

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**

**Teresa Blandina Castro Ribas**

**DISPOSIÇÃO NO SOLO DE EFLUENTES DE ESGOTO  
TRATADO VISANDO A REDUÇÃO DE  
COLIFORMES TERMOTOLERANTES**

**Taubaté - SP**

**2008**

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**

**Teresa Blandina Castro Ribas**

**DISPOSIÇÃO NO SOLO DE EFLUENTES DE ESGOTO  
TRATADO VISANDO A REDUÇÃO DE  
COLIFORMES TERMOTOLERANTES**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre pelo Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté.  
Área de Concentração: Gestão Integrada de Resíduos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fortes Neto

**Taubaté – SP**

**2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo  
SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas / UNITAU**

**R482d Ribas, Teresa Blandina Castro**

Disposição no solo de efluentes de esgoto tratado visando a redução de coliformes termotolerantes / Teresa Blandina Castro Ribas. - 2008.

70f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Taubaté, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, 2008.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Fortes Neto, Departamento de Ciências Agrárias.

**TERESA BLANDINA CASTRO RIBAS**

**DISPOSIÇÃO NO SOLO DE EFLUENTES DE ESGOTO TRATADO  
VISANDO A REDUÇÃO DE  
COLIFORMES TERMOTOLERANTES**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre pelo Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté. Área de Concentração: Gestão Integrada de Resíduos.

**Data: 12 de setembro de 2008**

**Resultado: APROVADA**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Paulo Fortes Neto**

**Universidade de Taubaté**

**Prof. Dr. Claudinei Fonseca Souza**

**Universidade de Taubaté**

**Prof. Dr. José Euclides Stipp Paterniani**

**Universidade Estadual de Campinas**

**Prof. Dr. Paulo Fortes Neto  
Orientador**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Iria Otília e Casimiro Ribas Serra, pela paciência em me ouvir nos momentos de euforia ou desânimo. Em especial, agradeço a minha mãe pelos “lanchinhos” tarde da noite e por cuidar de meus 30 “vira-latas”, sempre que havia a necessidade de me ausentar.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Paulo Fortes Neto, por sua incomensurável paciência e compreensão durante “aqueles” meus freqüentes 5 minutos mal humorados. Agradeço pela confiança e incentivo, nesta jornada que ainda está só começando.

Repetindo o que me disse uma vez: “ - É como diz o coelho na história da *Alice no País das Maravilhas*: parece não ter mais fim...”

Ao Prof. Dr. Claudinei Fonseca Souza, pesquisador e pessoa da mais alta qualificação, meu grande amigo e maior incentivador nestes meus primeiros passos de iniciante na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcelo dos Santos Targa, Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, pelo fundamental apoio e reconhecimento quando mais precisei.

Ao meu grande amigo e sempre solidário Prof. Dr. Getúlio Teixeira Batista, pessoa e profissional do mais alto nível intelectual, dono de um enorme coração carregado de bondade e atenção.

À Técnica de laboratório e Mestre em Ciências Ambientais Eliana Maria de Araújo Mariano da Silva, pela paciência e informações preciosas que possibilitaram a realização das análises microbiológicas.

Ao Sr. Domicio Sebastião da Silva e sua equipe, pela paciência, dedicação e fundamental apoio na estruturação do experimento em campo.

Ao Prof. Dr. João Luiz Gadioli e sua equipe, pelo apoio na realização das análises químicas no Laboratório de Solos e Plantas.

A minha amiga Neide B. C. Marques, Mestre em Ciências Ambientais, pessoa carismática, doce, divertida. Uma amiga das horas felizes e difíceis, que sempre me incentivou e esteve presente mesmo quando ausente.

À Aluna de Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária Roberta Eliza Marioto Gonçalves, pelo grande auxílio na realização das análises de laboratório.

Às meninas da Secretaria da Graduação, em especial a Marta, por sua simpatia, paciência e compreensão em me ouvir nos momentos de nervosismo...que não foram poucos.

Às meninas da Secretaria da Pós-graduação, em especial a Sra. Jeni Gondolo, por sua paciência em atender e “socorrer a complicada aluna da pós-graduação”.

A todos os demais funcionários e professores do Departamento de Ciências Agrárias da UNITAU e do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, pela simpatia e colaboração, que de uma forma ou de outra contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Ao Departamento de Ciências Agrárias, por ceder os laboratórios, equipamentos e materiais para realização das análises químicas e microbiológicas.

“O homem argumenta, a natureza age.”

*Voltaire (1694-1778).*



## RESUMO

### **Disposição no solo de efluentes de esgoto tratado visando a redução de coliformes termotolerantes**

O lançamento indiscriminado nos corpos d'água de esgotos domésticos sem tratamento, ou mesmo tratados, mas sem desinfecção apropriada, contribui com quantidade significativa de organismos do chamado "grupo coliforme", entre os quais agentes específicos de doenças de veiculação hídrica podem estar presentes. A aplicação no solo de efluentes de esgotos domésticos devidamente tratados, ao invés de sua disposição direta em cursos d'água, além de ser uma maneira alternativa para disposição de resíduos e controle biológico de poluentes, constitui um modo adequado de fornecimento de nutrientes ao solo e plantas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a redução de coliformes termotolerantes após aplicações no solo de efluente de esgoto doméstico tratado por um período de 60 dias, associando os valores obtidos ao adensamento de rizobactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* spp. presentes nas rizosferas de diferentes culturas. O experimento foi desenvolvido em área da Fazenda Piloto do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté e o Delineamento Experimental constou de blocos casualizados com cinco tratamentos envolvendo o cultivo de aveia, cevada, triticale, feijão preto e solo sem cultivo (Testemunha), totalizando 20 parcelas de solo classificado como Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico. Os resultados obtidos por meio de análises microbiológicas de amostras de solo rizosférico e não rizosférico apresentaram um maior adensamento de rizobactérias na rizosfera da aveia. Entretanto, a maior eficiência obtida na redução de coliformes termotolerantes foi alcançada nos tratamentos envolvendo feijão preto e solo sem cultivo.

Palavras-chaves: Disposição no solo; fitorremediação; esgoto; coliformes; *Pseudomonas*; *Bacillus*.

## ABSTRACT

### **Controlled disposal of effluent domestic sewage in the ground a study of the reduction of fecal coliforms**

The indiscriminate launching in the water courses of sewers domestic without treatment, or exactly treat, but without appropriate disinfection, contributes with significant amount of organisms of the called "coliform group", between which specific agents of illnesses of water propagation can be present. The application of the effluent in the ground, instead of its direct disposal in water courses, beyond being an alternative way for the disposal of residues and biological control of pollutants, constitutes an adequate way of supply of nutrients to the ground and plants. So, this work had as objective to evaluate the reduction of fecal coliforms, after controlled applications of effluent in ground cultivated, associating the values gotten to the increase of fluorescent rhizobacterias *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. presents in the rhizospheres of different cultures. The project was developed in conditions of field in area of the Pilot Farm of Department of Agrarian Sciences of the University of Taubaté, city of Taubaté, SP. The Experimental Delineation consisted of some blocks, with five treatments composites for culture of annual species: Oats, Barley, Wheat, Black Beans and ground without culture (as Witness) and four repetitions, totalizing 20 ground parcels with area of 2m x 1m and space among them of 50cm. Controlled applications of effluent had been carried through in Red - Yellow Latossolo, in intervals of 20 days for a period of sixty days. From 60 days had been registered in all the treatments reduction of high values base  $10^6$  to high values base  $10^3$ . One concludes that the technique of controlled application of effluent in ground cultivated revealed efficient in the reduction of fecal coliforms, however, for a conclusive evaluation of the capacity-support of the ground and performance of the rhizospheres of cultures, it becomes necessary the continuity of the experiment for a bigger period of applications, as well as, the job of other vegetal species in the treatment of domestic sewers.

Key words: Application in the ground; sewage; wastewater; coliforms; rhizobacterias.

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Eficiência alcançada por sistemas de tratamento de esgotos na redução de microrganismos patogênicos e microrganismos indicadores.....	16
Tabela 2 - Ocorrências típicas de microrganismos patogênicos e microrganismos indicadores em esgoto bruto.....	17
Tabela 3 – Períodos de sobrevivência de alguns agentes patogênicos no solo.....	24
Tabela 4 - Característica Química Natural do solo da área experimental.....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Vista geral da área de desenvolvimento do experimento no Departamento de Ciências Agrárias da UNITAU.....	31
Figura 2 - Vista do experimento, composto por cinco tratamentos com quatro repetições.....	34
Figura 3 – Vista geral da aplicação controlada de efluente nas parcelas de solo.....	35
Figura 4 – Colônias de bactérias <i>Pseudomonas fluorescens</i> observadas sob incidência de luz ultravioleta .....	36
Figura 5 – Número mais provável de Coliformes termotolerantes após 60 dias.....	40
Figura 6 - Unidade formadora de colônias de <i>P. fluorescens</i> e <i>Bacillus</i> spp. antes da primeira aplicação do efluente no solo.....	43
Figura 7 - Unidade formadora de colônias de <i>P. fluorescens</i> e <i>Bacillus</i> spp. após 20 dias da primeira aplicação.....	45
Figura 8 - Unidade formadora de colônias de <i>P. fluorescens</i> e <i>Bacillus</i> spp. após 40 dias da primeira aplicação.....	47
Figura 8 - Unidade formadora de colônias de <i>P. fluorescens</i> e <i>Bacillus</i> spp. após 60 dias da primeira aplicação.....	49

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Saneamento básico – um panorama.....	13
2.2 Sistema de tratamento de efluentes por leito de raízes.....	15
2.3 Disposição de efluente tratado no solo.....	17
2.4 Microrganismos patogênicos relacionados a esgotos sanitários.....	21
2.5 Efeitos da aplicação de efluente no solo.....	22
2.5.1 Aspectos físico-químicos.....	22
2.5.2 Aspectos microbiológicos.....	23
2.6 Relação solo-planta e o adensamento de bactérias nas rizosferas.....	26
2.7 Taxonomia de <i>Pseudomonas</i> spp de <i>Bacillus</i> spp.....	28
2.8 Mecanismos de ação desenvolvidos por rizobactérias.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Localização e condução do experimento.....	31
3.2 Monitoramento e análises microbiológicas.....	35
3.2.1 Solo.....	35
3.2.1.1 Contagem de bactérias <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	36
3.2.1.2 Contagem de bactérias <i>Bacillus</i> spp.....	37
3.2.1.3 Contagem de Coliformes termotolerantes.....	37
3.2.2 Efluente.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## 1 INTRODUÇÃO

O efluente doméstico, por ser um resíduo altamente poluidor, tem nos últimos anos demandado pesquisas com ênfase ao desenvolvimento de tecnologias adequadas e de baixo custo para o tratamento e disposição de águas residuárias.

O lançamento indiscriminado nos corpos d'água de esgotos domésticos sem tratamento, ou mesmo tratados, mas sem desinfecção apropriada, contribui com quantidade significativa de organismos do chamado “grupo coliforme”, entre os quais agentes específicos de doenças de veiculação hídrica podem estar presentes.

A aplicação do efluente no solo, ao invés de sua disposição direta em cursos d'água, além de ser uma maneira alternativa para disposição de resíduos e controle biológico de poluentes, constitui um modo adequado de fornecimento de nutrientes ao solo (FONSECA et al., 2000).

Ao entender o solo como um elemento depurador, e o sistema solo-planta como um reator renovável, reator este regido pelas leis da natureza, pode-se entender também, nesse contexto, os esgotos como fonte de energia, e não como um grande problema ambiental.

O solo é o habitat natural para uma grande variedade de organismos, tanto microrganismos, quanto animais invertebrados. Esse conjunto que vive e é responsável por inúmeras funções do solo é chamado de *microbiota do solo*, e apresenta uma grande variedade de tamanhos e metabolismos.

Os microrganismos são extremamente diversos com várias centenas de espécies de fungos e uma grande diversidade de tipos de bactérias com populações que variam de  $10^6$  a  $10^9$  células por centímetro cúbico (SWIFT et al., 1979). Estudos constataram, ainda, que um solo com a presença de raízes promove seu adensamento em relação a um solo sem raízes.

A colonização da rizosfera - área ao redor das raízes - deve-se a uma maior

disponibilidade de nutrientes em relação ao solo não-rizosférico.

Bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* e gênero *Bacillus* spp. caracterizam-se por serem os dois mais abundantes gêneros de microrganismos presentes nos solos, sendo considerados importantes agentes de controle biológico, pois podem suprimir patógenos da rizosfera, através de mecanismos de inibição que incluem predação, competição por espaço e nutrientes, produção de  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinases, antibióticos, ácido cianídrico e sideróforos, que são compostos de baixo peso molecular, quelantes de ferro, produzidos pela maioria das bactérias sob condições limitantes desse elemento. Podem ainda atuar como biorremediadores de áreas contaminadas, por degradarem substâncias xenobióticas.

Na variedade de microrganismos conhecidos que sintetizam sideróforos além das bactérias já mencionadas do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* spp., estão incluídas, também, várias bactérias entéricas; bactérias patogênicas de humanos do sub-grupo coliformes termotolerantes, dentre elas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurim* e *Aerobacter aerogenes* (BENITE et al., 2002).

Sendo assim, dada a relevância e atualidade da problemática da contaminação dos recursos naturais pela prática de descarte de efluentes domésticos no solo, o objetivo deste trabalho foi verificar se a disposição no solo de efluentes de esgoto doméstico tratado cultivado favorece o adensamento de rizobactérias do gênero *Pseudomonas* do grupo fluorescente e do gênero *Bacillus* spp., associando os valores obtidos na redução de coliformes termotolerantes presentes no efluente tratado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Saneamento Básico – um panorama

Durante séculos a água foi considerada um bem público de quantidade infinita; estaria sempre à disposição do homem, por se tratar de um recurso natural auto-sustentável em virtude de sua capacidade de autodepuração. No entanto, o crescimento populacional aumentou de tal forma que os esgotos lançados nos córregos, rios, represas e lagos próximos às aglomerações humanas superaram a capacidade de autodepuração desses corpos receptores, em decorrência da carga poluidora dos efluentes.

A falta de saneamento básico é atualmente a causa de um dos mais sérios problemas ambientais – o comprometimento dos recursos hídricos. Segundo Kresse (1997), os esgotos domésticos são responsáveis por 90% dos lançamentos que contaminam corpos d'água. Sendo a água um elemento essencial à vida, pode vir a trazer riscos à saúde em face de sua má qualidade, servindo de veículo para vários agentes biológicos e químicos (BARCELLOS et al., 2000).

Dados do Ministério da Saúde indicam que os grandes desafios da saúde, ainda são, principalmente, as hepatites, a malária, a febre amarela, a cólera, a esquistossomose, a dengue, as leishmanioses, a hantavirose, doenças de veiculação hídrica ou que tenham como elo importante da cadeia, o ambiente.

Não há como combater essas enfermidades deixando de lado as populações rurais, nas quais a adequada captação e uso da água e destinação dos esgotos são sabidamente mais negligenciados do que nos grandes centros urbanos (BARCELLOS et al., 2000). Há grande importância em se buscar o conhecimento da realidade rural, caracterizada por populações com menor acesso às medidas de saneamento e pela presença de atividades agropecuárias altamente impactantes, podendo interferir na qualidade dos mananciais, muito desses utilizados no abastecimento de água nas cidades (AMARAL et al., 2003).



De acordo com o relatório do PNUD - Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento -, emitido pela CEPAL – Comissão Econômica para a América Latina e o Caribe (2005), o Brasil regrediu na tarefa de reduzir pela metade a proporção da população rural sem acesso a saneamento adequado. Quase dois terços dos brasileiros que vivem fora de áreas urbanas ainda não contam com o serviço de saneamento básico. Isso significa que mais de 20 milhões de pessoas – o dobro da população de uma cidade como São Paulo – correm maiores riscos de contrair doenças infecciosas ou parasitárias, que são adquiridas principalmente pelo contato com o esgoto.

O relatório do PNUD (2005), mostra que a proporção da população rural brasileira com acesso a saneamento adequado caiu de 37% em 1990 para 35% em 2002.

No contexto urbano, a situação do saneamento no Brasil é melhor, mas não é suficiente para que o país avance nos “Objetivos de Desenvolvimento do Milênio”. De 1990 a 2002, a taxa de acesso ao benefício se manteve praticamente estacionada, com um modesto crescimento de 82% para 83%. Os “Objetivos de Desenvolvimento do Milênio” foram adotados em 2000 pelos governos de 189 países e elaborados pelos organismos das Nações Unidas sob coordenação da CEPAL, como um compromisso para combater a desigualdade e melhorar o desenvolvimento humano no mundo.

De acordo com o último Censo Demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2002), 81,38% da população reside em área urbana e 18,62% em zona rural. Estudos de Bernardes e Soares (2005) mostram que as regiões Norte e Nordeste do país são as mais atingidas pela falta de saneamento, principalmente na zona rural. Na região Sul, por exemplo, apenas 7,1% da população rural não tem banheiro nem sanitário, enquanto na região Nordeste, 61,4% da população rural (8.979.301 moradores) não possui banheiro nem sanitário.

Ao analisarmos a situação do saneamento no Brasil, pode-se afirmar que o modelo de atendimento com sistemas de coleta e tratamento de esgotos sanitários, centrados nas

companhias estaduais induziu a uma atenção maciça nas sedes municipais, sem que a população rural tivesse recebido atendimento significativo.

Os altos custos dos sistemas convencionais de tratamentos e políticas públicas ineficientes são apontados como barreiras para resolver essa situação. No entanto, podem-se adotar tecnologias que sejam apropriadas e de baixo custo para regiões carentes desse serviço, principalmente as situadas em áreas periféricas e zonas rurais, nas quais as distâncias à área urbana, a topografia irregular e o uso e ocupação do solo sem planejamento dificultam ainda mais a implantação dos complexos sistemas centrais. Segundo Ambros (*apud* Kaick, 2002), as estações de coleta e tratamento de esgotos convencionais podem ser substituídas por sistemas menores e mais flexíveis, e até individuais, nas regiões menos habitadas e periféricas. Esses sistemas devem voltar-se para as necessidades reais, ou seja, serem instalados próximos do cotidiano e de suas carências, em locais onde predomine a demanda por sistemas naturais de tratamento de esgotos realizados por processos biológicos, por meio de microrganismos decompositores presentes no solo ou na água, responsáveis pela degradação da matéria orgânica.

## **2.2 Sistema de tratamento de efluentes por leitos cultivados**

Uma das tecnologias para tratamento de efluentes sanitários empregada, embora não seja nova, mas que tomou impulso nos últimos dez anos é a *Fitorremediação*, pois a zona radicular das plantas, chamada de *rizosfera*, apresenta uma capacidade de transformar moléculas orgânicas exógenas em fontes de nutrientes para os diversos microrganismos que habitam nesta região (DINARDI et al., 2005). Trata-se de uma estratégia *in situ* que envolve o emprego de espécies vegetais adequadas e microrganismos a elas associados com o fim de degradar, reter e remover poluentes orgânicos e inorgânicos do solo e água.

Ribas et al. (2005), implantaram nos Municípios de Jacareí e Taubaté, Estado de

São Paulo, em 2004 e 2005, respectivamente, um sistema de tratamento de efluentes por leito cultivado, o qual emprega a técnica da *Fitorremediação*, através do uso da espécie *Zantedeschia aethiopica* L., conhecida popularmente como Copo-de-leite.

Caracteriza-se por ser um sistema físico-biológico, constituído por tanque séptico onde ocorre o tratamento primário do efluente bruto, cuja função é remover os sólidos sedimentáveis e leito de raízes, onde ocorre o tratamento secundário. Nos dois municípios, os sistemas alcançaram uma redução de 99% de Coliformes Totais e Fecais entre o efluente bruto e o tratado. Entretanto, segundo Chernicharo et al. (1997), embora a eficiência pareça elevada, de acordo com a Tabela 1, deve-se ressaltar que, em se tratando de coliformes, estes estão presentes em quantidades muito elevadas (Tabela 2) e, portanto, são necessárias eficiências de remoção também muito altas, usualmente na faixa de 99,99 a 99,999%, para o atendimento aos padrões de qualidade microbiológica. Vale ressaltar que a concentração de microrganismos sobreviventes – ou remanescentes vivos – é mais importante que a eficiência em termos percentuais.

**Tabela 1** – Eficiência alcançada por sistemas de tratamento de esgotos na redução de microrganismos patogênicos e microrganismos indicadores

<b>Microrganismos</b>	<b>Tratamento primário (%)</b>	<b>Tratamento secundário (%)</b>
Coliformes fecais	35	90 a 99
<i>Shigella</i> sp.	15	91 a 99
<i>Salmonella</i> sp.	15	96 a 99
<i>Escherichia coli</i>	15	90 a 99
Ovos de helmintos	50 a 90	70 a 99

Fonte: Adaptado de EPA (1986).

**Tabela 2** – Ocorrências típicas de microrganismos patogênicos e microrganismos indicadores em esgoto bruto

<b>Microrganismo</b>	<b>Contribuição per capita (org/hab.d)</b>	<b>Concentração (org/100mL de esgoto bruto)</b>
Coliformes totais	$10^9$ a $10^{12}$	$10^6$ a $10^9$
Coliformes fecais	$10^8$ a $10^{11}$	$10^5$ a $10^8$
Cistos de protozoários	$< 10^6$	$< 10^3$
Ovos de helmintos	$< 10^6$	$< 10^3$
Vírus	$10^5$ a $10^7$	$10^2$ a $10^4$

Fonte: Adaptado de VON SPERLING (1995) e ARCEIVALA (1981)

As diversas tecnologias de tratamento de esgotos, que atendem até a etapa de tratamento secundário, inclusive os sistemas por leito de raízes, usualmente alcançam uma remoção satisfatória de coliformes e organismos patogênicos em termos percentuais, mas não em concentrações reais. Apenas processos de tratamento de esgotos que incorporam: lagoas de maturação, infiltração no solo e desinfecção são capazes de alcançar níveis reduzidos de coliformes no efluente.

### **2.3 Disposição de efluente tratado no solo – Reúso de água**

A aplicação de efluente no solo constitui uma das práticas mais antigas de tratamento, destino final e/ou reciclagem de esgotos sanitários. As “fazendas de esgotos”, como ficaram conhecidas as primeiras experiências na Inglaterra, no início do século XIX, logo se disseminaram pela Europa e Estados Unidos. Entretanto, com o crescimento das cidades, a valorização das áreas periurbanas e a sedução exercida pelo desenvolvimento de alternativas tecnológicas mais sofisticadas, a opção pela disposição no solo como método de tratamento foi praticamente abandonada por volta do final da primeira metade do século XX (BASTOS et al, 2003).

Embora as primeiras experiências tivessem por objetivo inicial o tratamento dos esgotos, a irrigação, como meio de reciclagem da água e produção agrícola, também constituiu uma prática já centenária. Porém, o desenvolvimento da microbiologia sanitária e as preocupações crescentes com a saúde pública fizeram com que esta alternativa se tornasse praticamente desaconselhada em meados do século XX (MARA e CAIRNCROSS, 1989).

Por outro lado, vários fatores contribuíram para que o interesse pela disposição no solo, incluindo a irrigação, fosse renovado e se mostrasse cada vez mais freqüente em todo o mundo: a crescente escassez de recursos hídricos, a crescente deterioração dos mananciais de água, as limitações técnico-financeiras para implantar soluções mais complexas de tratamento, o elevado custo dos insumos agropecuários, o avanço do conhecimento científico sobre o potencial e as limitações dessa alternativa como método de tratamento e/ou reuso de água, incluindo os respectivos aspectos agronômicos, ambientais e, principalmente, sanitários (LUCAS FILHO et al., 2002).

Em certos países, como Israel (PAGANINI, 2005) a preocupação com a escassez de água favorece o uso da técnica de aplicação de resíduos no solo ao invés de descarregá-los nos corpos d'água (CAMERON et al., 1997). Em outros, como o Brasil, há falta de tradição na reciclagem de resíduos gerados, particularmente do efluente de esgoto (FONSECA, 2001).

Todavia, nos anos recentes, a aplicação de resíduos orgânicos na agricultura tem recebido atenção considerável pelo aumento crescente do requerimento de energia para produção de fertilizantes minerais e por causa dos custos e problemas ambientais associados com métodos alternativos de disposição de resíduos (CHAE e TABATABAI, 1986). Isso tem levado a um aumento expressivo do número de publicações relacionadas à utilização de resíduos orgânicos no solo. No entanto, não têm sido abordados os benefícios econômicos, energéticos e ambientais dos mesmos (SIMS, 1996).

Embora a aplicação de resíduos no solo esteja se tornando mais difundida como

regulamento das autoridades para proteger a qualidade da água, ainda não está bem claro se o solo é de fato, o local mais apropriado para receber todos os resíduos gerados pela ação antrópica (CAMERON et al., 1997).

O solo como elemento depurador, é considerado como um sistema disperso, polifásico e heterogêneo, possui propriedades que possibilitam sua utilização como meio de tratamento de águas residuárias (QUEIROZ et al., 2004). Sendo um meio físico formado por substâncias minerais e orgânicas, cujas formas predominantemente granulares conferem-lhe propriedades características como a porosidade, a permeabilidade, a textura e outras que o tornam habitat natural de um grande número de seres vivos microscópicos, vegetais e animais (PAGANINI, 2005). Os microrganismos se adaptam aos microhabitats interagindo uns com os outros e com outras partes da biota do solo (TORSVIK e OVREAS, 2002).

A escolha do método de disposição no solo está relacionada aos objetivos pretendidos em primeira instância: a disposição final dos esgotos, o tratamento dos esgotos com posterior destino final em corpos receptores ou a produção agrícola (irrigação), os quais devem ser compatibilizados às características do solo e da água, como a topografia e a composição físico-química. Se o objetivo é o tratamento de esgotos, pressupondo-se a produção de um efluente tratado em condições de ser lançado em um corpo d'água como disposição final, dependendo das características do solo e da taxa de aplicação predominarão a infiltração-percolação ou escoamento superficial. Normalmente, os esgotos são aplicados em solos menos permeáveis e de baixa declividade, em taxas mais reduzidas. Nos processos de infiltração-percolação pode haver ou não cobertura vegetal, enquanto nos processos de escoamento superficial as gramíneas são usualmente partes integrantes e importantes do processo de tratamento. O tratamento se dá tanto por processos físico-químicos no solo quanto por processos biológicos na interface do sistema solo-água-planta, onde se forma o biofilme (BASTOS et al, 2003).

O conjunto formado pelo solo, vegetação superior, energia solar e água asseguram a transformação da matéria orgânica em energia renovável (CAVINATTO, 2007). No sistema solo-microrganismos-planta encontram-se os elementos que atuam no tratamento por disposição no solo: solo e superfície do solo, sistema foliar, colo da planta e sistema radicular. Esses elementos irão atuar com maior ou menor intensidade dependendo do método de disposição adotado (PAGANINI, 1997).

A ação dos microrganismos presentes nos solos não estéreis e nas plantas é um dos principais fatores de remoção de microrganismos patogênicos que chegam com o esgoto ao solo (ANDRADE NETO, 1997). A ação dos microrganismos na remoção de patogênicos tanto é direta por competição vital, como indireta devido às transformações bioquímicas do substrato, principalmente a estabilização (mineralização) da matéria orgânica (ANDRADE NETO, 1997).

Estudos demonstram que o efluente doméstico apresenta elevado potencial para uso em áreas agrícolas como condicionador das propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo e como fonte de nutrientes para as plantas. Entretanto, ainda há falta de experimentos em condições de campo e de longa duração para solos e clima brasileiros, que permitam o estabelecimento de uma legislação segura para regular tal destinação.

Uma das soluções para o tratamento da água de reuso seria sua utilização na irrigação de culturas. Segundo Bond (1998), se mal planejado poderá causar problemas, principalmente com respeito a contaminação do solo e lençol freático por nitratos, compostos orgânicos, sodicidade, salinidade, metais pesados e agentes patogênicos. Contudo, os benefícios e os riscos ambientais e à saúde do homem e dos animais alcançados em decorrência da disposição de efluentes no solo, irão depender da composição do efluente em elementos tóxicos, patogênicos, das condições edafoclimáticas e da planta objeto. São esses fatores que definirão, também, a dose a ser aplicada e por quantas vezes a aplicação poderá

ser repetida.

O uso de água residuária de forma irrestrita às culturas é motivo de risco a saúde pública pela grande variedade de patógenos, incluindo bactérias, vírus, cistos de protozoários e ovos de helmintos. Quando utilizada a irrigação, esta pode ocasionar vários problemas para a planta, para o solo e para o próprio sistema de irrigação.

#### **2.4 Microrganismos patogênicos relacionados a esgotos domésticos**

O lançamento indiscriminado de esgotos domésticos nos corpos d'água sem tratamento, ou mesmo tratados, mas sem desinfecção apropriada, contribui com quantidade significativa de organismos do chamado “grupo coliforme”, entre os quais agentes específicos de doenças de veiculação hídrica podem estar presentes. A patogenia pode ser decorrente de infecções ou intoxicações. Uma infecção ocorre quando um patógeno penetra no trato gastrointestinal e se multiplica, podendo provocar danos ao tecido colonizado, como inflamações e ulcerações, e, ainda, se disseminar por outros órgãos: ações decorrentes das características *invasivas* da bactéria (FRANCI et al., 2003).

Em linhas gerais, as bactérias patogênicas têm no trato gastrointestinal do hospedeiro seu *habitat*, porém, a maioria delas só é capaz de provocar doença acima de um certo número, geralmente elevado; abaixo desta dose infectante o hospedeiro é um portador assintomático, o que não deixa de ter sua importância epidemiológica como reservatório do agente etiológico da doença. Como postulado geral, pode-se afirmar que as bactérias patogênicas não se reproduzem fora do organismo do hospedeiro; entretanto, algumas podem fazê-lo, temporariamente e em condições extremamente favoráveis, como disponibilidade de nutrientes, pouca competição e predação, e temperatura, pH e umidade adequados. Essas condições determinam a capacidade de sobrevivência das bactérias no meio ambiente, a qual



varia de acordo com a espécie, mas que de modo geral se situa em torno de duas semanas na água e no solo (BASTOS, 2000).

As doenças entéricas causadas por cepas patogênicas de *Escherichia coli*, bactéria da família *Enterobacteriaceae*, do grupo coliforme e sub-grupo coliformes fecais ou termotolerantes, como são classificados atualmente, são de reconhecida importância epidemiológica. Comprovadamente, *E. coli* é responsável por boa parte das estatísticas de morbidade infantil por doenças diarréicas agudas em países em desenvolvimento.

## **2.5 Efeitos da aplicação de efluente no solo**

### **2.5.1. Aspectos físico-químicos**

O esgoto sanitário apresenta concentrações relativamente baixas de matéria orgânica, mas as aplicações freqüentes associadas às altas taxas, podem incorporar quantidades apreciáveis de matéria orgânica ao solo (SOARES et al., 2005). O aumento da matéria orgânica exerce influência nas propriedades físicas do solo, dentre as quais se destacam: a massa específica, a estrutura de estabilidade dos agregados, a aeração, a drenagem, a retenção de água e a consistência.

Coraucci Filho (1991) aplicou esgoto sanitário em rampas de tratamento por escoamento superficial e verificou que, a concentração de carbono orgânico diminuiu com a profundidade do solo, demonstrando que durante a passagem do esgoto através da superfície do solo (infiltração), ocorre o processo de filtração que é influenciado pela taxa de aplicação e declividade da superfície do solo na rampa.

Elevadas concentrações de partículas orgânicas e inorgânicas dos esgotos sanitários obstruem os poros da superfície do solo, reduzindo a taxa de infiltração e a condutividade hidráulica entre 20 e 30%, sendo os solos arenosos mais suscetíveis ao

entupimento de poros que os solos argilosos (FEIGIN et al., 1991).

Falkiner e Smith (1997) não apenas observaram aumento no valor de pH de solos fertirrigados com água residuária, mas também, diminuição do teor de alumínio trocável, devido ao aumento dos cátions trocáveis do solo (cálcio, magnésio, potássio e sódio) e da alcalinidade, adicionados pelo esgoto sanitário tratado.

Estudos de Mikkelsen et al. (1997) mostram que a aplicação de águas residuárias no solo, por períodos longos, pode resultar em acúmulo de nutrientes, excedendo as exigências nutricionais das plantas. Quin & Woods (1978) verificaram aumento na concentração de nitrogênio total de pastagens fertirrigadas por mais de 16 anos com esgoto sanitário tratado. Quin & Forsythe (1978) constataram que a aplicação anual de 840mm de esgoto doméstico tratado, com concentrações de nitrogênio total variando de 14 a 41mgL<sup>-1</sup>, acarretou o aumento da concentração de nitrato e de outros nutrientes, exceto o fósforo. Entretanto, esse aumento de nitrato não atingiu concentrações perigosas na solução do solo.

Estudos realizados por Lund et al. (1981) comprovaram que, 51% do nitrogênio presente no esgoto sanitário aplicado foi lixiviado num perfil de solo de 0 a 6m de profundidade. Tal lixiviação foi decorrente das altas taxas de aplicação da água residuária e da textura arenosa do solo.

### **2.5.2. Aspectos microbiológicos**

O lodo de esgoto quando aplicado ao solo, causa alterações na estrutura e funcionamento do agroecossistema, sendo a comunidade microbiana um dos componentes mais sensíveis, podendo ser utilizada como indicador da qualidade dos solos (BETTIOL e FERNANDES, 2004).

Estudos de Léon Suematsu e Cavallini (1999), indicam que os microrganismos podem sobreviver por períodos mais longos no solo do que nas superfícies das culturas onde há maior exposição aos raios solares.

Na Tabela 3 estão apresentados os períodos de sobrevivência de alguns agentes patogênicos encontrados no solo fertirrigados com águas residuárias.

**Tabela 3** – Períodos de sobrevivência de alguns agentes patogênicos no solo para as condições de clima quente com temperatura entre 20 e 30° C

Agentes patogênicos	Período de sobrevivência no solo (dias)
Vírus	
<i>Enterovirus</i>	< 100, mais comum < 20
Bactérias	
Coliformes fecais	< 70, mais comum < 20
<i>Salmonella spp</i>	< 70, mais comum < 20
<i>Vibrio cholerae</i>	< 20, mais comum < 10
Protozoários	
<i>Entamoeba histolytica</i>	< 20, mais comum < 10
Helmintos	
<i>Acilostoma</i>	< 90, mais comum < 30

Fonte: Léon Suematsu e Cavallini (1999)

Soares et al. (2005) comprovaram que a umidade interfere na sobrevivência de *Salmonella typhosa* no solo. A persistência da bactéria nos solos arenosos, de baixa capacidade de retenção de água, foi de 4 a 7 dias durante o período seco, porém a sobrevivência da bactéria nos solos argilosos, com alta capacidade de retenção de água, foi superior a 42 dias. Em geral, a persistência da *Salmonella typhosa* em todos os tipos de estudos foi maior durante o período chuvoso.

Van Donsel et al. (1967) encontraram redução de 90% do nível populacional de coliformes fecais com 3,3 e 13,4 dias nas amostras de solo expostas ao ar livre, no verão e inverno, respectivamente. Chandler & Craven\_(1978) constataram que períodos de 18 dias em solo com 30% de umidade e de 2,5 dias em solo com 10% de umidade reduziram em 90% o nível populacional de *Escherichia coli*, para uma temperatura ambiente de 20°C. O tempo de sobrevivência de *Salmonella typhosa* em solos ácidos (pH de 3 a 5) é bem menor do que em alcalinos (SOARES et al., 2005).

Yitzhaki (1971), trabalhando com água residuária contendo *Salmonella typhimurium* em colunas preenchidas com solo arenoso verificou que a bactéria não reproduziu nestas condições, mas persistiu no solo por mais de 44 dias.

Quatro espécies da Bactéria do gênero *Shigella*. podem causar uma grave enfermidade intestinal nos humanos, denominada Shigelliose. A Bactéria invade a mucosa do intestino, provocando disenteria acompanhada de dor abdominal, febre e diarreia. O número de infecções por *Shigella* é baixo, e em alguns casos a transmissão ocorre de pessoa para pessoa. Quando ocorre um surto, ele normalmente é associado à contaminação fecal de alimentos ou água (*Standard Methods*, 2000).

Protozoários patogênicos intestinais apresentam significativos problemas em águas de abastecimento para consumo humano. Esses organismos causam diarreias ou gastroenterites em níveis variados de gravidade. Numerosos surtos têm ocorrido. Durante o ano de 1970, surtos por ingestão de água contaminada por *Giardia lamblia* foram observados com aumento de frequência, especialmente em comunidades usando água de fontes superficiais.

Em meados de 1980, surtos por ingestão de água contaminada por *Cryptosporidium parvum* começaram a aparecer, e em 1993, este organismo foi responsável pelo maior surto de doenças devido ao consumo de água contaminada da História dos Estados

Unidos (*Standard Methods*, 2000). O protozoário *Cryptosporidium* é um patógeno emergente que causa diarreia em humanos. Muitos surtos graves de criptosporidiose tem a água como possível origem da contaminação.

Estudos realizados por Gamba, Ciapina, Espindola et al., (2000) no município de Itaquaquecetuba – São Paulo, evidenciaram a presença de oocistos em duas fossas e em oito poços analisados, mostrando o risco que esta água representa para consumo humano e a necessidade de práticas mais eficientes de desinfecção e monitorando em amostras de águas no estado de São Paulo.

## **2.6 Relação solo-planta e o adensamento de bactérias nas rizosferas**

Estudos constataram que um solo com a presença de raízes possui muito mais bactérias do que um solo sem raízes. Sabe-se que a área ao redor das raízes – a rizosfera – pode aumentar a densidade de bactérias. A influência das raízes e as modificações bioquímicas e físicas ocasionadas pela presença destas, promovem *habitats* especializados para os microrganismos do solo. A rizosfera, como definida por Zago et al. (2003), é a região do solo sob influência das raízes.

Uma extensiva colonização por microrganismos é essencial para alcançar um eficiente controle biológico e estimular o crescimento das plantas (SOTTERO, 2003). A colonização da rizosfera deve-se a uma maior disponibilidade de nutrientes em relação ao solo não-rizosférico. Esta disponibilidade é resultado da translocação de fotossintatos da parte aérea das plantas, via floema, para as raízes, onde sustentam os processos biossintéticos, sendo uma parte liberada para o solo rizosférico. A quantidade de fotossintatos rizodepositados é variável em função da espécie vegetal e dos fatores ambientais, sendo os valores mais comuns entre 10 e 100 mg de carbono/grama de raiz seca ou, aproximadamente

20% dos fotossintatos (WHIPPS, 1985).

As bactérias são os organismos mais abundantes na rizosfera das plantas, mas não estão distribuídas aleatoriamente, e sim agregadas, principalmente nas regiões intercelulares da epiderme, por serem áreas de ativa exsudação (BOWEN e ROVIRA, 1976). A colonização de raízes recém formadas é mínima, mas após alguns dias, microcolônias aparecem em associação com a matéria orgânica que as pontas das raízes encontram à medida que crescem (STIRLING, 1991).

A capacidade da bactéria crescer e se multiplicar na rizosfera tem sido chamada de “competência da rizosfera” e este atributo é influenciado por uma série de fatores, tais como a textura do solo, a percolação de células bacterianas com água da chuva ou irrigação, e a influência de fungos ou bactérias que venham a apresentar antibiose. Alguns gêneros de microrganismos que conhecidamente produzem antibióticos são *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspegillus*. Estes organismos são abundantes na rizosfera na maioria das plantas cultivadas, o que indica que antibiose é um pré-requisito importante para a “competência de rizosfera”. Dentre as rizobactérias, o grupo das *Pseudomonas* fluorescentes é o mais consistentemente isolado, principalmente durante os períodos de grande produção de exsudatos radiculares (STIRLING, 1991).

*Bacillus* é outro gênero de bactéria que vem sendo considerado como forte agente de controle biológico de fitonematóides devido à sua capacidade de produção de substâncias tóxicas (WELLER, 1988).

Grande ênfase tem sido dada ao estudo do gênero *Pseudomonas* em sistemas de produção agrícola devido a grande versatilidade nutricional, habilidade de crescer em uma ampla variedade de ambientes e grande potencial de colonização de raízes. Estas bactérias são encontradas em solos, folhagens, águas e sedimentos e, principalmente as bactérias pertencentes a este gênero, são de muita importância em diversas áreas como Fitopatologia,

Tecnologia de alimentos e Controle Biológico.

## **2.7 Taxonomia de *Pseudomonas* e de *Bacillus***

*Pseudomonas* spp. fluorescentes são bactérias Gram-negativas e produzem um pigmento verde-amarelo fluorescente em meio B de King (KING et al., 1954), observado sob luz com comprimento de onda na faixa do ultra violeta (COELHO, 2006). De acordo com Stainer et al. (1966), esses organismos podem ser encontrados na água e no solo. As espécies mais importantes desse grupo são *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*, geralmente estudadas com o objetivo de avaliar a promoção de crescimento em plantas, e *Pseudomonas aeruginosa*, considerada patogênica a animais.

Segundo Coelho (2006), a diversidade metabólica de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* dá a essas bactérias uma grande habilidade para adaptação a vários ambientes, tais como solo e rizosfera.

Bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas e podem ser aeróbias, facultativas ou anaeróbias. São resistentes ao calor e a outros agentes destrutivos (STAINER, 1966). Formam endósporos – característica que as coloca entre os esporulados – e apresentam a habilidade de produzir antibiótico (FREITAS e PIZZINATTO, 1997). A formação de endósporos aumenta a resistência aos fatores adversos. Dessa forma, podem ser armazenados, como inoculantes, por um período mais longo, e possuem maior tempo de permanência no solo, além da facilidade de aplicação.

## **2.8 Mecanismos de ação desenvolvidos por rizobactérias**

São descritos vários mecanismos de ação dos antagonistas para controlar o desenvolvimento de patógenos. Alguns destes são antibiose, competição por espaço e por

nutrientes, interações diretas com o patógeno (microparasitismo e lise enzimática) e resistência induzida a doenças (FERNANDEZ e VEGA, 2001). As bactérias podem apresentar efeito antagônico a vários patógenos, inclusive aos nematóides (ZVALETA-MEJIA e VAN GUNDY, 1982; BECKER et al., (1988 ). Os agentes inibidores causam danos à parede celular, destroem parcial ou totalmente a membrana citoplasmática, causam danos às proteínas e aos ácidos nucléicos, interferem na síntese e na replicação do DNA e podem provocar a lise ou a morte das células. Não necessariamente as bactérias morrem, mas têm suas funções metabólicas comprometidas; por isso usualmente se emprega o termo inativação de bactérias (FRANCI et al, 2003).

Dentre as rizobactérias, o grupo das *Pseudomonas* fluorescentes é o mais consistentemente isolado, principalmente durante períodos de grande produção de exsudados radiculares (STIRLING, 1991), talvez porque seja melhor colonizadora de raízes do que outros gêneros.

Compostos como sideróforos, reguladores de crescimento e centenas de diferentes metabólicos secundários, incluindo antibióticos e HCN (Ácido cianídrico) são produzidos por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* produzem sideróforos amarelo-esverdeados solúveis em água denominados pioverdinas ou pseudobactinas. Kloepper et al. (1980) demonstraram que um isolado de *Pseudomonas fluorescens* apresentou antagonismo contra a bactéria *Escherichia coli* em meio B de King et al. (1954), que é deficiente em ferro.

A antibiose é a produção de compostos bactericidas, fungicidas e nematicidas. Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou a atividades metabólicas de outros organismos (FRAVEL, 1988).

Os sideróforos (do grego *sideros* = ferro, *foros* = transportador) são compostos de



baixo peso molecular, queladores de ferro, produzidos pela maioria das bactérias e fungos sob condições limitantes deste elemento (BENITE e MACHADO, 2002). Embora o ferro seja abundante em solos aerados (1-6%), é freqüentemente indisponível para as plantas devido a sua solubilidade, que é dependente do pH e controlada pela baixa solubilidade de óxidos de ferro (POWELL et al., 1980).

A medida em que o pH do solo decresce, a disponibilidade de ferro aumenta e os sideróforos se tornam menos efetivos. De fato, quase todas as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas produzem sideróforos, deferindo, contudo, na eficiência de produção.

As espécies pertencentes ao grupo das *Pseudomonas* spp. fluorescentes produzem sideróforos verde-amarelados, fluorescentes solúveis em água, como a pioverdina, cujo nome comum é pseudobactina, que apresenta alta afinidade com  $Fe^{+++}$  e transporta esse elemento para o interior das células. Dessa maneira, os microrganismos fixam  $Fe^{+++}$ , tornando-o menos disponível a outros incapazes de produzir agentes similares de transporte de ferro, ou cuja produção é comparativamente menor, ou ainda que produzam sideróforos que têm menos afinidade que as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (ROMBEL e LAMONT, 1992).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Localização e instalação do experimento

O experimento foi conduzido em condições de campo na Fazenda Piloto do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté (Figura 1), Município de Taubaté, Estado de São Paulo. Localizado nas Coordenadas Geográficas 23°02'34''S e 45°31'02''W, com altitude média de 577m e distante 140 Km da Cidade de São Paulo.



Figura 1 – Vista geral da fazenda piloto do Departamento de Ciências Agrárias da UNITAU. Em destaque, vê-se a área de desenvolvimento do projeto.

O clima local de acordo com a Classificação de Köpen (1948) é do tipo Cwa (Sub-tropical), com chuvas de verão e com uma precipitação média anual de 1300mm.

O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, de textura argilo-arenosa, constituído por perfil não hidromórfico, profundo, de fertilidade natural baixa, cuja característica química determinada na camada de 0-20 cm de profundidade está apresentada na Tabela 4:

**Tabela 4** – Característica Química Natural do solo da área experimental

pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	(a)						(b)	(c)					
	g/dm <sup>3</sup>	mg/dm <sup>3</sup>	-----mmolc/dm <sup>3</sup> -----				-----mg/dm <sup>3</sup> -----						
7,1	15	8	1,4	95	12	11	108,4	119,4	0,13	0,8	25	6,0	1,4

Fonte: Laboratório de Análises de Solos e Plantas – Depto. de Ciências Agrárias da UNITAU.

(a) MO = Matéria Orgânica; (b) SB = Soma de bases; (c) CTC = Capacidade de troca catiônica.

O delineamento experimental foi composto por blocos casualizados, com cinco tratamentos e quatro repetições (Figura 2), perfazendo assim um total de 20 parcelas. As parcelas de 2 x 1m foram construídas com 50cm de distância entre si e os blocos separados com distância de 1m.

Os estudos foram iniciados em maio de 2007, com a demarcação das 20 parcelas e coletas de amostras de solo na camada de 0-20cm em todas as parcelas para realização de análise de propriedades químicas antes da aplicação do efluente. A semeadura foi realizada em junho com o cultivo de quatro culturas.

Das quatro culturas utilizadas no experimento três espécies foram da família das Gramíneas, a aveia (*Avena fufua*) - Tratamento 1; a cevada (*Hordum vulgar*) - Tratamento 2 e o triticale (*Triticosecale* Wittmack) – Tratamento 4. A quarta espécie utilizada foi da família das Leguminosas, o feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.), Tratamento 3. Como Testemunha foi utilizado solo sem cultivo - Tratamento 5.

O espaçamento utilizado para cultivo das gramíneas dentro de cada parcela foi de 20cm e para a leguminosa o espaçamento foi de 40cm. A irrigação das culturas com água encanada foi realizada duas vezes por semana e teve como objetivo favorecer a germinação das sementes e, posteriormente, manutenção das plantas. A aplicação do efluente de esgoto tratado seguindo a técnica de irrigação superficial foi realizada com periodicidade de 60 dias e com intervalos de vinte dias entre cada aplicação, totalizando três aplicações. A primeira aplicação ocorreu 30 dias após a semeadura.

O efluente de esgoto utilizado no experimento foi proveniente do sistema de tratamento por leito cultivado implantado no Departamento de Ciências Agrárias – UNITAU, o qual trata o esgoto dos sanitários, laboratórios e cozinha existentes no prédio central do Departamento. A composição do efluente é basicamente advinda da higiene humana, tendo pouca contribuição de produtos químicos das atividades laboratoriais. Apresentou pH de 7,2 e Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 324 mg.L<sup>-1</sup>.

O Sistema de tratamento de esgoto por leito cultivado estruturalmente é composto por um tanque séptico (Tratamento primário), construído em concreto armado e com 30m<sup>3</sup> de capacidade, dois filtros anaeróbios compartimentados, instalados em duas caixas d'água de cimento amianto de 1m<sup>3</sup> cada e preenchidos com brita nº 2. Sendo o primeiro filtro de fluxo descendente seguido do segundo por fluxo ascendente (Tratamento secundário) e o leito de raízes (Tratamento secundário), construído em concreto armado, preenchido com brita nº 2 e capacidade de 15m<sup>3</sup>.

A espécie vegetal utilizada para compor o leito e cultivada diretamente sobre a brita foi a *Zantedeschia aethiopica*, conhecida popularmente como Copo-de-leite.



Figura 2 – Vista do experimento, composto por cinco tratamentos com quatro repetições. Sendo quatro tratamentos com solo cultivado (aveia, cevada, triticales e feijão preto) e um tratamento sem cultivo (Testemunha).

O volume de efluente de esgoto tratado aplicado em cada tratamento foi de 170 litros/parcela de solo. Utilizou-se uma mangueira de  $\frac{3}{4}$ " conectada a saída do leito cultivado para o enchimento de 20 tambores de 200 litros, posicionados a frente de cada uma das parcelas (Figura 3). Dos tambores o efluente foi distribuído superficialmente por meio de mangueiras de  $\frac{1}{2}$ " com taxa de aplicação de 25 litros/hora em cada parcela, totalizando aproximadamente 7 horas de irrigação para cada tratamento.



Figura 3 – Vista geral da irrigação superficial das parcelas de solo cultivado e Testemunha.

### **3.2 Monitoramento/ Procedimentos para amostragens e Análises microbiológicas**

#### **3.2.1 Solo**

Para coletas de amostras de solos rizosféricos, foram retiradas de cada parcela cultivada 6 (seis) plantas com torrão de solo aderido às raízes, acondicionadas em sacos plásticos identificados e levadas ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia do Depto. de Ciências Agrárias da UNITAU.

As raízes de cada uma das 6 amostras por parcela foram agitadas vigorosamente para desprender o solo que estava aderido e homogeneizadas formando uma amostra composta por parcela. Das parcelas não cultivadas foram retiradas amostras de solo na camada de 0-20cm e realizados os mesmos procedimentos descritos acima.

Foram pesadas 10g de cada amostra composta e colocadas em frascos com capacidade de  $90 \pm 2$  mL com tampa de rosca contendo solução salina esterilizada (solução tampão de Fosfato Monopotássico e Cloreto de Magnésio). A partir daí prepararam-se

diluições em série de fator 10 da suspensão de solo obtida para análises de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e Coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*).

Para análise química do solo foram pesadas novamente 10g de cada amostra de solo, acondicionadas em sacos plásticos identificados e levadas ao Laboratório de Análises de Solo e Plantas do Depto de Ciências Agrárias da UNITAU para realização da avaliação das características químicas do solo após aplicação do efluente.

### 3.2.1.1 Contagem de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*

Alíquotas de 0,1mL de cada diluição  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , foram transferidas para as placas de Petri contendo meio de cultura B de King (King et al., 1954) e espalhadas com alça de *Drigalski* em triplicata. As placas foram mantidas a  $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. Após o período de incubação as colônias foram observadas sob incidência de luz ultravioleta no interior da câmara negra, para avaliação da presença ou não de um halo esverdeado fluorescente, característico das *Pseudomonas fluorescens*. Na Figura 4 é mostrada uma placa de Petri contendo três colônias de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* com halos esverdeados fluorescentes.

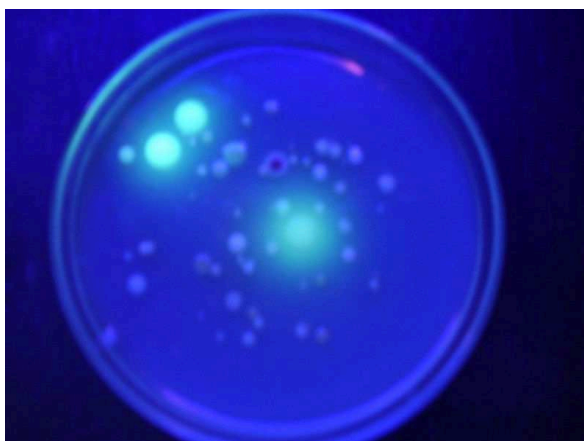


Figura 4 – Colônias de bactérias *Pseudomonas fluorescens* observadas sob incidência de luz ultravioleta – Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia – UNITAU.



### 3.2.1.2 Contagem de bactérias do gênero *Bacillus*

O procedimento utilizado para contagem de *Bacillus* spp. foi semelhante ao descrito no item 3.2.1.1, para contagem de *Pseudomonas* só que as diluições em série foram colocadas em banho Maria a  $\pm 80^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos e resfriadas a temperatura ambiente antes de serem transferidas para as placas de Petri.

Alíquotas de 0,1mL das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , com três repetições, foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar). A contagem de colônias que cresceram em meio de cultura BDA foi feita após incubação a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. Os resultados estão expressos em unidades formadoras de colônias por grama de solo seco (UFC/g solo seco).

### 3.1.1.3 Contagem do NMP de Coliformes termotolerantes

A metodologia empregada para a contagem do número mais provável (NMP) de Coliformes termotolerantes seguiu o preconizado no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed<sup>th</sup>, utilizando-se a Técnica de Tubos Múltiplos (TTM).

Para o Teste Presuntivo para contagem de bactérias do grupo coliformes utilizou-se meio de cultura Caldo Lactosado e para o Teste Confirmativo para Coliformes termotolerantes, especificamente para *Escherichia coli*, o meio E.C..

Alíquotas de 1 mL dos frascos contendo amostras de solo dos 20 Tratamentos diluídas em solução salina nas séries  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ , foram inoculadas na série de 5 tubos para cada diluição contendo meio caldo lactosado. Foi efetuada a incubação à  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 24/48 horas e ao final feita a 1ª leitura ainda do ensaio presuntivo.

Considera-se o resultado positivo a fermentação do meio evidenciada pela



produção do gás. Com o uso de alça de platina fez-se a inoculação do material dos tubos positivos para cada tubo correspondente do meio E.C. Após a transferência, os tubos contendo amostras positivas em meio E.C. foram transferidos para incubadora a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  por um período adicional de  $24 \pm 2$  horas.

A densidade de coliformes foi expressa em N.M.P. de coliformes termotolerantes por 100mL de água, o qual é obtido através de tabela no *Standard Methods 20 ed<sup>th</sup>*.

### **3.2.2 Efluente de esgoto tratado**

Para amostragem de efluente proveniente da ETE por leito de raízes, procedeu-se à coleta de 100mL de água residuária em frasco com tampa esterilizado na saída do sistema. A amostra foi levada ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia para realização dos procedimentos para as análises microbiológicas para contagem de unidades formadoras de colônias de rizobactérias *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* spp. e o número mais provável de coliformes termotolerantes.

A realização das análises microbiológicas do efluente de esgoto tratado seguiram os mesmos procedimentos e técnicas descritos nos itens acima para análises microbiológicas de solo.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A temperatura média e umidade relativa do ar registradas durante o período de desenvolvimento do experimento foram de 32°C e 28%, respectivamente. Estes valores indicam a predominância de dias quentes e baixa umidade do ar durante o desenvolvimento do projeto. Não houve ocorrência de chuvas na época de coletas de amostras de solo para análises microbiológicas do solo nos 20 e 40 dias após o início das aplicações de efluente. Entretanto, na época de realização da coleta de amostras de solo 60 dias após a primeira irrigação foram registradas chuvas de baixa intensidade.

Estes fatores físicos, como elevada temperatura ambiente, baixa umidade do ar e baixa precipitação pluviométrica podem ter interferido significativamente na sobrevivência de coliformes termotolerantes no solo, inviabilizando condições favoráveis ao seu crescimento. Já a ocorrência de chuvas aumentando a umidade do solo associada a matéria orgânica proveniente do efluente pode ter criado condições favoráveis à sobrevivência de coliformes termotolerantes, inclusive, possibilitando o aumento de sua concentração.

Os resultados da densidade de colônias de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* spp. em unidades formadoras de colônias por grama de solo seco (UFC.g<sup>-1</sup>) e do número mais provável de coliformes termotolerantes por grama de solo seco (NMP.g<sup>-1</sup>), obtidos em cada tratamento foram submetidos ao Teste de Duncan a 5% de probabilidade e são apresentados a seguir nas Figuras 5, 6, 7, 8 e 9, e discutidos ao longo deste capítulo.

As análises microbiológicas do efluente de esgoto tratado realizadas antecedendo as amostragens de solo, respectivamente aos 20, 40 e 60 dias apresentaram valor médio de concentração de coliformes termotolerantes de  $1 \times 10^6$  NMP/100 mL de efluente.

A Figura 5 apresenta a concentração de coliformes termotolerantes verificada em cada um dos tratamentos, após a terceira aplicação de efluente, o que corresponde a 60 dias

após a primeira aplicação e período de 120 dias do ciclo vegetativo das culturas.

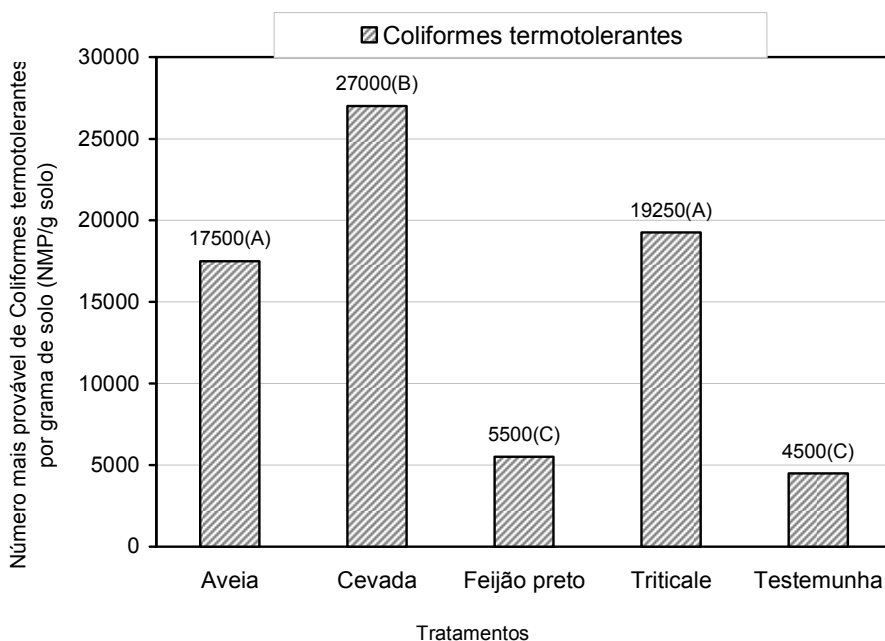


Figura 5 – Valores Médios do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes na camada de 0-20 cm de profundidade de solo cultivado com diferentes culturas e testemunha, tratado com aplicações de efluente de esgoto doméstico, 60 dias após a primeira aplicação.

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Nas análises microbiológicas de amostras de solo realizadas 20 e 40 dias após a primeira aplicação de efluente não foi constatada a existência de coliformes termotolerantes no solo em todos os tratamentos, o que pode ser entendido como resultado da atuação das rizobactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* spp., entre outros microrganismos presentes não avaliados neste trabalho, por meio de mecanismos antagonistas, predação, competição,

antibiose e produção de sideróforos, visto o teor de ferro presente no solo no local do experimento ser de 25 mg/dm<sup>3</sup>, considerado pelo Sistema IAC como baixo teor.

A reduzida concentração de matéria orgânica no solo variando de 15 a 19 mg/dm<sup>3</sup>, pode ser considerado como fator de competição por nutrientes entre a população de rizobactérias e coliformes. Assim, como investigado por Butler et al. (1954) ao aplicarem esgoto sanitário tratado na superfície de um solo argilo-arenoso e verificaram que, a partir de 3m no perfil do solo, os coliformes fecais não conseguem sobreviver, provavelmente em razão da ausência do material orgânico, fundamental para a sua sobrevivência.

Entretanto, nas análises microbiológicas 60 dias após as três aplicações verificou-se que os tratamentos envolvendo a aveia e o tritcale apresentaram valores de coliformes termotolerantes entre 17,5 x10<sup>3</sup> e 19,0 x10<sup>3</sup> NMP/100ml de água residuária, o que resultou numa eficiência de 98,0% na redução de coliformes termotolerantes; a cevada apresentou valor de 27 x10<sup>3</sup> NMP/100mL de água, o que corresponde a uma eficiência na redução de coliformes termotolerantes de 97,0%; e o feijão preto e testemunha apresentaram valores entre 6,0 x10<sup>3</sup> e 9,0 x10<sup>3</sup> NMP/100mL registrando uma eficiência de 99,4% na redução de coliformes termotolerantes. As diferenças de valores obtidos nos tratamentos aveia e tritcale não foram significativos, já a cevada mostrou a menor eficiência e os melhores resultados na redução de coliformes termotolerantes foram obtidos nos tratamentos com feijão preto e solo sem cultivo.

Observa-se que os melhores resultados na redução de coliformes termotolerantes foram obtidos até 40 dias após as aplicações de efluente coincidindo com o pleno desenvolvimento vegetativo das culturas utilizadas, ou seja, 90 dias, em que há a maior produção de exsudados pelas raízes das plantas e, conseqüentemente, maior adensamento de microrganismos nas rizosferas e no solo.

Estes resultados estão de acordo com estudos de Zavaleta-Mejia & Van Gundy,

(1982); Becker et al., (1988) os quais mostram que as bactérias são os organismos mais abundantes na rizosfera das plantas e podem apresentar efeito antagônico a vários patógenos.

Resultados similares foram obtidos por McGauher & Krone (1967) ao estudarem a remoção de coliformes fecais durante a percolação de água residuária através do perfil do solo, identificando confinamento das bactérias na camada de 0,0 a 0,9m e a redução de 64% no nível populacional, após 12 dias.

Já a constatação de coliformes após 60 dias coincide com o término do ciclo, no qual o número de colônias de bactérias nas rizosferas se encontrava muito reduzido. Nesse período a maior eficiência na redução de coliformes foi alcançada nos tratamentos envolvendo feijão preto, o qual apresenta ciclo vegetativo de 90 dias em relação a aveia, cevada e triticales que é de 120 dias e testemunha.

Em concordância com Chernicharo (1997), o qual menciona sobre a atuação de fatores físicos, tais como: umidade, pH, radiação solar, temperatura e concentração de matéria orgânica influenciando no tempo de sobrevivência dos coliformes no ambiente, acredita-se que os resultados obtidos neste experimento estejam também relacionados a fatores físicos, como temperatura e umidade. Já que a arquitetura da planta do feijão confere menor sombreamento, assim como, o solo sem cobertura vegetal (testemunha) propiciam maior exposição solar, elevando a temperatura e reduzindo a umidade no solo, resultando em condições desfavoráveis a sobrevivência e desenvolvimento de coliformes termotolerantes.

O controle biológico de nematóides não é restrito apenas às interações entre estes fitopatógenos e seus antagonistas, mas ambos são influenciados pela planta, pelo ambiente físico e pelas microflora e microfauna do solo (STIRLING, 1991).

Uma rizobactéria do grupo das fluorescentes, três *Pseudomonas* não fluorescentes e uma *Bacillus* spp. reduziram em até 53% o número de galhas de *M. incógnita* em tomateiros, sendo as mais eficientes entre as 156 testadas por Habte (1997). Rizobactérias do

gênero *Bacillus* também estão frequentemente associadas ao controle de nematóides, mas outros gêneros também se mostram promissores (SIKORA, 1988).

A Figura 6 apresenta os valores médios obtidos em quatro repetições dos cinco tratamentos da quantidade de colônias de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus spp.* presentes nas rizosferas das culturas e testemunha, antes da primeira irrigação.

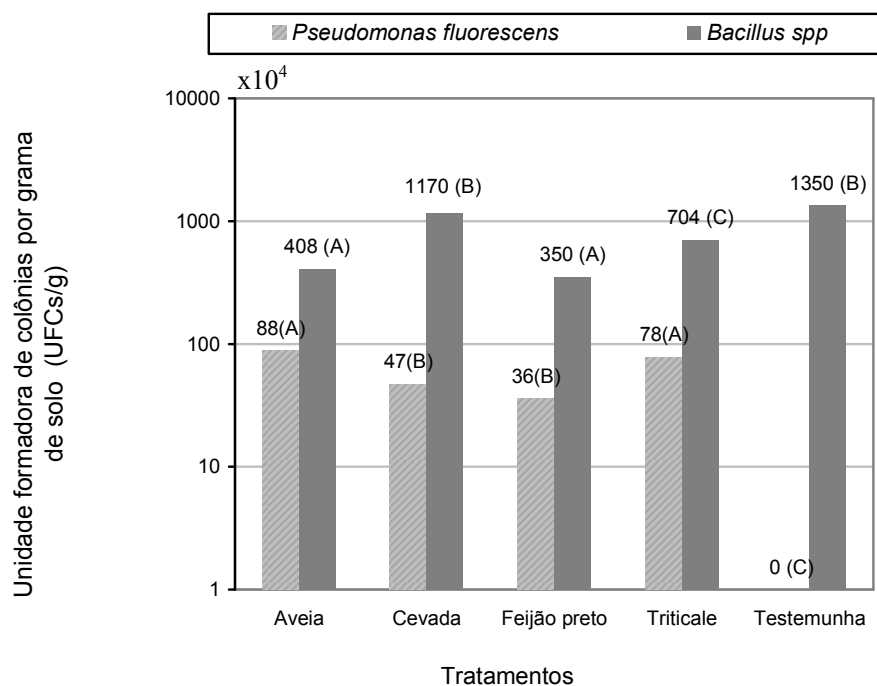


Figura 6 – Valores médios de Unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus spp.* na camada de 0-20 cm de profundidade de solo cultivado com diferentes culturas e testemunha, antes da aplicação de efluente doméstico tratado. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Antecedendo a aplicação de efluente tratado no solo, verificou-se a inexistência

de colônias de *Pseudomonas fluorescens* no tratamento testemunha. Contrariamente, a quantidade de *Bacillus* spp. presente foi a maior em relação aos demais tratamentos envolvendo solos cultivado.

Nos tratamentos com aveia e tritcale registraram-se os maiores valores entre  $78 \times 10^4$  e  $88 \times 10^4$  unidades formadoras de colônias por grama de solo seco (UFCs.g<sup>-1</sup>) de *Pseudomonas fluorescens*; nos tratamentos com cevada e feijão preto registraram-se quantidades menores entre  $36 \times 10^4$  e  $47 \times 10^4$  UFCs.g<sup>-1</sup>. Estes resultados indicam que as rizosferas da aveia e tritcale possibilitam uma maior colonização de rizobactérias *Pseudomonas fluorescens*, o que possivelmente esteja relacionado as substâncias exsudadas por suas raízes.

Em relação a quantidade de *Bacillus* spp. observou-se uma maior quantidade populacional na rizosfera da Cevada com valores médios próximos dos valores médios da testemunha. Os demais tratamentos apresentaram valores médios aproximados.

De qualquer forma, em todos os tratamentos verificou-se que a quantidade de colônias de *Bacillus* spp. antes mesmo da aplicação de efluente já era superior ao número de colônias de *Pseudomonas*. Estes dados estão de acordo com Stanier (1969), de que os *Bacillus* spp. são resistentes ao calor e a outros agentes destrutivos devido a sua característica de formar endósporos. A maioria deles tem exigências nutricionais simples, requerendo no máximo alguns aminoácidos ou vitaminas B como fatores de crescimento.

Na Figura 7 verificam-se os valores médios do adensamento de colônias de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* spp. por tratamento, 20 dias após a primeira irrigação com o efluente e com 80 dias de ciclo vegetativo das culturas.

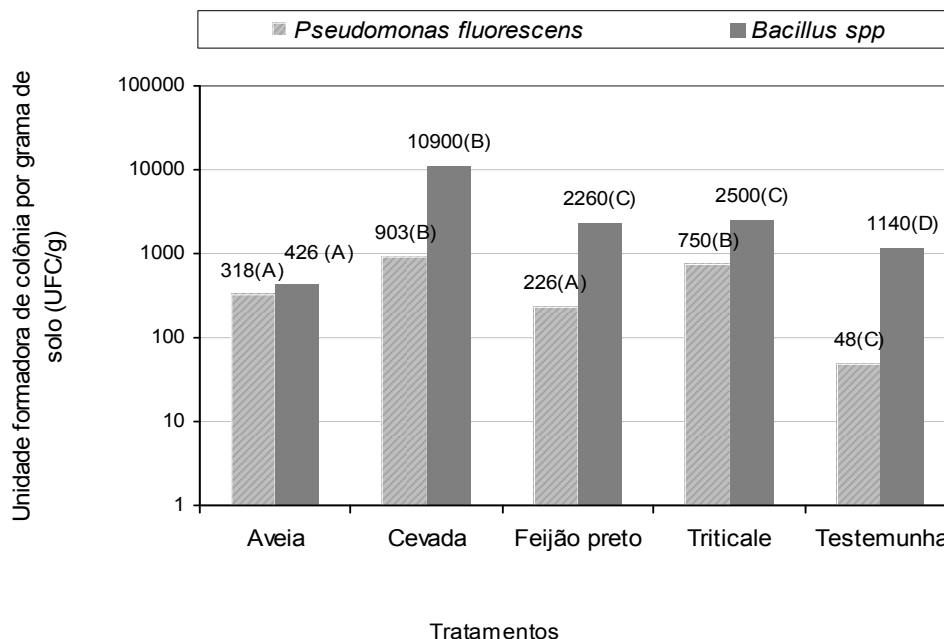


Figura 7 – Valores médios de Unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus spp.* na camada de 0-20 cm de profundidade de solo cultivado com diferentes culturas e testemunha, 20 dias após a primeira aplicação de efluente de esgoto doméstico tratado.

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos mostraram um adensamento significativo de *P. fluorescens* em todos os tratamentos, inclusive o surgimento de colônias na testemunha de  $48 \times 10^4$  unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFCs.g<sup>-1</sup>). A cevada apresentou uma quantidade de  $903 \times 10^4$  (UFC.g<sup>-1</sup>) e o triticale de  $750 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>; a aveia e o feijão preto apresentaram valores médios aproximados de  $318 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> e  $226 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Acredita-se que os adensamentos verificados em todos os tratamentos estejam relacionados ao aporte de matéria orgânica ao solo após a irrigação com o efluente



de esgoto, além da liberação de grande quantidade de exsudados pelas rizosferas das plantas durante o desenvolvimento de seus ciclos vegetativos.

Estes resultados confirmam a afirmação de Stirling (1991), de que dentre as rizobactérias, o grupo das *Pseudomonas* fluorescentes é o mais consistentemente isolado, principalmente durante os períodos de grande produção de exsudados radiculares.

Em relação ao adensamento de *Bacillus* spp. verificou-se um notável crescimento do número de colônias nos tratamentos envolvendo solos cultivados, o que não ocorreu na testemunha. Uma possível hipótese para entendimento deste resultado é a de que o surgimento de colônias e *P. fluorescens* no solo sem cultivo tenha promovido uma competição, já anteriormente descrita, não somente entre *P. fluorescens* e *Bacillus* spp. e coliformes termotolerantes, como também, entre os dois gêneros de rizobactérias.

A Figura 8 mostra os valores médios de unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* spp., obtidos 40 dias após a primeira irrigação com o efluente de esgoto tratado e com desenvolvimento de 100 dias de ciclo vegetativo das culturas.

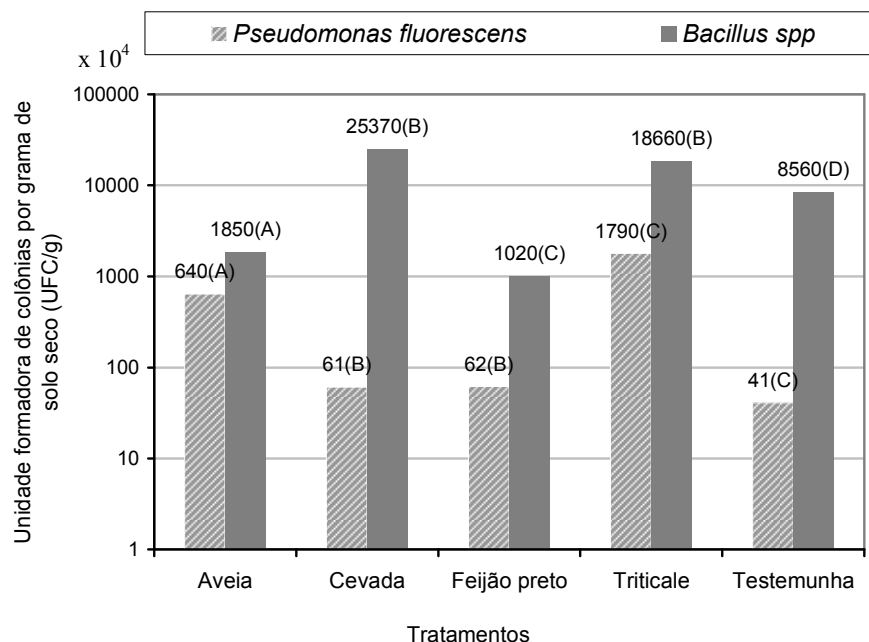


Figura 8 - Valores médios de Unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* spp. na camada de 0-20 cm de profundidade de solo cultivado com diferentes culturas e testemunha, 40 dias após a primeira aplicação de efluente de esgoto doméstico tratado.

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos 40 dias após a primeira irrigação, equivalente a vinte dias após a segunda aplicação de efluente, mostraram que os tratamentos envolvendo a aveia e o triticale continuaram apresentando um aumento no adensamento de colônias de *P. fluorescens*, enquanto as rizosferas da aveia e feijão preto tiveram seu número de colônias significativamente reduzido, sendo de  $903 \times 10^4$  para  $61 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> solo para a aveia e de  $226 \times 10^4$  para  $62 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> solo para o feijão preto. Na testemunha não ocorreu alteração significativa de valores médios.

Uma das hipóteses para a interpretação destes resultados seja a de que as análises realizadas 40 dias após a primeira aplicação coincidiu com 100 dias do ciclo vegetativo das culturas empregadas no experimento, sendo que a família das gramíneas possui um ciclo de 120 dias e as leguminosas de 90 dias. Sendo assim, o feijão preto já se encontrava com seu ciclo vegetativo encerrado, enquanto a aveia, a cevada e o triticale ainda encontravam-se na fase de amadurecimento. Porém, os resultados obtidos com a cevada, apesar de espécie vegetal da família das gramíneas, deve ter relação com uma redução acentuada e antecipada na produção de exsudados em relação a aveia e ao triticale.

Estes resultados atendem ao descrito por Clays-Josserand et al., (1995) de que o favorecimento de uma determinada espécie fluorescente de *Pseudomonas* spp. depende das características do solo e da espécie da planta e que seu desenvolvimento é maior na região das rizosferas do que me solos sem cultivo.

Coelho et al. (2007) detectaram que a rizosfera da alface favoreceu o crescimento de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas*, em comparação com o crescimento de *Bacillus* spp., que não foi beneficiado. Esse favorecimento foi detectado por comparação da rizosfera da alface com a da chicória (*Cichorium endiva*), rúcula (*Eruca sativa*), salsa (*Petroselinum sativum*) e tirica (*Cyperus rotundus*). Apenas a rizosfera da alface teve esse favorecimento. No entanto, a diversidade tanto de *Bacillus* spp. quanto de *Pseudomonas* spp. é influenciada pela rizosfera em que se desenvolvem (Coelho, 2006). A mesma conclusão chegaram Freitas & Aguilar-Vildoso (2004), em trabalho com três espécies cítricas (*Citrus* spp.).

Em relação a *Bacillus* spp. manteve-se o adensamento em quase todos os tratamentos, após aplicação do efluente no solo, excluindo-se o feijão preto que apresentou uma redução de 50% no valor médio de quantidade e colônias. Para este resultado ainda não temos uma interpretação.

Acredita-se que a maior quantidade de rizobactérias *Bacillus* spp. verificada mesmo após o encerramento do ciclo das plantas, é uma resposta direta a maior resistência desse gênero – formação de endósporos - à exposição aos raios solares.

Na Figura 9 são apresentados os resultados dos valores médios de unidades formadoras de colônias por grama de solo obtidos nas análises microbiológicas de amostras de solo, 60 dias após a primeira irrigação com o efluente e com desenvolvimento de 120 dias de ciclo vegetativo das culturas.

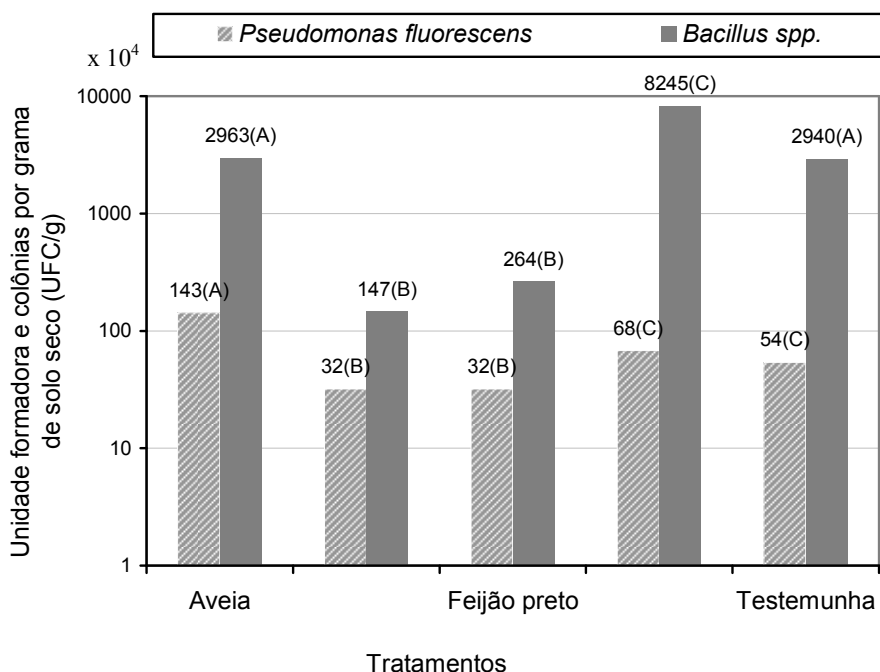


Figura 9 – Valores médios de Unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* spp. na camada de 0-20 cm de profundidade de solo cultivado com diferentes culturas e testemunha, 60 dias após a primeira aplicação de efluente de esgoto doméstico tratado. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos 60 dias após a primeira irrigação, ou seja, vinte dias após a terceira aplicação de efluente, indicaram uma notável redução no número de colônias de *Pseudomonas fluorescens* em quase todos os tratamentos, excluindo-se o tratamento testemunha, o qual não apresentou alterações significativas. Nesta época, todas as culturas já haviam encerrado seu ciclo vegetativo de 120 dias, portanto, prontas para a colheita.

De acordo com estudos de Gamliel & Katan, (1991) a solarização do solo em campo reduziu significativamente populações de *Pseudomonas fluorescens*, entretanto, após o semeio de tomateiros em solos solarizados a bactéria rapidamente colonizou a rizosfera e as raízes das plantas. Desta forma, pode-se deduzir que a seção de produção de exsudados pelas rizosferas aliada a redução do sombreamento causado pelo secamento da plantas possibilitou uma maior exposição de área de solo a radiação solar, elevando a temperatura e colaborando para a redução de *P. fluorescens*.

Em relação a quantidade de *Bacillus* spp., assim como aconteceu com *Pseudomonas fluorescens*, verificou-se uma elevada redução de unidades formadoras de colônias nos tratamentos, excluindo-se a aveia, na qual registrou-se um acréscimo de  $1.8 \times 10^4$  para  $2,9 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>. Este resultado também exige maior investigação para se chegar a uma interpretação conclusiva.

#### 4 CONCLUSÕES

Concluiu-se com este experimento que o adensamento das rizobactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* spp. em unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFCs.g<sup>-1</sup>) está diretamente relacionado a aplicação do efluente de esgoto tratado e, também, ao ciclo vegetativo das plantas.

A eficiência alcançada na redução da concentração de coliformes termotolerantes em número mais provável por 100mL de água residuária (NMP.100mL<sup>-1</sup>), após aplicação do efluente de esgoto no solo pode estar relacionada a atuação das rizobactérias, por meio de predação, competição por espaço e nutrientes e atuação de sideróforos; estar relacionada as substâncias exsudadas pelas rizosferas de diferentes culturas e, ainda, estar relacionada a influência de fatores físico externos, principalmente, temperatura ambiente elevada e baixa umidade do solo.

Sendo assim, dar-se-á continuidade ao experimento aqui apresentado, com a finalidade de obter-se um maior entendimento da dinâmica das interações solo – rizosfera – microrganismos, após sucessivas aplicações de efluentes domésticos no solo por um maior período de tempo, objetivando apresentar uma tecnologia adequada de biorremediação de solos contaminados por águas residuárias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCEIVALA, S.J.. **Wastewater treatment and disposal**: engineering and ecology in pollution control. New York: Marcel Dekker, 1981.

BASTOS, R.K.X.. **Coliformes como indicadores da qualidade da água: alcance e limitações**. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental L, 27, 2000, Porto Alegre. *Anais...*Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000.

BASTOS, R.K.X..**Utilização de esgotos tratados em fertirrigação, hidroponia e piscicultura**. PROSAB – Programa de Pesquisa em Saneamento Básico. Viçosa – MG. 2003. 253p.

BECKER, J. O.; ZAVALA-MEJIA, E.; COLBERT, S. F.; SCHROTH, M. N.; WEINHOLD, A. R.; HANDOCK, J. C. & VAN GUNDY, S. D..Effect of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. **Annual Review of Phytopathology**, v. 78, p. 1466-1469, 1988.

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P.. Sideróforos: uma resposta dos microrganismos. **Química Nova**, Vol. 25, No. 6B, 1155-11, 64. Rio de Janeiro. UFF, 2002.

BETTIOL, W.; FERNADES, S.A.P.. Efeito do lodo de esgoto na comunidade microbiana e atributos químicos do solo. **EMBRAPA Comunicado Técnico N.24**. Jaguariúna. São Paulo, 2004. ISSN 1516-8638.

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

BUTLER, R. G.; ORLOB, G. T.; McGAUHEY, P.H.. Underground movement of bacterial and chemical pollutants. **Journal of the American Water Works** . v.46, p. 97-111, 1954.

CETESB – Orientação para apresentação de projeto visando a aplicação de água de reúso proveniente de estação de tratamento de esgoto doméstico na agricultura. São Paulo, 2007.

CHANDLER, D. S.; CRAVEN, J. A.. Relationship of soil moisture to survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Journal Agricultural Research**, v. 29, p. 577-585, 1978.

CHERNICHARO, C. A. L.. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: tratamentos anaeróbios**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária/UFMG, v.5, 1997. 246p.

CLAYS-JOSSERAND, A.; LEMANCEAU, P.; PHILIPPOT, L.; AND LENSJ.. Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p.1745-1749, 1995.

COELHO, L. F.. **Interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. com diferentes rizosferas**. Campinas. São Paulo: Instituto Agrônomo de Campinas - IAC. 60p, 2006. Dissertação de Mestrado.

CORAUCCI FILHO, B.. **Tratamento de Esgoto Doméstico no Solo pelo Método de Escoamento Superficial**. São Paulo: USP. 400p, 1991. Tese de Doutorado.

DINARDI et al.. **Fitorremediação**. Centro Superior de Educação Tecnológica (CESAT) – UNICAMP, 2000.

Disponível em: <http://www.ceset.unicamp.br/Lte.Artigos/3fec2407.pdf+junco+phragmites>.

Acessado em: 04/01/2006.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Process design manual – land treatment of municipal wastewater**. Cincinnati, Ohio, 1981.

FALKINER, R. A.; SMITH, C. J.. Changes in soil chemistry in effluent-irrigated *Pinus radiata* and *Eucalyptus grandis*. **Australian Journal of Soil Research**, v.35, p.131 – 147, 1997.



FEIGIN, A.; RAVINA, I.; SHALHEVET, J.. **Sources, treatment, processes and uses of sewage effluent**. In: Irrigation with treated sewage effluent. (Eds.) Berlin: Springer-Verlag. 1991. Cap.2, p.3-33.

FERNÁNDEZ, O.; VEGA, L.. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. **Manejo Integrado de Plagas** (Costa Rica). No. 62, p. 96-100, 2001.

FONSECA, S.P.P.. Tratamento de esgoto doméstico bruto pelo método de escoamento superficial utilizando o capim-coastcross. Viçosa: UFV. 133p, 2000. Dissertação de Mestrado.

FONSECA, M.C.C.. Isolamento e caracterização morfológica de pseudomonas spp. Fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola. **EMBRAPA Comunicado Técnico**. N. 43, pl-4, dez/2000.

FRANCI, R.G.. **Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas. Aplicações para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidroponia**. PROSAB – Programa de Pesquisas em Saneamento Básico. Departamento de Saneamento Ambiental. UFES, Cap. 2, p.29-35, 2003.

FRAVEL, D.R.. Role of antibiotics in the biocontrol of plants disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p.75-91, 1988.

FREITAS, S. S.; SILVEIRA, A. P. D.. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agronômico de Campinas - IAC, Campinas, SP.,2007, 317p.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Saneamento**. Ministério da Saúde. 2000. 255p.

GAMBA, R.C.; CIAPINA,E. M.P.; ESPINDOLA, R.S.. Detecção de oocistos de

Cryptosporidium sp. em águas de poço para consumo humano em Itaquaquecetuba, região metropolitana de São Paulo. **Braz. J. Microbiol.**, abr./jun.2000, vol.31, no.2, p.151-153.

GAMLIEL, A. & KATAN, J. Involvement of fluorescent pseudomonads and other microorganisms in increases growth response of plants in solarizes soils. **Annual Review of Phytopathology**, v.. 81, p. 494-502, 1991.

HABTE, M.; BYAPPANAHALLIU, M. N.. Dependency of cassava. (*Manihot sculenta* Crantz) an vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v.4, p.241-245, 1994.

IBGE – Censo de 2002. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

JORDÃO, E.P.; PESSÔA, C.A. **Tratamento de esgostos domésticos**. 4ª edição. ABES. Rio de Janeiro, 2005. 932p.

KAICK, T. S. V. Estação de Tratamento de Esgoto por meio de zona de raízes: uma proposta de tecnologia apropriada para saneamento básico no Litoral do Paraná. Curitiba: CEFET-PR, 2002. Dissertação de Mestrado.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E.. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

KRESSE, K.. **Água potable y saneamiento**: Los Avances em los últimos años son insuficientes. Desencolvolvimento e Cooperação. Berlin. N. 2, p.26-29, mar.-abr., 1997.

LÉON SUEMATSU, G.; CAVALLINI, J. M.. **Tratamento e uso de águas residuárias**. Tradução de: H. R. Ghery, A. Konig, B. S. O. Ceballos, F. A. V. Damasceno. Campina Grande: UFPB, 1999. 109p.

LUND, L.; PAGE, A. L.; NELSON, C. O.; ELLIOTT, R. A. Nitrogen balances for an effluent irrigation area. **Journal of Environmental Quality**. v.10, p.349-352, 1981.

MARA, D.D.; CAIRNCROSS, S.. **Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture**. Geneva: World Health Organization, 1989. 187 p.

McGAUHEY, P. H.; KRONE, R. B.. Soil mantle as a wastewater treatment system. **Sanitary Engineering Research Laboratory**. Berkeley: University of California. 1967. Report. n. 67-11).

MIKKELSEN, R. L.; RECHEIGL, J. E.; MACKINNON, H. C.. **Agricultural and environmental issue in the management of swine waste**. Agriculture uses of products na waste. Oxford: Oxford Universit Press. v.6, 1997, p.110-119.

PAGANINI, W. S. Reúso de água. **Reuso de água na agricultura**. Editora USP/Manole, p.339, São Paulo, 2004.

PNUD – Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento.

Disponível em: <http://www.pnud.org.br/noticias/impressao.php?id01=1257>.

Acessado em: 11/10/2007.

QUIN, B. F.; FORSYTHE, L. J.. Surface irrigation of pasture with treated *sewage* effluent: II. Drainage losses of nitrate and other nutrients. **New Zealand Journal of Agricultural Research**. v. 21, p.427-434, 1978.

QUIN, B.F.; WOODS, P.H.. Surface irrigation of pasture with treated sewage effluent. I. Nutrient status of soil and pastures. **New Zeland Journal of Agricultural Research**, v. 21, p.419-426, 1978.

RIBAS, T.B.C.; FORTES NETO, P.; VALÉRIO FILHO, M.. **A Domestic Sewage Treatment Station using Root Zone processing: Aproposal for na Appropriate Biotechnology for Basic sanitation in the city of Jacareí – SP – Brazil**. In: Congresso Internacional Cooperação Universidade-Empresa - UNINDU, 2005, Ubatuba, SP.

SIKORA, R. A.. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant

parasitic nematodes and soil microorganisms. **Med. Fac. Kandbouww.** Rijksuniv. Gent, v. 53 (2b), p. 867-878, 1992.

SOARES, A. A.; BATISTA, R. O.; SOUZA, J. A. A.. **Aspectos Técnicos da Irrigação com águas de qualidade inferior.** In: Workshop Uso e Reúso de Águas Inferiores: Realidade e Perspectivas, 2005, Campina Grande, PB.

SOTTERO, A. N.. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias.** Instituto Agronômico de Campinas. Campinas. São Paulo, 2003. Dissertação de Mestrado.

STAINER, R.Y.; PALLERONI, N.J.; DOUDOROFF, M.. The aerobic *Pseudomonads*: a toxic study. **Journal of General Microbiology**, v. 43, p. 159-271, 1996.

STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 20<sup>th</sup> ed. APHA. AWWA. WEF, 2000.

SWIFT, M.J.; HEAL, O.W.; ANDERSON, J.M.. **Decomposition in Terrestrial Ecosystems.** Oxford: Blacwell, 1979, 372p.

STIRLING, G. R. 1991. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects.** Wallingford. Oxon, UK, 1991.

VAN DONSEL, D. L.; GELDREICH, E. E.; CLARKE, N. A.. Seasonal variations in survival of indicator bacteria in soil and their contribution to storm-water pollution. **Applied Microbiology**. v.15, p.1362-1370, 1967.

VON SPERLING, M.. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 2ed. Vol.1. Belo Horizonte, MG, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 1996. 243p.

WELLER, D.M.. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. **Annual Journal Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p.379-407, 1988.

WHIPPS, J.M.. Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

YTZHAKI, J.. The fate of enterobacteriaceae in recharge wells. **Israel Journal of Medical Science**. v. 9, p.1103-1103, 1971.

ZAGO, V.C.P.. Influência de diferentes sistemas de cultivo de olerícolas na diversidade das populações de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Seropédica. Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2003. Tese de Doutorado – UFRJ.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G.. *Pseudomonas* spp. Fluorescentes – bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. **EMBRAPA Documento n. 127**, 2000.

ZAVALETA-MEJIA, E. & VAN GUNDY, S. D.. Effects of rhizobacteria on *Meloidogyne* infection. **Journal of Nematology**, n. 14, p. 475-476, 1982.