

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**IMPACTO DE SUBPRODUTOS SÓLIDOS DA  
INDUSTRIALIZAÇÃO DO XISTO SOBRE ATRIBUTOS  
BIOLÓGICOS DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Marta Eliane Doumer**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

**IMPACTO DE SUBPRODUTOS SÓLIDOS DA  
INDUSTRIALIZAÇÃO DO XISTO SOBRE ATRIBUTOS  
BIOLÓGICOS DO SOLO**

**Marta Eliane Doumer**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência do Solo.**

**Orientador: Prof. Sandro José Giacomini**

**Santa Maria, RS, Brasil**

D738i Doumer, Marta Eliane  
Impacto de subprodutos sólidos da industrialização do xisto sobre atributos biológicos do solo / por Marta Eliane Doumer. – 2011.  
87 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Sandro José Giacomini  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, RS, 2011

1. Subprodutos sólidos do xisto 2. Indicadores de qualidade do solo  
3. Biodegradação I. Giacomini, Sandro José II. Título.

CDU 631.4

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109  
Biblioteca Central UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado**

**IMPACTO DE SUBPRODUTOS SÓLIDOS DA INDUSTRIALIZAÇÃO  
DO XISTO SOBRE ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DO SOLO**

elaborada por  
**Marta Eliane Doumer**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência do Solo**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sandro José Giacomini, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Carlos Augusto Posser Silveira, Dr.**  
(Embrapa Clima Temperado)

**Celso Aita, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 31 de março de 2011.

## **Agradecimentos**

*À Deus pelo constante sopro de vida.*

*À Universidade Federal de Santa Maria, ao Departamento de Solos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela possibilidade de realização do curso de mestrado.*

*Ao Dr. João Peterson Pereira Gardin por ter acreditado no meu potencial, suas brilhantes idéias na elaboração do projeto e seu espírito entusiasta.*

*A Dr<sup>a</sup> Claudinéia Rodrigues da Silva e ao Msc. Luis Henrique Ferreira pelo exemplo e apoio no Projeto Xisto Agrícola.*

*Ao Dr. Carlos Augusto Posser, pela ajuda desinteressada e efetiva contribuição durante o desenvolvimento das atividades.*

*Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal (CPACT): Patrícia, Fabiane, Renê, Rêrinton e a Dr<sup>a</sup> Ângela Campos. A solidariedade para comigo jamais será esquecida e servirá de eterno exemplo.*

*Aos amigos do Laboratório de Bromatologia (ETB): Rosângela, Raquel, Gabriela, Beto, Carlos (integrantes do Projeto Xisto Agrícola) e demais funcionários, pela amizade e por compartilharmos angústias e alegrias, estendido a todos os amigos da EMBRAPA Clima Temperado.*

*As amigas de Pelotas: Raquel Soares, Deisi Mari, Ester Buchweitz e Lílian Costa.*

*Ao Prof. Sandro Giacomini por sediar a pesquisa, orientação e apoio e ao Prof. Rodrigo Jacques pelas importantes sugestões e ajuda cordial.*

*A todos os professores do Departamento de Solos, pelos ensinamentos e convívio diários.*

*Aos amigos do PPGCS: Viviane Capoane, Marcelo Sulbacker, Deisy Morales, Juliana Lorensi, Stefen Pujol, Ezequiel Miola, Janáine Donini (UFMT), Ricardo e Geruza, aos demais alunos pela amizade e convívio enriquecedor.*

*Aos alunos de graduação do Laboratório de Microbiologia do Solo (UFMS): Luana, Raquel, Leonardo, Ricardo, Alex, Aílson, Isaiás, Guilherme, Maurício, Getúlio, que participaram efetivamente na condução deste trabalho.*

*Aos meus pais e irmãos com todo amor.*

***A todos que fizeram parte desta caminhada, meu muito obrigado!***

*"Se você pensa que pode ou sonha que pode, comece. Ousadia tem genialidade, poder e mágica. Ouse fazer e o poder lhe será dado."*

*Goethe*

*"Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."*

*Isaac Newton*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo  
Universidade Federal de Santa Maria

### IMPACTO DOS SUBPRODUTOS DA INDUSTRIALIZAÇÃO DO XISTO SOBRE ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DO SOLO

Autor: Marta Eliane Doumer  
Orientador: Sandro José Giacomini  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de março de 2011.

O impacto do uso de subprodutos do xisto no solo sobre a atividade biológica é um aspecto ainda pouco conhecido. O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o impacto da aplicação dos subprodutos do xisto sobre atributos biológicos do solo. No ano de 2010 foram conduzidos experimentos em solo Argissolo Vermelho distrófico arênico sob condições de laboratório e de campo. No laboratório, os tratamentos consistiram da aplicação ao solo de sete diferentes doses (0, 300, 450, 600, 750, 1500 e 3.000 kg ha<sup>-1</sup>) de xisto retornado (XR), calcário de xisto (CX) e finos de xisto (FX). No campo, em dois cultivos de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) em sistema plantio direto, os tratamentos avaliados foram compostos pelo XR, sendo quatro doses crescentes (0, 750, 1.500 e 3.000 kg ha<sup>-1</sup>) em combinação à adubação mineral (NPK) e uma dose isolada com somente XR (1.500 kg ha<sup>-1</sup>). Além desses, foi avaliado o tratamento sem XR e sem NPK. As avaliações realizadas foram: evolução de CO<sub>2</sub>, carbono da biomassa microbiana (CBM), atividade enzimática do solo (fosfatase ácida, arilsulfatase, β-glicosidase, urease, hidrólise do diacetato de fluoresceína, desidrogenase) e teste de ecotoxicidade. No estudo laboratorial, foi observada uma baixa degradabilidade da fração orgânica dos subprodutos sólidos da industrialização do xisto. A aplicação do XR ao solo reduz a emissão de CO<sub>2</sub> sem reduzir o CBM. O XR mesmo quando reaplicado em doses crescentes ao solo não causa impactos negativos sobre a atividade enzimática do solo. Os resultados obtidos com as enzimas em condições de campo, após duas aplicações de XR, aliados aos resultados de CBM, do quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>) e do teste ecotoxicológico indicam que os subprodutos sólidos da industrialização do xisto (XR, CX e FX) não provocam a degradação biológica do solo.

**Palavras chave:** subprodutos sólidos do xisto, indicadores de qualidade do solo, biodegradação.

## ABSTRACT

Dissertation  
Graduate Program in Soil Science  
Universidade Federal de Santa Maria

### IMPACT OF OIL SHALE INDUSTRIALIZATION BYPRODUCTS ON SOIL BIOLOGICAL ATTRIBUTES

Author: Marta Eliane Doumer  
Advisor: Sandro José Giacomini  
Date and Location of Defense: Santa Maria, March 31, 2011.

The impact of using oil shale byproducts in soil on biological activity is an aspect still little known. The aim of this work was to evaluate the oil shale byproducts impact on soil biological attributes. In 2010, experiments were conducted on soil Hapludalf under laboratory conditions and field. In the laboratory, the treatments consisted of seven different rates (0, 300, 450, 600, 750, 1500 and 3000 kg ha<sup>-1</sup>) of oil shale ash (OSA), calcareous of shale (CS) and fragments of shale (FS). In the field, in two crops of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in no-tillage system, the treatments were composed of the OAS, with four rates (0, 750, 1,500 and 3,000 kg ha<sup>-1</sup>) in combination with mineral fertilizer (NPK) and one treatment with only a single rate of OSA (1,500 kg ha<sup>-1</sup>). Other control treatment was beans cultivated without OSA and without NPK. The evaluations were: CO<sub>2</sub> evolution, microbial biomass carbon (MBC), soil enzyme activity (acid phosphatase, arylsulfatase, β-glucosidase, urease, fluorescein diacetate hydrolysis, dehydrogenase) and ecotoxicological test. In the laboratory study, the data show a low degradability of organic fraction of solid byproducts of the oil shale industrialization. The application of the OAS reduces CO<sub>2</sub> emissions without reducing the CBM. The OSA does not cause negative impacts on soil enzymatic activity even when reapplied to the soil at increasing rates. The results obtained with the enzymes activity under field conditions after two applications of OAS, combined with the results of MBC, the metabolic quotient (qCO<sub>2</sub>) and ecotoxicological test indicate that the solid byproducts of the oil shale industrialization (OSA, CS and FS) does not cause the biological degradation of soil.

**Keywords:** solid byproducts of oil shale, indicators of soil quality, biodegradation.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição química do xisto retornado.....	10
Tabela 3.2 – Propriedades físicas do xisto retornado.....	11
Tabela 3.3 - Número mínimo de indicadores utilizados nos programas de monitoramento de qualidade do solo da comunidade européia.....	15
Tabela 4.1 - Caracterização química dos subprodutos sólidos de xisto, coletados na Superintendência da Industrialização do Xisto, em São Mateus do Sul, PR, incubados com solo – CMP: concentração máxima permitida para metais pesados em condicionadores de solo.....	22
Tabela 5.1 - Concentração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) nos tratamentos com somente solo (S0) e solo com 1500 kg de XR ha <sup>-1</sup> (XR1500) no início e 60 dias após a incubação no experimento 1.....	32
Tabela 5.2 - Carbono da biomassa microbiana (CBM, mg C kg <sup>-1</sup> de solo) e quociente metabólico (qCO <sub>2</sub> , mg d <sup>-1</sup> C-CO <sub>2</sub> mg <sup>-1</sup> CBM) em solo incubado com doses crescentes de xisto retornado (XR), finos de xisto (FX) e calcário de xisto (CX).....	33
Tabela 5.3 - Carbono da biomassa microbiana em amostras de solo da camada de 0-5 cm coletadas após uma semana da aplicação do xisto retornado (A1) e no florescimento (A2) do feijão.....	34
Tabela 5.4 - Atividade enzimática sob a influência dos subprodutos sólidos de xisto aos 15, 30 e 60 dias após a incubação.....	38
Tabela 5.5 - Atividade enzimática do solo em amostras de solo da camada de 0-5 cm coletadas após uma semana da aplicação do xisto retornado (A1) e no florescimento (A2) do feijão.....	42
Tabela 5.6 - Coeficientes de estrutura ( <i>loadings</i> ) obtidos com a análise de componentes principais, obtidos através dos dados avaliados no florescimento da cultura do feijoeiro.....	47
Tabela 5.7 - Teste multivariado dos efeitos simples, para comparação dos contrastes testados pela estatística de Wilks.....	49
Tabela 5.8 – Teste de fuga com oligoquetas em solo tratado com doses crescentes de xisto retornado.....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – (A) Localização da extração de xisto pela Petrosix e (B) localização da Bacia do Paraná na região sul do Brasil, no membro Assistência da Formação Irati.....	6
Figura 3.2 – Perfil do terreno natural mostrando as diferentes camadas da coluna estratigráfica.....	7
Figura 3.3 – Difratoogramas de raios-X da rocha de xisto (ROS), finos de xisto (POS), calcário de xisto (DLS), xisto retornado coletado na superfície da pilha de armazenamento (OSRsur), xisto retornado coletado no interior da pilha de armazenamento (OSRins). Minerais identificados: quartzo (Q); pirita (P); goetita (Go); hematita (He); albita (A); caolinita (k).....	9
Figura 4.1 - Determinação da atividade enzimática do solo: a) Incubação de amostras para a enzima; b) Etapa de filtragem; c) Extrato após filtragem; d) Espectrofotômetro para medida da absorvância.....	24
Figura 4.2 - a) Área de experimentação após a semeadura do feijão; b) Aplicação do XR a lanço; c) Florescimento do feijoeiro.....	26
Figura 5.1 - Quantidades acumuladas de CO <sub>2</sub> do solo incubado com doses crescentes de finos de xisto (FX) (a) e calcário de xisto (CX) (b) no experimento 1. FX750: solo + 750 kg FX ha <sup>-1</sup> ; FX1500: solo + 1500 kg FX ha <sup>-1</sup> ; FX3000: solo + 3000 kg FX ha <sup>-1</sup> ; CX750: solo + 750 kg CX ha <sup>-1</sup> ; CX1500: solo + 1500 kg CX ha <sup>-1</sup> ; CX3000: solo + 3000 kg CX ha <sup>-1</sup> ; e S0: controle. A barra vertical representa a diferença mínima significativa entre as médias de cada tratamento (Tukey a 5 %)......	29
Figura 5.2 - Quantidades acumuladas de CO <sub>2</sub> do solo incubado com doses crescentes de xisto retornado (XR) nos experimentos 1 (a) e 2 (b). XR300: solo + 300 kg XR ha <sup>-1</sup> ; XR450: solo + 450 kg XR ha <sup>-1</sup> ; XR600: solo + 600 kg XR ha <sup>-1</sup> ; XR750: solo + 750 kg XR ha <sup>-1</sup> ; XR1500: solo + 1500 kg XR ha <sup>-1</sup> ; XR3000: solo + 3000 kg XR ha <sup>-1</sup> ; e S0: controle; A barra vertical representa a diferença mínima significativa entre as médias de cada tratamento (Tukey a 5 %)......	30
Figura 5.3 - Efeito de doses de finos de xisto (FX) (a), calcário de xisto (CX) (b) e xisto retornado (XR) (c) em condições laboratoriais no experimento 1; e condições de campo no	

plantio (P) do segundo ano de aplicação do xisto retornado (d) sobre o carbono da biomassa microbiana (CBM). PM=Ponto de máxima da curva.....	35
Figura 5.4 - Efeito de doses de xisto retornado (XR) sobre a atividade de algumas enzimas em diferentes datas de amostragem. Foram apresentados somente os resultados das enzimas em cada data de avaliação que tiveram a análise de regressão significativa. PM=Ponto de máxima da curva.....	39
Figura 5.5 - Efeito de doses de finos de xisto (FX) sobre a atividade de algumas enzimas em diferentes datas de amostragem. Foram apresentados somente os resultados das enzimas em cada data de avaliação que tiveram a análise de regressão significativa. PM=Ponto de máxima da curva.....	40
Figura 5.6 - Efeito de doses de calcário de xisto (CX) sobre a atividade de algumas enzimas em diferentes datas de amostragem. Foram apresentados somente os resultados das enzimas em cada data de avaliação que tiveram a análise de regressão significativa. PM=Ponto de máxima da curva.....	41
Figura 5.7 - Efeito do xisto retornado sobre indicadores ambientais em duas avaliações: plantio (P) e florescimento (F) da cultura do feijoeiro, no primeiro cultivo (a, b, c, d). PM=Ponto de máxima da curva.....	46
Figura 5.8 - Relação entre as componentes principais 1 e 2 (CP1 e CP2) da análise de componentes principais (ACP), discriminando a adubação mineral- NPK (NPK + XR0); XR1 (NPK + XR750); XR2 (NPK + XR1500); XR3 (NPK + XR3000); TEST (NPK0 + XR0) e XR S/NPK (NPK0+ XR1500), variáveis ambientais explicativas no primeiro cultivo (a) e no segundo cultivo (b). CBM= carbono da biomassa microbiana; FDA= hidrólise do diacetato de fluoresceína, DHA= desidrogenase e BG= $\beta$ -glicosidase.....	48

## LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Atributos químicos do solo avaliados no cultivo do feijoeiro.....	68
Apêndice B – Atividade enzimática do solo após 90 dias de incubação com doses crescentes de xisto retornado. <sup>(1)</sup> .....	69
Apêndice C – Quadro de análise estatística realizados para experimentos em condições de campo com variáveis que apresentaram significância frente à regressão polinomial sob a influência do xisto retornado.....	70
Apêndice D – Quadro de análise estatística realizados para experimentos em condições laboratoriais com variáveis que apresentaram significância frente a regressão polinomial sob a influência do xisto retornado.....	71
Apêndice E – Quadro de análise estatística realizados para experimentos em condições laboratoriais com variáveis que apresentaram significância frente à regressão polinomial sob a influência dos finos de xisto.....	72
Apêndice F – Quadro de análise estatística realizados para experimentos em condições laboratoriais com variáveis que apresentaram significância frente à regressão polinomial sob a influência do calcário de xisto.....	73

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Atividade da Fosfatase ácida.....	74
Anexo B - Atividade da Arilsulfatase.....	77
Anexo C - Atividade da $\beta$ -Glicosidase.....	78
Anexo D - Atividade da Urease.....	80
Anexo E - Hidrólise do Diacetato de Fluoresceína (FDA).....	82
Anexo F - Atividade da Desidrogenase (DHA).....	84
Anexo H – Fluxograma do processo Petrosix®.....	87

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 HIPÓTESE.....</b>	<b>4</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Xisto e subprodutos da sua industrialização .....</b>	<b>5</b>
3.1.1 Características dos subprodutos sólidos do xisto .....	9
3.1.2 Uso agrícola dos subprodutos sólidos da industrialização do xisto .....	11
<b>3.2 Bioindicadores de Qualidade do Solo.....</b>	<b>14</b>
3.2.1 Avaliação do impacto do uso de subprodutos em solo agrícola .....	17
<b>3.3 Ensaios ecotoxicológicos .....</b>	<b>19</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Experimentos sob condições controladas de laboratório .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Experimentos em condições de campo.....</b>	<b>25</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>5.1 Atividade e biomassa microbiana.....</b>	<b>28</b>
<b>5.2 Atividades enzimáticas no solo .....</b>	<b>36</b>
<b>5.3 Teste ecotoxicológico.....</b>	<b>50</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>74</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O termo xisto, embora geologicamente incorreto, é frequentemente utilizado para designar rochas betuminosas sedimentares que contêm um complexo molecular orgânico, (matéria orgânica) conhecido como querogênio. O termo mais exato para esse tipo de rocha seria “folhelhos”, que são rochas resultantes da decomposição de materiais minerais e orgânicos no fundo de grandes lagos ou mares interiores. Os agentes químicos e microorganismos transformam, ao longo de milhões de anos, a matéria orgânica presente nessas rochas em um complexo orgânico de composição indefinida, denominado querogênio (gerador de cera), que, quando convenientemente aquecido, produz um óleo semelhante ao petróleo.

Os métodos mais utilizados para separar o óleo do xisto são a retortagem e a combustão ou liquefação dos quais resulta a geração de um subproduto sólido, o xisto retortado (XR), que representa 80 a 90% da matéria prima de alimentação do processo de extração e processamento da rocha, além da geração de outros subprodutos, como calcário de xisto e finos de xisto.

O potencial de uso desses materiais na agricultura tem despertado o interesse de alguns órgãos brasileiros de pesquisa, como a Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS) e o IAPAR, que, em parceria com a Petrobras, estão desenvolvendo ações de pesquisa e desenvolvimento, visando à obtenção de novos insumos para a agricultura. Diversos trabalhos já realizados identificaram potencialidade do uso destes subprodutos na agricultura (PEREIRA e VITTI, 2004; ANJOS e REISSMAN, 1996). Entretanto, a presença de algumas substâncias e elementos-traço, geralmente causa preocupação pela possibilidade de risco à segurança ambiental e alimentar (ALLOWAY, 1993; CONAMA, 2006). De acordo com Stachiw (2008), resultados obtidos com ensaios de lixiviação e solubilização classificaram o XR e o FX em RESÍDUO CLASSE II A - Não Perigoso e Não Inerte. O termo *Não Perigoso* é devido a não presença de metais no lixiviado. O termo *Não Inerte* é devido à presença no solubilizado de alguns compostos cujos valores estão acima dos estabelecidos pela ABNT NBR 10004/2004, que para o XR e FX foram: alumínio, fenóis, manganês e sulfatos. Porém, a classificação de um resíduo em Classe I ou II não inviabiliza o seu uso na agricultura, pois os testes para a classificação consideram apenas as características de solubilidade em água ou ácido de elementos presentes. Entretanto, quando a destinação é o solo, ocorrem reações

específicas conforme as propriedades físicas, químicas e biológicas de cada tipo de solo (MATTIAZZO-PREZOTO e GLÓRIA, 2000), e é preciso levar em consideração que o solo pode suportar os elementos citados em níveis acima da norma para o solubilizado, de acordo com a Resolução CONAMA 375/06 (BRASIL, 2006), USEPA e UE (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Adicionalmente, os subprodutos do xisto podem apresentar compostos orgânico tóxicos, como os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), sendo observado por Nicolini et al. (2010), que quatro, dentre os dezesseis preconizados pela EPA (Agência de Proteção Ambiental), estavam acima do limite estabelecido. Contudo, pode-se fazer uso de indicadores ambientais para monitorar a toxicidade de subprodutos adicionados ao solo, sendo que microrganismos do solo apresentam um alto potencial de uso na avaliação da qualidade do solo por suas características, tais como, a abundância e atividade bioquímica e metabólica, além de proporcionar respostas mais rápidas a mudanças no ambiente (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007).

Impactos ambientais são definidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (Resolução nº. 1, de 23 de janeiro de 1986) como “quaisquer alterações nas características físicas, químicas ou biológicas do ambiente, causadas por qualquer forma de matéria ou energia derivada das atividades humanas, e que possam, direta ou indiretamente, afetar a saúde, segurança e o bem-estar da população, as atividades econômicas e sociais; a biota; as condições estéticas e sanitárias; e a qualidade dos recursos ambientais”. Frente a essa definição, Rodrigues et al. (2002) destacam que após ser considerada a eficiência de uma inovação tecnológica sobre o uso de insumos, como contribuição para a sustentabilidade da atividade agropecuária, deve-se atentar para os impactos da inovação tecnológica sobre a conservação ambiental. Esses impactos são avaliados por indicadores de emissão de poluentes, relacionados com comprometimento potencial da qualidade ambiental dos compartimentos atmosfera, solo e água. Os indicadores de conservação ambiental são, portanto, a qualidade da atmosfera, qualidade do solo (indicador fundamental da sustentabilidade das atividades agropecuárias), qualidade da água e qualidade da diversidade biológica (LANNA, 2002). Nesse sentido, um ecossistema saudável é caracterizado pela integridade dos ciclos de energia e nutrientes, estabilidade e resiliência a perturbações ou estresses (O’NEILL et al., 1986). E um indicador apropriado é aquele que provê uma medida quantitativa da magnitude e intensidade desse estresse ambiental experimentado por plantas e animais (LAL, 1999).

A microbiota do solo é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do solo, exercendo



influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem do carbono e nutrientes minerais (DEBOSZ et al., 2002). A maioria das transformações metabólicas do substrato orgânico do solo é catalisada por enzimas, que são componentes da microbiota do solo. A avaliação das enzimas do solo pode indicar um “estado de atividade” biológica do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Frente a isso, diversos trabalhos têm feito uso desses atributos para avaliar o impacto da aplicação de pesticidas, resíduos urbanos e industriais ao solo (TRANNIN et al., 2007; TEJADA et al., 2010; MELO, 2007; LAMBAIS e CAMARGO, 2008; ARAÚJO e MONTEIRO, 2007, FRANCO et al., 2004).

De acordo com Taylor et al. (2002), análises das atividades da arilsulfatase,  $\beta$ -glicosidase, fosfomonoesterase, desidrogenases, urease e fosfatase são requeridas para avaliação do componente biológico do solo (atividade microbiológica do solo e mineralização de substratos) porque são enzimas que catalisam reações envolvidas nas transformações biogeoquímicas de carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S). A hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), que é uma medida específica da atividade de proteases, lipases e esterases (atividade hidrolítica), é um indicador consistente como atividade microbiológica total. Essa atividade hidrolítica pode ser catalisada por bactérias, fungos, algas e protozoários, especialmente na superfície do solo (BARAK e CHET, 1986).

Outro parâmetro importante é a quantificação da biomassa microbiana, a qual constitui um reservatório lábil de matéria orgânica do solo e representa um importante compartimento de armazenamento e ciclagem de nutrientes (GODOI, 2001). A biomassa é definida como o componente microbiano vivo do solo, composta de bactérias, fungos e algas, excluindo-se raízes e animais maiores que 5000  $\mu\text{m}^3$  (WARDLE, 1992; WARDLE e HUNGRIA, 1994; OLIVEIRA et al., 2000). Nesse sentido, o objetivo deste estudo é avaliar o impacto da aplicação ao solo dos subprodutos sólidos da industrialização do xisto sobre características biológicas indicadoras da qualidade do solo.

## **2 HIPÓTESE**

Os subprodutos do xisto podem afetar negativamente os atributos biológicos do solo, provocando decréscimo na atividade enzimática do solo, no carbono da biomassa microbiana e inibir organismos do solo, como oligoquetas, devido à presença de elementos traços e compostos orgânicos recalcitrantes, bem como influir sobre a mineralização do carbono orgânico do solo.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Xisto e subprodutos da sua industrialização

Os principais depósitos de xisto, de maneira geral, situam-se em profundidades menores que 1.000 metros e estão distribuídos em camadas de espessuras variadas com teores de querogênio, também, variados. Geralmente, o conteúdo de matéria orgânica dos depósitos de xisto oscila de 5 a 25%. O xisto da formação Irati, em São Mateus do Sul (PR), possui, em média, 9% de óleo (PETROBRAS, 2011).

As principais reservas de xisto encontram-se espalhadas nos cinco continentes, sendo os países que se destacam em quantidade desse recurso: Canadá, Estônia, China, Rússia, Austrália, Brasil, Estados Unidos, Jordânia, Zaire, Marrocos e Itália. As dimensões dessas reservas abrangem, desde pequenos acúmulos, sem valor econômico algum, até depósitos gigantescos, como o da formação Green River, no oeste dos Estados Unidos, cujas estimativas indicam a existência de 213 bilhões de toneladas de óleo de xisto, ou seja, cerca de 1,5 trilhões de barris (DYNI, 2006).

No Brasil, segundo a Petrobras (2011), as principais áreas com recursos já classificadas como reservas, localizam-se nos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás. Juntas, essas reservas representam 700 milhões de barris de óleo, nove milhões de toneladas de gás liquefeito (GLP), 25 bilhões de metros cúbicos de gás de xisto e 18 milhões de toneladas de enxofre (PETROBRAS, 2011).

Na figura 3.1 é apresentada a localização e distribuição da Formação Irati, a qual é constituída principalmente por folhelhos e carbonatos ricos em matéria orgânica. A espessura média da Formação Irati é de aproximadamente 25 metros, sendo que em muitas localidades não ultrapassa 10 metros, enquanto que em outras localidades pode atingir de 30 a 35 metros (PETROBRAS, 2011). A Formação Irati também representa uma das maiores reservas mundial de folhelho betuminoso (REVISTA PETRO & QUÍMICA, 2004). O xisto, ou folhelho pirobetuminoso, como é conhecido cientificamente, não contém óleo, contudo, quando submetido a temperaturas elevadas, o querogênio, presente no xisto, decompõe-se em óleo, água, gás e um resíduo sólido contendo carbono (SCOUTEN, 1990; PIMENTEL et al., 2010). O querogênio não é solúvel em água e não pode ser extraído por solventes, mas pode ser transformado em óleo e gás quando a rocha é submetida à decomposição química, que

ocorre devido à ação do calor (~500°C), em temperaturas elevadas, na ausência de oxigênio (SCOUTEN, 1990). Esse aquecimento é conhecido por pirólise ou retortagem.

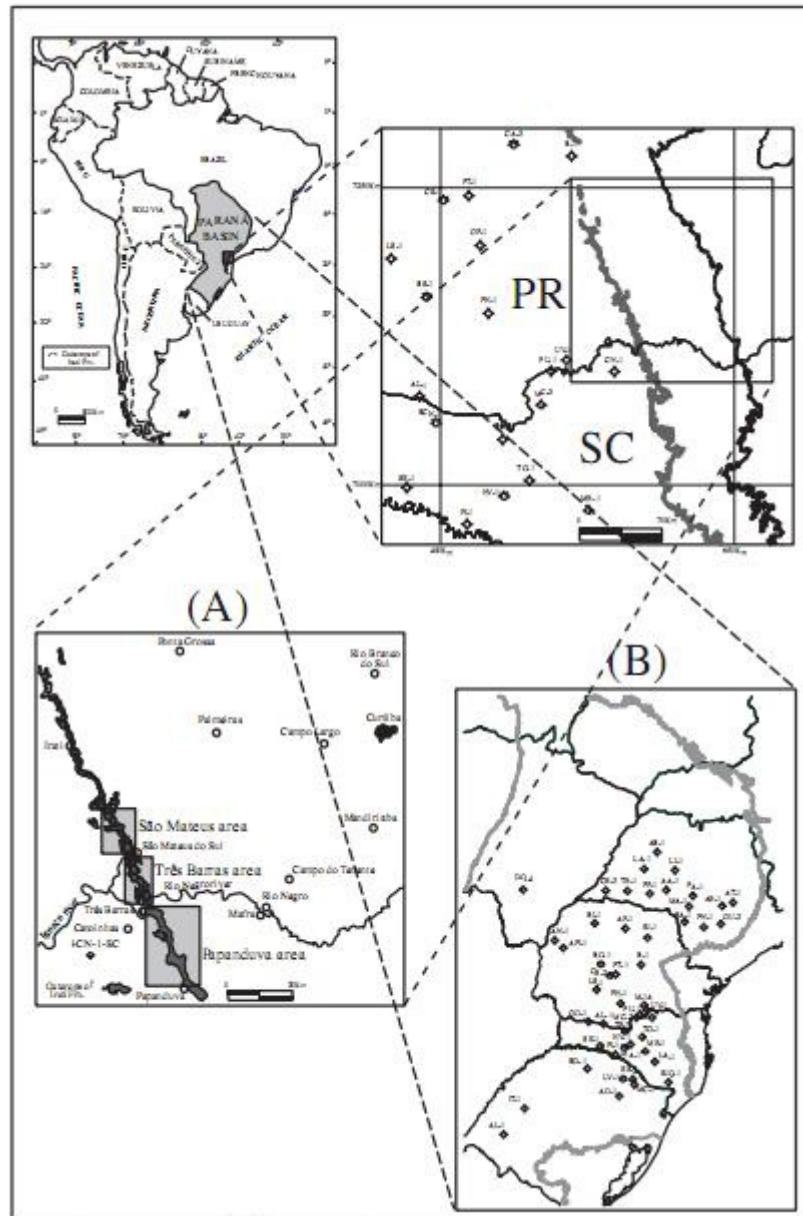


Figura 3.1 – (A) Localização da extração de xisto pela Petrosix e (B) localização da Bacia do Paraná na região sul do Brasil, no membro Assistência da Formação Irati (Araújo et al., 2000).

Atualmente, o Brasil é detentor da tecnologia mais avançada para produção de óleo de xisto, através do processo Petrosix<sup>®</sup>, desenvolvido pela Petrobras – SIX (Industrialização do Xisto), localizada em São Mateus do Sul (PR), sobre a maior reserva brasileira de xisto, a Formação Irati, da qual são extraídas, diariamente, 7.800 toneladas de xisto (PIMENTEL et al., 2010). Em São Mateus do Sul, a Formação Irati é composta por duas camadas de folhelhos pirobotuminosos, com espessura média de 6,5 e 3,2 metros, respectivamente, na primeira e na segunda camadas (Figura 3.2). Atualmente, no complexo industrial de beneficiamento, em São Mateus do Sul, das 7.800 toneladas de xisto processadas por dia, são geradas, diariamente, cerca de 480 t de óleo combustível, 90 t de nafta industrial, 120 t de gás combustível e 75 t de enxofre elementar. Já os subprodutos sólidos da extração do xisto, calcário de xisto (CX), finos de xisto e xisto retornado (XR) atingem um volume diário de 300, 45 e 6.600 toneladas, respectivamente.



Figura 3.2 – Perfil do terreno natural mostrando as diferentes camadas da coluna estratigráfica (Adaptado de Baggio, 2007).

O CX são rochas carbonáticas, originadas de material precipitado por agentes químicos, e fazem parte da Bacia Sedimentar do Paraná - Formação Irati, e se situam, segundo a coluna estratigráfica dessa formação, imediatamente abaixo da primeira camada de xisto (2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> lentes com espessura na ordem de 15 a 20 cm). Essas lentes, na cadeia

produtiva da mineração do xisto, são consideradas estéreis, pois não apresentam teor de óleo adequado ao processamento. Na mina, o xisto é separado do CX através da extração seletiva das lentes que contêm o calcário. Após, a rocha é britada em três moinhos, de acordo com o tamanho dos fragmentos, inicialmente em moinho de mandíbulas, quando o tamanho é maior do que 20 cm; em moinho concêntrico, para tamanho entre 5 e 10 cm, e, finalmente, em moinho de martelo, para tamanho de fragmentos menores do que 2 cm.

Os FX são fragmentos da rocha de xisto, menores do que 1,27 cm, originados em dois estágios dentro da extração e do processamento do xisto: a) na mina, devido à fragmentação do minério através do desmonte do xisto com explosivos e manuseio com escavadeiras e b) no tratamento do xisto através de britagem e empilhamento do xisto antecedendo a produção do óleo. Esse material não é aproveitado para a produção de óleo, gás e demais derivados devido unicamente a sua pequena granulometria, a qual não se enquadra nas necessidades do processo empregado. Após, esse material é britado em moinho de martelo, para tamanho de fragmentos menores do que 0,84 mm. Posteriormente a esse processo de cominuição é realizado o peneiramento do material adequando sua natureza física à legislação para uso na agricultura.

O XR é o subproduto sólido originado após a pirólise da rocha de xisto. Depois da mineração a céu aberto, a rocha é transportada para um britador, reduzindo a fragmentos entre 8 e 12 cm de diâmetro. Logo a seguir, esses fragmentos são levados por uma correia a um reator cilíndrico vertical (retorta), para aquecimento as temperaturas entre 220 e 490°C, liberando a matéria orgânica na forma de óleo e gás. Numa etapa seguinte, a rocha é resfriada, o que resulta na condensação dos vapores de óleo, que, sob a forma de gotículas, são transportados para fora da retorta pelos gases, os quais passam por outro processo de limpeza para a obtenção do óleo leve. O restante é encaminhado para a unidade de tratamento de gases, onde são produzidos gás combustível e gás liquefeito (GLP), e onde é feita a recuperação do enxofre elementar, em um processo patenteado pela Petrobras e denominado Petrosix<sup>®</sup>. A rocha resfriada sai do processo e permanece em uma pilha de armazenamento, de onde é retirada para retornar para a cava de mineração.

Após a obtenção das matérias primas, a granulometria das mesmas é adequada à legislação, especificamente à Instrução Normativa nº 4, de 02 de agosto de 2004, a qual aprova as definições e normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos corretivos de acidez, de alcalinidade, corretivos de sodicidade e dos condicionadores de solo, destinados à agricultura. Tal instrução, em relação à natureza

física, determina que 100% do material deve passar em peneira de 2,0 mm (ABNT n° 10), 70% em peneira de 0,84 mm (ABNT n° 20) e 50% na peneira de 0,3 mm (ABNT n° 50).

### 3.1.1 Características dos subprodutos sólidos do xisto

O xisto da formação Irati é constituído, principalmente, por folhelhos e carbonatos ricos em matéria orgânica (REVISTA PETRO & QUÍMICA, 2004).

Na figura 3.3 é apresentada a composição mineralógica dos subprodutos sólidos do xisto, de coletas na superfície e interior da pilha de armazenamento do xisto retornado.

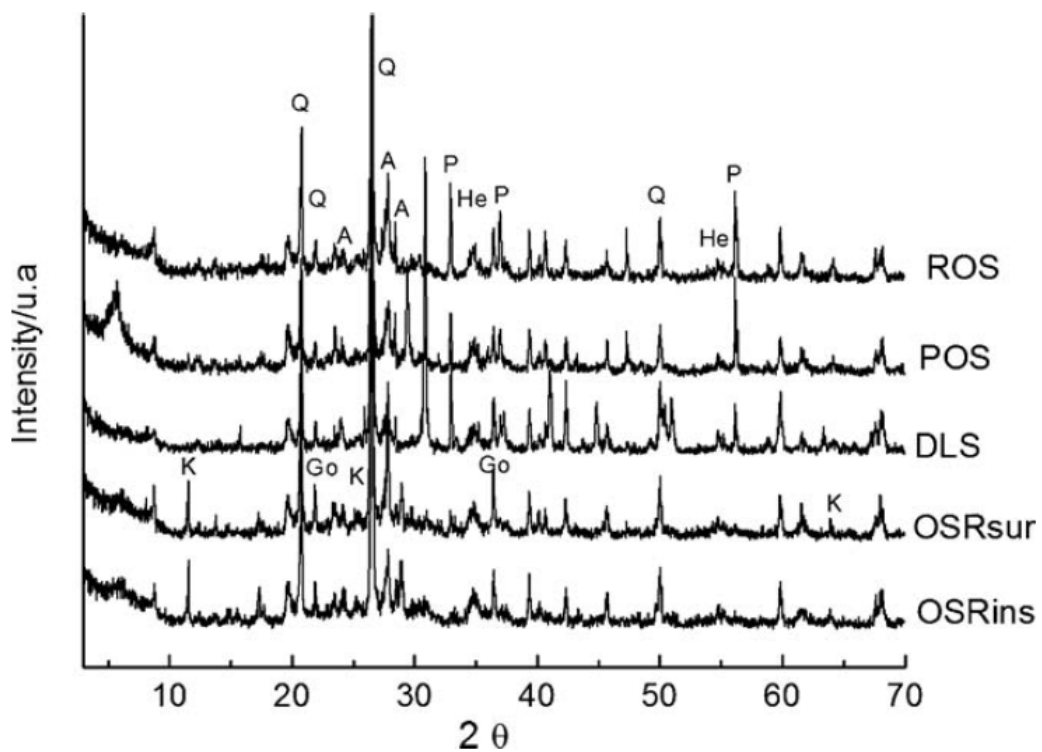


Figura 3.3 – Difratoogramas de raios-X da rocha de xisto (ROS), finos de xisto (POS), calcário de xisto (DLS), xisto retornado coletado na superfície da pilha de armazenamento (OSRsur), xisto retornado coletado no interior da pilha de armazenamento (OSRins). Minerais identificados: quartzo (Q); pirita (P); goetita (Go); hematita (He); albita (A); caolinita (k) (Nicolini et al., 2010).

Os subprodutos do xisto são bons exemplos dos diferentes estágios de intemperismo no solo. O quartzo (Q), por exemplo, é um mineral de estágio médio de intemperismo, e picos apresentando quartzo são comuns em todos os subprodutos. Em amostras não retortadas, rocha de xisto (ROS), finos de xisto (POS) e calcário de xisto (DLS) apresentam picos de pirita (P) ( $\text{FeS}_2$ ), um mineral de estágio inicial de intemperismo que, praticamente, desaparece em amostras após a pirólise (OSRsur, ORSins). Isso pode ser explicado pela reação de oxidação química da pirita por ácido sulfúrico a goetita (Go) ( $\text{FeOOH}$ ). O mesmo processo ocorre na formação da caolinita (K), presente no xisto pirolisado (OSRsur, ORSins), a partir da albita (A) ( $\text{KAlSi}_3\text{O}_8$ ), encontrada apenas nos subprodutos não retortados (NICOLINI et al., 2010).

Conforme Pimentel et al. (2010), a matriz do xisto é composta, principalmente, por silício (na forma de óxidos), matéria orgânica, ferro e alumínio (na forma de óxidos) (Tabela 3.1), a composição química do XR é formada, na sua maioria, por óxidos ácidos, básicos e anfóteros, os quais garantem na superfície dos grãos a presença de grupos ativos. Além disso, o XR apresenta aluminossilicatos (argilominerais) como principais constituintes.

Tabela 3.1 – Composição química do xisto retortado (Pimentel et al., 2010).

Óxido	Composição (%)
$\text{SiO}_2$	40,468
$\text{Al}_2\text{O}_3$	27,780
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	10,868
CaO	10,804
$\text{K}_2\text{O}$	6,754
$\text{FeS}_2$	6,320
$\text{TiO}_2$	1,789
MnO	0,326
$\text{V}_2\text{O}_5$	0,310
SrO	0,145
CuO	0,118
ZnO	0,108
$\text{ZrO}_2$	0,105
NiO	0,104
Total	100,000



Esses minerais, além dos característicos sítios de troca iônica, possuem os grupos superficiais aluminol ( $\equiv\text{Al-OH}$ ) e silanol ( $\equiv\text{Si-OH}$ ). Os mesmos autores verificaram que o XR apresenta em sua composição argilominerais de camada dupla (2:1), como ilita e montmorilonita.

Em estudo para aproveitamento do XR na formação de zeólitas, Miotto e Machado (2006) constataram que o xisto retornado apresenta grande predominância de mesoporos (poros com diâmetro entre 0,1 a 0,05  $\mu\text{m}$ ) (92%), com área superficial externa muito superior à área microporosa (poros com diâmetro inferior a 0,05  $\mu\text{m}$ ). A seguir, na Tabela 3.2, são apresentados dados das propriedades físicas do xisto retornado.

Tabela 3.2 – Propriedades físicas do xisto retornado (Pimentel et al., 2006).

Propriedades	Valores
Densidade aparente ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	0,972
Densidade real ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	1,139
Área Superficial específica ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	65,08
Volume total de Poro ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	0,058
Diâmetro médio do Poro ( $\text{Å}$ )	35,92
Diâmetro médio de partícula ( $\mu\text{m}$ )	17,56
Distribuição de partícula (%)	
1,5 $\mu\text{m}$	10,00*
13,25 $\mu\text{m}$	50,00*
40,91 $\mu\text{m}$	90,00*

\*Valores acumulativos em percentual

### 3.1.2 Uso agrícola dos subprodutos sólidos da industrialização do xisto

O Brasil, embora seja um dos principais produtores de alimentos agrícolas, é um país que se caracteriza por apresentar alta dependência externa por insumos usados na fabricação de fertilizantes. No caso de fertilizantes potássicos, 90% da matéria prima usada na fabricação desses fertilizantes são importadas de outros países. O aproveitamento de subprodutos na

agricultura como fonte de nutrientes é uma prática crescente e que pode contribuir para diminuir a dependência externa do Brasil por fertilizantes.

O uso dos subprodutos da industrialização do xisto na agricultura é recente e são escassas as informações sobre o efeito dessa prática na produção agrícola. Na cultura da aveia-preta (*Avena strigosa* S.), Anjos e Reissman (1996) estudaram o efeito da aplicação de XR e FX em Latossolo Vermelho escuro álico, sobre o crescimento e a composição química da fitomassa e altura média das plantas de aveia preta. Os autores verificaram que o uso de FX macerado contribui para um maior crescimento e produção de massa seca de plantas de aveia. Em dois experimentos, Pereira e Vitti (2004) avaliaram o efeito da adição de diferentes doses de XR (0, 3, 6, 9, 12 Mg ha<sup>-1</sup>) em Argissolo Vermelho-Amarelo Eutrófico sobre as características químicas do solo e a nutrição do tomateiro. Os resultados obtidos indicaram que a adição de XR promoveu um aumento significativo nos teores de enxofre e silício no solo e nas folhas de tomateiro. Os autores não detectaram alterações no valor de pH nem nos teores de cátions trocáveis, mas observaram que houve um aumento na disponibilidade de fósforo no solo.

Os subprodutos sólidos da industrialização do xisto, por apresentarem altos teores de Si, são considerados importantes fontes desse elemento para as plantas. Pereira et al. (2003) trabalharam com diferentes fontes de Si, dentre elas o XR, em uma dose de 6 Mg ha<sup>-1</sup>. Os experimentos foram conduzidos com a cultura do tomateiro em Argissolo Vermelho-Amarelo eutrófico abruptico. Dentre os materiais testados, o XR apresentou maior concentração de Si, porém de menor solubilidade. A aplicação do XR resultou em aumentos significativos de S no solo, sem causar aumento no pH, possivelmente devido à baixa reatividade do Si e à liberação de S. O S do XR encontra-se principalmente na forma elementar e de sulfeto, no solo esses compostos formam sulfato (SO<sub>4</sub>), podendo baixar o pH, conforme demonstrado por Mello et al. (1989). Nos experimentos realizados por Pereira et al. (2003), não foi verificada redução na produtividade do tomateiro em função da adição de XR ao solo.

Os elementos contidos nas rochas, potencialmente prejudiciais e a sua dinâmica no sistema solo/planta, carecem de melhor caracterização. O efeito danoso desses elementos químicos indesejáveis depende, basicamente, da quantidade acumulada e das formas químicas em que se apresentam no solo (MARTINS et al., 2008). Para estudar esse aspecto, Gonçalves et al. (2004) conduziram um estudo para avaliar o efeito de até 20 Mg ha<sup>-1</sup> de XR e FX na disponibilidade de metais pesados no solo (Cambissolo álico) e plantas de feijoeiro, em casa de vegetação. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que os tratamentos não influenciaram os teores de metais pesados no solo, na raiz e na parte aérea do feijoeiro. Já

Anjos e Reissman (1996) verificaram que a aplicação de FX resultou em teores de Cr considerados tóxicos às plantas de aveia. Possivelmente, esse resultado se deva à elevada dose de FX usada por esses autores, já que as plantas de aveia foram cultivadas em uma mistura de solo e FX na relação 1:1.

Os pós de rochas apresentam em sua composição minerais de baixa solubilidade, o que possibilita a liberação lenta e gradual de nutrientes para o solo (AMPARO, 2003; SILVA et al., 2008). Fontes de nutrientes com essas características são importantes para sistemas com culturas perenes como na fruticultura. Pereira (2008) avaliou, em Latossolo Vermelho Distrófico típico, o efeito de sete diferentes adubações de pré-plantio compostas com XR e CX sobre as cultivares Tupy e Xavante de amoreira preta. As formulações consistiram de combinações de cama de aviário (CA), termofosfato (TMF), XR (até 2,0 Mg ha<sup>-1</sup>), CX (até 4,0 Mg ha<sup>-1</sup>). O tratamento contendo 2,0 Mg ha<sup>-1</sup> de CA + 1,2 Mg ha<sup>-1</sup> TMF + 4,0 Mg ha<sup>-1</sup> de CX + 2,0 Mg ha<sup>-1</sup> de XR e o tratamento contendo a recomendação de adubação em NPK apresentaram as maiores concentrações de fósforo e potássio no solo, respectivamente. Entretanto, as diferentes adubações de pré-plantio não influenciaram significativamente as variáveis respostas estudadas.

Em estudo realizado pela Embrapa Clima Temperado (XISTO AGRÍCOLA, 2008) foi avaliado o efeito imediato e residual da aplicação da matriz fertilizante a base de xisto, MBR1 (XR e FX na proporção de 50%, sendo a granulometria 100% entre 0,30 e 0,84mm), combinada com a redução das adubações fosfatada e potássica em sistema de rotação de culturas com milho e soja. A combinação da adubação reduzida, tendo como fonte de fósforo o FNA (Fosfato Natural de Arad) e MBR1, proporcionou IEA (índice de eficiência agrônômica) superior ao tratamento padrão (adubação corretiva integral) no residual de um e dois anos. Em outro estudo (XISTO AGRÍCOLA, 2009a), foi considerado o efeito imediato da aplicação da MBR7 (50% XR + 20% FX + 20% Calcário de xisto + 10% SBR - Enxofre elementar - com granulometria 100% entre 0,3 e 0,85 mm), combinada com FNA sobre a produtividade de grãos de trigo Cv. BRS Guamirim. Os resultados obtidos indicaram que a combinação de fosfato natural com a MBR7 proporcionou aumento na produtividade de grãos, comparado ao tratamento testemunha, sem uma fonte de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, FNA ou SFT - Super Fosfato Triplo), e não diferiu da testemunha referência com SFT.

Subprodutos podem ser considerados fontes de nutrientes às plantas, desde que a sua aplicação ao solo não cause impacto à qualidade do solo. Rodrigues et al. (2010) avaliaram a atividade das enzimas arilsulfatase e fosfatase ácida sob condições de adição de diferentes doses e fontes de pós de rocha, Basalto, Whitmarsum, MB4, XR, FX e Cal Xisto, na presença

ou não de esterco bovino. O experimento foi realizado em casa de vegetação, com Latossolo Vermelho distrófico, onde foram realizados dois cultivos subsequentes de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e crotalária (*Spectabilis roth*) no mesmo vaso que recebeu doses dos pós de rochas que atingiram até 25 Mg ha<sup>-1</sup>. Foi verificado que na presença de esterco a adição de FX e XR decresceu a atividade da arilsulfatase, assim como as demais rochas, exceto o basalto. Enquanto que a fosfatase ácida teve sua atividade diminuída pelo XR na ausência de esterco e estimulada pelo FX na presença de esterco. Possivelmente, ocorreu um aumento do produto da reação da arilsulfatase (SO<sup>-4</sup>), havendo efeito supressor na atividade desta enzima (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), uma vez que o XR promove um aumento no SO<sup>-4</sup> no solo (PEREIRA e VITTI, 2004).

Os impactos ambientais negativos e o alto custo gerado pelos fertilizantes sintéticos podem tornar inviável a atividade agrícola devido aos altos custos ambientais e econômicos (STARK e REDENTE, 1990). Nesse sentido, o XR, FX e CX por apresentarem baixo teor de metais pesados (XISTO AGRÍCOLA, 2006) e de modo geral, efeito positivo sobre as culturas estudadas, representam a viabilização de métodos alternativos para a fertilização dos solos. No entanto, existem ainda poucos trabalhos sobre esta temática e se faz necessária a intensificação desses estudos.

### **3.2 Bioindicadores de Qualidade do Solo**

Os efeitos de práticas agrícolas sobre a qualidade do solo, normalmente, são avaliados através de indicadores da qualidade do solo, os quais podem ser atributos físicos, químicos e biológicos do solo (DORAN e ZEISS, 2000). A capacidade de responder rapidamente a mudanças no ambiente do solo derivadas das alterações no manejo aponta os atributos biológicos como importantes indicadores de qualidade do solo (KENNEDY e PAPENDICK, 1995). Os atributos microbiológicos têm sido amplamente discutidos na literatura como indicadores de qualidade (CARTER, 1986; SPARLING, 1992; ANGERS et al., 1993; KENNEDY e PAPENDICK, 1995; TRINDADE et al., 2000; TÓTOLA e CHAER, 2002; MATSUOKA et al., 2003; COSTA et al., 2006; FRANCHINI et al., 2007, ARAÚJO e MONTEIRO, 2007; MENDES et al, 2009; MELO, 2007).

Várias agências reguladoras internacionais têm discutido os padrões a serem utilizados nas avaliações de qualidade do solo. A título de exemplo, o Comitê Técnico Internacional ISO

190, Qualidade do Solo, propôs uma lista de 35 parâmetros (químicos, físicos e biológicos) como indicadores de qualidade do solo; o *US Environmental Protection Agency* (EPA) propôs uma lista de 1.800 parâmetros como indicadores de qualidade química do solo; enquanto na *Organization of Economic Cooperation and Development* (OECD), estão sendo definidos diversos indicadores agroambientais, aproximadamente 250, dos quais 58 relacionados à qualidade do solo (BURNS et al., 2006).

A utilização de todos os indicadores microbiológicos disponíveis num programa de monitoramento seria inviável. Ao invés disso, um “*minimum data set* (MDS)” ou número mínimo de indicadores deve ser determinado. Os critérios para a seleção de indicadores relacionam-se, principalmente, com sua utilidade em definir processos do ecossistema. Na Tabela 3.3 estão apresentados os indicadores biológicos mais comumente utilizados no monitoramento da qualidade dos solos da comunidade européia.

Tabela 3.3 - Número mínimo de indicadores utilizados nos programas de monitoramento de qualidade do solo da comunidade européia.

Programa de Monitoramento	Número mínimo de indicadores
Alemanha	Respiração do solo Biomassa microbiana Quociente Metabólico
República Tcheca	Biomassa microbiana Respiração do solo Enzimas de solo
Reino Unido	Biomassa microbiana Respiração do solo <i>Rhizobium</i>
Áustria	Biomassa microbiana Enzimas de solo Nitrificação
Outros países	Respiração do solo Decomposição da matéria orgânica Enzimas de solo

Fonte: International Co-operative Programme on Integrated Monitoring (Adaptado de Araújo & Monteiro, 2007).

A biomassa microbiana é definida como o componente microbiano vivo do solo, composta de bactérias, fungos e algas, excluindo-se raízes e animais maiores que 5000  $\mu\text{m}^3$  (WARDLE, 1992; WARDLE e HUNGRIA, 1994; OLIVEIRA et al., 2000). Constitui um reservatório lábil de matéria orgânica do solo e representa um importante compartimento de armazenamento e ciclagem de nutrientes (GODOI, 2001). Por ser sensível às práticas de manejo do solo, a biomassa microbiana pode ser considerada um bom indicador de distúrbios provocados, por exemplo, pela adição ao solo de subprodutos de origem industrial ou agrícola.

Em função das baixas concentrações das enzimas no solo, a sua quantificação é feita de maneira indireta, através da medida de sua atividade, e não pela sua quantidade. Geralmente, a atividade é medida através da quebra de um substrato específico para cada enzima a ser avaliada, em condições padronizadas de pH e temperatura (TABATABAI, 1994).

As enzimas de solo participam como catalisadores de várias reações que resultam na decomposição de resíduos orgânicos (ligninases, celulasas, proteases, glucosidases, galactosidases), ciclagem de nutrientes (fosfatases, amidases, sulfatases), formação da matéria orgânica e da estrutura do solo (MENDES e VIVALDI, 2001). Nesse sentido, a atividade metabólica do solo sofre uma forte influência da presença de raízes e materiais orgânicos em decomposição (GRAYSTON e JONES, 1996). De acordo com Dick (1994), a atividade enzimática de um solo é o resultado do somatório da atividade enzimática dos organismos vivos (microorganismos, animais e plantas) e das enzimas associadas à fração não viva (enzimas abiônicas) que se acumulam no solo, protegidas da ação das proteases através da adsorção em partículas de argila e na matéria orgânica. A avaliação da atividade enzimática do solo pode ser uma importante ferramenta na avaliação de práticas agrícolas sobre a qualidade do solo.

A avaliação dos indicadores de qualidade do solo e sua efetiva identificação são complicadas pela multiplicidade dos fatores físicos, químicos e biológicos que controlam os processos biogeoquímicos e suas variações no tempo, espaço e intensidade (DORAN e PARKIN, 1994). Dessa maneira, técnicas estatísticas têm sido aplicadas para identificar e quantificar os indicadores que causam influência significativa sobre os resultados dos experimentos. A estatística multivariada é uma técnica cada vez mais popular usada para analisar conjuntos complexos de dados (TABACHNICK e FIDELL, 2007).

### 3.2.1 Avaliação do impacto do uso de subprodutos em solo agrícola

Biondicadores de qualidade do solo como: atividade enzimática, carbono da biomassa e respiração têm sido usados para avaliar o impacto de resíduos no solo, como lodo de esgoto e resíduos urbanos (GARCÍA-GIL et al., 2000; PUGLISI et al., 2006; MELO, 2007; TRANNIN et al., 2007; TEJADA, 2009; TEJADA et al., 2010; LAMBAIS e CAMARGO, 2008; SOUZA et al., 2009), escória de siderurgia (VIDAL, 2008), cinzas (PATI e SAHU, 2004; PICHTEL e HAYES, 1990), dejetos animais (ROCHA, 2009; ZHAO et al., 2009), bem como contaminação por hidrocarbonetos (FRANCO et al., 2004; TRASAR-CEPEDA et al., 2000; LABUD et al., 2007), metais pesados (MIKANOVA, 2006; HINOJOSA et al., 2004) e aplicação de rochas ao solo (SILVA et al., 2008, AMPARO, 2003, RODRIGUES et al., 2010).

A adição de fertilizantes orgânicos e inorgânicos ao solo pode afetar suas características qualitativas, e tais modificações podem ser avaliadas através das análises da atividade enzimática do solo (BOLTON et al., 1985; VERSTRAETE e VOETS, 1977; MARTENS et al., 1992). Martens et al. (1992) conduziram um estudo com adições repetidas de diferentes resíduos orgânicos. A atividade de 10 enzimas (fosfatase ácida e alcalina, arilsulfatase, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase, invertase, desidrogenase, amidase e urease) foi analisada em um solo que recebeu  $100 \text{ Mg ha}^{-1}$  ( $25 \text{ Mg ha}^{-1} \times 4$  adições) de esterco de galinha, lodo de esgoto, palha de cevada e alfafa, em um período de 31 meses. A atividade enzimática aumentou em média duas a quatro vezes pela incorporação dos quatro adubos ao solo, comparado com o solo não adubado. Esse aumento da atividade enzimática nos solos deve estar relacionado ao aporte de material orgânico ao solo que estimula a atividade biológica pelo aumento da disponibilidade de C e energia.

A aplicação de lodo de esgoto e biossólidos em solos agrícolas é uma prática cada vez mais comum, a qual busca promover a ciclagem de nutrientes. García-Gil et al. (2000) observaram que a aplicação de  $80 \text{ t ha}^{-1}$  de lodo compostado em solo arenoso durante nove anos aumentou em 46 % o C da biomassa e em mais de 100 % a atividade da  $\beta$ -glicosidase, porém reduziu em 62 % a atividade da fosfatase ácida, devido ao aumento de P solúvel, e em 28 % a atividade da urease, em razão dos altos teores de metais pesados e de  $\text{N-NH}^{4+}$  daquele resíduo. A aplicação de biossólidos pode melhorar a qualidade do solo, devido ao incremento de matéria orgânica e à ativação de processos biológicos e bioquímicos; contudo, a presença de metais pesados e de outros potenciais poluentes pode inibir processos bioquímicos essenciais à mineralização da fração orgânica, limitando o uso agrícola desses resíduos

(GARCÍA-GIL et al., 2000). Deboz et al. (2002) verificaram que os efeitos da aplicação de 4,2 Mg ha<sup>-1</sup> de biossólido municipal sobre C e N da biomassa, respiração, qCO<sub>2</sub>, hidrólise da FDA e atividade da β-glicosidase foram transientes. Esses estudos mostram que a utilização agrícola de biossólidos pode ter efeitos diversos sobre importantes características biológicas do solo, como a biomassa microbiana e a atividade enzimática, que respondem às mudanças de uso e práticas de manejo em curto espaço de tempo e fornecem informação segura e consistente sobre a qualidade do solo (GARCÍA-GIL et al., 2000).

Ao aplicar biossólido da indústria de celulose, Gagnon et al. (2000) verificaram aumento linear na atividade da fosfatase ácida em resposta às doses de 8 a 65 Mg ha<sup>-1</sup> do biossólido aplicados a um solo orgânico, utilizado para horticultura, mesmo após três anos da aplicação. Chantigny et al. (2000) constataram que a aplicação de 50 M ha<sup>-1</sup> de biossólido da indústria de celulose, a um solo argiloso, aumentou em 100 % o C da biomassa e em 40 % a hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), que manteve atividade superior à do controle três anos após a aplicação.

Atualmente, existe grande preocupação em relação à contaminação do solo pela aplicação de subprodutos contaminados com metais pesados. Estudos mostraram que a adição de metais pesados influencia a biomassa e a atividade microbiana, agindo negativamente sobre a microbiota do solo (BERTON et al., 2006; CHANDER e BROOKES, 1991; CHANDER e JOERGENSEN, 2001). Em estudo realizado para investigar o efeito da aplicação de dois metais pesados (Cu e Zn), em duas concentrações (200 a 2000 µg g<sup>-1</sup> solo) e em dois tipos de solo sobre a comunidade microbiana do solo e atividade de três enzimas do solo (urease, redutase do nitrato e amidase), Hemida et al. (1997) observaram que a adição dos metais geralmente causou redução na comunidade de microorganismos e atividade das enzimas de solo, afetando a ciclagem de nutrientes no solo. Tyler (1974) avaliou a atividade de enzimas e da respiração basal em solo contaminado com Cu e Zn, e observou que houve diminuição acentuada na respiração e na atividade das enzimas urease e fosfatase ácida com aumento das concentrações de Cu e Zn, e uma diminuição menos expressiva na atividade da β-glicosidase. Em estudo realizado por Berton et al. (2006), os resultados indicaram que tanto o carbono da biomassa quanto à respiração do solo foram afetados pelo aumento na concentração de Ni. A diminuição da biomassa microbiana e da respiração do solo nos tratamentos com altas concentrações de Ni, (47 e 210 mg kg<sup>-1</sup>) foi acompanhada de um aumento no quociente metabólico, o qual foi considerado um indicador adequado do grau de estresse causado pelo Ni sobre a comunidade microbiana do solo.



O estudo de materiais alternativos ao aporte de nutrientes ao solo tem contemplado também o uso de escória de siderurgia e rochas. Nesse sentido, Vidal (2008) observou que, apesar da presença de metais pesados nas escórias, os micronutrientes favoreceram, de maneira geral, a atividade microbiana do solo, em experimento com a cultura do arroz, e concluiu que, provavelmente, houve maior disponibilidade de nutrientes como S, P e N. Entretanto, Silva et al. (2008) verificaram efeitos incipientes com a rochagem (basalto) em área de recuperação até 165 dias da aplicação. Isto se deve à prática da rochagem (aplicação de rochas ao solo) não apresentar efeitos imediatos na atividade enzimática do solo (RODRIGUES et al., 2010), possivelmente por não apresentar fração orgânica decomponível (substrato enzimático).

Os parâmetros microbiológicos (enzimas de solo, CBM e respiração do solo), de modo geral, têm melhorado com a adição de subprodutos ao solo. Os resultados favoráveis da aplicação de subprodutos sobre características biológicas indicadoras de qualidade do solo se devem ao elevado teor de matéria orgânica, no caso dos biossólidos e resíduos orgânicos, e de nutrientes, bem como ao baixo teor de metais pesados desses resíduos.

### **3.3 Ensaio ecotoxicológicos**

Ensaio ecotoxicológicos são utilizados para verificar a toxicidade de substâncias aos seres vivos de um ecossistema. Esses podem indicar uma resposta mais precisa da toxicidade dos possíveis contaminantes, presentes nos subprodutos aplicados ao solo. Um dos métodos mais empregados para a avaliação dos efeitos adversos de agentes químicos sobre a biota terrestre e aquática são os testes de toxicidade, onde são utilizados organismos alvo terrestres, de águas continentais, estuarinas e marinhas que ficam expostos aos contaminantes sob condições controladas (CETESB, 2005). Tais estudos possibilitam o estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas e a avaliação dos impactos de poluentes para organismos do solo e aos corpos receptores (RÖMBKE et al., 2006). Alguns ensaios servem para avaliar a qualidade do solo, pelo comportamento de organismos como a minhoca, testada por repelência a determinadas substâncias químicas.

Proposto como uma alternativa rápida e fácil para ensaios ecotoxicológicos, o teste de fuga é considerado um teste de maior sensibilidade do que testes agudos e, muitas vezes, do que testes crônicos - teste de reprodução (GARCIA et al., 2008). Testes de toxicidade aguda e

de efeito comportamental (fuga) têm sido utilizados para avaliar a toxicidade de metais pesados e agrotóxicos, e os efeitos se manifestam dentro de períodos curtos (horas ou dias) de exposição dos organismos a um contaminante nocivo (RODRIGUES e PAWLOWSKY, 2007).

A toxicidade de um composto químico depende do tempo de exposição, da suscetibilidade do organismo, concentração, características químicas do agente e de fatores ambientais (ABNT, 2004). A resposta da toxicidade a diferentes substâncias varia entre regiões temperadas e tropicais, pela sensibilidade dos organismos-teste variarem em cada região (LAABS et al., 2002; GARCIA, 2004). Contudo, dados sobre os efeitos de pesticidas, resíduos industriais e domiciliares em solos tropicais, utilizando invertebrados como bioindicadores são, de maneira geral, escassos (HELLING et al., 2000).

As minhocas têm sido utilizadas como excelentes indicadoras da qualidade e saúde dos solos, visto que, frequentemente, são estudadas em solos degradados, perturbados (LAVELLE et al., 1987), contaminados com mercúrio (CARVALHO FILHO et al., 2005; RAMOS et al., 2006), agrotóxicos (RIBERA et al., 2001; ANDREA et al., 2004) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - PAHs (SISINNO et al., 2006). O uso do teste de fuga com minhocas parece ser uma importante estratégia na avaliação dos possíveis impactos da aplicação dos subprodutos da industrialização do xisto sobre a atividade biológica do solo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Experimentos sob condições controladas de laboratório

O estudo de laboratório foi desenvolvido no período de janeiro a novembro de 2010. Os subprodutos xisto retornado (XR), finos de xisto (FX) e calcário de xisto (CX) foram provenientes da Petrobras-SIX (Industrialização do Xisto), em São Mateus do Sul, PR. A coleta desses materiais foi realizada em outubro de 2008. Após a coleta, os materiais foram moídos e armazenados em sacos de rafia com capacidade para 50 kg, mantidos em local seco, ao abrigo do sol e da chuva. O XR, FX e CX apresentavam granulometria  $<0,3$  mm e características químicas conforme resultados apresentados na tabela 4.1.

O solo utilizado nos experimentos foi um Argissolo Vermelho distrófico arênico, coletado da camada 0-10 cm. Após a coleta, o solo foi homogeneizado e peneirado com peneira de 2 mm. Nos experimentos realizados para avaliar a atividade e o carbono da biomassa microbiana e a atividade enzimática, o solo utilizado foi coletado em uma área que estava sendo manejada sob plantio direto, enquanto que no experimento de ecotoxicidade o solo era oriundo de uma área sob campo nativo.

A atividade microbiana foi avaliada em dois experimentos (1 e 2), o primeiro com duração de 60 dias e o segundo com 90 dias. No experimento 1, os tratamentos avaliados foram: Solo +  $750 \text{ kg ha}^{-1}$  de XR (XR750); Solo +  $1500 \text{ kg ha}^{-1}$  de XR (XR1500); Solo +  $3000 \text{ kg ha}^{-1}$  de XR (XR3000); Solo +  $750 \text{ kg ha}^{-1}$  de FX (FX750); Solo +  $1500 \text{ kg ha}^{-1}$  de FX (FX1500); Solo +  $3000 \text{ kg ha}^{-1}$  de FX (FX3000); Solo +  $750 \text{ kg ha}^{-1}$  de CX (CX750); Solo +  $1500 \text{ kg ha}^{-1}$  de CX (CX1500); Solo +  $3000 \text{ kg ha}^{-1}$  de CX (CX3000); e Solo (S0). No experimento 2, foram avaliados os tratamentos com XR do experimento 1, sendo incluídos outros três tratamentos com XR: Solo +  $300 \text{ kg ha}^{-1}$  de XR (XR300); Solo +  $450 \text{ kg ha}^{-1}$  de XR (XR450); e Solo +  $600 \text{ kg ha}^{-1}$  de XR (XR600). O delineamento experimental utilizado nos dois experimentos foi o inteiramente casualizado com três repetições. Cada unidade experimental foi montada separadamente. Em recipientes cilíndricos de acrílico foram colocados 114,4g de solo úmido (100g solo seco a  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), cuja umidade foi elevada à capacidade de campo.

Tabela 4.1 - Caracterização química dos subprodutos sólidos de xisto, coletados na Superintendência da Industrialização do Xisto, em São Mateus do Sul, PR, incubados com solo – CMP: concentração máxima permitida para metais pesados em condicionadores de solo.

<b>Parâmetro</b> <sup>(1)</sup>	<b>Xisto retornado</b>	<b>Finos de xisto</b>	<b>Calcário de xisto</b>	<b>CMP</b> <sup>(3)</sup>
% sólidos (%p/p)	96,2	94,4	97,3	-
Cianeto (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,2	<0,2	<0,2	-
Nitrogênio Total (mg kg <sup>-1</sup> )	152	351	142	-
C <sup>(2)</sup> (%p/p)	6,16	10,03	9,3	-
Fósforo (mg kg <sup>-1</sup> )	1547	1310	1259	-
Potássio (mg kg <sup>-1</sup> )	2746	1502	1849	-
Cálcio (mg kg <sup>-1</sup> )	11325	14531	34000	-
Enxofre (% p/p)	0,84	0,64	0,85	-
Magnésio (mg kg <sup>-1</sup> )	2146	2258	3387	-
Boro (mg kg <sup>-1</sup> )	76	49	46	-
Zinco (mg kg <sup>-1</sup> )	112	64	41	-
Manganês (mg kg <sup>-1</sup> )	233	404	776	-
Molibdênio (mg kg <sup>-1</sup> )	7,1	2,1	4,5	-
Cobalto (mg kg <sup>-1</sup> )	14	8,5	9,1	-
Sódio (mg kg <sup>-1</sup> )	1675	1792	2421	-
Cloreto (mg kg <sup>-1</sup> )	359	<53	441	-
Níquel (mg kg <sup>-1</sup> )	18	11	11	175
Cobre (mg kg <sup>-1</sup> )	69	42	46	-
Ferro (mg kg <sup>-1</sup> )	12934	11504	9539	-
Sílica + Insolúveis (%p/p)	71,8	67,3	55,9	-
Arsênio (mg kg <sup>-1</sup> )	6,8	4,9	<0,4	20
Selênio (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,4	1,1	1,5	80
Mercúrio (mg kg <sup>-1</sup> )	0,19	0,3	0,24	2,5
Cromo (mg kg <sup>-1</sup> )	7,7	4,2	11	500
Chumbo (mg kg <sup>-1</sup> )	22	15	15	300
Cádmio (mg kg <sup>-1</sup> )	<0,042	<0,043	<0,042	8

<sup>(1)</sup> Determinado pela Bioagri Ambiental. <sup>(2)</sup> Determinado no Laboratório de Microbiologia do Solo e Ambiente – UFSM. <sup>(3)</sup> Concentração máxima permitida. Portaria do MAPA n° 402 (BRASIL, 2010).

A mistura do solo úmido com os subprodutos foi realizada manualmente com auxílio de espátula e em seguida foi compactada até a densidade de 1,2 g cm<sup>3</sup>. Nos dois

experimentos, as unidades experimentais foram acondicionadas individualmente em frascos de vidro com capacidade de 800 mL. Três unidades foram utilizadas como prova em branco, nas quais se colocou somente NaOH, para captar o CO<sub>2</sub> presente na atmosfera interior ao frasco.

A avaliação da emissão de CO<sub>2</sub>, durante a incubação, foi realizada sempre nas mesmas unidades experimentais. Em cada frasco de vidro foi colocado um recipiente com volume de 2,5 mL de água para manter as condições de umidade no interior do frasco, a fim de diminuir a perda de água do solo. Para evitar a deficiência de O<sub>2</sub>, os frascos de vidro foram periodicamente abertos para promover a renovação da atmosfera interna. Os tratamentos permaneceram em incubadora na ausência de luz e com temperatura controlada a 28°C ± 2°C. O CO<sub>2</sub> liberado em cada tratamento foi captado em 10 mL de uma solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, cujo excesso foi titulado com uma solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup> (STOTZKY, 1965).

O carbono da biomassa microbiana (CBM) e a atividade enzimática no solo foram avaliados aos 15, 30 e 60 dias após a incubação dos tratamentos do experimento 1 da atividade microbiana. Para isso, foram montadas 36 unidades experimentais, as quais foram acondicionadas em potes de vidro em grupo de três. O procedimento adotado na montagem das unidades experimentais foi o mesmo descrito anteriormente. Em cada data de avaliação foram analisadas 12 unidades experimentais. Os tratamentos permaneceram em incubadora na ausência de luz e com temperatura controlada a 28°C ± 2°C.

O CBM foi avaliado pelo método da fumigação-extração conforme Silva et al. (2007), com aplicação do fator *K<sub>c</sub>* de 0.33 (SPARLING e WEST, 1988). Com base nos valores de CBM e da emissão de CO<sub>2</sub>, medidos até os 15 e 30 dias do experimento 1 da avaliação da atividade microbiana, foi determinado o quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>). O valor do qCO<sub>2</sub> representa a razão entre o C-CO<sub>2</sub> e o C da biomassa medido no período considerado (ANDERSON e DOMSCH, 1993).

A atividade enzimática do solo foi avaliada através da medida de seis enzimas: a atividade da desidrogenase (DHA) determinada conforme descrito em Thalmann (1968), a atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) segundo Alef (1995), a atividade da fosfatase ácida, da β-glicosidase, da urease e da arilsulfatase, conforme descrito em Tabatabai (1994). Na figura 4.1 são ilustradas algumas etapas do processo. Nos anexos (A, B, C, D, E, F) estão apresentados, detalhadamente, os procedimentos utilizados em cada metodologia aplicada na avaliação da atividade enzimática do solo.



Figura 4.1 - Determinação da atividade enzimática do solo: a) Incubação de amostras para a enzima; b) Etapa de filtragem; c) Extrato após filtragem; d) Espectrofotômetro para medida da absorbância.

No solo dos tratamentos XR0 e XR1500 do experimento 1 (60 dias de incubação) foram realizadas análises de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs). As amostras de solo foram enviadas para a Bioagri Ambiental (Piracicaba-SP) para a análise dos seguintes HPAs: benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, acenaftileno, fluoreno, antraceno, benzo(g,h,i)perileno, fenantreno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3,cd)pireno, pireno, acenafteno, fluoranteno, naftaleno e benzo(a)antraceno. As análises dos HPAs na Bioagri Ambiental (Piracicaba-SP) foram realizadas conforme as metodologias SVOC`s POP PA 76/USEPA 8270, 3535.

A ecotoxicidade foi avaliada através de ensaio de comportamento, conforme a ISO (2002). O organismo utilizado no teste foi a minhoca da espécie *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). Foram testadas as doses de 375, 750, 1.500 e 3.000 kg ha<sup>-1</sup> de XR. Para isso, amostras de 400 g de solo com e sem XR, e na umidade a 60% da capacidade de campo, foram colocadas no mesmo recipiente, separadas por meio de uma divisória móvel, formando duas seções. Após a colocação das amostras, a divisória foi removida e no local desta foram colocadas 10 minhocas na superfície do solo. Ao final de 48 horas, realizou-se a contagem das

minhocas presentes em cada seção do recipiente. O princípio desse ensaio é a exposição das minhocas, simultaneamente, às amostras de solo com e sem XR. A amostra é considerada tóxica (com a função de habitat do solo limitada) se forem encontradas mais de 80% das minhocas na seção do recipiente que contém a amostra de solo sem o XR.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% para as demais variáveis.

#### 4.2 Experimentos em condições de campo

O experimento foi implantado em janeiro de 2010 na área experimental do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, localizada a 29° 45' Latitude Sul, Longitude 53° 42' W GrW e altitude de 95 m. O clima da região, segundo Köppen, é classificado como subtropical úmido, tipo Cfa2. O solo da área pertence à unidade de mapeamento São Pedro, e é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico arênico (EMBRAPA, 2006), com os seguintes atributos químicos: pH: 5,4; MO: 1,9 % (m/v); K: 0,27, Mg: 1,22, Ca: 3,3, H + Al<sup>+</sup>: 2,35 (cmolc dm<sup>-3</sup>) e P: 31 (mg dm<sup>-3</sup>).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições em parcelas de 25 m<sup>2</sup> (5 m x 5 m) (Figura 4.2). Os tratamentos estudados na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) foram: T1- Adubação NPK; T2, T3 e T4 consistiram, respectivamente, de 750, 1500, 3000 kg ha<sup>-1</sup> de xisto retornado (XR) + NPK; T5- Testemunha absoluta; e T6- 1500 kg ha<sup>-1</sup> de XR. A adubação mineral foi realizada no plantio, na linha de semeadura e consistiu de 150 kg ha<sup>-1</sup> de NPK da formulação 00-25-20 e 45 kg ha<sup>-1</sup> de ureia em cobertura. O XR foi aplicado na superfície do solo antecedendo a semeadura do feijão, manualmente a lança, na área total das parcelas experimentais. O xisto retornado, utilizado no experimento de campo, foi o mesmo do experimento de laboratório. As características químicas do XR estão apresentadas na tabela 4.1.

Os tratamentos foram avaliados em dois cultivos de feijoeiro, realizados na mesma área experimental, com reaplicação dos tratamentos. A semeadura do feijão no primeiro e no segundo cultivo foi realizada em 23/01/2010 e em 27/09/2010, respectivamente. A variedade de feijão utilizada nos dois cultivos foi a IAPAR Tiziu e o espaçamento entre linhas foi de 0,45 m com população final de 311.000 plantas por hectare (14 plantas por metro linear). Antecedendo a semeadura, as sementes de feijão foram inoculadas com *Rhizobium tropici*.



Nos dois cultivos o feijão foi semeado com semeadora equipada para plantio direto sobre resíduos culturais de aveia preta (*Avena sativa L.*).



Figura 4.2 - a) Área de experimentação após a semeadura do feijão; b) Aplicação do XR a lanço; c) Florescimento do feijoeiro.

A avaliação do carbono da biomassa microbiana (CBM) e da atividade enzimática do solo foi realizada em amostras de solo da camada de 0-5 cm coletadas na entrelinha, após uma



semana da aplicação dos tratamentos (A1) e no estágio de florescimento do feijão (A2). Em cada parcela, foram retiradas cinco subamostras de solo, com auxílio de um trado calador, que foram acondicionadas em um saco plástico e passaram a constituir uma amostra única. No laboratório, as amostras foram homogeneizadas manualmente, peneiradas à malha de 2 mm e, em seguida, refrigeradas a 4°C até o momento das análises. As metodologias utilizadas para avaliar o CBM e a atividade enzimática foram as mesmas empregadas no estudo de laboratório.

Para a comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey a 5%; a análise dos componentes principais pelo software Canoco Versão 4.0 (TER BRAAK e SMILAUER, 1998), o programa estatístico SAS – Statistical Analytical System (SAS, 1998) foi usado para os testes de contraste através da MANOVA com Wilks's lambda a 10% de significância. A análise de regressão foi realizada pelo programa Winstat (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2003).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade e biomassa microbiana

A evolução de CO<sub>2</sub> não foi afetada pela aplicação de finos de xisto (FX) e calcário de xisto (CX) ao solo (Figura 5.1). Observa-se que ao final do experimento 1, as quantidades de CO<sub>2</sub> emitidas não diferiram entre os tratamentos com FX, CX e S0. Já, com a aplicação do XR, observa-se que ao final do experimento 1 (Figura 5.2a) e do experimento 2 (Figura 5.2b), os tratamentos com doses de XR, a partir de 1.500 kg ha<sup>-1</sup> e 750 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente, apresentaram quantidades acumuladas de CO<sub>2</sub>, significativamente inferiores ao tratamento controle. No tratamento XR3000, a redução média na quantidade de CO<sub>2</sub> acumulada ao final dos dois experimentos em relação ao tratamento XR0 foi de 19% (104 mg de C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de solo). A diferença na quantidade de CO<sub>2</sub> entre esse tratamento com XR e o S0, equivale a aproximadamente nove vezes a quantidade de C adicionada com o XR (12 mg de C kg<sup>-1</sup> de solo). Tais resultados indicam que, além do C adicionado com o FX, CX e XR ser de difícil biodegradação, a aplicação de XR ao solo afetou a atividade microbiana com impacto sobre a mineralização do C presente na matéria orgânica do solo (MOS).

Resultados sobre a emissão de CO<sub>2</sub> após a adição de subprodutos da extração do xisto ao solo não foram encontrados na literatura. Recentemente, alguns estudos estão sendo realizados para avaliar o efeito da adição de biomassa carbonizada (“biochar”) sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (NOVAK et al., 2010; KIMETU e LEHMANN, 2010; ATKINSON et al., 2010). Em condições de laboratório, Novak et al. (2010) aplicaram ao solo quatro doses (0, 5, 10 e 20 Mg ha<sup>-1</sup>) de biomassa carbonizada e verificaram que em 67 dias de incubação a emissão acumulada de CO<sub>2</sub> reduziu em 9% na dose de 5 Mg ha<sup>-1</sup> e 36% na dose de 20 Mg ha<sup>-1</sup>. Já, em condições de campo Kimetu e Lehmann (2010) verificaram que três aplicações de 7 Mg ha<sup>-1</sup> de biomassa carbonizada em um período de dois anos reduziu em 27% a emissão de CO<sub>2</sub> para a atmosfera, em relação ao solo que não recebeu a biomassa carbonizada. Embora a biomassa carbonizada difira em muitos aspectos do XR, ambos são gerados a partir do processo de pirólise, o que faz com que esses materiais apresentem em sua composição carbono recalcitrante.

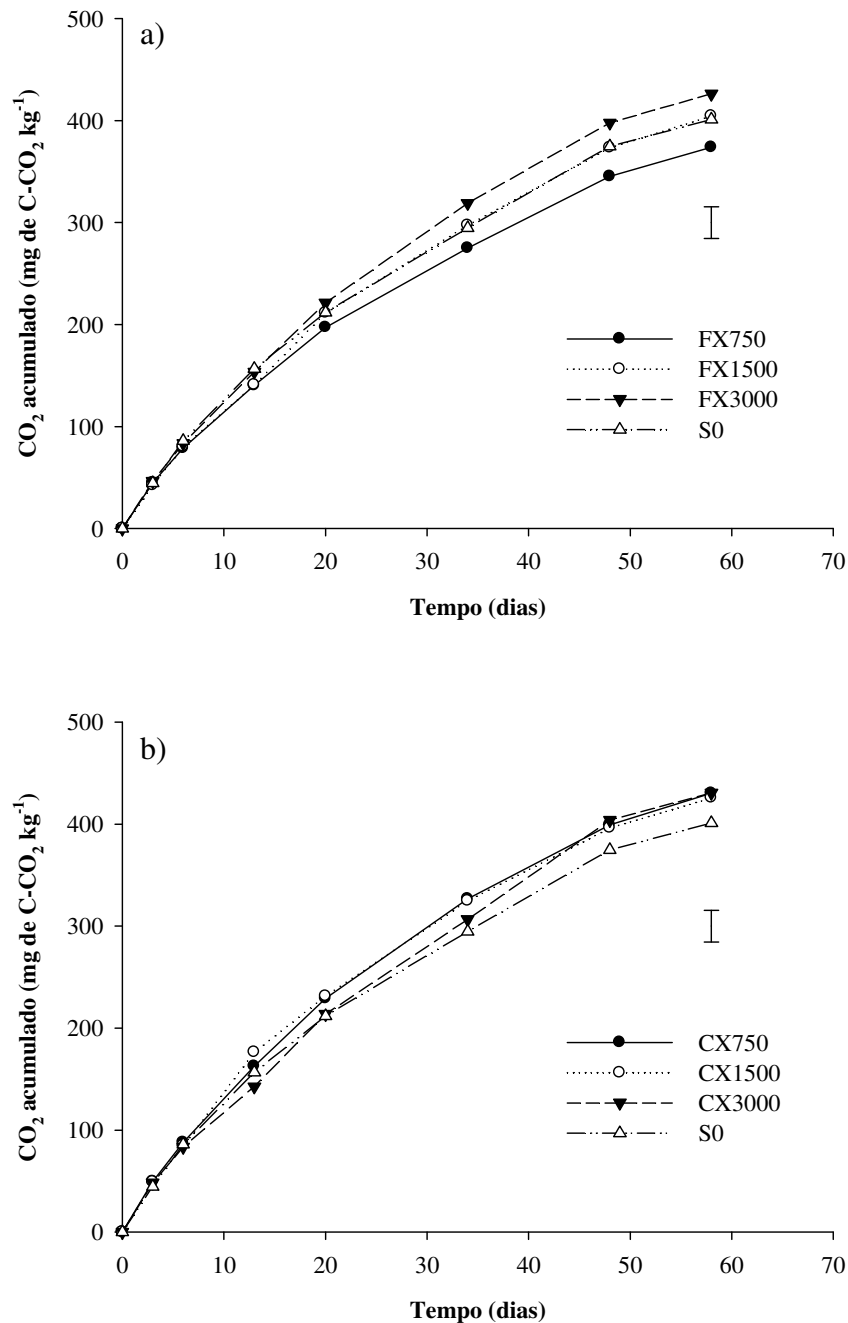


Figura 5.1 - Quantidades acumuladas de CO<sub>2</sub> do solo incubado com doses crescentes de finos de xisto (FX) (a) e calcário de xisto (CX) (b) no experimento 1. FX750: solo + 750 kg FX ha<sup>-1</sup>; FX1500: solo + 1500 kg FX ha<sup>-1</sup>; FX3000: solo + 3000 kg FX ha<sup>-1</sup>; CX750: solo + 750 kg CX ha<sup>-1</sup>; CX1500: solo + 1500 kg CX ha<sup>-1</sup>; CX3000: solo + 3000 kg CX ha<sup>-1</sup>; e S0: controle. A barra vertical representa a diferença mínima significativa entre as médias de cada tratamento (Tukey a 5 %).

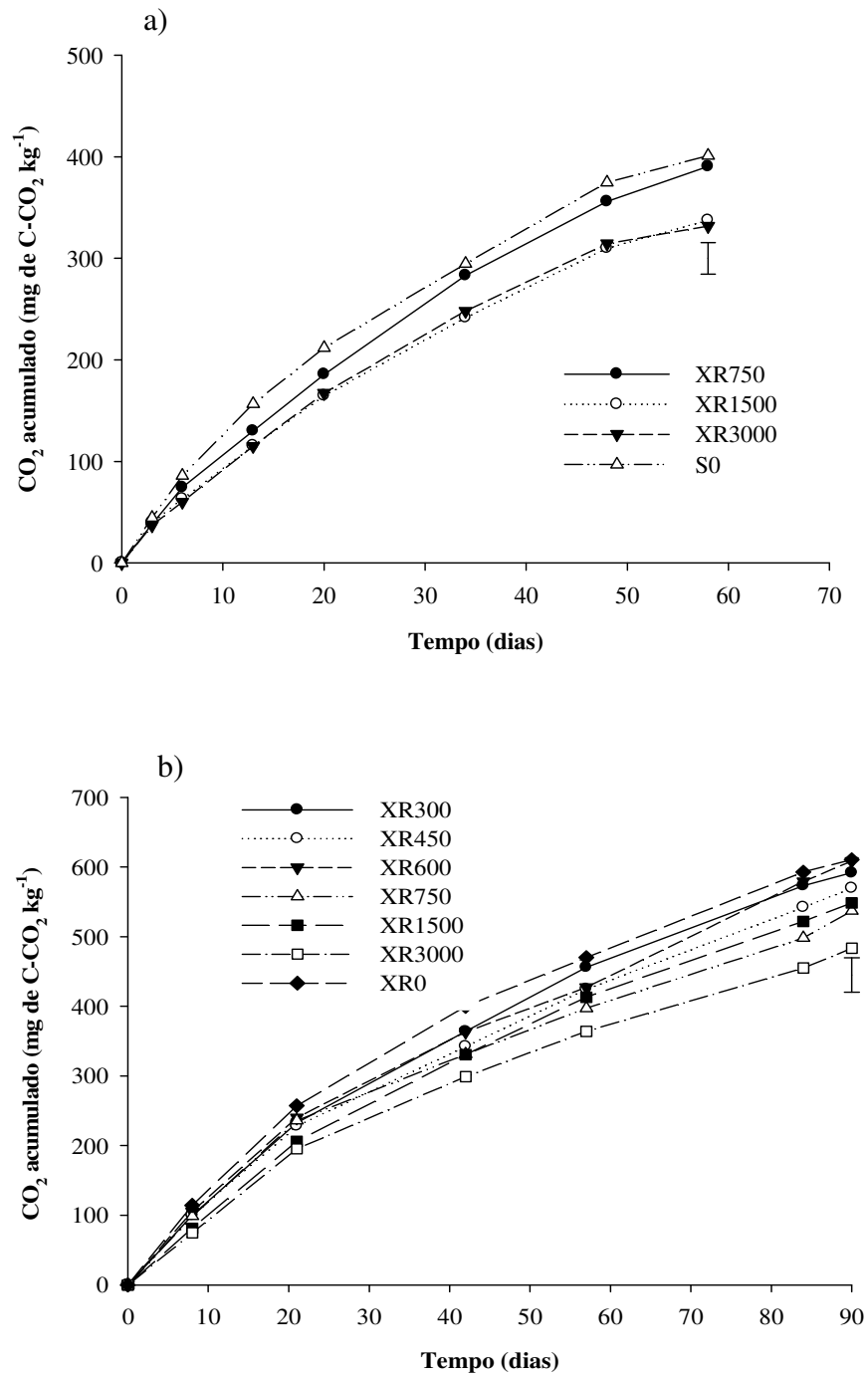


Figura 5.2 - Quantidades acumuladas de CO<sub>2</sub> do solo incubado com doses crescentes de xisto retornado (XR) nos experimentos 1 (a) e 2 (b). XR300: solo + 300 kg XR ha<sup>-1</sup>; XR450: solo + 450 kg XR ha<sup>-1</sup>; XR600: solo + 600 kg XR ha<sup>-1</sup>; XR750: solo + 750 kg XR ha<sup>-1</sup>; XR1500: solo + 1500 kg XR ha<sup>-1</sup>; XR3000: solo + 3000 kg XR ha<sup>-1</sup>; e S0: controle; A barra vertical representa a diferença mínima significativa entre as médias de cada tratamento (Tukey a 5 %).

O XR apresenta em sua composição elementos traço (STARK e REDENTE, 1990) e compostos orgânicos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (AFONSO et al., 1991; NICOLINE et al., 2010), e a redução na atividade microbiana, medida através da emissão do CO<sub>2</sub>, poderia ser atribuída à presença destes poluentes. Porém, no presente estudo, a análise química do XR indicou que os valores de metais pesados foram baixos (Tabela 4.1) e inferiores aos permitidos em condicionadores de solo, conforme limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária - MAPA (BRASIL, 2010) e em lodos de esgoto segundo a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (BRASIL, 2006). Tem-se ainda que, Gonçalves et al. (2004) não encontraram incremento nos teores de metais pesados na parte aérea de feijoeiro com aplicação de até 20 Mg ha<sup>-1</sup> de FX e XR. Corroborando com Pereira e Vitti (2004), que não observaram influência da aplicação de até 12 Mg ha<sup>-1</sup> de XR ao solo, na absorção de metais pesados pelo tomateiro.

Em relação à presença de HAPs no XR, a análise dos 16 principais HAPs (POTIN et al., 2004) realizada no solo do tratamento S0 (controle) e XR1500 no início e ao final do experimento 1, indicaram que os teores dos HAPs foram menores que 0,01 mg kg<sup>-1</sup> nas duas datas de avaliação (Tabela 5.1).

Os valores de concentração dos HAPs no solo, do presente estudo, estão de acordo com os valores orientadores de referência normatizados pela CETESB (2005), a qual estabelece valores de alerta e intervenção. Os valores de referência de qualidade foram estabelecidos com base em análises de amostras ambientais para, de forma preventiva, efetuar a proteção da qualidade dos solos e das águas subterrâneas. Esses valores foram estabelecidos com base em análise de amostras coletadas em áreas com pouca interferência humana, no caso, florestas. Esses valores serão reavaliados no futuro, considerando-se as concentrações naturais em solo de uso agrícola e urbano. O valor de alerta, indica a alteração da qualidade natural dos solos e será utilizado em caráter preventivo e, quando excedido no solo, deverá ser exigido o monitoramento do solo e das águas subterrâneas, efetuando-se um diagnóstico de qualidade desses meios, identificando-se e controlando-se as possíveis fontes de poluição. O valor de intervenção, utilizado em caráter corretivo, indica a existência de contaminação do solo ou das águas subterrâneas. Quando excedido, a área será declarada contaminada, pois existe risco potencial de efeito deletério sobre a saúde humana, devendo-se efetuar a investigação detalhada, incluindo modelagem de fluxo, transporte e avaliação de risco com objetivos de intervenção na área, executando-se medidas emergenciais de contenção da pluma, restrição de acesso a pessoas, restrição da utilização das águas locais e ações de remediação (CETESB, 2005). Com base nos resultados das análises de metais pesados e

HAPs do presente estudo e em Brasil (2006; 2010) e CETESB (2005), pode-se inferir que esses fatores não foram a principal causa da redução na emissão de CO<sub>2</sub> do solo dos tratamentos com XR.

Tabela 5.1 - Concentração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) nos tratamentos com somente solo (S0) e solo com 1500 kg de XR ha<sup>-1</sup> (XR1500) no início e 60 dias após a incubação no experimento 1<sup>1</sup>.

HAPs	Início		60 dias	
	S0	XR1500	S0	XR1500
	----- mg kg <sup>-1</sup> -----			
Benzo(a)pireno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Benzo(b)fluoranteno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Benzo(k)fluoranteno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Criseno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Acenaftileno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Fluoreno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Antraceno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Benzo(g,h,i)perileno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Fenantreno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Indeno(1,2,3,cd)pireno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Pireno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Acenafteno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Fluoranteno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Naftaleno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Benzo(a)antraceno	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

<sup>1</sup> As análises foram realizadas na Laboratório da Bioagri Ambiental Piracicaba-SP; Limite de detecção foi igual a 0,01 mg kg<sup>-1</sup>.

O XR também é caracterizado por apresentar elevada alcalinidade. Valores de pH superior a 9,0 para o XR foram reportados por Reddy e Lindsay (1986). Aliado ao pH, esses subprodutos, principalmente o XR, podem apresentar elevados teores de sais, levando a uma alteração na condutividade elétrica do solo. No entanto, até o momento foi verificado que dentre o XR, FX e CX apenas o CX provoca um aumento no pH do solo (XISTO AGRÍCOLA, 2009b). Silveira et al. (2010), em estudos com CX, relata seu potencial de correção da acidez do solo em sistemas de cultivo. Dependendo do pH do solo, um aumento

nessa variável pode ser benéfico para a atividade microbiana do solo, conforme verificaram Pati e Sahu (2004); Pichtel e Hayes (1990).

Analisando os resultados obtidos com o carbono da biomassa microbiana (CBM) observa-se que em nenhuma das avaliações realizadas o CBM dos tratamentos com os subprodutos da extração de xisto foi inferior ao tratamento S0 (Tabela 5.2). Naquelas datas em que houve efeito das doses dos subprodutos sobre o CBM pode-se observar que o modelo ajustado foi o quadrático (Figura 5.3), com aumento do CBM com doses acima de 1500 kg ha<sup>-1</sup>. O quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>), o qual reflete a eficiência microbiana (BROOKES, 1995), verifica-se que os tratamentos com os subprodutos apresentaram valores que não superaram àqueles do tratamento controle (Tabela 5.2), indicando que esse materiais não provocaram estresse/perturbação na biomassa microbiana do solo. Isso porque, segundo Brookes (1995), valores menores de qCO<sub>2</sub> representam um aumento na eficiência microbiana, pois menor quantidade de CO<sub>2</sub> é liberada por unidade de CBM.

Tabela 5.2 - Carbono da biomassa microbiana (CBM, mg C kg<sup>-1</sup> de solo) e quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>, mg d<sup>-1</sup> C-CO<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> CBM) em solo incubado com doses crescentes de xisto retortado (XR), finos de xisto (FX) e calcário de xisto (CX).

Tratamento	CBM			qCO <sub>2</sub>	
	15 dias	30 dias	60 dias	15 dias	30 dias
XR750	140 <sup>ns</sup> B	195 <sup>ns</sup> B	408aA	0,08 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>
XR1500	134 <sup>ns</sup> B	189 <sup>ns</sup> B	401aA	0,08 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>
XR3000	199 <sup>ns</sup> B	176 <sup>ns</sup> B	323abA	0,05 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>
FX750	144 <sup>ns</sup> B	175 <sup>ns</sup> B	346aA	0,09 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>
FX1500	204 <sup>ns</sup> B	188 <sup>ns</sup> B	323abA	0,06 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>
FX3000	213 <sup>ns</sup> B	185 <sup>ns</sup> B	335abA	0,07 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>
CX750	143 <sup>ns</sup> B	166 <sup>ns</sup> B	309abA	0,11 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>
CX1500	165 <sup>ns</sup> B	144 <sup>ns</sup> B	335abA	0,09 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>
CX3000	126 <sup>ns</sup> B	76 <sup>ns</sup> B	297abA	0,11 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>
S0	165 <sup>ns</sup> AB	120 <sup>ns</sup> aB	224bA	0,10 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>
CV( %)	35,94	20,69	27,21	38,17	21,31

<sup>(1)</sup> Valores seguidos por letras iguais, nas linhas e colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05); valores se referem à mg kg<sup>-1</sup>.

Em condições de campo, no primeiro cultivo de feijão, no período de florescimento, o CBM no tratamento NPK + XR0 (adubação mineral) teve baixos índices para esta atividade biológica e diferiu do tratamento NPK0 + XR0 (testemunha) e do tratamento NPK0 + XR 1500 (xisto sem adubação mineral) (Tabela 5.3). Já, no segundo cultivo, foram encontradas diferenças entre os tratamentos na amostragem realizada sete dias após a aplicação dos tratamentos (A1), sendo que os valores de CBM decresceram com o aumento das doses de XR (Figura 5.3d). Tem-se ainda que, no florescimento no cultivo 1, foram observados melhores índices para a CBM, porém no cultivo 2 a data inicial apresentou valores mais elevados, com exceção à testemunha, que não diferiu. A atividade biológica do solo é capaz de decompor, através da ação enzimática, os componentes da MOS e outros componentes orgânicos depositados no solo, resultando em compostos mais simples (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Nesse sentido, pode-se relacionar os resultados, ainda incipientes, à alta recalcitrância do C presente no XR e baixa biodisponibilidade ao ataque microbiano.

Tabela 5.3 - Carbono da biomassa microbiana em amostras de solo da camada de 0-5 cm coletadas após uma semana da aplicação do xisto retornado (A1) e no florescimento (A2) do feijão <sup>(1)</sup>.

Tratamento	1º cultivo	
	A1	A2
NPK + XR0	136,21aB	153,29bA
NPK + XR750	128,92aB	186,08abA
NPK + XR1500	131,00aA	170,33abA
NPK + XR3000	103,37aB	186,45abA
NPK0 + XR0	139,38aB	232,74aA
NPK0+ XR1500	152,54aB	230,34aA
CV (%)	25,89	20,34
Tratamento	2º cultivo	
	A1	A2
NPK + XR0	268,80aA	80,94aB
NPK + XR750	160,52bA	77,77aB
NPK + XR1500	158,33bA	47,19aB
NPK + XR3000	121,33bA	38,73aB
NPK0 + XR0	73,95cA	62,73aB
NPK0+ XR1500	115,38bcA	73,81aB
CV (%)	14,69	31,1

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p < 0,05)



Esses resultados, em que o CBM e o  $q\text{CO}_2$  não foram afetados pelo uso do XR apontam que a redução na emissão de  $\text{CO}_2$  pela aplicação do XR ao solo (Figura 5.2) não esteve relacionada a um efeito direto do XR sobre a biomassa microbiana do solo.

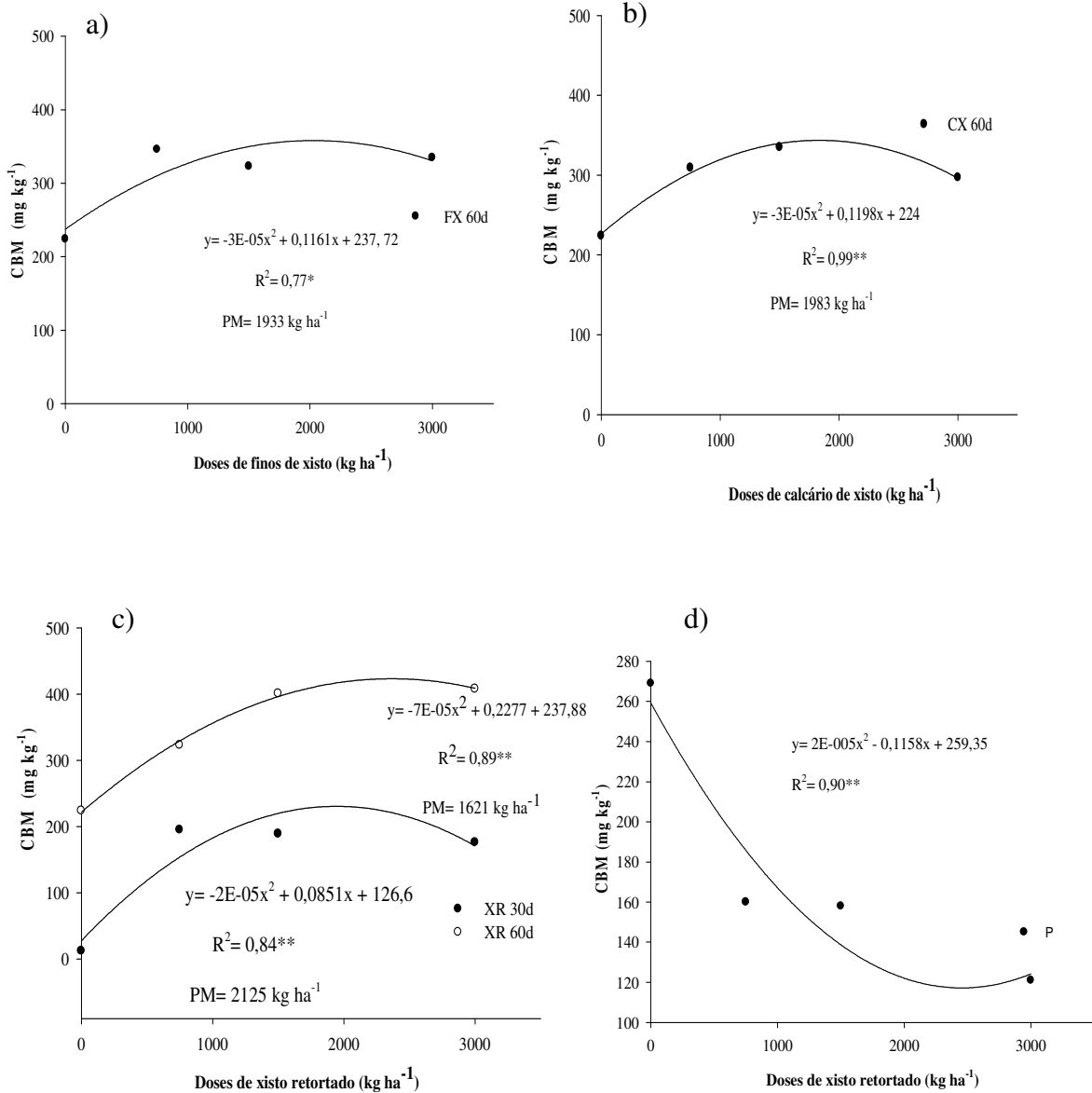


Figura 5.3 - Efeito de doses de finos de xisto (FX) (a), calcário de xisto (CX) (b) e xisto retornado (XR) (c) em condições laboratoriais no experimento 1; e condições de campo no plantio (P) do segundo ano de aplicação do xisto retornado (d) sobre o carbono da biomassa microbiana (CBM). PM=Ponto de máxima da curva.

Possivelmente, o XR tenha reduzido a disponibilidade de carbono para os microrganismos, através da promoção da proteção física e química da MOS e da adsorção do

C lábil presente no solo. Kimetu e Lehmann (2010) também atribuíram esse efeito ao processo de estabilização da MOS pela biomassa carbonizada, após terem verificado que a aplicação desse material ao solo reduziu a emissão de CO<sub>2</sub> para a atmosfera. O efeito de materiais como o da biomassa carbonizada sobre a estabilização da MOS parece ser mais efetivo em solos que apresentam baixos teores de C e argila (KIMETU e LEHMANN, 2010; ATKINSON et al., 2010), características essas presentes no solo utilizado no presente estudo.

A hipótese de que o XR possa promover a proteção da MOS do ataque microbiano, baseia-se nas características mineralógicas e na estrutura lamelar do XR que, segundo Miotto e Machado (2006), são semelhantes às das argilas comumente usadas como matéria prima em síntese de zeólitas. Ao realizar a caracterização física e química do XR, Pimentel et al. (2010) verificaram que o XR apresenta em sua composição argilominerais de camada dupla (2:1) como ilita e montmorilonita. Nesse mesmo trabalho, o XR apresentou área superficial específica igual a 65 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, valor esse semelhante ao obtido por Cessa et al. (2009) para argilas extraídas de um solo Latossolo Vermelho distroférico com textura muito argilosa. Entre as características químicas apresentadas pelo XR que podem potencializar a estabilização/proteção da MOS estão os grupos funcionais silanóides, hidroxílicos e carboxílicos (PIMENTEL et al., 2010). Embora, os resultados obtidos no presente estudo não permitam confirmar que o XR tenha promovido a proteção da MOS contra o ataque microbiano, essa parece ser a principal causa da redução na emissão de CO<sub>2</sub> verificada nos tratamentos com XR. Estudos futuros são necessários para confirmar essa possível estabilização da MOS pelo XR. Especial atenção deve ser dada aos mecanismos pelos quais a textura do solo e o XR interagem afetando a ciclagem do C e nutrientes presentes na MOS. Esses aspectos são importantes tanto do ponto de vista da estabilização da MOS, como do sequestro de C no solo e na disponibilidade de nutrientes para as plantas.

## **5.2 Atividades enzimáticas no solo**

A aplicação ao solo dos subprodutos de xisto teve pouco efeito sobre a atividade enzimática do solo (Tabela 5.4). Observa-se também que, com exceção da desidrogenase, as demais enzimas apresentaram valores de atividade que diferiram entre as datas de avaliação, sendo que, na maioria dos tratamentos, os maiores valores de atividade foram observados na primeira e na segunda avaliação realizadas aos 15 e 30 dias após a incubação,

respectivamente. Nas figuras 5.4, 5.5, e 5.6, são apresentadas, em cada data de avaliação, as análises de regressão significativas entre os fatores doses de subprodutos de xisto e atividade das enzimas, sendo que o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático. Os valores obtidos para a atividade das enzimas avaliadas no presente estudo estão dentro de uma ampla faixa de valores obtidos em trabalhos com diferentes formas de uso do solo e em distintas condições edafoclimáticas (GARCIA-GIL et al., 2000; MARCOTE et al., 2001; TRANNIN et al., 2007; LAGOMARSINO et al., 2009).

As alterações verificadas na atividade das enzimas fosfatase e arilsulfatase, possivelmente, estejam relacionadas ao aporte de P e S realizados ao solo com o XR. Pereira e Vitti (2004) observaram que a adição de xisto ao solo eleva os teores de enxofre, pela presença de pirita, sendo esta a principal fonte de S no solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Trannin et al. (2007) verificaram que, após dois anos de aplicação de lodo de esgoto acrescidos de  $P_2O_5$ , houve uma diminuição na atividade da fosfatase ácida em relação ao solo controle. Possivelmente, isso deve estar relacionado ao aumento dos produtos finais de reação das enzimas fosfatase e arilsulfatase no solo, que provoca a inibição na atividade das mesmas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O efeito do incremento das doses dos subprodutos de xisto sobre a atividade das enzimas  $\beta$ -glicosidase, FDA e Desidrogenase, pode ser considerado baixo quando comparado a outros estudos em que foram aplicadas ao solo doses crescentes de outras fontes orgânicas (CHANTIGNY et al., 2000; GARCÍA-GIL et al., 2000, MARCOTE et al., 2001). Além das diferenças nas condições edafoclimáticas entre os experimentos, os resultados do presente estudo devem estar relacionados à baixa quantidade de carbono adicionada com os subprodutos e ao seu elevado grau de recalcitrância. Isso porque, essas enzimas estão relacionadas às transformações de compostos orgânicos no solo. A medida da hidrólise do FDA pela fluoresceína é um bom indicador da atividade total dos decompositores no solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). As desidrogenases são enzimas intracelulares, as quais oxidam compostos orgânicos pela transferência de um par de elétrons para um aceptor, NAD ou NADP, formando o NADH ou NADPH (ROGERS e TATE, 2001), refletindo, portanto, a taxa da respiração microbológica. A baixa disponibilidade de C, com o uso dos subprodutos do xisto, não provocaram alterações importantes na atividade dessas enzimas.

Tabela 5.4 - Atividade enzimática sob a influência dos subprodutos sólidos de xisto aos 15, 30 e 60 dias após a incubação.

Trat	Dias após incubação			Trat	Dias após incubação			Trat	Dias após incubação		
	15	30	60		15	30	60		15	30	60
<b>Fosfatase àcida, <math>\mu\text{g PNF g}^{-1}\text{h}^{-1}</math></b>				<b>Arilsulfatase, <math>\mu\text{g PNF g}^{-1}\text{h}^{-1}</math></b>				<b>Urease, <math>\text{mg NH}_4^+ \text{kg}^{-1}</math></b>			
XR750	351 <sup>ns</sup> B	784bA	201 <sup>ns</sup> C	XR750	13bcA	15bA	9abB	XR750	32bA	55cA	26 <sup>ns</sup> A
XR1500	323 <sup>ns</sup> B	807abA	214 <sup>ns</sup> C	XR1500	14bcA	15bA	9abB	XR1500	56abB	113abA	38 <sup>ns</sup> B
XR3000	346 <sup>ns</sup> B	751bA	241 <sup>ns</sup> C	XR3000	27aA	15bB	7abC	XR3000	59abA	53cAB	19 <sup>ns</sup> B
FX750	342 <sup>ns</sup> B	776bA	232 <sup>ns</sup> C	FX750	15bB	17bA	10aC	FX750	82aA	73bcA	37 <sup>ns</sup> A
FX1500	275 <sup>ns</sup> B	794bA	222 <sup>ns</sup> B	FX1500	14bA	18abA	5bB	FX1500	66abB	133aA	37 <sup>ns</sup> B
FX3000	299 <sup>ns</sup> B	761bA	220 <sup>ns</sup> C	FX3000	15bA	17bA	9abB	FX3000	49abB	124aA	30 <sup>ns</sup> B
CX750	326 <sup>ns</sup> B	808abA	246 <sup>ns</sup> C	CX750	9cB	17bA	9abB	CX750	38abB	120abA	28 <sup>ns</sup> B
CX1500	313 <sup>ns</sup> B	803bA	260 <sup>ns</sup> B	CX1500	16bB	23aA	9abC	CX1500	71abAB	86abcA	43 <sup>ns</sup> B
CX3000	323 <sup>ns</sup> B	817abA	252 <sup>ns</sup> B	CX3000	15bA	17bA	8abB	CX3000	80aAB	105abA	47 <sup>ns</sup> B
S0	303 <sup>ns</sup> B	908aA	247 <sup>ns</sup> B	S0	12bC	18abA	9abB	S0	72abA	95abcA	28 <sup>ns</sup> B
CV (%)	7,8	7,9	7,8	CV (%)	8,3	15,8	12	CV (%)	10,2	28,2	25,9
<b><math>\beta</math>-glicosidase, <math>\mu\text{g PNF g}^{-1}\text{h}^{-1}</math></b>				<b>FDA, <math>\mu\text{g F g}^{-1}\text{h}^{-1}</math></b>				<b>Desidrogenase, <math>\mu\text{g TTF g}^{-1}24\text{h}^{-1}</math> <sup>(2)</sup></b>			
XR750	40 <sup>ns</sup> B	17 <sup>ns</sup> C	67aA	XR750	77 <sup>ns</sup> A	68abB	53bC	XR750	41,17b	16,90b	34,81b
XR1500	42 <sup>ns</sup> B	18 <sup>ns</sup> C	64aA	XR1500	78 <sup>ns</sup> A	65abB	64aB	XR1500	43,64b	15,37b	41,04b
XR3000	39 <sup>ns</sup> A	19 <sup>ns</sup> B	41bA	XR3000	76 <sup>ns</sup> A	62abB	62abB	XR3000	40,21b	20,84b	35,70b
FX750	45 <sup>ns</sup> A	19 <sup>ns</sup> C	40bB	FX750	81 <sup>ns</sup> A	66abB	59abC	FX750	36,02b	17,91b	34,05b
FX1500	44 <sup>ns</sup> A	17 <sup>ns</sup> C	38bB	FX1500	78 <sup>ns</sup> A	68abB	62abB	FX1500	42,56b	17,66b	32,53b
FX3000	44 <sup>ns</sup> A	16 <sup>ns</sup> C	30cB	FX3000	78 <sup>ns</sup> A	63abB	57abB	FX3000	51,27a	18,04a	38,62b
CX750	44 <sup>ns</sup> A	17 <sup>ns</sup> C	39bB	CX750	78 <sup>ns</sup> A	62abB	64aB	CX750	56,48a	26,81a	47,90a
CX1500	43 <sup>ns</sup> A	17 <sup>ns</sup> A	40bA	CX1500	75 <sup>ns</sup> A	61bB	58abB	CX1500	52,66a	24,01a	52,85a
CX3000	44 <sup>ns</sup> A	16 <sup>ns</sup> C	38bB	CX3000	79 <sup>ns</sup> A	71aB	61abC	CX3000	52,92a	23,89a	55,78a
S0	44 <sup>ns</sup> A	16 <sup>ns</sup> B	43bA	S0	74 <sup>ns</sup> A	65abB	66aB	S0	44,47a	20,58b	27,44b
CV (%)	5,8	7,7	5,1	CV (%)	4,3	7,1	4,6	CV (%)	10,6	15,8	22,9

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ); <sup>(2)</sup> Não significativo na interação com o tempo.

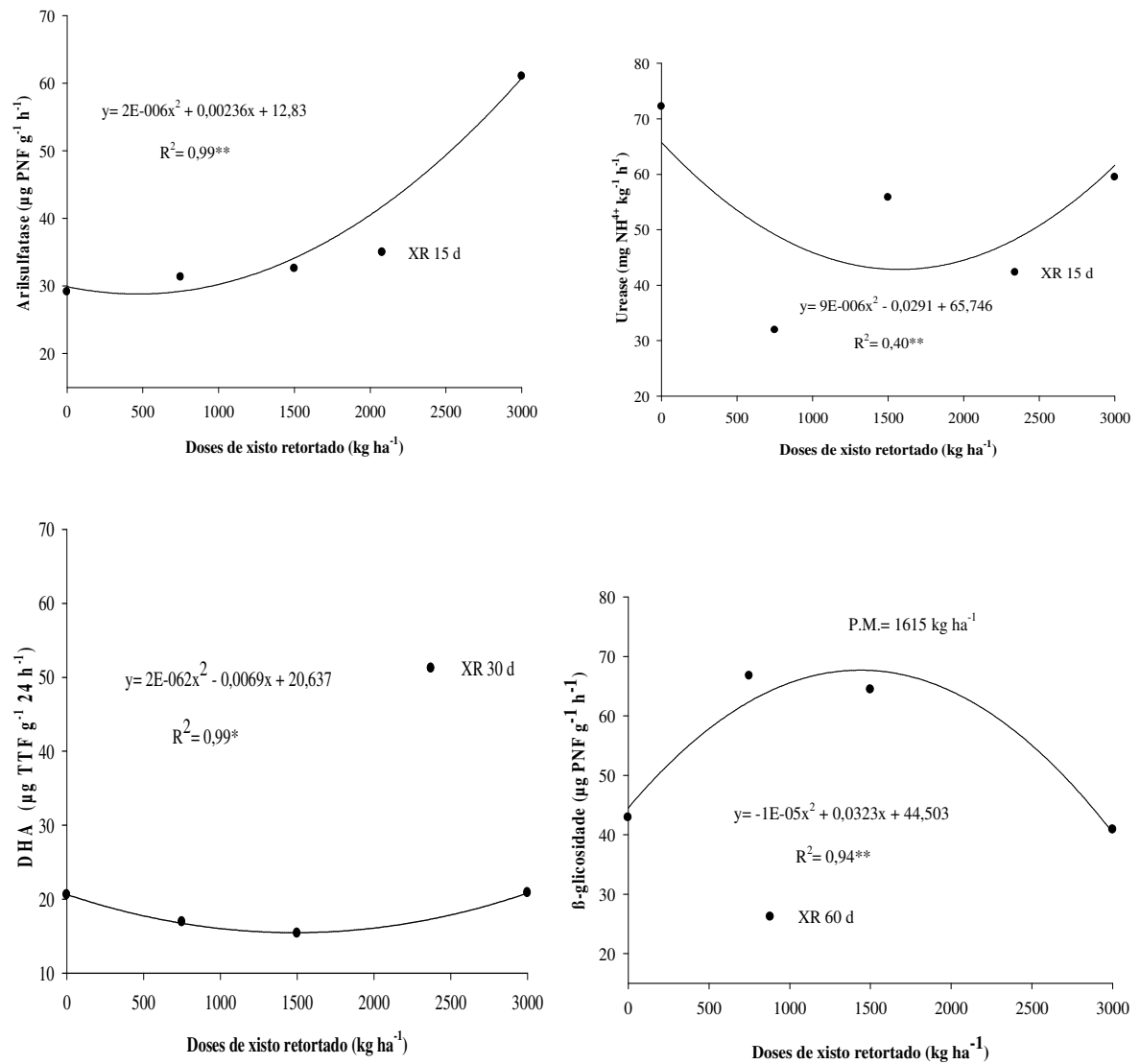


Figura 5.4 - Efeito de doses de xisto retornado (XR) sobre a atividade de algumas enzimas em diferentes datas de amostragem. Foram apresentados somente os resultados das enzimas em cada data de avaliação que tiveram a análise de regressão significativa. PM=Ponto de máxima da curva.

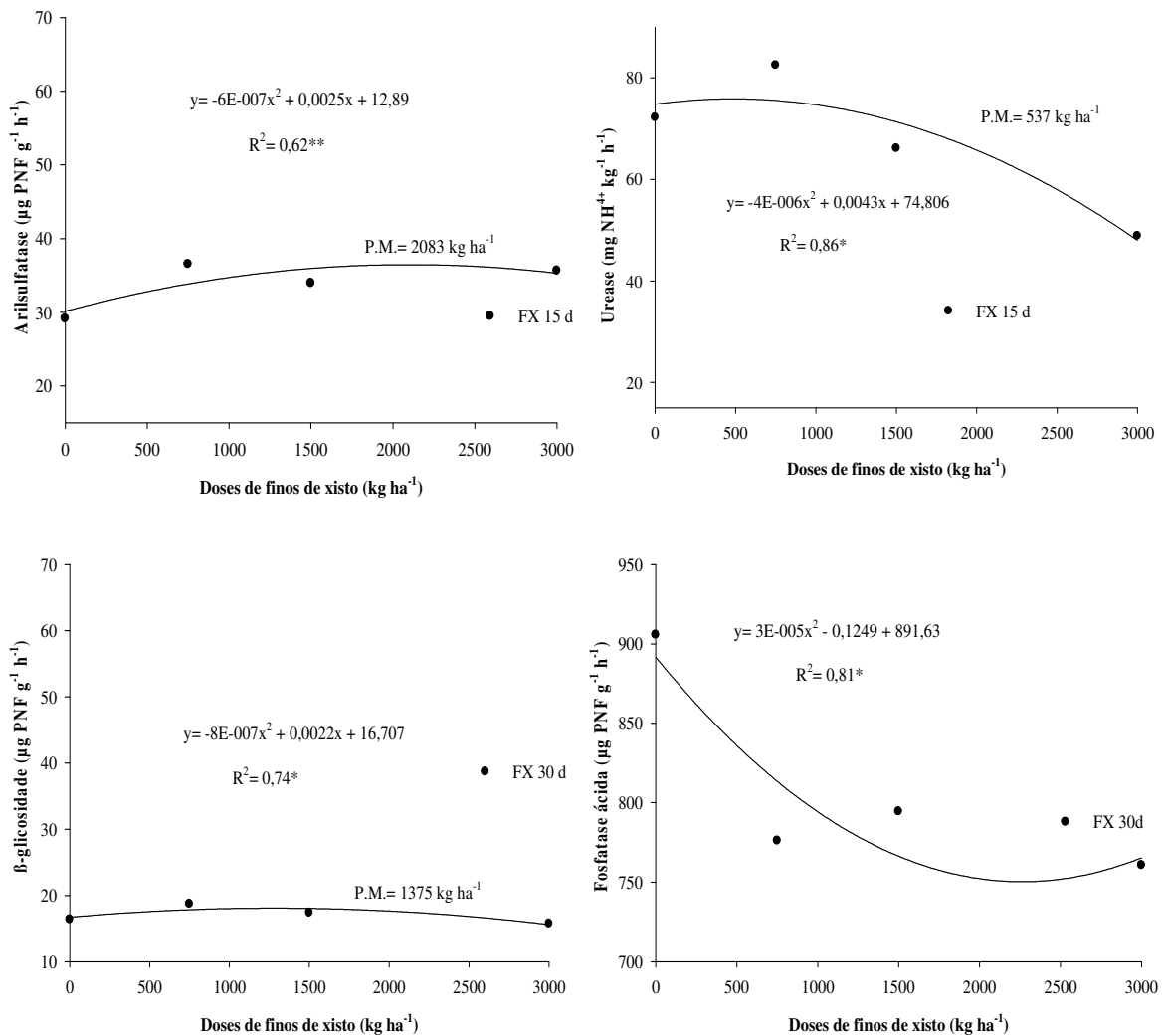


Figura 5.5 - Efeito de doses de finos de xisto (FX) sobre a atividade de algumas enzimas em diferentes datas de amostragem. Foram apresentados somente os resultados das enzimas em cada data de avaliação que tiveram a análise de regressão significativa. PM=Ponto de máxima da curva.

Na tabela 5.5 são apresentados os resultados da atividade enzimática do solo após a aplicação na superfície do solo das diferentes doses de XR, em condições de campo, onde se observa que a atividade da enzima urease foi a mais responsiva à aplicação do XR ao solo. Tal efeito do XR ocorreu apenas no primeiro cultivo de feijão, sendo observado um incremento da atividade dessa enzima com o uso da dose de 1.500 kg de XR ha<sup>-1</sup> (XR2). A velocidade da enzima urease variou de 9 a 64 mg NH<sup>4+</sup> kg<sup>-1</sup> solo h<sup>-1</sup>, valores que se mostram em consonância com Silveira (2007) para solos do Rio Grande do Sul que apresentaram seus mínimos e máximos entre 3,5 a 70 mg NH<sup>4+</sup> kg<sup>-1</sup> solo h<sup>-1</sup> (valor convertido para unidade deste

estudo). Em estudo realizado por Nahas et al. (1997), foi observado que a adição de enxofre ao solo aumentou a atividade da urease. Possivelmente, a alteração verificada na atividade da enzima urease, está relacionada ao aporte de S via o XR, o qual possui considerável concentração desse elemento (Tabela 4.1).

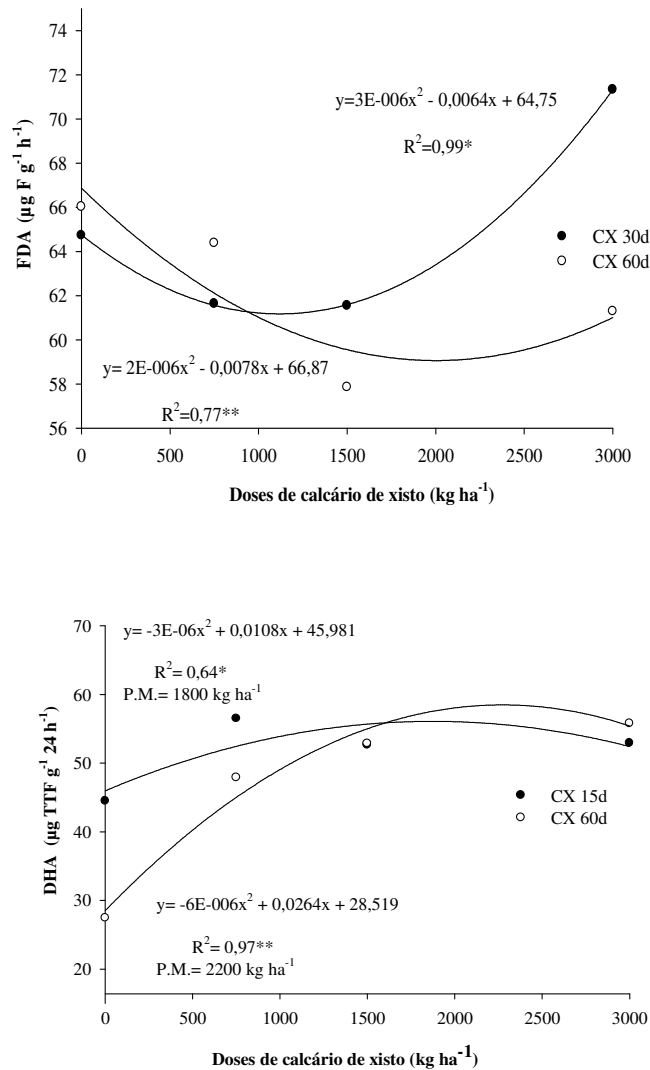


Figura 5.6 - Efeito de doses de calcário de xisto (CX) sobre a atividade de algumas enzimas em diferentes datas de amostragem. Foram apresentados somente os resultados das enzimas em cada data de avaliação que tiveram a análise de regressão significativa. PM=Ponto de máxima da curva.

Tabela 5.5 - Atividade enzimática do solo em amostras de solo da camada de 0-5 cm coletadas após uma semana da aplicação do xisto retornado (A1) e no florescimento (A2) do feijão <sup>(1)</sup>.

Tratamentos	1° Cultivo											
	Urease <sup>(2)</sup>		Arilsulfatase <sup>(3)</sup>		$\beta$ -glicosidase <sup>(3)</sup>		FDA <sup>(4)</sup>		DHA <sup>(5)</sup>		Fosfatase ácida <sup>(3)</sup>	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
NPK + XR0	9,49cB	15,95cA	27,32 <sup>ns</sup>	24,33 <sup>ns</sup>	45,56a	31,76 <sup>ns</sup>	40,78abc	59,46 <sup>ns</sup>	47,42aA	36,02bA	129,07 <sup>ns</sup>	134,08ab
NPK + XR750	14,17bcB	24,08bA	31,65 <sup>ns</sup>	28,03 <sup>ns</sup>	46,10a	28,87 <sup>ns</sup>	35,54bc	61,73 <sup>ns</sup>	40,87abA	38,55bA	139,14 <sup>ns</sup>	145,15ab
NPK + XR1500	25,91aB	44,22aA	26,15 <sup>ns</sup>	26,47 <sup>ns</sup>	44,68a	25,85 <sup>ns</sup>	40,58abc	58,83 <sup>ns</sup>	41,58abA	32,45bA	126,59 <sup>ns</sup>	132,17b
NPK + XR3000	27,02aB	40,14aA	24,44 <sup>ns</sup>	28,12 <sup>ns</sup>	40,73ab	29,42 <sup>ns</sup>	46,67ab	61,06 <sup>ns</sup>	26,51bB	42,42abA	129,94 <sup>ns</sup>	152,96a
NPK0 + XR0	15,86 aB	25,46bA	25,65 <sup>ns</sup>	30,34 <sup>ns</sup>	40,06ab	25,20 <sup>ns</sup>	57,14a	66,06 <sup>ns</sup>	46,00abB	57,20aA	130,43 <sup>ns</sup>	133,15ab
NPK0+ XR1500	25,23 aB	43,49aA	22,32 <sup>ns</sup>	28,85 <sup>ns</sup>	29,23b	25,21 <sup>ns</sup>	25,62c	61,58 <sup>ns</sup>	40,22abA	50,76abA	125,83 <sup>ns</sup>	127,72b
CV (%)	10,88	9,87	15,36	14,22	15,27	15,10	20,38	6,22	29,58	26,25	10,64	9,15
Tratamentos	2° cultivo											
	Urease <sup>(2)</sup>		Arilsulfatase <sup>(3)</sup>		$\beta$ -glicosidase <sup>(3)</sup>		FDA <sup>(4)</sup>		DHA <sup>(5)</sup>		Fosfatase ácida <sup>(3)</sup>	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
NPK + XR0	39,63 <sup>ns</sup>	62,98 <sup>ns</sup>	27,53 <sup>ns</sup>	11,12 <sup>ns</sup>	49,83 <sup>ns</sup>	42,52 <sup>ns</sup>	54,93 <sup>ns</sup>	24,25 <sup>ns</sup>	101,59aA	46,35 <sup>ns</sup> B	119,86 <sup>ns</sup>	205,26ab
NPK + XR750	44,42 <sup>ns</sup>	64,57 <sup>ns</sup>	36,80 <sup>ns</sup>	11,74 <sup>ns</sup>	53,52 <sup>ns</sup>	48,10 <sup>ns</sup>	57,23 <sup>ns</sup>	23,22 <sup>ns</sup>	52,20bA	52,30 <sup>ns</sup> A	124,02 <sup>ns</sup>	215,95a
NPK + XR1500	49,65 <sup>ns</sup>	59,51 <sup>ns</sup>	26,66 <sup>ns</sup>	12,44 <sup>ns</sup>	49,91 <sup>ns</sup>	44,62 <sup>ns</sup>	55,62 <sup>ns</sup>	23,29 <sup>ns</sup>	82,92abA	48,70 <sup>ns</sup> B	127,10 <sup>ns</sup>	186,62ab
NPK + XR3000	46,33 <sup>ns</sup>	48,34 <sup>ns</sup>	20,55 <sup>ns</sup>	9,86 <sup>ns</sup>	46,34 <sup>ns</sup>	45,65 <sup>ns</sup>	53,76 <sup>ns</sup>	22,51 <sup>ns</sup>	62,32abA	43,56 <sup>ns</sup> A	110,64 <sup>ns</sup>	207,59ab
NPK0 + XR0	49,65 <sup>ns</sup>	44,74 <sup>ns</sup>	21,66 <sup>ns</sup>	11,12 <sup>ns</sup>	45,53 <sup>ns</sup>	51,27 <sup>ns</sup>	55,88 <sup>ns</sup>	21,30 <sup>ns</sup>	75,04abA	50,60 <sup>ns</sup> B	114,93 <sup>ns</sup>	195,41ab
NPK0+ XR1500	45,35 <sup>ns</sup>	37,26 <sup>ns</sup>	25,65 <sup>ns</sup>	9,80 <sup>ns</sup>	53,90 <sup>ns</sup>	49,34 <sup>ns</sup>	56,35 <sup>ns</sup>	20,26 <sup>ns</sup>	49,77bA	45,99 <sup>ns</sup> A	126,06 <sup>ns</sup>	178,41b
CV (%)	24,76	35,49	28,42	16,80	13,47	16,45	11,38	9,61	25,37	17,92	17,08	7,32

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p < 0,05), a ausência da letra maiúscula indica que o teste de interação tratamento-tempo não foi significativo. <sup>(2)</sup> mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, <sup>(3)</sup> µg de PNF g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, <sup>(4)</sup> µg de Fluoresceína g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, <sup>(5)</sup> µg TTF g<sup>-1</sup> 24h<sup>-1</sup>.



A urease é uma enzima relacionada ao ciclo do N, atuando na hidrólise da ureia a  $\text{CO}_2$  e  $\text{NH}_3$ , sendo amplamente distribuída na natureza e foi detectada em microorganismos, plantas e animais (DICK et al., 1996). Essa enzima exibe alto percentual de inibição por metais pesados (como Cd e Cr) em comparação a BG, fosfatase e arilsulfatase (TEJADA et al., 2010), podendo ser usado como indicador da contaminação de ambientes por metais pesados. Presume-se que os metais pesados, na maioria das vezes, inibem as reações enzimáticas, criando um complexo com o substrato, ou bloqueando a reatividade do grupo funcional das enzimas, ou reagindo com complexo enzima-substrato (MIKANOVA, 2006; HINOJOSA et al., 2004, TEJADA et al., 2010), inibindo sua atividade no solo. A partir dos resultados obtidos com a enzima urease no presente estudo, pode-se inferir que o XR, mesmo quando utilizado em reaplicação com a maior dose ( $3.000 \text{ kg ha}^{-1}$ ) proporcionou efeitos benéficos sobre a atividade biológica do solo.

A atividade da enzima arilsulfatase, a qual participa do ciclo do S no solo, não foi influenciada pela aplicação do XR (Tabela 5.5). Possivelmente, a não ativação da arilsulfatase após a aplicação do XR, contendo 0,84% de S, deve estar relacionado à forma química com que o S encontra-se no XR. Segundo Pereira et al. (2003), o XR apresenta em sua composição, principalmente, S na forma elementar e de sulfeto, como discutido anteriormente no experimento sob condições controladas. Com isso, a aplicação do XR não promoveu o aporte de quantidades significativas de S orgânico ao solo, a fim de alterar a atividade da enzima arilsulfatase, a qual atua sobre o S orgânico, hidrolisando ligações do tipo éster de sulfato, o que libera íons sulfato (TABATABAI e BREMNER, 1970).

A análise do solo onde foi aplicado o XR indicou um aumento no teor de  $\text{SO}_4^{-2}$  no solo (apêndice A), comparado ao solo sem XR. Possivelmente, esse enxofre tenha sido gerado a partir da oxidação do S elementar e dos sulfetos presentes no XR, através da ação de bactérias quimiolitotróficas oxidantes de enxofre. Como o S elementar é insolúvel, as bactérias, como as do gênero *Thiobacillus*, consideradas de maior importância na oxidação de compostos reduzidos do S no solo (LENS et al., 2000), devem ligar-se aos cristais de enxofre para obter seu substrato (MADIGAN et al., 2010). Vários microorganismos heterotróficos também oxidam o S elementar a tiosulfato, tetracionato e pentacionato, resultando como produto final o sulfato no solo (KELLY et al., 1997). O aumento do teor de  $\text{SO}_4^{-2}$  no solo poderia diminuir a atividade da enzima arilsulfatase já que sua síntese e atividade são estimuladas em solos com baixos teores de S (PRIETZEL, 2001; SPEIR et al., 1980). Porém, resultados obtidos em solo com a aplicação de gesso agrícola como fonte de S mostram que a atividade da

arilsulfatase foi pouco influenciada pela adição de gesso (NAHAS et al., 1997; NOGUEIRA e MELO, 2003).

Os valores observados para a atividade da  $\beta$ -glicosidase, FDA e DHA (Tabela 5.5) estão dentro da faixa de variação estabelecida por Dick et al. (1996). Essas enzimas estão estreitamente relacionadas com as biotransformações do carbono no solo, sendo que a sua atividade normalmente é aumentada em solos que recebem material orgânico decomponível (FRANKENBERGER e DICK, 1983; TRANNNIN et al., 2007). Eivazi e Tabatabai (1988) descreveram que a atividade da  $\beta$ -glicosidase possui correlação positiva com a matéria orgânica do solo (MOS), e atua tanto na hidrólise da celobiose como também de oligossacarídeos, liberando açúcar (glicose) que servirá como fonte de carbono e energia para os microorganismos heterotróficos. A hidrólise do FDA é usada como indicador geral da atividade hidrolítica, incluindo proteases, lípases e esterases que também são capazes de clivar compostos fluorogênicos (TAYLOR et al., 2002). Já a DHA, é uma oxirredutase intracelular, apresenta-se somente em células viáveis e pode ser considerada uma medida direta da atividade microbiana, sua medida é considerada um bom indicador de poluição do solo (HINOJOSA et al., 2004; TEJADA et al., 2010), bem como um marcador capaz de indicar mudanças na atividade microbiana total em resposta a mudanças impostas pelo uso ou manejo do solo (CECCANTI et al., 1994; ROLDÁN et al., 2005). O fato da aplicação de XR não ter influenciado, significativamente, a atividade das enzimas  $\beta$ -glicosidase, FDA e DHA deve-se à baixa quantidade de C adicionada ao solo via XR e a qualidade desse carbono. No experimento de laboratório foi demonstrado que o C, presente no XR é altamente recalcitrante. Rodrigues et al. (2010), ao avaliarem o efeito da rochagem (aplicação de pó de basalto, Whitmarsum, MB4, XR, FX e Cal Xisto ao solo) na atividade enzimática da arilsulfatase e fosfatase ácida, sob a cultura do sorgo, também revelaram pouco efeito dos pós de rochas na atividade enzimática, atribuindo este efeito ao processo lento e gradual de liberação de nutrientes dos pós de rocha (AMPARO, 2003, SILVA et al., 2008).

A aplicação do XR na superfície do solo não afetou a atividade da enzima fosfatase ácida (Tabela 5.5). No XR são encontrados silicatos de cálcio e magnésio que poderiam estimular a atividade desta enzima, conforme observado por Yada et al. (2009), ao adicionar ao solo silicatos de cálcio (Fertion) com 10% de SiO<sub>2</sub>, 12% de Ca e 6% de Mg. Vidal (2008) verificou influência da aplicação de escória de siderurgia sobre enzimas de solo (FDA, fosfatase ácida, arilsulfatase) e atribuiu esses resultados à presença de micronutrientes que favoreceram, de maneira geral, a atividade microbiana do solo. Tendo em vista que estes materiais apresentam características semelhantes na sua constituição, como abundância de

silicatos, fornecimento de S e micronutrientes ao solo, era esperado um efeito maior do XR sobre a atividade da enzima fosfatase. Entretanto, essa comparação precisa ser feita com certo critério, pois, como já observado por Pereira et al., 2003, os silicatos presentes no XR apresentam uma menor solubilidade em comparação às escórias de siderurgia, isto se deve à maior temperatura durante o processo industrial que chega a 1500°C, enquanto que o processo de retortagem da extração do óleo de xisto não passa de 500°C. Tem-se ainda que o Fertion também apresenta temperaturas mais elevadas em seu processo industrial (de 1200 a 1300°C), certamente apresentando maior solubilidade. Os valores para a atividade da fosfatase ácida no presente trabalho estão dentro da faixa observada por Silveira (2007), de 117 a 1587  $\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ , para solos do Rio Grande do Sul.

Na figura 5.7 são apresentados os resultados da análise de regressão para as enzimas que tiveram sua atividade influenciada pelas doses de XR. Observa-se que o efeito das doses de XR foram maiores para a enzima urease, na qual o modelo ajustado foi o quadrático. Para as enzimas  $\beta$ -glicosidase, FDA e DHA observam-se baixa variação nos valores de atividade com o incremento das doses de XR, sendo que a DHA foi a única enzima que apresentou decréscimo linear em sua atividade com a aplicação do XR. O valor da atividade da DHA reduziu de 46  $\mu\text{g TTF g}^{-1} 24\text{h}^{-1}$  no tratamento controle para 26  $\mu\text{g TTF g}^{-1} 24\text{h}^{-1}$  no tratamento XR3.

Resultados obtidos em estudos realizados para avaliar a aplicação de doses crescentes de lodo de esgoto sobre características biológicas do solo apontam que a atividade das enzimas tende a aumentar com o acréscimo das doses desse material orgânico (GARCIA-GIL et al., 2000; MARCOTE et al., 2001; PASCUAL et al., 1999; ROS et al., 2003, CRECCHIO et al., 2004). No presente estudo, possivelmente, esse efeito não seja observado em função das características químicas do XR, o qual apresenta em sua composição, principalmente, compostos recalcitrantes, sendo, dessa forma, um substrato que contribui pouco para a atividade microbiana no solo.

Alguns autores têm revelado a necessidade de integrar as diferentes enzimas de solo (PUGLISI et al., 2006; TRASAR-CEPEDA et al., 2000; GARCÍA-RUIZ et al., 2008, GIL-SOTRES et al., 2005, MARCOTE et al., 2001). Nesse sentido, um método para aumentar o potencial das enzimas de solo na detecção da contaminação do solo pode ser combiná-las com o uso da análise multivariada, tendo sido proposta como forma de exibir simultaneamente todos os parâmetros medidos e diferenças relativas entre os tratamentos (NANNIPIERE et al., 2002; HINOJOSA et al., 2004).

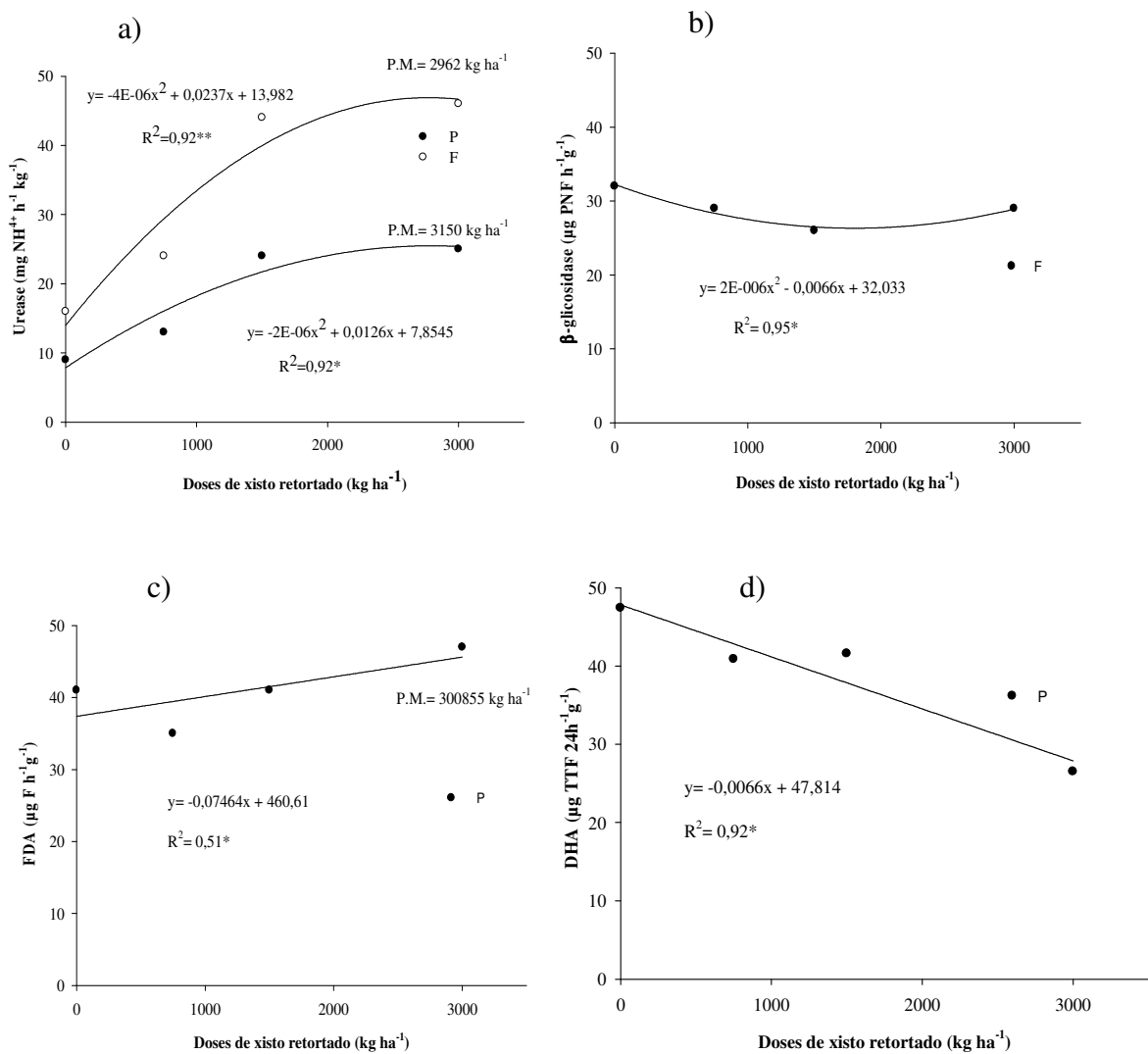


Figura 5.7 - Efeito do xisto retornado sobre indicadores ambientais em duas avaliações: plantio (P) e florescimento (F) da cultura do feijoeiro, no primeiro cultivo (a, b, c, d). PM=Ponto de máxima da curva.

No primeiro cultivo, a variabilidade dos dados foi explicada em 74% até a CP3 (soma da CP1, CP2 e CP3 sobre a significância) (Tabela 5.6). A CP1 explicou 38,6% dos resultados, onde a fosfatase ácida e a DHA tiveram maior contribuição para esta resposta, a CP2 apresentou uma parcela de 20,3% da resposta, destacando-se a urease e a  $\beta$ -glicosidase, a CP3 representou 14,9% nesta soma, sendo representada, principalmente, pela FDA. Já no segundo cultivo, a soma das três primeiras componentes (CP1, CP2 e CP3) explicou 71,45% dos resultados, onde a CP1 contribui em 29,78% da soma total, sendo representada, respectivamente, pela fosfatase ácida, arilsulfatase, DHA e FDA. A CP2 explicou 23,22% dos

resultados, sendo a  $\beta$ -glicosidase a representante deste eixo, e a CP3 representou 18,45% dos resultados, com destaque para a CBM.

Nos dois cultivos, o gráfico da ACP (Figura 5.8) permitiu segregar os diferentes tratamentos, onde foram observadas correlações para a adubação mineral e XR1, e inter-relação entre as duas maiores dosagens de xisto, a testemunha e o tratamento contendo XR sem o fertilizante mineral, apresentaram-se em quadrantes diferentes dos demais tratamentos.

No primeiro cultivo, os tratamentos NPK e XR1 estiveram correlacionados com as variáveis ambientais CBM, FDA, fosfatase ácida e  $\beta$ -glicosidase. Tendo esta última correlação negativa com a arilsulfatase, a qual foi responsiva pelos resultados apresentados pelos tratamentos XR S/NPK, seguido do XR3 e XR2. Por outro lado, a urease apresentou alta correlação com XR3 e, em menor grau, com o XR2 e XR S/NPK. A DHA apresentou alta correlação com a testemunha.

Tabela 5.6 - Coeficientes de estrutura (*loadings*) obtidos com a análise de componentes principais, obtidos através dos dados avaliados no florescimento da cultura do feijoeiro <sup>(1)</sup>.

Variável	1° Cultivo			2° Cultivo		
	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
Fosfatase àcida	<b>0.5093</b>	-0.1340	-0.1148	<b>0.5188</b>	0.1519	0.0193
Arilsulfatase	0.3746	-0.0976	0.3284	<b>0.4117</b>	-0.3265	-0.4111
DHA	<b>0.4826</b>	-0.0402	0.1776	<b>0.4032</b>	0.4429	-0.1447
FDA	0.2706	0.2844	<b>-0.7100</b>	<b>0.4429</b>	-0.4577	-0.0273
Urease	0.0847	<b>0.5820</b>	0.5683	0.3105	-0.3538	0.5404
$\beta$ -glicosidase	0.3354	<b>-0.5811</b>	0.1029	0.3091	<b>0.5555</b>	-0.0364
CBM	0.4174	0.4619	-0.0978	0.1019	0.1752	<b>0.7180</b>

<sup>(1)</sup> Valor em negrito refere-se à variável com o maior coeficiente associado ao componente principal.

No cultivo 2, pode-se observar que a urease foi a variável ambiental mais significativa na resposta à adubação mineral e a XR1, seguida da fosfatase ácida e FDA, as quais apresentaram alta correlação entre si. Entretanto, a arilsulfatase correlacionou-se com o XR2, seguido XR3, sendo esta hidrolase a principal variável resposta desses tratamentos. A CBM apresentou melhor correlação com o XR2 e NPK e foi responsável por parte da explicabilidade desses tratamentos, sendo correlacionada, num segundo momento, com a adição de XR isolada. Adicionalmente, a  $\beta$ -glicosidase e DHA estão interconectadas, e foram

responsáveis pela explicabilidade da resposta dos tratamentos contendo XR e NPK (isolados), da testemunha e da dose mínima de XR.

Através da tabela 5.7, pode-se observar que as variáveis analisadas no florescimento, foram significativas pela MANOVA para o cultivo 1 (Lambda Wilks's 0.00213  $p < 0.001$ ) e para o cultivo 2 (Lambda Wilks's 0.05309  $p < 0.0162$ ) (Tabela 5.7). Os dois anos de cultivo não foram comparados entre si, porque para uma análise com medidas repetidas é necessário um maior tempo de experimentação.

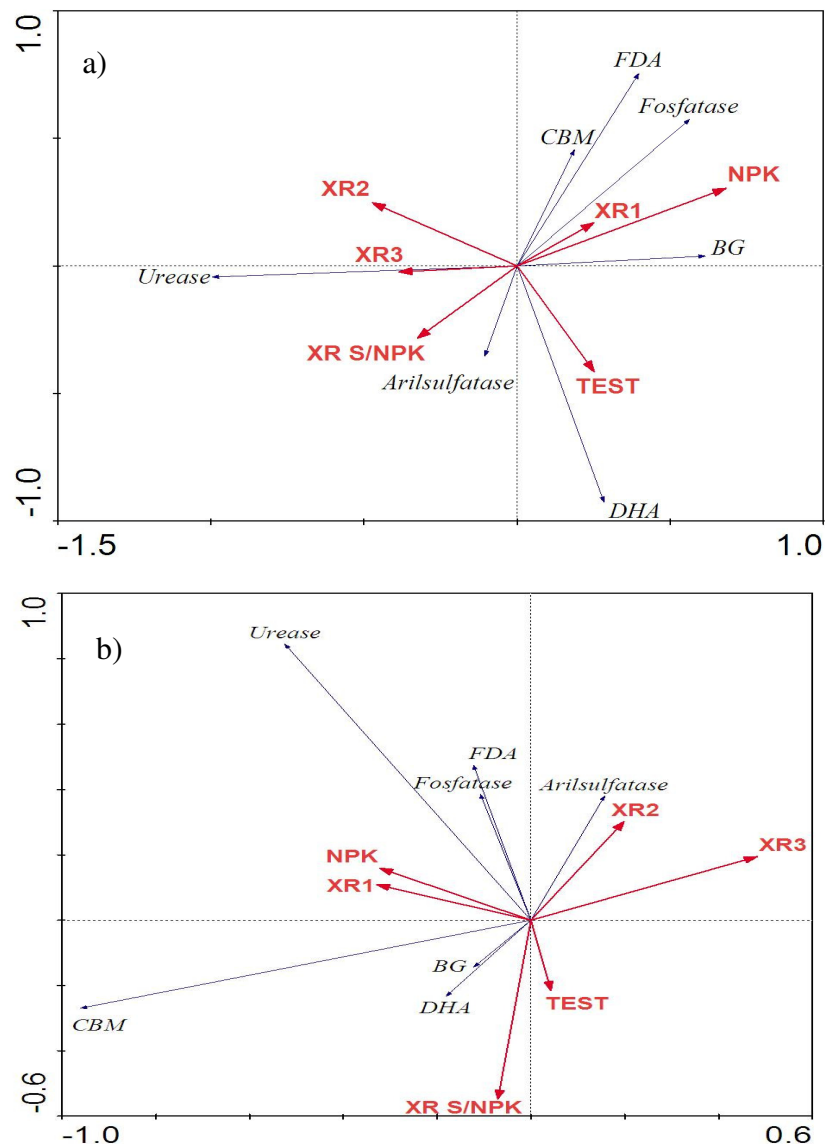


Figura 5.8 - Relação entre as componentes principais 1 e 2 (CP1 e CP2) da análise de componentes principais (ACP), discriminando a adubação mineral- NPK (NPK + XR0); XR1 (NPK + XR750); XR2 (NPK + XR1500); XR3 (NPK + XR3000); TEST (NPK0 + XR0) e XR S/NPK (NPK0+ XR1500), variáveis ambientais explicativas no primeiro cultivo (a) e no segundo cultivo (b). CBM= carbono da biomassa microbiana; FDA= hidrólise do diacetato de fluoresceína, DHA= desidrogenase e BG=  $\beta$ -glicosidase.

Os contrastes: C1, C2 e C3, foram realizados para detectar o efeito das diferentes doses de XR sobre as variáveis ambientais. No primeiro cultivo, o NPK + XR750 diferiu do do NPK + XR1500 e NPK + XR3000, os quais não diferiram entre si. Este resultado segue a mesma tendência verificada na ACP, onde a maioria dos indicadores, correlacionou seus índices ao NPK + XR750. Entretanto, na reaplicação do xisto, pode-se observar que o NPK + XR750 diferiu NPK + XR1500, porém não diferiu do NPK + XR3000. Assim, presume-se que a dose intermediária de xisto (1500 kg ha<sup>-1</sup>) apresentou sinergismo com a adubação mineral, alcançando melhores índices, com a explicabilidade baseada na arilsulfatase (CP1).

Tabela 5.7 - Teste multivariado dos efeitos simples, para comparação dos contrastes testados pela estatística de Wilks<sup>(1)</sup>.

<b>1° cultivo</b>			
	<b>Contraste</b>	<b>Wilks' Lambda</b>	<b>P</b>
C1	NPK + XR750 vs. NPK + XR1500	0.17331	<0.0001 <sup>a</sup>
C2	NPK + XR750 vs. NPK + XR300	0.16904	<0.0001 <sup>a</sup>
C3	NPK + XR1500 vs. NPK + XR3000	0.80044	0.6333
C4	NPK vs. Doses XR	0.10717	<0.0001 <sup>a</sup>
C5	NPK vs. XR	0.06130	<0.0001 <sup>a</sup>
<b>2° cultivo</b>			
	<b>Contraste</b>	<b>Wilks' Lambda</b>	<b>P</b>
C1	NPK + XR750 vs. NPK + XR1500	0.43776	0.0576 <sup>a</sup>
C2	NPK + XR750 vs. NPK + XR300	0.50412	0.1151
C3	NPK + XR1500 vs. NPK + XR3000	0.47714	0.0906 <sup>a</sup>
C4	NPK vs. Doses de XR	0.57355	0.2212
C5	NPK vs. XR	0.29384	0.0062 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Significância a 10% de probabilidade de erro.

O contraste quatro (C4) foi realizado com o intuito de verificar possíveis efeitos prejudiciais da aplicação de XR ao solo. Nesse sentido, C4 teve um efeito significativo com o aumento da dosagem de XR na primeira aplicação de xisto. Se for considerada apenas a fosfatase ácida e a DHA (CP1), verifica-se que o NPK + XR3000 teve melhores índices frente a adubação mineral, dentro do contraste proposto. Isto pode ter ocorrido devido ao aporte de enxofre ao solo pelo XR. O S é essencial para os organismos vivos, por fazer parte da constituição de proteínas e outros compostos orgânicos, e por ser fonte de energia para as bactérias litotróficas e acceptor de elétrons oriundos do metabolismo respiratório das bactérias redutoras de sulfato (TATE, 1995). Além de os teores de S disponível serem bastante baixos, principalmente nos solos tropicais, e não satisfazerem as necessidades das plantas

(CASTELLANO e DICK, 1990), alterações na condução das práticas agrícolas têm concorrido para diminuir a quantidade de S disponível (ERIKSEN et al., 1995, VITTI, 1988). Dessa forma, há necessidade de se aplicar fertilizantes que contenham S na forma elementar ou superfosfato simples (NAHAS, 1997; PINTO e NAHAS, 2002). Entretanto, na reaplicação, não foi encontrada significância, permitindo inferir que o XR não altera as variáveis biológicas do solo, constata-se que esses resultados corroboram com os relatos de Pereira e Vitti (2004), onde o acúmulo de metais pesados nas plantas não foi influenciado pela adição de até 12 Mg ha<sup>-1</sup> de XR; e de Martins et al. (2008), os quais afirmam que até o momento não foi observada toxidez por metais pesados com adição de rochas ao solo.

O contraste cinco (C5), entre XR e NPK, sem combinações, demonstrou significância frente ao teste de hipótese, para ambos os cultivos. Porém o XR2 esteve correlacionado com a testemunha pela ACP, o que indica que não causa danos ao solo.

### 5.3 Teste ecotoxicológico

No teste ecotoxicológico as amostras de solo que receberam doses equivalentes de 375, 750, 1.500 e 3.000 kg ha<sup>-1</sup> de XR (Tabela 5.8). Segundo a ISO (2002), a amostra é considerada tóxica quando mais de 80% dos organismos usados no teste são encontrados na amostra usada como controle. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo apresentaram um máximo de 60% na amostra controle para a dose de 3.000 kg ha<sup>-1</sup> de XR, indicando que o XR nas doses utilizadas não apresentou toxicidade ao ambiente. Segundo Lopes et al. (2004), se as populações naturais têm a habilidade de fugir do ambiente contaminado antes que efeitos letais ou subletais ocorram, então o desaparecimento desses animais é equivalente à erradicação da população inteira.

Tabela 5.8 – Teste de fuga com oligoquetas em solo tratado com doses crescentes de xisto retortado.

XR (Kg ha <sup>-1</sup> )	% de organismos	
	Controle	Tratamento
0	50,0	50,0
375	42,5	57,5
750	35,0	65,0
1500	47,5	52,5
3000	60,0	40,0



## 6 CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos no teste ecotoxicológico aliados aos resultados das enzimas, CBM e do  $qCO_2$ , indicam que a aplicação no solo dos subprodutos da extração do xisto não provoca a degradação biológica do solo.
2. A redução da emissão de  $CO_2$  pela aplicação do XR parece indicar que o uso do XR em solos agrícolas pode ser uma importante estratégia para promover a estabilização da MOS no solo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIACAO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS. NBR 12713: **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustácea)**. Rio de Janeiro, 17 p., 2004.

ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; BAZARIN, S.; MATALLO, M. B. Glyphosate: Influência na bioatividade do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. **Planta Daninha**, v.22 (1), p.95-100, 2004.

AFONSO, J.C. et al. Hydrotreatment of Irati Shale Oil: Behavior of the aromatic fraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.30, p.2133-2137, 1991.

ALEF, K. Estimation of the hydrolysis of fluorescein diacetate. In: ALEF, k. & NANNIPIERI, P. (Ed.) **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. New York: Academic Press, 1995. p. 232-233.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. London. Blackie A & P, 1993.

ANDRADE, S.A.L.; SILVEIRA, A.P.D. Biomassa e atividade microbianas do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.1191-1198, 2004.

ANDRÉA, M. M. et al. Glyphosate: Influência na bioatividade do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. **Planta Daninha**, v.22, p.95-100, 2004.

ANGERS, D.A. et al. Microbial and biochemical changes induced by rotation and tillage in a soil under barley production. **Canadian Journal of Soil Science**, v.73, p.39-50, 1993.

ANJOS, A.R.M. dos; REISSMAN, C.B. Influência dos resíduos da mineração do xisto no crescimento e no teor foliar de Cd, Co e Cr em plantas de aveia preta. **Ciência Rural**, v.26, p.75-79, 1996.

AMPARO, A. Farinha de rocha e biomassa. **Revista Agroecologia Hoje**, v.20, p.11, 2003.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> ( $qCO_2$ ) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.25, p.393-395, 1993.

ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R. Indicadores Biológicos de Qualidade do Solo. **Bioscience Journal**, v.23, p.66-75, 2007.

ARAÚJO, L.M. The atypical Permian petroleum system of the Paraná Basin, Brazil. In: Mello, MR.; Katz, b.J. (Eds). **Petroleum systems of South Atlantic margins:AAPG Memoir 73**, 2000.p.377-402.

ARUNACHALAN, A.; MELKANIA, N.P. Influence of soil properties on microbial populations, activity and biomass in humid subtropical mountains ecosystems of India. **Soil Biology & Biochemistry**, v.30, p.2217-2223, 1999.

ATKINSON, C.J.; FITZGERALD, J.D; HIPPS, N.A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. **Plant and Soil**, v.337, p.1-18, 2010.

BAGGIO, A. **Proposta para Remoção de Fenóis e Aplicação de Análises Quimiométricas no Estudo de Subproduto Líquido de Indústria Petroquímica**. 2007. 99p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BANDICK, A.K.; DICK, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology & Biochemistry**, v.31, p.1471-1479, 1999.

BARAK, R.; CHET, I. Determination, by fluorescein diacetate staining, of fungal viability during mycoparasitism. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 18, p. 315–319, 1986.

BARETTA, D. **Fauna do solo e outros atributos edáficos como indicadores de qualidade ambiental em áreas com *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. 2007. 158p. Dissertação (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BARROS, R.P., RAMOS, L.R.A. **Um modelo de crescimento para a indústria de xisto**. Rio de Janeiro: IPEA, 1982. n.4, p.57. (Documento preliminar do grupo de energia - texto para discussão).

BERTON, R.S. et al. Toxicidade do níquel em plantas de feijoeiro e efeitos sobre a microbiota do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1305-1312, 2006.

BOLTON, H. Jr. et al. Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effects of fertilization and cropping practices. **Soil Biology & Biochemistry**, v.17, p. 297-302, 1985.

BRASIL. **Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.** Portaria nº 402, de 22 de julho de 2010. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, 23 jul. 2010. Seção 1, p.3.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente.** Resolução CONAMA nº 375. Define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 167, p. 141-146, 30 ago 2006.

BROOKES, P.C.; POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.14, p.319-329, 1982.

BROOKES, P.C. et al. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.17, p. 837-842, 1985.

BROOKES, P.C.; POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.14, n.4, p.319-329, 1982.

BURNS, R.G. et al. Defining soil quality. In: Bloem, J.; Hopkins, D.W.; Benedetti, A. (Ed) **Microbiological methods for evaluating soil quality**. Cambridge.CABI Publishing, 2006.p.23-49.

CARTER, M.R. Microbial biomass as an index for tillage-induced changes in soil biological properties. **Soil & Tillage Research**, v.7, p.29-40, 1986.

CARVALHO FILHO, C. A; TRINDADE, M. C.; BRANCO, O. E. A. Contamination by Mercury from Past Gold Mining Activities at Descoberto, State of Minas Gerais, Brazil: Historical Reconstitution. **XIII International Conference on Heavy Metals in the Environment**, 2005.

CASTELLANO, S. D.; DICK, R. P. Cropping and sulfur fertilization influence on sulfur transformations in soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 54, p. 114-121, 1990.

CECCANTI, B. et al. .Biotests as markers of soil utilization and fertility. **Geomicrobiology Journal**, v. 11, p. 309-316, 1994.

CESSA, R.M.A.C. et al. Área superficial específica, porosidade da fração argila e adsorção de fósforo em dois Latossolos Vermelhos. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.33, p.1153-1162, 2009.

CETESB - Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. 2005. Decisão da Diretoria nº 195/2005. **Valores orientadores para solos e águas subterrâneas do estado de São Paulo**. 4p. Disponível em: [www.cetesb.sp.org.br](http://www.cetesb.sp.org.br). Acessado em: 30 dez. 2010.

CHANDER, K., BROOKES, P.C. Microbial biomass dynamics during decomposition of glucose and maize in metal-contaminated and non-contaminated soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 23, p. 917-925, 1991.

CHANDER, K.; JOERGENSEN, R.G. Decomposition of <sup>14</sup>C glucose in two soil with different amounts of heavy metal contamination. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.1811-1816, 2001.

CHANTIGNY, M.H.; ANGERS, D.A.; BEAUCHAMP, C.J. Active carbon pools and enzyme activities in soils amended with de-inking paper sludge. **Canadian Journal Soil Science**, v.80; p.99-105, 2000.

COSTA, E.A.; GOEDERT, W.J.; DE SOUZA, D.M.G. Qualidade do solo submetido a sistemas de cultivo com preparo convencional e plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1185-1191, 2006.

CRECCHIO, C. et al. Effect of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1595-1605, 2004.

DARWIN, C. **The formation of vegetable mould through the action of worms**. Murray, London, 326 p., 1881.

DEBOSZ, K.; PETERSEN, S.O.; KURE, L.K. & AMBUS, P. Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. **Applied Soil Ecology**, v.19, p.237-248, 2002.

DICK, R.P. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: Doran, J.W.; JONES, A.J. (Eds.), **Methods for assessing soil quality**. Madison: SSSA, 1996. p. 247-271.

DICK, R.P.; BREACKWELL, D.P.; TURCO, R.F. Soil enzyme activities And biodiversity measurements as integrative microbial indicators. In: Doran, J.W. et al (Eds.), **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: SSSA and ASA, 1994. p. 107-124. (SSSA Spec. Publ., 35).

DYNI, J. R. Geology and resources of some world oil-shale deposits. **Oil Shale Journal**, v. 20, p. 193-252, 2003.

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W. et al. (eds) **Defining soil quality for a sustanaible environment**. Madison: SSSA: ASA, 1994. p. 3-21.

DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. Soil Health and sustainability; managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.3-11, 2000.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M.A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 20, p. 601-606, 1998.

EMBRAPA. Centro Nacional e Pesquisa em Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa-SPI; Rio de Janeiro: Embrapa-Solos, 2006. 306 p.

ERIKSEN, J. et al. Sulphur mineralization in five Danish soils as measured by plant uptake in a pot experiment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 56, p. 43-51, 1995.

FACCI, I. dos S. **Variáveis microbiológicas como indicadoras da qualidade do solo sob diferentes usos**. Campinas, 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Gestão de Recursos Agroambientais) – Pós-Graduação-Instituto Agronômico de Campinas.

FRANCO, I. et al. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. **Geoderma**, v. 121, p. 17-30, 2004.

FRANCHINI, J.C. et al. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.92, p.18-29, 2007.

FRANKENBERGER, W.T.; DICK, W.A. Relationships between enzyme activities and growth and activity indices in soil. **Soil Science Society of American Journal**, v. 47, p. 945-951, 1983.

GAGNON, B.; LALANDE, R.; SIMARD, R.R. & ROY, M. Soil enzyme activities following paper sludge addition in a winter cabbage-sweet corn rotation. **Canadian Journal Soil Science**, v.80, p.91-97, 2000.

GARCÍA-GIL, J.C. et al. Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32, p.1907-1913, 2000.

GARCIA, M. V. B. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions**. Ecology and Development Series; Zentrum für 17 Entwicklungsforschung, University of Bonn, 281p., 2004.

GARCIA, M. V. B. et al. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, v.153, p. 450-456, 2008.

GARCÍA-RUIZ, R. et al.. Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40. p. 2137-2145, 2008.

GHINI, R.; MENDES, M. D. L.; BETTIOL, W. Métodos de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador da atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 239-242, 1998.

GIL-SOTRES, F. et al. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, p. 877-887, 2005.

GODOI, L. C. L. de. **Propriedades microbiológicas de solos em áreas degradadas e recuperadas na região dos cerrados goianos**. 2001. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

GONÇALVES, P. B. et al. **Disponibilidade de metais pesados em solos tratados com resíduos de xisto pirotetuminoso para o feijoeiro**. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Anais. Águas de Lindóia, SP, 2009. CD-ROM.

GRAYSTON, S.J.; JONES, D.V.D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with an annual plant: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, v.5, p.29-56, 1996.

HELLING, B.; REINECKE, S. A.; REINECKE, A. J. Effects of the fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida*, (Oligochaeta). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.46, p. 108-116, 2000.

HEMIDA, S.K.; OMAR, S.A.; ABDEL-MALLEK, A.Y. Microbial populations and enzymes activity in soil treated with heavy metal. **Water, Air and Soil Pollution**, v.95, p.13-22, 1997.

HINOJOSA, M.B. et al. Soil moisture pre-treatments effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1559-1568, 2004.

KELLY, D. P. et al. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 71, p. 95-107, 1997.

KENNEDY, A.C.; PAPENDICK, R.I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of soil and water conservation**, v.50, p.243-248, 1995.

KIMETU, J.M.; LEHMANN, J. Stability and stabilisation of biochar and green manure in soil with different organic carbon contents. **Australian Journal of Soil Research**, v.48, p.577-585, 2010.

LAABS, V. et al. Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. **Journal of Environmental Quality**, 31: 256-268, 2002.

LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere**, v.66, p. 1863-1871, 2007.

LAMBAIS, M.R.; CAMARGO, J.B. Impacto da aplicação de biossólidos na microbiota de solos tropical. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1129-1138, 2008.

LAL, R. **Métodos para avaliação do uso sustentável dos recursos solo e água nos trópicos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 97 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 3).

LANNA, A. C. **Impacto ambiental de tecnologias, indicadores de sustentabilidade e metodologias de aferição: uma revisão**. Santo Antônio do Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002 (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 144).



LAVELLE, P.; BAROIS, I.; CRUZ, I.; FRAGOSO, C.; HERNANDEZ, A.; PINEDA, A.; RANGEL, P. Adaptative strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. **Biology of Fertility of Soils**, v.5, p.188-194, 1987.

LENS, P.; TICHY, R.; POL, L. H. Sulfur cycle. In: LEDERBERG, J. (Ed.). **Encyclopedia of microbiology**. 2. ed. San Diego: Academic, 2000. v. 4, p. 495-505.

LOPES, I., BAIRD, D. J.; RIBEIRO, R. Avoidance of copper contamination by field populations of *Daphnia longispina*. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 23, p. 1702-1708, 2004.

MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A.R. Programa estatístico WinStat: **sistema de análise estatístico para Windows**. Pelotas, RS, 2003. Disponível em: <http://minerva.ufpel.edu.br/~amachado/WinStat.EXE>.

MACHADO, N.R.C.F.; MIOTTO, M.M.D. Utilização de xisto retornado como matéria-prima em síntese de zeólitas. **Acta Science Technology**, v.28, p.39-45, 2006.

MADIGAN, M.T., et al. **Microbiologia de Brock**. 12ed Artmed: São Paulo, 2010. 1128 p.

MARCOTE, I. et al. Influence of one or two successive annual applications of organic fertilisers on the enzyme activity of a soil under barley cultivation. **Bioresource Technology**, v.79, p.147-154, 2001.

MARTENS, D.A.; JOHANSON, J.B.; FRANKENBERGER, W.T.Jr. Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues. **Soil Science**, v.153, p.53-61, 1992.

MARTINS, E.D.; RESENDES, A.V.; MATOS, M.S.F. Agrominerais – Rochas silicáticas como fontes minerais alternativos de potássio para a agricultura. In: Luz, A. B.; Lins, F.F. (Ed). **Rochas e Minerais industriais**. Rio de Janeiro: CETEM, 2008. p. 205-223.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M.E.; GLÓRIA, N.A. **LCE – 502 – Uso de resíduos na agricultura**. Piracicaba, ESALQ, 2000.5p.

MATSUOKA, M.; MENDES, I.C.; LOUREIRO, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p.425-433, 2003.

MELLO, F.A.F. et al. **Fertilidade do solo**. 3 ed. São Paulo, Nobel, 1989. 400p.

MELO, W.J. Uso de resíduos na agricultura e qualidade ambiental. In: Silveira, A.P.D.; Santos, S.S. (Ed) **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas, SP. Instituto Agronômico Campinas, 2007. p.275-297.

MENDES, I.C.; VIVALDI, L.A. A dinâmica da biomassa e atividade microbiana em uma área sob mata da galeria na região do Distrito Federal. In: RIBEIRO, J.F.; FONSECA, C.L.; SOUZA-SILVA, J.C. (Eds). **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001.

MENDES, I.C et al. **Bioindicadores para a avaliação da qualidade dos solos tropicais: utopia ou realidade?** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 31p (Embrapa Cerrados. Documentos, 246).

MIKANOVA, O. Effects of heavy metals on some soil biological parameters. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 8, p.220-223, 2006.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ªedição, Editora UFLA, 2006. 623 p.

NAHAS, E.; DELFINO, J.H.; ASSIS, L.C. Atividade microbiana e propriedades bioquímicas do solo resultantes da aplicação de gesso agrícola na cultura do repolho. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.54, n.3, p.160-163, 1997.

NANNIPIERI, P.; KANDELER, E.; RUGGIERO, P. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil, in: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), **Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications**. Dekker Marcel, New York, 2002.p.1-33.

NICOLINI, J. et al. Characterization of Brazilian oil shale byproducts planned for use as soil conditioners for food and agro-energy production. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. In press 2010.

NOGUEIRA, M.A.; MELO, W.J. Enxofre disponível para a soja e atividade de arilsulfatase em solo tratado com gesso agrícola. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27. p.655-663, 2003.

NOVAK, J.M. et al. Short-term CO<sub>2</sub> mineralization after additions of biochar and switchgrass to a Typic Kandudult. **Geoderma**, v. 154, p.281–288, 2010.

OLIVEIRA, J. R. A. et al. Microbiological properties of a cerrado soil under conventional and integrated forage and annual cropping systems. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SOIL FUNCTIONING UNDER PASTURES IN INTERTROPICAL AREAS, 2000. Brasília. **Extendend abstracts...** Planaltina: Embrapa Cerrados: IRD, 2000. 1 CD-ROM Section 3.

O'NEILL, R.V. et al. **A hierarchical concept of ecosystems**. Princeton: Princeton University Press, 1986. 263p.

PASCUAL, J.A.; GARCIA, C.; HERNÁNDEZ, T. Lasting microbiological and biochemical effects of the addition of municipal solid waste to an arid soil. **Biology Fertility Soils**, v.30,p.1-6, 1999.

PATI, S.S., SAHU, S.K. CO<sub>2</sub> evolution and enzyme activities (dehydrogenase, protease e amylase) of fly ash amended soil in the presence and absence of earthworms (*Drawida willsi* Michaelsen) under laboratory conditions. **Geoderma**, Amsterdam, v.118, p. 289-301, 2004.

PEREIRA, H. S.; VITTI, G. C. Efeito do uso do xisto em características químicas do solo e nutrição do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v.22, p. 317-322, 2004.

PEREIRA, H. S.; VITTI, G. C.; KORNDORFER, G. H. Comportamento de diferentes fontes de silício no solo e na cultura do tomateiro. **Revista Brasileira de Ciência de Solo**, v.27, p. 101-108, 2003.

PEREIRA, I. dos S. **Adubação de pré-plantio no crescimento, produção e qualidade da amoreira-preta (*Rubus* sp)**. Pelotas, 2008. 148f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas.

PETROBRAS. Disponível em: [http://www2.petrobras.com.br/minisite/refinarias/petrosix/portugues/oxisto/oxisto\\_reservas.ap](http://www2.petrobras.com.br/minisite/refinarias/petrosix/portugues/oxisto/oxisto_reservas.ap)  
Acesso em: 02/02/2011.

PICHTEL, J.R., HAYES, J.M. Influence of fly ash on soil microbial activities and populations. **Journal of Environmental Quality**. Madison, v.19, p.593–597, 1990.

PINTO, C.R.; NAHAS, E. Atividade e população microbiana envolvida nas transformações do enxofre em solos com diferentes vegetações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1751-1756, 2002.

PIMENTEL, P.M. et al. Characterization of retorted shale for use in heavy metal removal. **Applied Clay Science**, v.48, p.375-378, 2010.

PIMENTEL, P.M. *et al.* Caracterização e uso de xisto para adsorção de chumbo (II) em solução. **Cerâmica**. v. 52, p.194-199, 2006.

PRIETZEL, J. Arylsulfatase activities in soils of the Black Forest/Germany– seasonal variation and effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fertilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1317-1328, 2001.

PUGLISI, E.; DEL RE, A.A.M.; GIANFREDA, L. Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p. 1673-1681, 2006.

RAMOS, A. S.; CASTILHOS, Z. C.; EGLER, S. G.; Avaliação ecotoxicológica de solo contaminado por mercúrio metálico utilizando o oligoqueta *Eisenia foetida*. In: **XIV Jornada de Iniciação Científica**, Rio de Janeiro, 2006.

REDDY, K.J.; LINDSAY, W.L. The solubility relationships of calcium and magnesium minerals in processed oil shells. **Journal of Environmental Quality**, v.15, p.1-4, 1986.

REVISTA PETRO & QUÍMICA. v. 28, n.263, ago. 2004. Rio de Janeiro. [**Revista Científica**] Valette Editora Técnica.

RIBERA, D. et al. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia foetida, andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p. 1123-1130, 2001.

ROCHA, N. M. S. **Emissões de óxido nitroso e indicadores microbiológicos da qualidade de um gleissolo sob aplicação de dejetos animais**. Porto Alegre. 2009.52f. (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RODRIGUES, G. C. et al. **Efeito de pós de rocha na atividade enzimática do solo**. In: 29ª Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. Anais. Guarapari, ES, 2010. CR-ROM.

RODRIGUES, G. S.; CAMPANHOLA, C.; KITAMURA, P. C. Avaliação de impacto ambiental da inovação tecnológica agropecuária: um sistema de avaliação para o contexto institucional de P&D. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.19, n. 3, p. 349-375, 2002.

RODRIGUES, N. L. V. B.; PAWLOWSKY, U. Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado de resíduos, classe II A – não inertes e classe II B – inertes. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.12, p. 8-16, 2007.

ROGERS, B.F.; TATE, R.L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1389-1401, 2001.

ROLDÁN, A. et al. Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions. **Geoderma**, v.129, p.178-185, 2005.

RÖMBKE, J.; SOUSA, J. P.; SCHOUTENC, T.; RIEPERTD, F. Monitoring of soil organisms: a set of standardized field methods proposed by ISO. **European Journal of Soil Biology**, 42: 61 – 64, 2006.

ROS, M.; HERNÁNDEZ, M.T.; GARCÍA, C. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, p.463-469, 2003.

SAS. **SAS/STAT® User Guide Release 6.03 Cary NC**: SAS Institute, 1998.

SCOUTEN, C.S. **Fuel Science and technology Handbook**. Marcel Dekker, New York, 1990.

SILVA, E.A. et al. Efeito da roçagem e resíduos orgânicos sobre aspectos químicos e microbiológicos de um subsolo exposto e sobre o crescimento de *Astronium fraxinifolium* Schott. **Revista Árvore**, v.32, p. 323-333, 2008.

SILVA, E.E. da; AZEVEDO, P.H.S. de; DE-POLLI, H. **Determinação do carbono da Biomassa Microbiana do Solo (BMS-C)**. Seropédica. Embrapa Agrobiologia, 2007. 6p. (Embrapa Agrobiologia, Comunicado Técnico 98).

SILVEIRA, A. O. **Atividades enzimáticas como indicadores biológicos da qualidade de solos agrícolas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2007. 94 f.. Dissertação (Mestrado Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVEIRA, C.A.P. et al. **Efeito da combinação de calcário de xisto e calcário dolomítico sobre a produtividade de grãos e de dois sistemas de rotação de culturas**. In: MARTINS,

E.S.; THEODORO, S.H. (Eds) Anais I Congresso Brasileiro de Rochagem, DF. Embrapa Cerrados, 2010. p.215-218.

SISINNO, C. L. S. et al. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia foetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. **Revista brasileira da sociedade de ecotoxicologia**, v.1 (2), p. 41-44, 2006.

SOUZA, C.A. et al. Lodo de esgoto em atributos biológicos do solo e na nodulação e produção de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1319-1327, 2009

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

SPARLING, G.P; WEST, A.W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial respiration and <sup>14</sup>C labeled cells. **Soil Biology & Biochemistry**, v.20, p. 337-343, 1988.

SPEIR, T.W. et al. A comparison of sulphatase, urease and protease activities in planted and fallow soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 12, p. 281-291, 1980.

STACHIV, R. **Modelagem e simulação do processo de adsorção de compostos orgânicos em xisto, catalisador exaurido de FCC e carvão ativado em pó**. Paraná, 2008. 237f.. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

STARK, J.M.; REDENTE, E.F. Plant uptake and cycling of trace elements on retorted oil shale disposal piles. **Journal of Environmental Quality**, v.19, n.3, p. 495-501, 1990.

STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C.A. (Org.) **Agronomy 9**, Part 2., Madison: American Society of Agronomy, 1965. p.1550-1572.

TABACHNICK, B.G.; FIDELL, L.S. **Using multivariate statistics**. 5.ed. Boston: Pearson Allyn & Bacon. 2007. 980p.

TABATABAI, M. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W.; SCOTT, A.; BOTTOMELEY, P. J., (eds) **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: **Soil Science Society of America**, Part 2; 1994. p. 778-835. (Special Publication, 5).

TATE, R. L. The sulfur and related biogeochemical cycles. In: TATE, R. L. (Ed.). **Soil microbiology**. New York: J. Willey, 1995. p. 359-373.

TAYLOR, J. P. et al. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 387-401, 2002.

TEJADA, M. Application of different organic wastes in a soil polluted by cadmium: Effects on soil biological properties. *Geoderma*, v.153, p.254-268, 2009.

TEJADA, M.; et al. The biochemical response to different Cr and Cd concentrations in soils amended with organic wastes. **Journal of Hazardous Materials**. In press 2010.

TER BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows**: Software for canonical community ordination (version 4). New York: Microcomputer Power, 1998.

THALMANN A. Zur methodik der bestimmung der dehydrogenase aktivitat triphenyltetrazolium chlorid (TTC) im bodem mittels. **Landwirtsch Forch**, v.21, p.249-258, 1968.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. **Tópicos em ciência do solo**, v.2, p. 195-276, 2002.

TRANNIN, I.C. de B.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M. de S. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de biossólido industrial e cultivo de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1173-1184, 2007.

TRASAR-CEPEDA, C. et al. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p.1867-1875, 2000.

TRINDADE, A.V.; GRAZZIOTTI, P.H.; TÓTOLA, M.R. Utilização de características microbiológicas na avaliação da degradação ou recuperação de uma área sob mineração de ferro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.683-688, 2000.

TYLER, G. Heavy metal pollution and soil enzymatic activity. **Plant and Soil**, v.41, p.301-311, 1974.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, Background report on fertilizer use, contaminants and regulations, Washington, 1999.

VERSTRAETE, W.; VOETS, J.P. Soil microbial and biochemical characteristics in relation to soil management and fertility. **Soil Biology & Biochemistry**, v.19, p. 251-258, 1977.

VIDAL, A. de A. **Escória de siderurgia na cultura do arroz: Fonte de silício e a interação com o Nitrogênio**. São Paulo, 2008. 111f.. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

VITTI, G.C. **Avaliação e interpretação do enxofre no solo e na planta**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 37p.

WARDLE, D. A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 67, p. 321-358, 1992.

WARDLE, D. A.; HUNGRIA, M. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 195-216.

YADA, M. M. et al. **Adição de silicato e a alteração da atividade microbiana do solo**. Synergismus Scientifica UTPR, 4: 2009. Disponível em: <http://revistas.utfpr.edu.br/pb/index.php/SysScy/article/view/617>. Acessado em: 30 dez. 2010.

XISTO AGRÍCOLA. **Caracterização mineralógica, química, microbiológica e espectroscópica – Avaliação de risco dos sólidos de xisto**. Relatório Técnico. Pelotas, 70p, 2006.

XISTO AGRÍCOLA. **Avaliação da eficiência agrônômica de matrizes fertilizantes a base de xisto (MBR) em sistemas de produção de culturas anuais**. Relatório Técnico. Pelotas, 45p, 2008.

XISTO AGRÍCOLA. **Avaliação da eficiência agrônômica da matriz fertilizante MBR7 na cultura do trigo**. Relatório Técnico. Pelotas, 9p, 2009.a

XISTO AGRÍCOLA. **Variações no pH em água e na condutividade elétrica do extrato de saturação de solo decorrentes da aplicação de calcário de de xisto, finos de xisto e xisto retornado**. Relatório Técnico. Pelotas, 7p, 2009.b



ZHAO, Y. et al. The effects of two organic manures on soil properties and crop yields on a temperate calcareous soil under a wheat maize cropping system. **European Journal of Agronomy**, v.32, p.36-45, 2009.

## APÊNDICES

### Apêndice A – Atributos químicos do solo avaliados no cultivo do feijoeiro.

Tratamentos	% MO	% Argila	pH H <sub>2</sub> O	Índice	P	S	K	Al	Ca	Mg	H + Al	CTC ef	CTC pH7	SB %
	-----m/v-----		1:1	SMP	-----mg L <sup>-1</sup> -----			-----Cmolc L <sup>-1</sup> -----						
<b>Experimento 1 - Florescimento</b>														
Testemunha	1,82a	16,0a	5,45a	6,3a	31,02a	7,5b	0,27a	0,175a	3,3ab	1,22a	3,35a	5,00a	8,17ab	59,37a
NPK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XR (750 kg ha <sup>-1</sup> ) + NPK	1,90a	14,0a	5,70a	6,2a	16,02a	8,6b	0,27a	0,00a	4,4a	1,6a	3,50a	6,30a	9,80a	63,90a
XR (1500 kg ha <sup>-1</sup> ) + NPK	1,92a	15,0a	5,50a	6,5a	31,07a	10,72ab	0,27a	0,05a	3,9ab	1,45a	2,50a	5,67a	8,12b	69,10a
XR (3000 kg ha <sup>-1</sup> ) + NPK	1,95a	15,5a	5,35a	6,5a	31,30a	15,25a	0,27a	0,125a	3,7ab	1,22a	2,45a	5,35a	7,67b	67,42a
XR (1500kg ha <sup>-1</sup> ) S/NPK	1,80a	18,0a	5,30a	6,3a	23,10a	11,5ab	0,42a	0,225a	3,0b	1,05a	2,90a	4,72a	7,40b	60,26a
CV %	10,00	20,39	5,10	3,19	38,63	19,34	41,71	95,35	16,31	23,00	23,53	15,47	9,20	12,59
<b>Experimento 2 - Início (7 dias)</b>														
Testemunha	1,37b	7,75a	5,80a	6,97a	36,92b	3,92d	0,25a	0,00a	2,70a	0,87a	1,30a	3,82a	5,12b	74,12a
NPK	1,65ab	11,50a	5,80a	6,92a	55,07ab	7,87c	0,48a	0,00a	3,65a	1,17a	1,45a	5,30a	6,75a	78,45a
XR (750 kg ha <sup>-1</sup> ) + NPK	1,55ab	10,00a	5,80a	6,95a	44,00ab	8,25bc	0,33a	0,00a	3,42a	1,15a	1,52a	4,90a	6,42ab	76,15a
XR (1500 kg ha <sup>-1</sup> ) + NPK	1,55ab	9,50a	5,72a	7,05a	46,6ab	7,12cd	0,32a	0,00a	3,47a	1,07a	1,52a	4,90a	6,37ab	76,22a
XR (3000 kg ha <sup>-1</sup> ) + NPK	1,55ab	10,25a	5,72a	7,05a	65,97a	12,37a	0,31a	0,00a	3,35a	1,00a	1,30a	4,67a	5,97ab	77,95a
XR (1500kg ha <sup>-1</sup> ) S/NPK	1,72a	9,75a	5,72a	6,9a	37,80b	6,35cd	0,21a	0,00a	3,42a	1,00a	1,57a	4,65a	6,22ab	74,3a
CV %	9,69	25,5	3,34	1,37	25,2	19,95	42,17	0,00	15,48	19,55	11,97	14,89	10,22	5,45
<b>Experimento 2 - Florescimento</b>														
Testemunha	1,70a	10,75ab	5,32a	6,40b	50,57a	7,20a	0,25a	0,12a	3,65ab	0,79a	2,84ab	4,80ab	7,52a	62,22ab
NPK	1,70a	11,75ab	5,20a	6,35b	48,87a	5,02a	0,25a	0,17a	2,88b	0,72a	3,00a	4,02b	6,85a	56,60ab
XR (750 kg ha <sup>-1</sup> ) + NPK	1,65a	14,25a	5,37a	6,60ab	37,77a	4,62a	0,24a	0,10a	3,16b	0,83a	2,22ab	4,35ab	6,45a	65,60ab
XR (1500 kg ha <sup>-1</sup> ) + NPK	1,67a	13,75ab	5,35a	6,45ab	27,35a	5,20a	0,22a	0,15a	2,81b	0,72a	2,67ab	3,90b	6,42a	58,22b
XR (3000 kg ha <sup>-1</sup> ) + NPK	1,77a	8,75b	5,32a	6,45ab	48,85a	6,60a	0,28a	0,10a	3,26ab	0,67a	2,65ab	4,32ab	6,87a	61,47ab
XR (1500kg ha <sup>-1</sup> ) S/NPK	1,50a	8,75b	5,55a	6,80a	52,30a	7,50a	0,22a	0,02a	4,48a	0,83a	1,75b	5,60a	7,32a	75,77a
CV %	10,25	21,26	4,08	2,58	31,02	23,08	12,82	101,00	17,09	14,97	20,8	12,69	9,88	10,91

**Apêndice B – Atividade enzimática do solo após 90 dias de incubação com doses crescentes de xisto retornado.** <sup>(1)</sup>

Parâmetro	Experimento 2 - 90 dias							CV %
	xisto retornado							
	0	300	450	600	750	1500	3000	
	-----kg ha <sup>-1</sup> -----							
β-glicosidase <sup>(2)</sup>	32,81a	30,24ab	26,83b	32,49a	26,90b	27,47b	28,34ab	5,65
DHA <sup>(3)</sup>	25,43a	22,33ab	21,85ab	11,52c	18,44abc	23,10ab	15,40bc	16,96
FDA <sup>(4)</sup>	57,48ab	63,00a	57,64ab	52,08b	57,96ab	53,00b	51,37b	5,18
Fosfatase ácida <sup>(2)</sup>	82,71b	86,65ab	93,37a	86,58ab	82,05b	85,28ab	85,28ab	48,15
Ariulfatase <sup>(2)</sup>	11,27a	10,50a	10,05a	8,02b	10,44a	11,61a	10,21a	8,17
Urease <sup>(5)</sup>	29,89a	17,00b	20,34ab	13,14b	16,44b	20,32ab	18,11b	29,8
CBM <sup>(6)</sup>	55,88b	90,26a	71,75ab	73,08ab	69,23ab	64,78b	70,63ab	37,04

(1) Valores seguidos por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05). <sup>(2)</sup> μg de PNF g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, <sup>(3)</sup> μg TTF g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, <sup>(4)</sup> μg de fluoresceína g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; <sup>(5)</sup> mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; <sup>(6)</sup> mg kg<sup>-1</sup>.

**Apêndice C – Quadro de análise estatística realizados para experimentos em condições de campo com variáveis que apresentaram significância frente à regressão polinomial sob a influência do xisto retornado.**

<b>DHA - Ano 1 - Plantio</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	3	484.53	161.51	-	-
Doses	3	948.45	316.15	18.075	0,2178
Resíduo	9	1574.15	174.90	-	-
Total	15	3007.14	-	-	-

<b>FDA - Ano 1 - Plantio</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	3	79428.49	26476.16	-	-
Doses	3	115142.82	38380.94	1.948	0.1924
Resíduo	9	177288.13	19698.68	-	-
Total	15	371859.43	-	-	-

<b>Urease - Ano 1 - Plantio</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	3	15.11	5.03	-	-
Doses	3	902.45	300.81	94.458	4,02E-04
Resíduo	9	28.66	3.18	-	-
Total	15	946.22	-	-	-

<b>Urease - Ano 1 - Florescimento</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	3	39.79	13.26	-	-
Doses	3	2672.42	890.80	107.19	2,32E-04
Resíduo	9	74.79	8.31	-	-
Total	15	2787.01	-	-	-

<b><math>\beta</math>-Glicosidase - Ano 1 - Florescimento</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	3	210.74	70.24	-	-
Doses	3	70.96	23.65	2.615	0.115
Resíduo	9	81.39	9.04	-	-
Total	15	363.11	-	-	-

<b>Carbono da biomassa microbiana - Ano 2 - Plantio</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	3	3225.91	1075.30	-	-
Doses	3	2974.21	991.40	0.786	0.5309
Resíduo	9	11339.53	1259.95	-	-
Total	15	17539.65	-	-	-

**Apêndice D – Quadro de análise estatística realizados para experimentos em condições laboratoriais com variáveis que apresentaram significância frente a regressão polinomial sob a influência do xisto retornado.**

<b>Arilsulfatase - XR - 15 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	7.34	3.67	-	-
Doses	3	454.06	151.35	146.23	5.34E-006
Resíduo	6	6.21	1.03	-	-
Total	11	467.61	-	-	-

<b>Urease - XR - 15 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	184.82	92.41	-	-
Doses	3	2548.07	849.36	31.76	0.00044
Resíduo	6	160.45	26.74	-	-
Total	11	2893.35	-	-	-

<b>DHA - XR - 30 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	12.88	6.44	-	-
Doses	3	66.34	22.11	3.633	0.08376
Resíduo	6	36.52	6.08	-	-
Total	11	115.74	-	-	-

<b><math>\beta</math>-Glicosidase - XR - 60 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	21.04	10.52	-	-
Doses	3	1698.33	566.11	65.327	5.67E-005
Resíduo	6	51.99	8.66	-	-
Total	11	1771.38	-	-	-

**Apêndice E – Quadro de análise estatística realizados para experimentos em condições laboratoriais com variáveis que apresentaram significância frente à regressão polinomial sob a influência dos finos de xisto.**

<b>Arilsulfatase - FX - 15 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	0.254	0.127	-	-
Doses	3	17.93	5.97	69.261	4.78E-005
Resíduo	6	0.517	0.086	-	-
Total	11	18.70	-	-	-

<b>Urease - FX - 15 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	9.90	4.95	-	-
Doses	3	1791.78	597.26	19.145	0.00178
Resíduo	6	187.18	31.19	-	-
Total	11	1988.86	-	-	-

<b>Fosfatase Àcida - FX - 30 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	11237.20	5618.60	-	-
Doses	3	38913.02	1297.01	82.176	0.01515
Resíduo	6	9479.69	1578.45	-	-
Total	11	59620.92	-	-	-

<b>Fosfatase Àcida - FX - 30 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	0.035	0.017	-	-
Doses	3	15.47	5.15	4.497	0.0559
Resíduo	6	6.88	1.14	-	-
Total	11	22.38	-	-	-

**Apêndice F – Quadro de análise estatística realizados para experimentos em condições laboratoriais com variáveis que apresentaram significância frente à regressão polinomial sob a influência do calcário de xisto.**

<b>DHA - CX - 30 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	17.72	8.86	-	-
Doses	3	58.35	19.45	0.911	0.4894
Resíduo	6	128.06	21.34	-	-
Total	11	204.15	-	-	-

<b>FDA - CX - 30 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	63.34	31.67	-	-
Doses	3	189.81	63.27	3.58	0.08581
Resíduo	6	105.88	17.64	-	-
Total	11	359.04	-	-	-

<b>DHA - CX - 60 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	69.75	34.87	-	-
Doses	3	1471.57	490.52	92.99	2,03E-02
Resíduo	6	31.64	5.27	-	-
Total	11	1572.97	-	-	-

<b>FDA - CX - 60 dias</b>					
Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Bloco	2	10.44	5.22	-	-
Doses	3	116.80	38.93	55.395	0.03653
Resíduo	6	42.17	7.02	-	-
Total	11	169.40	-	-	-

## ANEXOS

### Anexo A - Atividade da Fosfatase ácida.

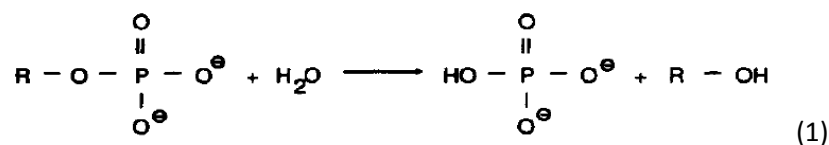
(Tabatabai, 1994)

#### Princípio do método

O método é baseado na determinação do  $\rho$ -nitrofenol formado após a incubação do solo com  $\rho$ -nitrofenilfosfato de sódio tamponado por 30 min a 37°C.

O tratamento  $\text{CaCl}_2\text{-NaOH}$  descrito para a extração do  $\rho$ -nitrofenol depois da incubação serve (a) para parar a atividade da fosfatase (b) para desenvolver a cor amarela usada para estimar este fenol, e (c) dar a recuperação quantitativa do  $\rho$ -nitrofenol do solo.

Fosfatases catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato e são enzimas de especificidade relativamente alta, capazes de ativar diferentes estruturas aliado ao substrato. A fosfatase (EC 3.1.3) catalisa a reação irreversível:



#### Soluções

Tampão universal (MUB) solução estoque: pesar 12,10g de TRIS, 11,60g de ácido maleico, 14,00 g de ácido cítrico e 6,30 g de ácido bórico e colocar em bécker de 1000 mL. Adicionar 500 mL de solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> e dissolver, transferir para balão volumétrico de 1000mL e completar o volume com água deionizada. Armazenar a 4°C.

Tampão universal (MUB) pH 6,5: pipetar 200 mL de solução estoque de tampão universal modificada e colocar em bécker de 500 mL. Adicionar sob constante agitação, solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup> até atingir pH 6,5. Transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água deionizada.

Solução de cloreto de cálcio (0,5 M): pesar 7,35 g de cloreto de cálcio, dissolver, e completar o volume para 100 mL.



Solução de NaOH (0,5M): pesar 2,00 g de hidróxido de sódio, dissolver e completar o volume para 100 mL.

Solução de p-nitrofenilfosfato de sódio (PNF, 1,28 mM): pesar 5 mg de p-nitrofosfato de sódio e dissolver com 1 mL de tampão MUB (pH 6,5). Preparar na hora do uso.

Solução padrão de p-nitrofenol: dissolve 1g de p-nitrofenol em cerca de 70 mL de água destilada e eleva a solução a 1000 mL com água destilada. Armazenar a 4°C.

### Procedimento

Pesar 0,5g de solo úmido peneirado (2 mm) em um Erlenmeyer (100 mL) e tratado com 2 mL de MUB (pH 6,5) e 0,5 mL de solução de p-nitrofenilfosfato de sódio. Depois os frascos são agitados manualmente e incubados por 30 min a 37°C. Após a incubação, adicionar 0,5 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,5 M) e 2 mL de NaOH (0,5 M). Agitar e deixar reagir por 30 min e filtrar. A medida da absorbância é feita em 400 nm. Para os controles é adicionada água destilada no mesmo volume do substrato (0,5 mL).

A cor do p-nitrofenol é estável por 24 h.

### Curva de calibração

Diluir 1 mL da solução padrão de p-nitrofenol a 100 mL com água destilada em balão volumétrico. Então pipete 0; 0,3; 0,7; 1,0; 1,3; 1,7; 2,0 e 2,5 mL de alíquota da solução diluída em tubos de ensaio, ajustar o volume a 2,5 mL adicionando água destilada, e proceder como descrito para a análise de p-nitrofenol das amostras de solo incubadas.

### Cálculo

$$U(\%) = (PU - PS) * 100 / TU \quad (2)$$

$$Fc = (100 / 100 - U\%)$$

Onde U% é a umidade percentual PU é o peso úmido de uma amostra de 5g, PS é peso seco após 24h a 105°C, Fc é fator de correção da umidade.

$$\rho\text{-Nitrofenol } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}) = \frac{\{(C/FC) \times V \times FD\} \times Fc \times t}{P} \quad (3)$$

Onde C é a concentração medida de p-nitrofenol ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  filtrado), FC é o fator de correção plotado com a curva padrão, v é o volume total da solução de solo em mililitros, FD é o fator

de diluição (usado para amostras cujo valor ultrapassou a concentração máxima da curva padrão),  $F_c$  é o fator de correção da umidade,  $t$  é o tempo de incubação em horas e  $P$  é o peso da amostra de solo usada (0,5 g).

## Anexo B - Atividade da Arilsulfatase.

(Tabatabai, 1994)

### Princípio do método

O método é baseado na determinação do  $\rho$ -nitrofenol formado após a incubação do solo com  $\rho$ -nitrofenilfosfato de sódio por 1h a 37°C.

Sulfatases catalisam a hidrólise de ésteres de sulfato orgânico e tem sido detectada em microorganismos plantas e animais e sua atividade aumenta com a secagem ao ar. A Arilsulfatase (EC 3.1.6.1) catalisa a reação irreversível:



### Soluções

Tampão acetato pH 5,8: Dissolver 38,59g de acetato anidro em becker, contendo aproximadamente 500mL de água deionizada. Acertar o pH com ácido acético glacial até pH 5,8, completar volume para 1000mL.

Solução de  $\rho$ -nitrofenil sulfato de potássio 0,005M: Dissolver 0,1287g de  $\rho$ -nitrofenil sulfato de potássio em 50ml de solução tampão acetato (0,5M pH 5,8), transferir para balão de 100mL com solução tampão, guardar no congelador em geladeira por uma semana.

Os demais reagentes seguem a mesma descrição para a fosfatase.

### Procedimento

Pesar 0,5g de solo úmido peneirado (2 mm) em um Erlenmeyer (100 mL) e tratado com 2 mL de tampão acetato (pH 5,8) e 0,5 mL de solução de  $\rho$ -nitrofenil sulfato de potássio. Depois os frascos são agitados manualmente e incubados por 1h a 37°C. Após a incubação, adicionar 0,5 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0,5 M) e 2 mL de NaOH (0,5 M). Agitar e deixar reagir por 30 min e filtrar. A medida da absorbância é feita em 400 nm. Para os controles é adicionada água destilada no mesmo volume do substrato (0,5 mL). A leitura deve ser realizada imediatamente após a filtração e não devem ser analisadas mais de 15 amostras devido a instabilidade da filtrado.

A curva de calibração e os cálculos seguem as prescrições para a fosfatase.

## Anexo C - Atividade da $\beta$ -Glicosidase.

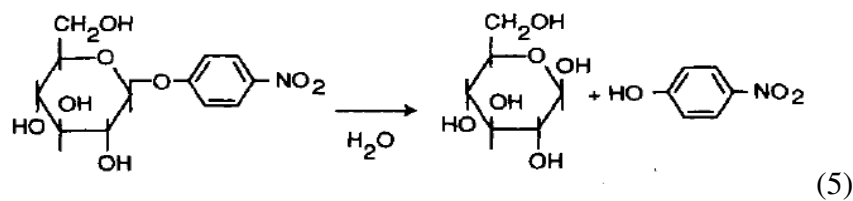
(Tabatabai, 1994)

### Princípio

O método é baseado na determinação colorimétrica do  $p$ -nitrofenol formado através da  $\beta$ -glicosidase, quando o solo é incubado com solução de PNG tamponada 1h a 37°C.

O tratamento  $\text{CaCl}_2$ -THAM é necessária para uma eficiente extração do  $p$ -nitrofenol do solo, porém tem o mesmo propósito do  $\text{CaCl}_2$ -NaOH.

$\beta$ -glicosidase é uma enzima limitante na degradação microbiana da celulose para glicose. A enzima (EC 3.2.1.21) catalisa a hidrólise de glicosídeos de acordo com a seguinte reação:



### Soluções

Tampão universal, pH 6,0: em 200 mL de MUB da solução estoque em um Becker de 500 mL e titular a solução com HCl até atingir pH 6,0. Transferir para um balão volumétrico de 1L e completar o volume.

$p$ -nitrofenol- $\beta$ -D-glicosídeo (PNG) 0,025 M: dissolver 0,377g de PNG em 40 mL de MUB (pH 6,0), após a dissolução, completar a solução para 50 mL com MUB (pH 6,0), após a dissolução, completar a solução para 50 mL com MUB (pH 6,0). Estocar a solução em geladeira (no máximo por 4 dias).

Tampão tris (hidroximetil) aminometano (THAM) (0,1M), pH 12: Dissolver 12,2 g de THAM em cerca de 800 mL de água destilada, ajustar o pH da solução para 12 por titulação com NaOH, e elevar a 1000 mL.

As demais soluções seguem a mesma descrição para a fosfatase.

### Procedimento

Pesar 0,5g de solo úmido peneirado (2 mm) em um Erlenmeyer (100 mL) e tratado com 2 mL de MUB (pH 6,0) e 0,5 mL de solução de  $p$ -nitrofenol- $\beta$ -D-glicosídeo. Depois os frascos são

agitados manualmente e incubados por 1h a 37°C. Após a incubação, adicionar 0,5 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0,5 M) e 2 mL de THAM (pH 12). Agitar e deixar reagir por 30 min e filtrar. A medida da absorbância é feita em 400 nm. Para os controles é adicionada água destilada no mesmo volume do substrato (0,5 mL).

A curva de calibração e os cálculos seguem as prescrições para a fosfatase.

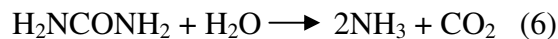
## Anexo D - Atividade da Urease.

(Tabatabai, 1994)

### Princípio

O método se baseia na determinação da amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) formado depois da incubação de amostras de solo com solução de uréia por 2 h a  $37^\circ\text{C}$ .

A enzima urease catalisa a hidrólise da uréia a  $\text{CO}_2$  e  $\text{NH}_3$  com o mecanismo de reação baseado na formação do carbamato como intermediário.



### Soluções

Tampão THAM (pH 9,0) 0,05 M: Dissolve 6,1 de THAM em 700 mL de água destilada, adicionar ácido sulfúrico (0,2M) até o pH atingir 9,0 e completar para 1 L.

Uréia 0,2M: dissolver 1,2g de uréia em 80 mL do tampão completando posteriormente para 100 mL com o mesmo tampão.

Cloreto de potássio (2,5M) sulfato de prata (100 ppm) KCl –  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ : dissolver 100 mg de  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  em 700 mL de água destilada, após adicionar 188g de KCl nesta solução e completar para 1L.

Solução padrão Amônia: Dissolver 0,234g de sulfato de amônio em 700mL de água e completar para 1 L. Cada mL contém  $50 \mu\text{g N-NH}_4^+$ .

Indicador de solo: Dissolver 20g de ácido bórico em 800 mL de água destilada quente ( $50-60^\circ\text{C}$ ). Esfriar, ajustar o volume e transferir para um frasco de volume adequado. Adicionar 100 mL de etanol e a solução de indicador preparada dissolvendo 0,0132 g de verde de bromocresol e 0,0066g de vermelho de metila em 100 mL de etanol. Agitar e titular adicionando cuidadosamente NaOH 0,05 M até pH 5,1, onde mal se observe uma leve mudança de cor roxo para verde claro. Esta solução pode ser conservada indefinitivamente.

### Procedimento

Foram pesados 5g de solo referente às amostras em erlenmeyer de 250 mL e adicionaram-se 9 mL de THAM (0,05M) pH 9 e 1 mL de solução com uréia ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ), deixando os por 2 horas em repouso na incubadora a  $37^\circ\text{C}$ .

Após este período foram adicionados 35 mL de KCl – Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para que a reação fosse interrompida deixando os frascos por 5 minutos á temperatura ambiente, completando-os posteriormente para 50 mL de KCl – Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e agitando por alguns segundos.

Filtrar para snapers com tampa vedante.

Para a estimativa de amônia liberada foram pipetados 10 mL de suspensão de solo resultante dentro de um frasco de destilação contendo 0,2g MgO em pó calcinado, destila-se para erlenmeyer de 125mL, com 5 mL de indicador de solo, destilar 40 mL, onde se determina o N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> liberado pelo vapor da destilação através da titulação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,0025 mol L<sup>-1</sup>), a reação passa da cor verde para rosa, de acordo com Tedesco et al (1995).

Para cada amostra foi feita amostra controle, sendo que é adicionada água destilada em no mesmo volume do substrato.

### **Cálculo**

Corrigir os resultados com os controles.

Para a determinação da atividade da urease usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{N-NH}_4^+ (\text{mg kg}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}) = \frac{C \times V \times \text{NR} \times 1000 \times \text{Fc}}{P \times t} \quad (7)$$

Onde C é a concentração medida de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, V é o volume total da solução de solo em mililitros, NR é a normalidade real do ácido, Fc é o fator de correção da umidade, t é o tempo de incubação em horas e P é o peso da amostra de solo usada (0,5 g).

## **Anexo E - Hidrólise do Diacetato de Fluoresceína (FDA).**

(Alef, K., 1995)

### **Princípio**

O método se baseia na formação fluoresceína sódica depois da incubação de amostras de solo com solução de diacetato de Fluoresceína por 3 h a 24°C.

Esta técnica pode ser utilizada para estimar a atividade microbiana de cultura de células puras ou em solos.

Compostos fluorogênicos podem ser transformados por enzimas (lípsases, esterases e proteases) em substâncias fluorescentes. Esta reação pode ser catalisada pela presença de células intactas (microrganismos, algas, protozoários e tecido animal) com exceção de esporos e de células que se encontram em fase de crescimento estacional.

### **Soluções**

Fosfato trissódico dodeca-hidratado  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : solução tampão fosfato de sódio (60mM, pH 7,6): dissolver 22,74 g de fosfato de sódio em 800 mL de água destilada, ajustar o pH para 7,6 com ácido clorídrico e completar para 1000 mL.

Solução de diacetato de fluoresceína (FDA): dissolver 2 mg mL<sup>-1</sup> de FDA em acetona e estocar a -20°C.No momento da determinação diluir a solução estoque 1:18 (111 µg mL<sup>-1</sup>) com água destilada; Para cada mL de tampão adicionado ao teste adicionar 100µL da solução de FDA .

Solução padrão 2,6 mM: dissolver 0,1 g de fluoresceína sódica em 100mL de água destilada.

### **Procedimento**

O solo deve ser peneirado em peneira com abertura de malha de 2 mm. Pesar 2g de solo úmido. Transferir a amostra em Erlenmeyer de 250 ml e adicionar de 25 mL de tampão fosfatado pH 7,6. Adicionar 2,5 mL de diacetato de fluoresceína (FDA) nas amostras. Para cada amostra foi desenvolvido um controle sem substrato, com adição 2,5 ml de água destilada. Incubar em BOD a 24°C por 3h. Encerrar a atividade através da adição de acetona até a concentração final de 50% v/v (25 mL). Filtrar e realizar leitura a 490nm.

### **Curva de calibração**



Da solução padrão de fluoresceína sódica pipetar (0,0) (0,05) (0,1) (0,2) (0,5) (1,0) e (2,0) mL transferir para balão volumétrico de 100 mL e ajustar o volume com solução tampão.

A concentração final nos balões é de (0,0) (0,5) (1,0) (2,0) (5,0) (10,0) e (20,0)  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **Cálculo**

Corrigir os resultados para o controle e calcular a fluoresceína por mililitro de filtrado com referência na curva padrão.

Fluoresceína ( $\mu\text{g}$  de fluoresceína  $\text{g}^{-1}$  de solo  $\text{h}^{-1}$ ) =

$$\frac{\{(C/FC) \times V\} \times FD \times Fc / t}{P} \quad (7)$$

Onde C é a de fluoresceína ( $\mu\text{g}$  de fluoresceína  $\text{g}^{-1}$  de solo  $\text{h}^{-1}$ ), FC é o fator de correção plotado com a curva padrão, v é o volume total da solução de solo em mililitros, FD é o fator de diluição (usado para amostras cujo valor ultrapassou a concentração máxima da curva padrão), Fc é o fator de correção da umidade, t é o tempo de incubação em horas e P é o peso da amostra de solo usada (2 g).

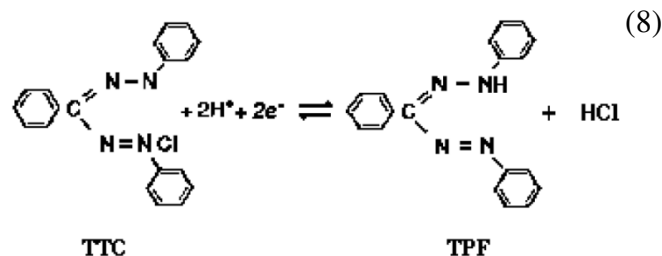
## Anexo F - Atividade da Desidrogenase (DHA).

(Thalman, 1968)

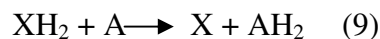
### Princípio

Sais de tetrazolium são representativos de uma única classe de compostos. Estes compostos têm combinações de propriedades desejáveis. Eles tem sais de  $\text{NH}_4^+$  quaternário e, como tal, tem alto grau de solubilidade em água. A solubilidade em água varia consideravelmente e depende da natureza e propriedade do grupo substituído. A solubilidade do TTC (Cloro de trifeniltetrazolium) é suficientemente alta para permitir que o sal seja usado em solução aquosa. Este tetrazolium incolor ou de baixa coloração tem a propriedade de ser facilmente transformada em formazam, intensamente colorido, insolúvel em água e solúvel em metanol e acetona, por redução. O aparente potencial redox do TTC é em torno de  $-0.08 \text{ V}$ , que faz deste composto um aceptor para muitas desidrogenases (Tabatabai, 1994).

O método descrito é baseado na extração com acetona e determinação colorimétrica do TTF produzido da redução do TTC em solos. A transformação ocorre através da ruptura de anéis, e a reação geral é dada por:



A oxidação biológica de compostos orgânicos é geralmente um processo de desidrogenação, e muitas são as desidrogenases, que são altamente específicas. O processo geral para a desidrogenase pode ser representado pela seguinte reação:



Onde  $\text{XH}_2$  é um composto orgânico (doador de elétrons) e A é um aceptor de hidrogênio. A enzima desidrogenase parece aparentemente cumprir um significativo papel na oxidação de matéria orgânica do solo como a transferência de H de substratos para aceptores. Estes sistemas são uma parte integral dos microorganismos. Portanto, o resultado para a

metodologia da desidrogenase mostraria a atividade média da população ativa (Tabatabai, 1994).

### Soluções

Tampão TRIS-HCl (100 mM): Pesar 12,10g de TRIS (hidroximetilaminometano) em Becker de 1000 mL, adicionar 700 mL de água deionizada e acertar o pH para 7,8 através da adição de HCl, transferir para balão volumétrico de 1000mL e completar o volume

Solução cloreto de trifeniltetrazolium TCC: pesar a quantidade de TTC e dissolver em tampão TRIS-HCl (100 mL), 0,1g para solos arenosos com baixo teor de matéria orgânica, 1g para solos argilosos, e 1,5g para solos argilosos com elevado teor de matéria orgânica. Deve ser preparado na hora do uso.

Solução de trifenil formazan TTF: 500 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>: pesar 50mg de TTF e dissolver com 80 mL de acetona, completar o volume para 100 mL.

### Procedimento

Pesar 5g de solo em tubos de digestão em duplicata e um tubo para o branco. Adicionar 5 mL de solução de TTC. Tampar com rolha, incubar a 30°C por 24horas. Na amostra em branco adicionar 5 mL de solução tampão TRIS (sem TTC). Após a incubação adicionar 20 mL de acetona, agitar e esperar uma hora, completar para 40 mL, agitar e filtrar. Realizar a leitura a 546nm.

### Curva de calibração

Da solução padrão de trifenil formazan (TTF) pipetar (0,0) (0,5) (1,0) (2,0) (3,0) e (4,0) mL transferir para balão volumétrico de 50 mL e adicionar 8,3 mL de tampão Tris-HCl e completar o volume com acetona.

A concentração final nos balões é de (0,0) (5,0) (10,0) (20,0) (30,0) e (40,0)  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

### Cálculo

Corrigir os resultados para o controle e calcular o trifenil formazan por mililitro de filtrado com referência na curva padrão.

( $\mu$ g TTF g<sup>-1</sup> solo seco 24 h<sup>-1</sup>) =

$$\frac{C \times V \times Fc}{P} \quad (10)$$

Onde  $C$  é a concentração medida de trifenil formazan ( $\mu\text{g TTF g}^{-1}$  solo seco  $\text{h}^{-1}$ ),  $F_c$  é fator de correção da umidade,  $V$  é o volume total da suspensão de solo e  $P$  é o peso de solo usado no teste.

Anexo H – Fluxograma do processo Petrosix® (Petrobrás, 2011).

