição final*. 3. Ed. Belo Horizonte: Depto. Eng. Sanitária e Ambiental-UFGM; Companhia de Saneamento do Paraná, 2001, 484 p.
- ANDREOLI, C. V.; GARBOSSA, L. H. P.; LUPATINI, G.; PEGORINI, E. S. Wastewater sludge management: a Brazilian Approach. In: *WASTEWATER BIOSOLIDS SUSTAINABILITY, 2007, Moncton, Moving Forward – Wastewater Biosolids Sustainability, 2007*. P. 117-131.
- ANTOLÍN, M. C.; FIASCONARO, M. L.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Relationship between photosynthetic capacity, nitrogen assimilation and nodule metabolism in alfalfa (*Medicago sativa*) grown with sewage sludge. *Journal of hazardous materials*, v. 182, n. 1, p. 210-216, 2010a.
- ANTOLÍN, M. C.; MURO, I.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Application of sewage sludge improves growth, photosynthesis and antioxidant activities of nodulated alfalfa plants under drought conditions. *Environmental and Experimental Botany*, v. 68, n. 1, p. 75-82, 2010b.
- ARAÚJO, F. F. Efeito de lodo de esgoto sobre nutrição, nodulação e doenças da soja. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista. Botucatu-SP. 99 p., 2003.
- ARAÚJO, F. F.; TIRITAN, C. S.; IAROSSE, F. R. Reciclagem de lodo industrial, Classe II, como substrato para produção de mudas. *Colloquium Agrariae, Presidente Prudente*, v. 3, n.1, Jun. 2007. p. 25-34.
- ASSIMI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Influence of phosphorus levels on interactions between VA mycorrhizae and Rhizobium in soybeans. *Canadian Journal of Botany: Ottawa*, v. 58, p. 2200-2205, 1980.
- BACKES, C.; BULL, L. T.; GODOY, L. J. G.; VILLAS BÔAS, R. L.; LIMA, C. P.; PIRES, E. C. Uso de lodo de esgoto na produção de tapetes de grama esmeralda. *Cienc. Rural*, Santa

Maria, v. 39, n. 4, Jul. 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000400014&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 04 set. 2013.

BARBOZA, R. S. L. Influência do Lodo de Esgoto na Nodulação e no Desenvolvimento do Caupi (*Vigna unguiculata* [L.]. Dissertação (Mestrado) Universidade Católica de Pernambuco. 2007, 84p.

BAREA, J.M.; ESCUDERO, J.L.; AZCON, G. & AGUILAR, C. de. Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of Medicago sativa in phosphate-fixing soils as affected by P fertilizers. Plant and Soil: The Hague, v. 54, p. 283-296, 1980.

BASTOS, R. K. X.; BEVILACQUA, P. D.; DIAS, G. M. F.; BARONY, F. J. A. Análise crítica da legislação brasileira para uso agrícola de lodos de esgotos na perspectiva da avaliação quantitativa de risco microbiológico. Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, Desarrollo y Práctica, v. 2, n. 1, p. 143-159, 2009.

BEHLING, M ; SOBRINHO, N. M. B. A.; OLIVEIRA, C.; MAZUR, N.. Nodulação, acúmulo de nitrogênio no solo e na planta, e produtividade de soja em solo tratado com lodo de estação de tratamento de resíduos industriais. Bragantia, Campinas , v. 68, n. 2, 2009 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052009000200020&lng=pt&nrm=iso>. acesso em 29 jan. 2014.

BERTON, R. S.; NOGUEIRA, T. A. R. Uso de lodo de esgoto na agricultura. In: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. Uso agrícola de lodo de esgoto: avaliação após a resolução nº 375 do CONAMA. Botucatu: FEPAF, 2010. Cap. 2, p 31-50.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. Lodo de esgoto na agricultura: potencial de uso e problemas. Instituto de Educação Tecnológica – IETEC, 2003. Disponível em www.ietec.com.br. Acesso em: 05/2014.

BOEIRA, R.C. Uso de lodo de esgoto como fertilizante orgânico: disponibilização de nitrogênio em solo tropical. Jaguariúna, SP. EMBRAPA. 2004. 3p. (Comunicado Técnico).

BOEIRA, R.C.; LIGO, M.A.V.; DYNIA, J.F. Mineralização de nitrogênio em solo tropical tratado com lodos de esgoto. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.37, p.1639-1647, 2002.

BONINI, C. S. B.; ALVES, M. C. Recovery of soil physical properties by green manure, liming, gypsum and pasture and spontaneous native species¹. Rev. Bras. Ciênc. Solo, Viçosa , v. 35, n. 4, Aug. 2011 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832011000400034&lng=en&nrm=iso>. Acesso: mai/2014

BORRELY, S. I. – Tratamento de esgoto sanitário com o uso de acelerador de elétrons, Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP, São Paulo, 1995.

BRASIL.

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/111445.htm

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2012. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2014. 164 p.

CAMPOS, F. S.; ALVES, M. C. Uso de lodo de esgoto na reestruturação de solo degradado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n. 4, p. 1389-1397, 2008.

CARLING, D.E.; RIEHLE, W.E.; BROWN, M.F. & JOHNSON, D.R. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on nitrate reductase and nitrogenase activities in nodulating and non-nodulating soybeans. *Physiology and Biochemistry: Columbia*, v. 68, p. 1590-1596, 1978.

CARVALHO, M.M. A comparative study of response of six *Stylosanthes* species to acid soil factors with particular reference to Al. University of Quesland, Quensland, Tese de Doutorado, 1978.

CARVALHO, D. E . A; DIAS, N. W. Impacto erosivo da precipitação nas Bacias de encosta dos ribeirões Taquaral e Gomerál, formadores do Ribeirão Guaratinguetá, SP. *Revista Biociências, UNITAU*. v. 15. n. 2, p 139-146, 2009.

CHAUDRI, A. M.; ALLAIN, C. M. G.; BARBOSA-JEFFERSON, V. L.; NICHOLSON, F.A.; CHAMBERS, B.J.; McGRATH; S. P. A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. *Plant and Soil*, v. 221, 2000.

COLODRO, G.; ESPINDOLA, C. R.; CASSIOLATO, A. M. R.; ALVES, M. C. Atividade microbiana em um Latossolo degradado tratado com lodo de esgoto. *Rev. bras. eng. agríc. ambient., Campina Grande* , v. 11, n. 2, Apr. 2007 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662007000200010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 Jan. 2014.

COSTA, G.S.; ANDRADE, A.G.; POWELL, C.L.; FARIA, S.M. de. Ciclagem de nutrientes em um plantio de *Acácia mangium* com seis anos de idade. In: CONGRESSO BRASILEIRO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25, Águas de Lindóia, SP, Viçosa, 1996. Comissão 10-Solos Florestais (10-027), Programa Oficial. CD-ROM. Águas de Lindóia, Sociedade Latino-Americana de Ciência do Solo/Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p.61, 1996.

COUTINHO, M.P.; CARNEIRO, J.G.A.; BARROSO, D.G.; RODRIGUES, L.A.; FIGUEIREDO, F.A.M.M.A.; MENDONÇA, A.V.R.; NOVAES, A.B. Crescimento de mudas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Plantadas em uma área degradada por extração de argila. *Floresta*, [S.l.], mar. 2006. ISSN 1982-4688. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/floresta/article/view/4608>>. Acesso em: 30 Jan. 2014.

DAFT, M.J.; EL-GIAHMI, A.A. Effect of *Endogone* mycorrhiza on plant growth. VII. Influence of infection on the growth and nodulation in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *The New Phytology: London*, v. 73, p. 1139-1147, 1974.

DAFT, M.J.; EL-GIAHMI, A.A. Effects of *Glomus* infection on three legumes. In: *Endomycorrhizas*. (eds) SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. Academic Press. London and New York. 1975. p. 581-592.

DIAS, L. E.; FRANCO, A. A.; CAMPELO, E.; FARIA, S. M de; SILVA, E. M. Leguminosas florestales: aspectos relacionados com su nutrición y uso em la recuperación de suelos degradados. *Bosque*, v. 16, n. 1, p. 121-127, 1995.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2.ed. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 306p, 2006.

FARIA, S.M. de; FRANCO, A.A.; JESUS, R.M.; MENANDRO, M. de S.; BAITELLO, J.B.; MUCCI, E.S.F.; DÖBEREINER, J. & SPRENT, J.I. New nodulating legume trees from Southeast Brazil. *New Phytol.*, Oxford, 98:317-328, 1984.

FARIA, S.M. de; LIMA, H.C.; FRANCO, A.A.; MUCCI, E.S.F. & SPRENT, J.I. Nodulation of legume trees from South East Brazil. *Plant and Soil*, Dordrecht, 99(3):347-356, 1987.

FEIJÃO-DE-PORCO: leguminosa para controle de mato e adubação verde do solo. Belém – PA. EMBRAPA Amazônia Oriental, 1 folder, 2000. (EMBRAPA Amazônia Oriental. Recomendações técnicas, nº 12).

FERREIRA, M. C.; TRANNIN, I. C. B.; FERREIRA, C. C; SIMÕES, S. J. C. Sistema de informações geográficas aplicado à análise do uso e ocupação do solo em áreas de preservação permanente da bacia hidrográfica do ribeirão Guaratinguetá (SP). In: XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Curitiba, Anais... p.1365, 2011.

FERREIRA, A. C.; ANDREOLI, C. V.; JÜRGENSEN, D. I. Produção e características dos biossólidos. In. PROGRAMA DE PESQUISA EM SANEAMENTO BÁSICO. Uso e Manejo do lodo de esgoto na agricultura. Rio de Janeiro: PROSAB, 1999. p. 16-25.

FRANCO, A.A.; DIAS, L.E.; FARIAS, S.M.; CAMPELLO, E.F.C. & SILVA, E.M.R. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizas como agente de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. SIMPÓSIO SOBRE ESTRUTURA,

FUNCIONAMENTO E MANEJO DOS ECOSSISTEMAS. Itaguaí, Anais... Itaguaí, 13 p, 1992.

GILLER, K. E.; McGRATH, S. P.; HIRSCH, P. R. Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biol. Biochem.* , v. 21, p. 841-848, 1989.

GONÇALVES, J.L.M.; BARROS, N.F.; NAMBIAR, E.K.S. & NOVAIS, R.F. Soil and stand management for shortrotation plantations. In: NAMBIAR, S. & BROWN, A., eds. Management of soil, nutrients and water in tropical plantation forests. Camberra, ACIAR, CSIRO, CIFOR, 1997. p.379-418.

GONÇALVES, R. F.; LUDUVICE, M.; LIMA, M. R. P.; RAMALDES, D. L. C.; FERREIRA, A. C.; TELES, C. R.; ANDREOLI, C. V. (coord.). Resíduos sólidos do saneamento: processamento, reciclagem e disposição final. 1. Ed. Rio de Janeiro: RiMa/ABES, 2001. 282 p.

- GRIGOLETTI-JUNIOR, A.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. do. Estratégias de manejo de doenças em viveiros florestais. Embrapa Florestas, Colombo – PR, Circular técnica, n. 47., 2001.
- GURGEL, G. C. S.; Uso de esgoto doméstico secundário e rizóbios na produção de mudas de Timbaúba em distintos substratos. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Dissertação de Mestrado. 63p, 2012.
- HABTE, M.; MANJUNATH, A. Soil solution phosphorus status and mycorrhizal dependency in *Leucena leucocephala*, *Applied and Environmental Microbiology*: Oxford. v. 53, n.4. p. 797-801, 1987.
- HERRERA, M.A.; SALAMANCA, C.P.; BAREA, J.M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizae fungi and rhizobia to recover desertified mediterranean ecosystems. *Applied and Environ. Microbiol.* 59(1); 129-133, 1993.
- HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 542 p., 1994.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.
- ISRAEL, D. M. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiology*, Dordrecht, v. 84, p. 835-840, 1987.
- JASPER, D.A.; ABBOTT, L.K. & ROBSON, AD. Acacias respond to additions of phosphorus and to inoculation with VA mycorrhizal fungi in soils stockpiled during mineral sand mining. *Plant Soil*, Dordrecht, 115:99-108, 1989.
- KIRKHAM, B. B. Agricultural use of phosphorus in sewage sludge. *Advances in Agronomy*, New York, v. 35. 1982, p. 1159-1163.
- KITAMURA, A.E.; ALVES, M.C.; GUSTAVO, L. & GONZALEZ, A.S. Recuperação de um solo degradado com aplicação de adubos verdes e lodo de esgoto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32. n. 1 p. 405-416, 2008.
- KOBAYASHI, H. & RITTMANN, B. E. Microbial removal of hazardous organic compounds. *Environmental Science and Technology*, v. 16. 1982, p. 170A-183A.
- LEMANSKI, J.; SILVA, J. E. Avaliação agronômica e econômica da aplicação de biossólido na produção de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 10, p. 1477-1484, 2006.
- LOBO, T. F.; FILHO, H. G.; NOGUEIRA, E. J. B.; ALMEIDA, L. S.; JUNIOR, N. N. Crescimento e fixação biológica do nitrogênio em soja cultivada com doses de lodo de esgoto compostado. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.33, n.4, p.1333-1342, 2012.
- LORENZI, H. - Plantas Ornamentais no Brasil-Plantarum, Nova Odessa, 1995.

MAGALHÃES, F. M. M.; MAGALHÃES, L. M. S.; OLIVEIRA, L. A.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme nativas da região de Manaus-AM. *Acta Amaz.*, 12:509-514, 1982.

MATOS, A. P. R.; SILVA, J. P. P.; COSTA, M. C. R.; GADIOLI, J. L. Avaliação dos teores de metais pesados em solo e plantas de uma área utilizada para lavagens de peças e deposição de resíduos industriais. In: FERTBIO, Lages, 2004. Resumos... Lages, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004. CD-ROM.

McLAUGHLIN, M. J.; WARNE, M. St. J.; STEVENS, D. P. et al., "Australia's National Biosolid Research Program—how it came about, and what has it discovered?" *Water Practice and Technology*, vol. 2, no. 4, article 88, 2007.

MELO, W. J.; MARQUES, O. M. 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: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. p. 109-141.

MELO, W. J.; MARQUES, O. M.; MELO, V. P. O uso agrícola do biossólido e as propriedades do solo. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, L.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O. (Ed). *Biossólidos na agricultura*. SABESP, Escola Politécnica, USP, ESALQ-USP / Nupegel, UNESP – Jaboticabal, São Paulo.

MIKI, M. K.; SOBRINHO, P. A.; VAN HAANDEL, A. C. Tratamento da fase sólida em estações de tratamento de esgotos – Condicionamento, desaguamento Mecanizado e Secagem Térmica do Lodo. In: PROGRAMA DE PESQUISA EM SANEAMENTO BÁSICO. Alternativas de Uso de resíduos do saneamento. Rio de Janeiro: PROASB, 2006. p. 49-107.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, M. F.; FARIA, S. M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon Region of Brazil. *New Phytologist*, 121:563-570, 1992.

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

MOSSE, B.; POWELL, C.D.L. & HAYMAN, D.S. Plant growth responses to VA mycorrhiza. IX. Interactions between VA mycorrhiza rock phosphate and symbiotic nitrogen fixation. *The New Phytologist*: London, v. 76, p. 331-342, 1976.

MUNNS, D. N.; FRANCO, A. A. Soil constraints to legume production.: GRAHAM,P.H. & HARRIS,S.C. (eds.) *Biological Nitrogen Fixation Tech. for Tropical Agric.* Cali, CIAT, 1981, p133-152.

NASCIMENTO, J. T.; SILVA, I. F. da. Avaliação quantitativa e qualitativa da fitomassa de leguminosas para uso como cobertura de solo. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 3, June 2004. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000300047&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 Jan. 2014.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Diversity and adaptability of soyben and cowpea rhizobhia in tropicals soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.29, 1997.

- NÓBREGA, R. S. A.; VILAS BOAS, R. C.; NÓBREGA, J. C. A.; PAULA, A. M.; MOREIRA, F. M. S. Utilização de biossólido no crescimento inicial de mudas de aroeira (*Schinus terebinthifolius addi*). *Revista Árvore*, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 239-246, 2007.
- OLIVEIRA, F.C.; MATTIAZZO, M.E.; MARCIANO, C.R. & ROSSETO, R. Efeitos de aplicações sucessivas de lodo de esgoto em um Latossolo Amarelo distrófico cultivado com cana-de-açúcar: Carbono orgânico, condutividade elétrica, pH e CTC. *R. Bras. Ci. Solo*, 26:505-519, 2002.
- PAND, P.C. & PAUL, E.A. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on ¹⁴C and ¹⁵N distribution in nodulated faba beans. *Canadian Journal Soil Science*: v. 60, p. 244-250, 1980.
- PEDROZA, M. M.; VIEIRA, G. E. G.; SOUSA, J. F.; PICKLER, A. C.; LEAL, E. R. M.; MILHOMEN, C. C. Produção e tratamento de lodo de esgoto - uma revisão. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 11, n. 16, p.89-188, jul/dez 2010.
- PELEGRINI, R.; MERCANTE, F. M.; OTSUDO, I.M. N.; OTSUDO, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 219-226, 2009.
- PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F.; LADHA, J.K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant Soil*, 174:3-28, 1995.
- RAIJ, B. V.; CANTARELA, H.; GUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo. 2 ed. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundação IAC, 1997.
- REDDY, G. B.; CHENG, C. N.; DUNN, S. J. Survival of *rhizobium japonicum* in soil-sludge environment. *Soil Biology and Biochemistry*. V. 15, 1983.
- ROCHA, J. H. T.; BACKES, C.; DIOGO, F. A.; Composto de lodo de esgoto como substrato para mudas de eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 33, n. 73, p. 27-35, 2013.
- SANDHU, J.; SINHA, M. & AMBASHT, R.S. Nitrogen release from decomposition litter of *Leucaena leucocephala* in the dry tropics. *Soil Biol. Biochem.*, 22(6):859-863, 1990.
- SANTANA FILHO, S.; CARDOSO, I. M.; PEREIRA NETO, J. T. Utilização de compostos orgânicos de lixo urbano na recuperação de áreas degradadas. In. *Simpósio Nacional de Áreas Degradadas – SINRAD*, 3, Viçosa: SOBRADE/UFV, Anais... p. 403-406, 1997.
- SANTOS, J. A.; NUNES, L. A. P. L.; MELO, W. J.; FIGUEIREDO, M. B. V.; SINGH, R. P.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, A. S. F. Growth, nodulation and nitrogen fixation of cowpea in soils amended with composted tannery sludge. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, Viçosa, v. 35, n. 6, dez. 2011. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832011000600003&lng=pt&nrm=iso>. acesso em 29 jan. 2014.
- SELIVANOVSKAYA, S. Y.; LATYPOVA, V.Z.; KIYAMOVA, S.N.; ALIMOVA, F.K. Use of microbial parameters to assess treatment methods of municipal sewage sludge applied to

grey forest soils of Tatarstan. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 86, p. 145-153, 2001.

SILVA, C. F.; PEREIRA, M. G.; MIGUEL, D. L.; FEITORA, J. C. F.; LOSS, A.; MENEZES, C. E. G.; SILVA, E. M. R. Carbono orgânico total, biomassa microbiana e atividade enzimática do solo de áreas agrícolas, florestais e pastagem no médio Vale do Paraíba do Sul (RJ). *Rev. Bras. Ciênc. Solo* [online]. 2012, vol.36, n.6, pp. 1680-1689. ISSN 0100-0683.

SILVEIRA, J. A. G. da; COSTA, R. C. L. da; OLIVEIRA, J. T. A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Brazdyrhizobium* spp. Under moderate nitrate level. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, 2001.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. *Biotechnology do solo: fundamentos e perspectivas*. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 236p, 1988.

SOARES, M. T. S. Taxas de mineralização e de lixiviação do nitrogênio, e alterações da fertilidade de um latossolo vermelho-amarelo degradado e outro não-degradado fertilizados com biofóssido e florestados com *Eucalyptus grandis*. 2003. 140 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP.

SOARES, P. V. As interrelações de elementos do meio físico natural e modificado na definição de áreas potenciais de infiltração na porção paulista da bacia do rio Paraíba do Sul. 2005. 192 f. Tese (Doutorado em Geociências) - Instituto de Geociências, UNICAMP, Campinas, 2005.

SOBRINHO, P. A. Tratamento de esgoto e geração de lodo. In: Tsutiya, M.T. et al. 2001. p. 7-40.

SOUZA, F. A.; SILVA, E. M. R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In. *Avanços em Fundamentos e aplicação de micorrizas*. Ed. J.O. Siqueira, UFLA/DCS e DCF, p. 255-290, 1996.

TEIXEIRA, K. R. G.; GONÇALVES FILHO, L. A. R.; CARVALHO, E. M. S.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B. Efeito da adição de lodo de curtume na fertilidade do solo, nodulação e rendimento de matéria seca do Caupi. *Ciênc. agrotec.* [online] Lavras -MG. V.30, n.6, p. 1071-1076, 2006. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542006000600004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em Jan/2014..

THE NATURE CONSERVANCY – TNC. “Relatório Técnico: Interpretação de Uso e Ocupação do Solo da Bacia de Guaratinguetá”. 2006.

TRANNIN, I.C.B. Avaliação agronômica de uma biofóssido industrial e de seus efeitos sobre os atributos do solo. 2004. 171 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG.

TRANNIN, I. C. B. ; SIQUEIRA, J.O. ; MOREIRA, F.M.S. Atributos químicos e físicos de um solo tratado com biofóssido industrial e cultivado com milho. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 12, p. 223-230, 2008.

TRANNIN, I.C.B.; BRANCO, A.M.M.; PETENUSSO, M. Biomassa e Atividade Microbiana de Solos sob Landfarming com Resíduos de Laticínios e Diferentes Coberturas Vegetais. In: XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO. 2013, Florianópolis. Anais... Disponível em <<http://www.cbcs2013.com.br/anais/arquivos/1573.pdf>>. Acesso em 06 set. 2013.

TSUTIYA, M. T. Alternativas de disposição final de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgoto. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. (Ed) Impacto Ambiental do Uso Agrícola do Lodo de Esgoto. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. Cap. 4, p. 69-106.

USEPA – U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Process design manual: land application of sewage sludge and domestic septage. Washington, 1995. 290p.

USEPA – U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Biosolids generation use and disposal in the United States. Municipal and Industrial Solid Waste Division, Office of Solid Waste, 1999. 75p.

VAN HAANDEL, A.; SOBRINHO, P. A. Produção, Composição e Constituição de Lodo de Esgoto. In. PROGRAMA DE PESQUISA EM SANEAMENTO BÁSICO. Alternativas de Uso de resíduos do saneamento. Rio de Janeiro: PROASB, 2006. p. 7-28.

VAZ, L. M. S.; GONÇALVES, J. L. M. Uso de biossólidos em povoamento de eucalipto: efeito em atributos químicos do solo, no crescimento e na absorção de nutrientes. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 26, n. 3, p. 747-758, 2002.

VERMA, D. P.; LONG, S. The molecular biology of Rhizobium-legume symbiosis. *Internacional Review of Cytology*, v. 158, p. 151-162. 1983.v

VIDOR, C. Descarte de lodo de estações de tratamento de efluentes domésticos no solo. In: TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C. (ed.) Manejo racional de resíduos no solo. Porto Alegre: DS/UFRGS, p. 128-150, 1999.

VIEIRA, R. F.; TANAKA, R. T.; SILVA, C. M. M. Utilização do lodo de esgoto na cultura da soja. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 21p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

VIEIRA, R. F.; TSAI, S. M.; TEIXEIRA, M. A. Nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em feijoeiro com estirpes nativas de rizóbio, em solo tratado com lodo de esgoto. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 40, n. 10, out. 2005. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2005001000015&lng=pt&nrm=iso>. acesso em 29 jan. 2014.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. London: International Biological Programme, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).

ZEITOUNI, R. F. Análise Crítica da Norma CETESB P 4.230 – “Aplicação de Lodos de Sistemas de Tratamento Biológico em Áreas Agrícolas – Critérios Para Projeto e Operação” - Dissertação (Mestrado) – Instituto Agrônomo de Campinas, 2005. 211p.