

Atividade microbiana e enzimática em solo após a aplicação de xisto retornado

Marta Eliane Doumer⁽¹⁾, Sandro José Giacomini⁽¹⁾, Carlos Augusto Posser Silveira⁽²⁾, Douglas Adams Weiler⁽¹⁾, Leonardo Mendes Bastos⁽¹⁾ e Luana Liberalesso de Freitas⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Solos, Caixa Postal 221, CEP 97105-900 Santa Maria, RS. E-mail: martaelianedoumer@gmail.com, sjgiacomini@gmail.com, douglasweiler@yahoo.com.br, leonardombastos@gmail.com, luh_liberalesso@hotmail.com ⁽²⁾Embrapa Clima Temperado, Rodovia BR 392, Km 78, Caixa Postal 403, CEP 96010-971 Pelotas, RS. E-mail: augusto.posser@cpact.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de doses crescentes de xisto retornado (XR) sobre características biológicas indicadoras da qualidade do solo. Foram realizados experimentos, em Argissolo Vermelho distrófico arênico, em condições de laboratório e de campo. Em laboratório, os tratamentos consistiram da aplicação ao solo de sete diferentes doses de XR (0, 300, 450, 600, 750, 1.500 e 3.000 kg ha⁻¹). Em campo, os tratamentos foram compostos por quatro diferentes doses de XR (0, 750, 1.500, 3.000 kg ha⁻¹) combinadas à adubação mineral recomendada, avaliados em dois cultivos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), no sistema plantio direto. Avaliaram-se: a evolução de CO₂, o carbono da biomassa microbiana (CBM), a atividade enzimática do solo e o teste de ecotoxicidade. A aplicação de doses crescentes de XR melhorou a atividade microbiológica do solo, por reduzir a emissão de CO₂ sem causar variação no CBM e sem provocar 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 de CBM, do quociente metabólico (qCO₂) e do teste ecotoxicológico, em condições de laboratório, indicam que o uso do XR não provoca a degradação biológica do solo.

Termos para indexação: biomassa microbiana, ecotoxicidade, enzimas do solo, mineralização do carbono, qualidade do solo.

Microbial and enzymatic activities in the soil after application of retorted oil shale

Abstract – The objective of this study was to assess the effect of increasing doses of retorted oil shale (ROS) application on the biological property indicators of soil quality. Experiments were carried out, under field and laboratory conditions, on a Hapludalf soil. In the laboratory, the treatments consisted of the application of seven different ROS rates (0, 300, 450, 600, 750, 1,500 and 3,000 kg ha⁻¹) to the soil. In the field, the treatments were composed by four different ROS rates (0, 750, 1,500 and 3,000 kg ha⁻¹) combined with the recommended mineral fertilizer rate, evaluated in two croppings of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), under no-till system. CO₂ evolution, microbial biomass carbon (MBC), soil enzyme activity and the ecotoxicity test were evaluated. Application of increasing ROS rates improved the soil microbial activity by decreasing CO₂ emission and causing no variations in MBC nor negative impacts on the soil enzymatic activity. The results obtained with the enzymes under field conditions, after two ROS applications, allied to MBC results, and to the metabolic quotient (qCO₂) and to the ecotoxicity test, under laboratory conditions, show that the use of ROS cause no soil biological degradation.

Index terms: microbial biomass, ecotoxicity, soil enzymes, carbon mineralization, soil quality.

Introdução

O Brasil possui uma das maiores reservas mundiais de xisto, o qual apresenta em sua matriz mineral o querogênio, um complexo orgânico que se decompõe termicamente, produzindo óleo e gás. Na exploração do xisto, são gerados diversos subprodutos, dos quais se destaca o rejeito sólido proveniente da pirólise da rocha, o xisto retornado (XR). Este subproduto representa 80 a 90% do volume de xisto (6.600 Mg) processado diariamente na Unidade de Industrialização do Xisto

(Pimentel et al., 2006), instalada em São Mateus do Sul (PR) sobre a Formação Irati, que contém a maior reserva brasileira de xisto. O grande volume de XR gerado e a necessidade de sua disposição no ambiente são os principais problemas que limitam o desenvolvimento da indústria do xisto (Stark & Redente, 1990).

O XR apresenta estrutura lamelar, com argilominerais aluminossilicatos como principais constituintes e área superficial específica de 65 m² g⁻¹ (Miotto & Machado, 2006; Pimentel et al., 2006), além de elevado teor de

silício, entre outros elementos minerais essenciais às plantas (Pereira & Vitti, 2004). Essas características podem viabilizar sua aplicação na síntese de materiais zeolíticos adsorptivos (Miotto & Machado, 2006) e, na agricultura, como fertilizante (Pereira & Vitti, 2004). Com relação ao seu uso em solos agrícolas, o XR pode melhorar as condições físicas e aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo. No entanto, o XR apresenta compostos como hidrocarbonetos (Afonso et al., 1991) e metais pesados (Stark & Redente, 1990; Anjos & Reissmann, 1996) e, conforme a dose aplicada, pode provocar a contaminação do solo. Contudo, resultados sobre os efeitos da aplicação de XR sobre indicadores da qualidade do solo não foram localizados na literatura.

Alterações na qualidade do solo, provocadas pela aplicação de subprodutos, são frequentemente avaliadas por meio das características biológicas do solo (García-Gil et al., 2000; Trannin et al., 2007; Lambais & Carmo, 2008; Souza et al., 2009). Em geral, a quantidade de C na biomassa microbiana, o quociente metabólico (qCO_2) e a atividade enzimática do solo são indicadores sensíveis e precoces de distúrbios naturais e antropogênicos (Lambais & Carmo, 2008; Lagomarsino et al., 2009). Atualmente, testes ecotoxicológicos estão sendo incluídos em protocolos de monitoramento da contaminação dos solos (Sisinno et al., 2006). Assim, estudos nessa área são importantes para auxiliar na recomendação do uso do XR na agricultura.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de doses crescentes de xisto retornado (XR) sobre as características biológicas indicadoras de qualidade do solo.

Materiais e Métodos

Em condições controladas de laboratório, de janeiro a novembro de 2010, foram realizados experimentos para avaliar a atividade e o carbono da biomassa microbiana (CBM), a atividade enzimática e a ecotoxicidade, após a aplicação do XR ao solo. Em todos os experimentos, o solo utilizado foi um Argissolo Vermelho distrófico arênico coletado da camada 0–10 cm. Com exceção do experimento para avaliar a ecotoxicidade, em que o solo utilizado foi coletado em área sob campo nativo, nos demais experimentos, o solo foi oriundo de uma área que estava sendo manejada sob plantio direto.

O XR foi proveniente da Unidade de Industrialização do Xisto, em São Mateus do Sul, PR. A coleta do XR foi realizada em outubro de 2008, dois dias após a sua saída do processo de retortagem, e foram coletados aproximadamente 5 Mg de XR. Após a coleta, o XR foi moído e armazenado em sacos de ráfia, com capacidade para 50 kg, mantidos em local seco e ao abrigo do sol e da chuva. O XR utilizado nos experimentos apresentava granulometria <0,3 mm e características químicas conforme resultados apresentados na Tabela 1.

A atividade microbiana foi avaliada em dois experimentos, o primeiro com duração de 60 dias e o segundo com 90 dias. No experimento 1, os tratamentos avaliados foram: solo + 750 kg ha⁻¹ de XR (XR750); solo + 1.500 kg ha⁻¹ de XR (XR1500); solo + 3.000 kg ha⁻¹ de XR (XR3000); e o controle com solo, sem o XR (XR0). No experimento 2, foram

Tabela 1. Caracterização química do lote de xisto retornado (XR), coletado na Superintendência da Industrialização do Xisto, em São Mateus do Sul, PR, utilizado nos experimentos, e concentração máxima permitida (CMP) para metais pesados em condicionadores de solo.

Parâmetro ⁽¹⁾	Xisto retornado	CMP ⁽²⁾
Sólidos (%)	96,2	-
Nitrogênio total (mg kg ⁻¹)	152	-
C (%) ⁽³⁾	6,16	-
Fósforo (mg kg ⁻¹)	1.547	-
Potássio (mg kg ⁻¹)	2.746	-
Cálcio (mg kg ⁻¹)	11.325	-
Enxofre (mg kg ⁻¹)	840	-
Magnésio (mg kg ⁻¹)	2.146	-
Boro (mg kg ⁻¹)	76	-
Zinco (mg kg ⁻¹)	112	-
Manganês (mg kg ⁻¹)	233	-
Molibdênio (mg kg ⁻¹)	7,1	-
Cobalto (mg kg ⁻¹)	14	-
Sódio (mg kg ⁻¹)	1.675	-
Cloreto (mg kg ⁻¹)	359	-
Níquel (mg kg ⁻¹)	18	175
Cobre (mg kg ⁻¹)	69	-
Ferro (mg kg ⁻¹)	12.934	-
Sílica + insolúveis (%)	71,8	-
Arsênio (mg kg ⁻¹)	6,8	20
Selênio (mg kg ⁻¹)	<0,4	80
Mercúrio (mg kg ⁻¹)	0,19	2,5
Cromo (mg kg ⁻¹)	7,7	500
Chumbo (mg kg ⁻¹)	22	300
Cádmio (mg kg ⁻¹)	<0,042	8

⁽¹⁾Determinado pela Bioagri Ambiental. ⁽²⁾De acordo com a Portaria do MAPA número 402 (Brasil, 2010). ⁽³⁾Determinado no Laboratório de Microbiologia do Solo e Ambiente da Universidade Federal de Santa Maria.

avaliados os mesmos tratamentos do experimento 1, tendo sido incluídos outros três tratamentos: solo + 300 kg ha⁻¹ de XR (XR300); solo + 450 kg ha⁻¹ de XR (XR450); e solo + 600 kg ha⁻¹ de XR (XR600). Nos dois experimentos, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Cada unidade experimental foi montada separadamente. Em recipientes cilíndricos de acrílico, foram colocados 114,4 g de solo úmido (100 g de solo seco a 105°C), cuja umidade foi elevada à capacidade de campo. A quantidade de XR adicionada ao solo foi proporcional à dose equivalente por hectare, considerando sua incorporação à camada de 0–10 cm de um solo com densidade de 1,5 g cm⁻³. Assim, a quantidade de XR adicionada ao tratamento XR3000 foi de 2 g kg⁻¹ solo seco (12,3 mg de C kg⁻¹ de solo). A mistura do solo úmido com o XR foi realizada manualmente, com auxílio de espátula e, em seguida, foi compactada até a densidade de 1,2 g cm⁻³. 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 CO₂ presente na atmosfera interior do frasco.

A avaliação da emissão de CO₂ 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 O₂, os frascos de vidro foram periodicamente abertos, para promover a renovação da atmosfera interna. Os tratamentos permaneceram em incubadora, nas mesmas condições das unidades experimentais utilizadas na avaliação da emissão de CO₂. O CO₂ liberado em cada tratamento foi captado em 10 mL de solução de NaOH 1 mol L⁻¹, cujo excesso foi titulado com solução de HCl 1 mol L⁻¹ (Stotzky, 1965).

O CBM e a atividade enzimática no solo foram avaliados aos 15, 30 e 60 dias após a incubação dos tratamentos do experimento 1. Para isso, foram montadas 36 unidades experimentais (quatro tratamentos x três repetições x três datas de avaliação), as quais foram acondicionadas em potes de vidro em triplicata. 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, em ausência de luz e com temperatura controlada à 28±2°C.

O CBM foi avaliado pelo método da fumigação-extração conforme Vance et al. (1987), com aplicação do fator de correção Kc de 0,33, expresso pela fração do C da CBM recuperado após o processo de fumigação-extração (Sparling & West, 1988). Com base nos valores de CBM e da emissão de CO₂ medida até os 15 e 30 dias, foi determinado o qCO₂, cujo valor representa a razão entre o C-CO₂ e o C da biomassa, medido no período considerado (Anderson & Domsch, 1993). A atividade enzimática do solo foi avaliada pela medida de cinco enzimas: a atividade da desidrogenase (DHA), determinada conforme Thalmann (1968); a atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), conforme Alef (1995); a atividade da fosfatase ácida, da β-glicosidase, da urease e da arilsulfatase, conforme descrito em Tabatabai (1994).

No solo dos tratamentos XR0 e XR1500, foram realizadas análises de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), em amostras coletadas no momento da incubação e 60 dias depois desta. As amostras de solo foram enviadas à Bioagri Ambiental (Piracicaba, SP), para a análise dos seguintes HPA: 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 HPA, na Bioagri Ambiental, foram realizadas conforme as metodologias SVOC's POP PA 76/USEPA 8270, 3535 (United States Environmental Protection Agency, 1996).

A ecotoxicidade foi avaliada no ensaio de comportamento, conforme a International Organization for Standardization (2002). O organismo utilizado no teste foi a minhoca da espécie *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). Foram testadas as doses de 375, 750, 1.500 e 3.000 kg ha⁻¹ de XR. Para isso, amostras de 400 g de solo, com e sem XR e à umidade a 60% da capacidade de campo, foram colocadas no mesmo recipiente, separadas por meio de uma divisória móvel, que formava 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 deste ensaio é a exposição simultânea das minhocas

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.

O experimento a campo foi desenvolvido no ano de 2010, na área experimental do Departamento de Solos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, a 29°45'S, 53°42'W e à altitude de 95 m. O clima da região, segundo Köppen, é classificado como subtropical úmido, tipo Cfa2. O solo da área é um Argissolo Vermelho distrófico arênico (Santos et al., 2006), com os seguintes atributos químicos na camada de 0–10 cm: pH, 5,4; matéria orgânica, 18 g kg⁻¹; P, 31 mg dm⁻³; K, 105 mg dm⁻³; Mg, 1,2 cmol_c dm⁻³; Ca, 3,3 cmol_c dm⁻³; e H + Al, 2,3 cmol_c dm⁻³.

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições, em parcelas de 25 m² (5 m x 5 m). Os tratamentos avaliados na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) foram: adubação mineral com NPK (NPK + XR0); NPK + 750 kg ha⁻¹ de XR (NPK + XR750); NPK + 1.500 kg ha⁻¹ de XR (NPK + XR1500); e NPK + 3.000 kg ha⁻¹ de XR (NPK + XR3000). A adubação mineral foi realizada ao plantio, aplicada à linha de semeadura, e consistiu de 150 kg ha⁻¹ de NPK na formulação 00-25-20 e 45 kg ha⁻¹ de ureia em cobertura. O XR foi aplicado manualmente a lanço à superfície do solo, antes da semeadura do feijão na área total das parcelas experimentais. O XR utilizado pertence ao mesmo lote de onde foi retirado o XR para o estudo de laboratório.

Os tratamentos foram avaliados em dois cultivos de feijoeiro, realizados na mesma área experimental. A semeadura do feijão, no primeiro e no segundo cultivos, foi realizada em 23/1/2010 e em 27/9/2010, 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 14 plantas por metro linear. Antes da semeadura, o *Rhizobium tropici* foi inoculado nas sementes de feijão. Nos dois cultivos, o feijão foi semeado com semeadora equipada para plantio direto sobre resíduos culturais de aveia-preta (*Avena sativa* L.).

A avaliação do 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 ambos os cultivos. De cada parcela, foram retiradas cinco subamostras de solo, com auxílio de trado calador, que foram acondicionadas em sacos de plástico e passaram a constituir uma amostra única. No laboratório, as amostras foram homogeneizadas manualmente, peneiradas com 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.

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F, aplicaram-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade e as análises de regressão com o programa estatístico Winstat (Machado & Conceição, 2003).

Resultados e Discussão

A aplicação do xisto retornado (XR) ao solo, em condições de laboratório, afetou a emissão de CO₂ (Figura 1), e os tratamentos que receberam doses crescentes de XR apresentaram menor respiração microbiana do que o tratamento controle (XR0). Ao final do experimento 1 e do experimento 2, os tratamentos com doses de XR a partir de 1.500 kg ha⁻¹ e 750 kg ha⁻¹, respectivamente, apresentaram quantidades acumuladas de CO₂ significativamente inferiores às do tratamento XR0. No tratamento XR3000, a redução média na quantidade de CO₂ acumulada ao final dos dois experimentos, em comparação ao tratamento XR0, foi de 19% (104 mg de C-CO₂ kg⁻¹ de solo). Essa diferença na quantidade de CO₂, entre o tratamento XR3000 e o XR0, equivale a aproximadamente nove vezes a quantidade de C adicionada com o XR (12,3 mg kg⁻¹). Tais resultados indicam que, além do C adicionado com o XR ser de difícil biodegradação, o XR afetou a atividade microbiana, provocando diminuição na emissão de CO₂.

A análise química do XR indicou que os valores de metais pesados foram baixos (Tabela 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). Em relação à presença de HAP, a análise realizada no solo dos tratamentos XR0 e XR1500, no início e no final do experimento 1, indicou que os teores de HAP

foram menores que $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$, nas duas datas de avaliação, e podem ser aplicados até a dose equivalente a 1.500 kg ha^{-1} , segundo os valores orientadores de referência normalizados pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - Cetesb (São Paulo, 2005). Os valores de referência foram determinados a partir da análise de HAP, em 13 solos de áreas sob vegetação nativa, e os solos com valores menores ou iguais aos de referência são considerados solos “limpos”. Com base nos resultados das análises de metais pesados e HAP do presente trabalho e de acordo com os valores

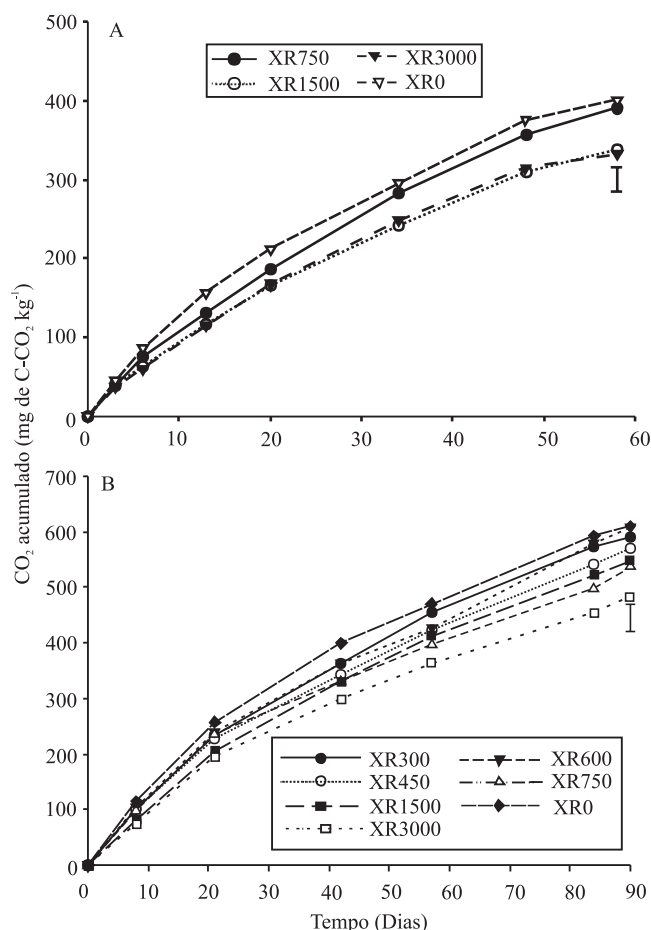


Figura 1. Quantidades acumuladas de CO_2 do solo, incubado com doses crescentes de xisto retornado (XR), nos experimentos 1 (A) e 2 (B), da avaliação da atividade microbiana em condições de laboratório. XR0, controle; XR300, solo + 300 kg ha^{-1} de XR; XR450, solo + 450 kg ha^{-1} de XR; XR600, solo + 600 kg ha^{-1} de XR; XR750, solo + 750 kg ha^{-1} de XR; XR1500, solo + 1.500 kg ha^{-1} de XR; XR3000, solo + 3.000 kg ha^{-1} de XR. As barras verticais representam a diferença mínima significativa entre as médias de cada tratamento, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

orientadores disponíveis (São Paulo, 2005; Brasil, 2006, 2010), pode-se concluir que esses fatores não foram a principal causa da redução na emissão de CO_2 do solo dos tratamentos com XR.

O CBM dos tratamentos com XR não foi inferior ao do tratamento XR0 (Tabela 2). Ainda, pelo modelo quadrático ajustado aos dados de CBM aos 30 e 60 dias, foi possível determinar que os maiores valores de CBM podem ser obtidos com doses de 1.800 kg ha^{-1} de XR.

Em relação ao $q\text{CO}_2$, o qual reflete a eficiência microbiana (Brookes, 1995), verifica-se que os tratamentos com XR apresentaram valores semelhantes ou inferiores àqueles do tratamento controle, o que indica que a adição do XR não provocou estresse ou perturbação à biomassa microbiana do solo. Segundo Brookes (1995), menores valores de $q\text{CO}_2$ representam aumento na eficiência microbiana, pois menor quantidade de CO_2 é liberada por unidade de CBM.

Resultados sobre a emissão de CO_2 e CBM, após a adição de XR ao solo, não foram encontrados na literatura consultada. Os resultados do presente trabalho, em que o CBM e o $q\text{CO}_2$ foram afetados positivamente pelo uso do XR, indicam que a redução na emissão de CO_2 , com a aplicação do XR ao solo, não esteve relacionada a um efeito deletério do XR sobre a biomassa microbiana do solo (Figura 1). Portanto, a redução observada na emissão de CO_2 pode ser atribuída a dois aspectos principais. O primeiro se refere a um possível aumento na eficiência de assimilação do C pela biomassa microbiana do solo, induzido pela presença do XR. O fato de o rendimento de assimilação do C representar a proporção do C atacado pelos microrganismos, que

Tabela 2. Carbono da biomassa microbiana (CBM) e quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), em solo incubado com doses crescentes de xisto retornado (XR)⁽¹⁾.

Tratamento ⁽²⁾	CBM (mg kg^{-1})			$q\text{CO}_2$ ($\text{mg CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \text{ CBM}$)	
	15 dias	30 dias ⁽³⁾	60 dias ⁽⁴⁾	15 dias	30 dias ⁽⁵⁾
XR0	165a	120b	224b	0,09a	0,07a
XR750	140a	195a	408a	0,08a	0,04b
XR1500	134a	189a	401a	0,08a	0,04b
XR3000	199a	176a	323ab	0,05a	0,04b
CV (%)	23	13	17	17	20

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. ⁽²⁾XR0, controle; XR750, solo + 750 kg ha^{-1} de XR; XR1500, solo + 1.500 kg ha^{-1} de XR; XR3000, solo + 3.000 kg ha^{-1} de XR. ⁽³⁾ $y = 126,6 + 0,08x - 0,00002x^2$, $R^2 = 0,85^*$. ⁽⁴⁾ $y = 237,9 + 0,22x - 0,00007x^2$, $R^2 = 0,89^{**}$. ⁽⁵⁾ $y = 0,09 + 0,00046x - 0,00000008x^2$, $R^2 = 0,99^*$. * e **Significativo a 5 e 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente.

é transformado em biomassa microbiana (Sylvia et al., 1998), indica que o aumento nesse atributo resulta em maior proporção de biomassa formada por unidade de C atacado e em menor quantidade de C mineralizado até CO₂. O segundo aspecto pode estar relacionado à mudança na taxa de decomposição da MOS, em razão da adição de um novo substrato ao solo (Kuzyakov et al., 2000). Esse efeito, denominado de “priming”, pode ser positivo ou negativo e resultar, portanto, em aumento ou retardamento na taxa de mineralização da MOS (Kuzyakov, 2010). Os resultados do presente trabalho indicam que o XR provocou “priming” negativo, já que a sua aplicação ao solo provocou diminuição da evolução de CO₂, em comparação ao tratamento controle. Zimmerman et al. (2011) apontam que a adição ao solo de substratos formados por um componente sortivo, como é o caso do XR, pode promover priming negativo e proporcionar maior proteção da MOS à mineralização.

Ao realizar a caracterização física e química do XR, Pimentel et al. (2006) 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 de 65 m² g⁻¹, valor semelhante ao obtido por Cessa et al. (2009) para argilas extraídas de um Latossolo Vermelho distroférico, com textura muito argilosa. Essa elevada área superficial específica do XR, também pode ser consequência da presença de minerais silicatados e óxidos de ferro e de alumínio em sua composição (Cogo, 2008). Entre as características químicas apresentadas pelo XR estão os grupos funcionais silanoides, hidroxílicos e carboxílicos (Pimentel et al., 2006). Aliada à fração mineral do XR está a fração orgânica (C residual), composta por materiais orgânicos refratários, especialmente estruturas aromáticas, que são resistentes à decomposição microbiana. Embora quantitativamente o C aportado ao sistema pelo XR possa não ser significativo, é provável que os compostos orgânicos presentes em sua estrutura exerçam papel importante nas interações organominerais.

Considerando-se todas essas características do XR, pode-se dizer que o XR, quando adicionado ao solo, tem potencial para promover a proteção física e química da MOS e a adsorção de C lábil, além de promover um efeito “priming” negativo. As propriedades coloidais do XR devem aumentar a área superficial da matriz

do solo, favorecer as associações com compostos orgânicos e minerais do solo, promovendo a agregação e, portanto, protegendo estruturas orgânicas mais lábeis. Este efeito estabilizante da complexação de superfície pode influenciar atributos físicos do solo, especialmente a distribuição do tamanho dos poros e tamanho de agregados e, com isso, afetar o acesso dos microrganismos e das enzimas extracelulares à MO fisicamente protegida no interior dos agregados. Correlação positiva entre a percentagem de argila e o conteúdo de C de um solo, com predominância de argilas 2:1 expansivas (esmetctitas) e não expansivas (ilitas), foi observada por Wiseman & Püttmann (2006).

Embora os resultados obtidos no presente trabalho não permitam confirmar que o XR tenha promovido a proteção da MOS contra o ataque microbiano, esta parece ser a principal causa da redução na emissão de CO₂ 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 e afetam a ciclagem do C e nutrientes presentes na MOS. Esses aspectos são importantes tanto do ponto de vista da estabilização da MOS, quanto do sequestro de C no solo e da disponibilidade de nutrientes às plantas e aos microrganismos do solo.

No teste ecotoxicológico, as amostras de solo que receberam doses equivalentes de 375, 750, 1.500 e 3.000 kg ha⁻¹ de XR apresentaram, respectivamente, 58, 65, 53 e 40% das dez minhocas utilizadas no teste. Nas amostras de solo sem XR usadas como controle para cada dose de XR, os percentuais foram de 42, 35, 47 e 60. Segundo a International Organization for Standardization (2002), a amostra é considerada tóxica, quando mais de 80% dos organismos usados no teste são encontrados na amostra usada como controle. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o XR, nas doses utilizadas, não apresentou toxicidade aos organismos estudados.

De maneira geral, a atividade enzimática do solo não foi afetada pela adição do XR. Em condições de laboratório, as principais alterações foram observadas com as enzimas fosfatase ácida e arilsulfatase (Tabela 3). Observa-se que, aos 30 dias, a aplicação do XR causou redução na atividade dessas enzimas. Em condições de campo, o XR afetou apenas a atividade das enzimas urease e DHA. O efeito do

XR sobre a atividade da enzima urease foi observado somente no primeiro cultivo, em que foi ajustado o modelo quadrático (Tabela 4). Em relação à atividade da DHA, a aplicação das doses de 750 kg ha⁻¹ e 3.000 kg ha⁻¹ de XR provocaram redução na atividade dessa enzima, somente na avaliação realizada aos sete dias, do segundo cultivo de feijão. Os valores obtidos para a atividade das enzimas avaliadas estão dentro de uma ampla faixa de valores, obtidos em trabalhos

com diferentes formas de uso do solo e em distintas condições edafoclimáticas (García-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 em condições de laboratório, possivelmente, estão relacionados ao aporte de P e S realizados ao solo com o XR, o que indica que esse subproduto pode aumentar a disponibilidade desses

Tabela 3. Atividade enzimática em solo incubado com doses crescentes de xisto retornado (XR)⁽¹⁾.

Tratamento ⁽²⁾	β glicosidase ⁽³⁾	Desidrogenase ⁽⁴⁾	Diacetato de fluoresceína ⁽⁵⁾	Fosfatase ácida ⁽³⁾	Arilsulfatase ⁽³⁾	Urease ⁽⁶⁾
15 dias ⁽⁷⁾						
XR0	44a	44a	74a	303b	29c	95ab
XR750	40a	41a	77a	351a	31c	55bc
XR1500	42a	44a	78a	323ab	33bc	113a
XR3000	39a	40a	76a	346a	61a	53c
30 dias						
XR0	16a	21a	65a	906a	18a	95ab
XR750	17a	17a	68a	784bc	15b	55bc
XR1500	18a	15a	65a	807b	15b	113a
XR3000	19a	21a	62a	751b	15b	53c
60 dias ⁽⁸⁾						
XR0	43b	27a	66a	247a	9a	28a
XR750	67a	35a	53c	201b	8a	26a
XR1500	64a	41a	64ab	214ab	9a	39a
XR3000	41b	36a	62b	241a	7b	19a

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. ⁽²⁾XR0, controle; XR750, solo + 750 kg ha⁻¹ de XR; XR1500, solo + 1.500 kg ha⁻¹ de XR; XR3000, solo + 3.000 kg ha⁻¹ de XR. ⁽³⁾ μ g de paranitrofenol g⁻¹ de solo por hora. ⁽⁴⁾ μ g de trifênil formazan g⁻¹ de solo por hora. ⁽⁵⁾ μ g de fluoresceína g⁻¹ de solo por hora. ⁽⁶⁾mg de N NH₄⁺ kg⁻¹ de solo por hora. ⁽⁷⁾Equação de regressão para arilsulfatase: $y = 29,6 + 0,004x - 0,00005x^2$, $R^2 = 0,99^{**}$. ⁽⁸⁾Equação de regressão para β glicosidase: $y = 44,5 + 0,032x - 0,00001x^2$, $R = 0,79^{**}$. ******Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 4. Atividade enzimática do solo e carbono da biomassa microbiana (CBM, mg kg⁻¹), em amostras de solo da camada de 0–5 cm, coletadas após uma semana da aplicação do xisto retornado (A1) e ao florescimento (A2) do feijão⁽¹⁾.

Tratamento ⁽²⁾	Urease ⁽³⁾		Arilsulfatase ⁽⁴⁾		β glicosidase ⁽⁴⁾		Diacetato de fluoresceína ⁽⁵⁾		Desidrogenase ⁽⁶⁾		Fosfatase ácida ⁽⁴⁾		CBM	
	A1 ⁽⁷⁾	A2 ⁽⁸⁾	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1 ⁽⁹⁾	A2
Primeiro cultivo														
NPK+XR0	9c	16c	27a	24a	45a	32a	41a	59a	47a	36a	129a	134a	104a	153a
NPK+XR750	13b	24b	32a	28a	46a	29a	35a	62a	41a	38a	139a	145a	117a	186a
NPK+XR1500	24a	44a	26a	26a	45a	26a	41a	59a	41a	32a	127a	132a	129a	170a
NPK+XR3000	25a	46a	24a	28a	41a	29a	47a	61a	26a	42a	130a	153a	131a	186a
CV (%)	9	8	14	25	16	10	38	4	34	17	9	9	22	20
Segundo cultivo														
NPK+XR0	40a	63a	27a	11a	50a	42a	55a	24a	101a	46a	120a	205a	269a	81a
NPK+XR750	44a	65a	37a	12a	53a	48a	57a	23a	52c	52a	124a	216a	160bc	78a
NPK+XR1500	50a	59a	27a	12a	50a	44a	56a	23a	83ab	49a	127a	187a	158c	47a
NPK+XR3000	46a	48a	20a	10a	46a	46a	54a	22a	62bc	44a	110a	208a	121c	39a
CV (%)	28	31	29	16	12	17	11	9	12	24	19	8	13	33

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. ⁽²⁾NPK+XR0, controle; NPK+XR750, NPK + 750 kg ha⁻¹ de XR; NPK+XR1500, NPK + 1.500 kg ha⁻¹ de XR; NPK+XR3000, NPK + 3.000 kg ha⁻¹ de XR. ⁽³⁾mg de N NH₄⁺ kg⁻¹ de solo por hora. ⁽⁴⁾ μ g de paranitrofenol g⁻¹ de solo por hora. ⁽⁵⁾ μ g de fluoresceína g⁻¹ de solo por hora. ⁽⁶⁾ μ g de trifênil formazan g⁻¹ de solo por 24 horas. ⁽⁷⁾Primeiro cultivo: $y = 8,3 + 0,01x - 0,000002x^2$, $R^2 = 0,92^{**}$. ⁽⁸⁾Primeiro cultivo: $y = 14,0 + 0,02x - 0,000004x^2$, $R^2 = 0,92^{**}$. ⁽⁹⁾Segundo cultivo: $y = 259,3 + 0,11x - 0,00002x^2$, $R^2 = 0,90^{**}$. ******Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

nutrientes no solo para as plantas e microrganismos. Trannin et al. (2007) verificaram que, após dois anos de aplicação de lodo de esgoto, acrescido de P_2O_5 , houve diminuição na atividade da fosfatase ácida, em comparação ao solo controle. As demais enzimas avaliadas não tiveram sua atividade alterada pela aplicação do XR, condição que pode estar relacionada à baixa quantidade de C adicionada com o XR e ao seu elevado grau de recalcitrância. Os resultados obtidos com as enzimas, em condições de campo, após duas aplicações de XR, aliados aos resultados de CBM, do qCO_2 e do teste ecotoxicológico, em condições de laboratório, indicam que o uso do XR não provoca a degradação biológica do solo. Ainda, 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 preservar o C no solo, por reduzir a mineralização da MOS.

Conclusões

1. A aplicação do xisto retornado ao solo reduz a emissão de CO_2 , sem reduzir a biomassa microbiana do solo.
2. O xisto retornado, mesmo quando reaplicado em doses crescentes ao solo até o limite de 3.000 kg ha^{-1} , não causa impactos negativos sobre a atividade enzimática do solo.

Agradecimentos

À Petrobras, pelo auxílio financeiro, por meio da Unidade de Industrialização do Xisto, em São Mateus do Sul, PR.

Referências

- AFONSO, J.C.; SCHMAL, M.; CARDOSO, J.N.; FRETY, R. Hydrotreatment of Irati shale oil: behavior of the aromatic fraction. **Industrial and 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, 1995. p.232-233.
- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient for CO_2 (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 and Biochemistry**, v.25, p.393-395, 1993.
- ANJOS, A.R.M. dos; REISSMANN, 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.
- BRASIL. Ministério da 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 nº 375, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 30 ago. 2006. Seção 1, p.141-146.
- BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility Soils**, v.19, p.269-279, 1995.
- CESSA, R.M.A.; CELI, L.; VITORINO, A.C.T.; NOVELINO, J.O.; BARBERIS, E. 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.
- COGO, S.L. **Um estudo dos subprodutos e rejeitos do xisto por ressonância paramagnética eletrônica**. 2008. 94p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- GARCÍA-GIL, J.C.; PLAZA, C.; SOLER-ROVIRA, P.; POLO, A. Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1907-1913, 2000.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/FDIS 17512-1: avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals on behaviour: part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)**. Geneva: ISO, 2002.
- KUZYAKOV, Y. Priming effects: interactions between living and dead organic matter. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p.1363-1371, 2010.
- KUZYAKOV, Y.; FRIEDEL, J.K.; STAHR, K. Review of mechanisms and quantification of priming effects. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1485-1498, 2000.
- LAGOMARSINO, A.; MOSCATELLI, M.C.; DI TIZIO, A.; MANCINELLI, S.; GREGO, S.; MARINARI, S. Soil biochemical indicators as a tool to assess the short-term impact of agricultural management on changes in organic C in a Mediterranean environment. **Ecological Indicators**, v.9, p.518-527, 2009.
- LAMBAIS, M.R.; CARMO, J.B. do. Impactos da aplicação de biossólidos na microbiota de solos tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1129-1138, 2008.
- MACHADO, A.A.; CONCEIÇÃO, A.R. **Winstat: sistema de análise estatística para Windows**. Versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2003.
- MARCOTE, I.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; POLO, A. 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.

- MIOTTO, D.M.M.; MACHADO, N.R.C.F. Utilização de xisto retortado como matéria-prima em síntese de zeólitas. **Acta Scientiarum. Technology**, v.28, p.39-45, 2006.
- 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.
- PIMENTEL, P.M.; SILVA JUNIOR, C.N.; MELO, D.M.A.; MELO, M.A.F.; MALDONADO, G.; HENRIQUE, D.M. Caracterização e uso de xisto para adsorção de chumbo (II) em solução. **Cerâmica**, v.52, p.194-199, 2006.
- SANTOS, H.G. dos; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C. dos; OLIVEIRA, V.A. de; OLIVEIRA, J.B. de; COELHO, M.R.; LUMBRERAS, J.F.; CUNHA, T.J.F. (Ed.). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306p.
- SÃO PAULO (Estado). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Decisão de diretoria nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005. Dispõe sobre a aprovação dos valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos valores orientadores de 2001, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2011.
- SISINNO, C.L.S.; BULUS, M.R.M.; RIZZO, A.C.; MOREIRA, J.C. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.1, p.137-140, 2006.
- SOUZA, C.A. de; REIS JUNIOR, F.B. dos; MENDES, I. de C.; LEMAINSKI, J.; SILVA, J.E. da. 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.; WEST, A.W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labelled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p.337-343, 1988.
- 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, p.495-501, 1990.
- STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C.A. (Org.). **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. v.2, p.1550-1572.
- SYLVIA, D.M.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1998. 550p.
- TABATABAI, M. Soil enzymes. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Ed.). **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. pt.2, p.778-835. (Soil Science Society of America. Book series, 5).
- THALMANN, A. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). **Landwirtschaftliche Forschung**, v.21, p.249-258, 1968.
- 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.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 8270C: semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)**. 1996. 54p. Revision 3. Available at: <http://accustandard.com/asi/pdfs/epa_methods/8270c.pdf>. Accessed on: 9 Oct. 2011.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.703-707, 1987.
- WISEMAN, C.L.S.; PÜTTMANN, W. Interactions between mineral phases in the preservation of soil organic matter. **Geoderma**, v.134, p.109-118, 2006.
- ZIMMERMAN, A.R.; GAO, B.; AHN, M.-Y. Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.43, p.1169-1179, 2011.

Recebido em 11 de março de 2011 e aprovado em 5 de outubro de 2011