

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E ENZIMÁTICA EM SOLO
TRATADO COM CLORETO E SULFATO DE BÁRIO**

Ana Carolina Trisztz Perassolo Guedes

Engenheira Agrônoma

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E ENZIMÁTICA EM SOLO
TRATADO COM CLORETO E SULFATO DE BÁRIO**

Ana Carolina Trislitz Perassolo Guedes

Orientador: Prof. Dr. Wanderley José de Melo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal)

2013

G924a Guedes, Ana Carolina Trislitz Perassolo
Atividade biológica e enzimática em solo tratado com cloreto e
sulfato de bário / Ana Carolina Trislitz Perassolo Guedes. –
Jaboticabal, 2013
vi, 66 p. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientadora: Wanderley José de Melo
Banca examinadora: Mara Cristina Pessoa da Cruz, Leyser
Rodrigues Oliveira
Bibliografia

1. Contaminação do solo. 2. Metais Pesados. 3. Qualidade do solo.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.427

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Ana Carolina Trislitz Perassolo Guedes – Nascida em São Carlos (SP) no dia 12 de Novembro de 1986. Conclui a graduação em Agronomia em 2011 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - FCAV da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Em 2011, ingressou no Mestrado do Programa de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV – UNESP. O mestrado foi realizado com bolsa da CAPES por 24 meses. O trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Wandelely José de Melo, do Departamento de Tecnologia da FCAV-UNESP.

Às minhas irmãs: *Fernanda e Mariana*, pela amizade, amor, compreensão, apoio e companheirismo que só aumentam mesmo com toda distância. Por toda ajuda sempre e compreensão em meus momentos de ausência.

Dedico

Aos meus pais: *João Batista e Regina*, pelo amor, carinho, confiança, respeito, dedicação e luta para que eu conseguisse chegar e me manter até aqui. Por toda educação, por me ensinarem a ser a pessoa que sou e sempre acreditarem que eu era capaz. Sem vocês nada do que faço teria sentido.

Homenageio

A minha avó *Leonora Perassolo* por todo carinho, amor, incentivo e exemplo, por ser a melhor avó que eu poderia ter. Aos meus outros *avós, Tios e Tias, primos e primas* por fazerem parte da minha vida e por sempre me apoiarem quando precisei.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda saúde, por sempre me guiar, iluminar e proteger.

À UNESP, Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade de aprendizado.

Ao Departamento de Tecnologia da Unesp-Jaboticabal, destacando a amizade dos Professores, Funcionários e Alunos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto

Ao meu orientador Prof. Dr. Wanderley José de Melo por todo apoio, dedicação, confiança, por toda ajuda sempre, tanto no lado pessoal como profissional; pessoa sem a qual eu não conseguiria estar aqui hoje, não teria feito tudo que tive oportunidade de fazer e não teria crescido profissionalmente como cresci.

Aos membros da Banca Examinadora, pela atenção e, principalmente, pelas críticas e sugestões que fizeram enriquecer este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia, e agradecimento especial aos Técnicos de Laboratório, Sueli, Rodrigo, Sheli, pela participação efetiva no desenvolvimento dos trabalhos e pela amizade durante todos esses anos.

Agradecimentos especiais a grande amiga e companheira de trabalho Luciana Cristina Merlino Souza pelo apoio e exemplo dados desde meu ingresso nesta faculdade; por todo exemplo de dedicação, esforço e amor pelo que faz; por tudo que já fez e ainda faz por mim, exemplo de vida, de pessoa e de mulher, com certeza sem você este trabalho não teria sido concretizado.

Aos meus amigos de trabalho Iolanda Reis, Suelen, Amanda e Marcela.

Às grandes e essenciais amizades conquistadas e cada dia mais fortalecidas: Alexandre, Aline, Ana Paula, Carlos Rafael, Elizio, Everton, Jacqueline, Maristela, Natali, Stefanie, Mariele, Thais, Wendy, Victor, que são de extrema importância em minha vida, sem os quais tudo seria bem menos agradável e muito mais árduo. Vocês fazem com que minha vida tenha um sentido muito maior a cada dia.

Obrigada por estarem sempre ao meu lado.

À minha segunda família, Anaiane, Mayara, Natália e Vanja, pelo companheirismo, carinho, amizade e amor. Por me apoiarem sempre e tanto. Por serem as melhores pessoas que eu poderia ter a meu lado e por terem se tornado parte essencial da minha vida.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e concretização deste sonho.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Efeito dos metais na microbiologia do solo	4
2.1.1 Bário	4
2.2 Indicadores de qualidade do solo	5
2.2.1 Atividade Enzimática	7
2.2.2 Atividade Biológica	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local de condução do experimento	17
3.2 Solo	17
3.3 Planta teste	18
3.4 Delineamento experimental e tratamentos	18
3.5 Preparo do solo	19
3.6 Instalação e condução dos experimentos	20
3.6.1 Etapa I	20
3.6.2 Etapa II	21
3.7. Destinação dos resíduos gerados	22
3.8 Preparo das amostras de solo para análises de Ba.	22
3.9 Preparo das amostras de solo para análises biológicas	23
3.10 Avaliações nas amostras de solo	23
3.10.1 Teores extraíveis de Ba no solo	23
3.10.2 Atividade enzimática	23
3.10.3 Atividade biológica	24
3.11 Análise dos resultados	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Etapa I	27
4.1.1 Atividade enzimática nas amostras de solo	27

4.1.2 Atividade Biológica	32
4.1.3 Correlações entre atividades enzimáticas, biológicas e bário extraível.....	37
4.2 Etapa II	41
4.2.1 Atividade enzimática	45
4.2.2 Atividade biológica	41
4.2.3 Correlações bário extraível, atividades enzimáticas e biológicas.....	45
5 CONCLUSÕES	51
6 REFERÊNCIAS.....	52

ATIVIDADE BIOLÓGICA E ENZIMÁTICA EM SOLO TRATADO COM CLORETO E SULFATO DE BÁRIO

RESUMO – Atualmente, diversas atividades antrópicas têm aumentado a carga de elementos tóxicos no ambiente, especialmente no solo. Dentre esses elementos, estão os metais pesados, tendo sido o bário (Ba) recentemente incluído na lista dos elementos que apresentam risco à saúde humana, o que o leva a ser foco de diversas pesquisas, já que as informações sobre seus efeitos tóxicos no solo e nas plantas ainda são muito limitadas. Assim, objetiva-se com o presente trabalho avaliar os efeitos de sais de Ba (BaSO_4 e BaCl_2), na atividade enzimática e biológica. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foram testadas doses de 2 fontes de Ba (BaSO_4 e BaCl_2) em delineamento experimental em blocos casualizados com 7 tratamentos [2 fontes de Ba em 3 doses (150, 300 e 600 mg kg^{-1}), mais 1 testemunha] e 4 repetições. A segunda etapa teve início com o término da primeira, nesta etapa foi avaliada a liberação de Ba para o solo devido a biodegradação das plantas, e para isso foram testados 6 tratamentos, sendo 2 tipos de solos (solo que não recebeu Ba e solo que recebeu 300 mg kg^{-1} de Ba na forma de BaCl_2) e 3 tipos de adição de material e 4 repetições em delineamento experimental inteiramente casualizado. Na primeira etapa foram coletadas amostras de solo aos 56 dias. Na segunda etapa, amostragens de solo foram realizadas aos 15, 30 e 90 dias após sua instalação, as quais foram submetidas às análises de atividade biológica e enzimática. O efeito da adição do bário mostrou que, em resposta ao estresse, os microrganismos do solo podem aumentar a atividade metabólica, o que ocasionou aumento na atividade de algumas enzimas, sem o correspondente aumento na biomassa. As enzimas que assim se comportam também podem ser boas indicadoras da presença do fator causador do estresse.

Palavras chaves: contaminação de solo, metais pesados, qualidade do solo.

BIOLOGICAL AND ENZYMATIC ACTIVITY IN SOIL TREATED WITH CHLORIDE AND SULPHATE BARIUM

ABSTRACT - Currently, various anthropogenic activities have increased the burden of toxic elements in the environment, especially in soil. Among these elements are heavy metals, having barium (Ba) recently included in the list of elements that pose a risk to human health, which leads him to be the focus of many studies, since the information about their toxic effects on soil and plants are still quite limited. Thus, the objective of the present work was to evaluate the effects of salts of Ba (and BaCl₂ BaSO₄), the enzymatic and biological activity. The experiment was conducted in a greenhouse and was divided into two stages. In the first stage were tested doses of 2 sources of Ba (BaSO₄ and BaCl₂) in randomized complete block design with seven treatments [2 Ba sources in 3 doses (150, 300 and 600 mg kg⁻¹) plus one witness] and 4 replicates. The second stage began with the end of the first, at this stage we evaluated the release of Ba to the ground due to biodegradation of plants, and 6 treatments that were tested, with two types of soils (soil that received no Ba and soil received 300 mg kg⁻¹ Ba as BaCl₂) and 3 types of material addition and 4 replications in a completely randomized design. In the first stage soil samples were collected after 56 days. In the second stage, soil samples were taken 15, 30 and 90 days after installation, which were submitted to analyses of biological and enzymatic activity. The effect of adding the barium showed that in response to stress, organisms of the soil may increase metabolic activity, which caused an increase in the activity of some enzymes without a corresponding increase in the biomass. The enzymes that behave well can also be good indicators of the presence of the causative factor of stress.

Keywords: Soil contamination, heavy metals, soil quality.

LISTA DE ABREVIATURAS

SB1	150 mg kg ⁻¹ Ba na forma de BaSO ₄
SB2	300 mg kg ⁻¹ Ba na forma de BaSO ₄
SB3	600 mg kg ⁻¹ Ba na forma de BaSO ₄
CB1	150 mg kg ⁻¹ Ba na forma de BaCl ₂
CB2	300 mg kg ⁻¹ Ba na forma de BaCl ₂
CB3	600 mg kg ⁻¹ Ba na forma de BaCl ₂
S0A0R0	Solo dos vasos do tratamento testemunha do experimento da primeira Etapa.
S0A0R1	Solo do tratamento testemunha do experimento prévio + raízes das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg ⁻¹ de Ba na forma de BaCl ₂ do experimento prévio.
S0A1R1	Solo dos vasos do tratamento testemunha e raízes das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg ⁻¹ de Ba na forma de BaCl ₂ do experimento da primeira etapa).
S1A0R0	Solo dos vasos do tratamento com 300 mg kg ⁻¹ de Ba na forma de BaCl ₂ do experimento da primeira etapa
S1A0R1	Solo dos vasos do tratamento com 300 mg kg ⁻¹ de Ba na forma de BaCl ₂ do experimento da primeira etapa e raízes das plantas cultivadas no mesmo tratamento.
S1A1R1	Solo dos vasos do tratamento com 300 mg kg ⁻¹ de Ba na forma de BaCl ₂ do experimento da primeira etapa e raízes e parte aérea das plantas cultivadas no mesmo tratamento
Ba	Bário
CRA	Capacidade de retenção de água
DAT	Dias após transplante
RBS	Respiração basal do solo
BMS	Biomassa microbiana do solo
qCO ₂	Quociente metabólico

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Atividade biológica em Latossolo Vermelho contaminado com cloreto e sulfato de Ba e cultivado com sorgo granífero.....	28
Tabela 02.	Valores médios da interação significativa, entre sais e doses de Ba, da análise de variância referente a atividade biológica em Latossolo Vermelho contaminado com sais de Ba de diferentes solubilidades.....	32
Tabela 03.	Atividade enzimática em Latossolo Vermelho contaminado com cloreto e sulfato de Ba e cultivado com sorgo granífero.....	34
Tabela 04.	Valores médios da interação significativa, entre sais e doses de Ba, da análise de variância referente a atividade enzimática em Latossolo Vermelho contaminado com sais de Ba de diferentes solubilidades.....	37
Tabela 05.	Correlação entre atividades enzimáticas, biológicas e Ba extraível de um Latossolo Vermelho contaminado com cloreto e sulfato de Ba.....	40
Tabela 06.	Atividade biológica em Latossolo Vermelho contaminado com cloreto de Ba e/ou com restos culturais de plantas de sorgo granífero também contaminadas com cloreto de Ba em diferentes épocas de amostragem.....	44
Tabela 07.	Atividade enzimática em Latossolo Vermelho distrófico contaminado com cloreto de Ba e/ou com restos culturais de plantas de sorgo granífero também contaminadas com cloreto de Ba em diferentes épocas de amostragem.....	48
Tabela 08.	Correlação entre bário solúvel e atividade biológica e enzimática de um Latossolo Vermelho, contaminado com cloreto de Ba em várias épocas de amostragem.....	49
Tabela 09.	Correlação entre atividade enzimática/biológica de um Latossolo Vermelho distrófico, contaminado com cloreto de Ba e/ou com restos culturais de plantas de sorgo também contaminadas com cloreto de Ba, em várias épocas de amostragem.....	50

1 INTRODUÇÃO

Devido à intensificação das atividades agrícolas, industriais e de mineração, proporcionadas principalmente pelo elevado crescimento demográfico mundial e desenvolvimento tecnológico, a produção de resíduos contendo constituintes tóxicos aos seres vivos vem aumentando, com riscos à poluição dos solos e da água, o que traz grande preocupação à população em geral. Entre esses constituintes estão os metais pesados, que podem causar danos graves à saúde humana.

Dentre os metais pesados incluídos nas legislações ambientais brasileiras, o Ba foi recentemente adicionado na lista dos elementos que apresentam risco potencial à saúde humana (CETESB, 2001), o que exige pesquisas que auxiliem no entendimento da sua ação e possibilidade de interferência na qualidade do solo.

Na natureza, o Ba normalmente ocorre associado a outros elementos e as principais formas existentes são o sulfato e o carbonato de Ba (BaSO_4 e BaCO_3), na forma dos minerais barita e whiterita, respectivamente. Ele também está presente em pequenas quantidades em rochas ígneas semelhantes a feldspatos e micas (USEPA, 2005), e sua concentração natural no solo, em escala mundial, varia de 19 a 2368 mg kg^{-1} , podendo ser mobilizado em diferentes condições (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1992).

Do ponto de vista biológico, o Ba não é essencial aos seres vivos, sendo considerado muito tóxico quando está presente no ambiente, mesmo em baixas concentrações, por ser acumulativo no organismo humano e dos animais (CUNHA; MACHADO, 2004). Esse elemento pode entrar no corpo humano por meio do consumo de alimentos e/ou água (NOGUEIRA et al., 2010), sendo a dose mínima letal de carbonato de Ba (BaCO_3) de 57 mg kg^{-1} de peso corporal, e de cloreto de Ba (BaCl_2), de 11,4 mg kg^{-1} (OLIVEIRA et al., 2005). Portanto, o acompanhamento do acúmulo de Ba no solo e na água merece atenção especial de órgãos ambientais nacionais e internacionais.

Considerando a necessidade de prevenção da contaminação do solo para a manutenção de sua funcionalidade e a proteção da qualidade das águas superficiais e subterrâneas, bem como o conhecimento de que a existência de áreas

contaminadas pode configurar sério risco à saúde pública e ao ambiente, atualmente tem sido estabelecidos valores de referência para a concentração de Ba em solos agrícolas (CONAMA, 2009). A resolução nº 420 do CONAMA (2009) estabelece para o Ba um valor de alerta para solos agrícolas de 150 mg kg^{-1} (menor concentração a causar alguma fitotoxicidade) e um valor de intervenção de 300 mg kg^{-1} .

A contaminação do solo por metais ocasiona uma alteração na comunidade microbiana. Esses efeitos adversos de metais pesados nos microrganismos do solo podem alterar a qualidade do solo, principalmente no que se refere à ciclagem de nutrientes.

Segundo Doran e Parkin (1994), a qualidade do solo é definida como a capacidade de funcionar dentro do ecossistema para sustentar a atividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde das plantas e animais. Esta pode ser mensurada através do uso de indicadores que refletem o status ambiental ou a condição de sustentabilidade do ecossistema. Estes indicadores podem ser classificados como físicos, químicos e biológicos (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007).

Os indicadores biológicos que são representados pelos microrganismos, são responsáveis por muitas reações bioquímicas relacionadas não só com a transformação da matéria orgânica, mas também com o intemperismo das rochas. Os microrganismos desempenham papel fundamental na gênese do solo e ainda atuam como reguladores de nutrientes, pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos elementos atuando, portanto, como fonte de nutrientes para o crescimento das plantas (ANDREOLA; FERNANDES, 2007).

Os microrganismos são responsáveis também por mediar processos no solo relacionados com o manejo (POWLSON; BROOKES; CHRISTESEN, 1987), de tal modo que podem ser sensíveis indicadores de mudanças. Esses indicadores biológicos, por constituírem a parte viva da matéria orgânica do solo e atuarem em importantes processos biogeoquímicos, são considerados em vários estudos como mais sensíveis que os indicadores químicos e físicos para detectar, com antecedência, alterações que ocorrem no solo em função do seu uso e manejo (DORAN, 1980; DICK, 1994; TRASAR-CÈPEDA et al., 1998).

Em alguns casos, alterações na população e na atividade microbiana podem preceder a mudanças nas propriedades químicas e físicas, refletindo um claro sinal

na melhoria ou na degradação do solo (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

Devido à atividade enzimática e biológica responderem mais rapidamente às mudanças do solo que outros parâmetros de avaliação torna-se interessante avaliar o efeito do maior número de enzimas e da atividade biológica possíveis no solo, visto que cada uma é responsável por uma determinada função e responde diferente a essa mudança. Alterações na atividade biológica do solo podem ser determinadas por meio de diversas análises como: biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico (qCO_2), dentre outras (TRANNIN; SIQUEIRA; MOREIRA, 2007, BROOKES, 1995).

Na literatura nacional e internacional os estudos que trata da atividade biológica e enzimática em solos sobre os efeitos tóxicos do Ba ainda são escassos, tornando necessária a realização de pesquisas para melhor caracterizar o destino ambiental do Ba, determinando seus efeitos na qualidade do solo, caracterizada pela microbiota do solo, e assim definir a importância do menor acúmulo na cadeia alimentar para a saúde humana.

Objetivou-se, nesse trabalho, avaliar a atividade biológica e enzimática em solo contaminado com sais de Ba, assim como, mensura-las após a incorporação dos restos culturais de plantas cultivadas em solo contaminado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A contaminação dos solos por metais pesados é um grave problema ambiental, por causa da persistência dos mesmos no ambiente e pelo alto poder de toxicidade (REDDY; PRASAD, 1990). Estes elementos podem ser tóxicos às plantas, entrar na cadeia alimentar humana, contaminar a água (subterrânea e superficial) e, principalmente, afetar a saúde humana.

Um fator importante no controle do comportamento químico dos metais é a reação do solo. Em geral, os metais apresentam maior solubilidade em condições de acidez e reduzem sua disponibilidade para as plantas com aumento do pH do solo, proporcionado pela calagem. Sims e Patrick (1978) verificaram maiores teores de Fe, Mn, Zn e Cu nas frações trocável e orgânica em menores valores de pH. Sims (1986) relatou que as formas trocáveis de Mn e Zn foram predominantes em valores de pH inferiores a 5,2, ao passo que, em valores acima deste, predominaram as formas ligadas à matéria orgânica e aos óxidos.

2.1 *Bário*

O Ba é um elemento alcalino-terroso encontrado em pequenas quantidades em rochas ígneas, semelhantes a feldspatos e micas (USEPA, 2005), sendo pouco encontrado na natureza na forma livre, ocorrendo, principalmente, em formas combinadas com outras espécies químicas sendo, a principal, barita (sulfato de bário) e a witherita (carbonato de bário) (USEPA, 2005). A barita é a principal fonte de obtenção de bário metálico e juntamente com seus compostos, são usados na indústria para fabricação de plásticos, vidros, cerâmicas, CETESB (2012) e sua maior aplicação é como um fluido de perfuração (CETESB, 2001). Já o sulfato de bário é usado em clínica médica como contraste em radiografia.

O bário pode ser considerado muito tóxico quando está presente no ambiente, mesmo em baixas concentrações, por ser acumulativo nos organismos dos homens e dos animais (CUNHA; MACHADO, 2004). Esse elemento pode ser encontrado em muitos alimentos, mas a maioria contém menos de $3 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, exceto em

castanhas do Brasil que podem conter altas concentrações do metal (150-300mg.100g⁻¹) e, assim sendo, pode entrar no corpo humano por meio do consumo de alimentos e/ou água (NOGUEIRA et al., 2010).

A ingestão de pequenas quantidades de bário em curtos períodos de tempo pode provocar vômito, cólica estomacal, diarreia, dificuldade respiratória, alteração da pressão sanguínea, adormecimento da face e debilidade muscular. A ingestão de altas quantidades de compostos de bário solúveis em água ou no conteúdo estomacal pode causar alterações no ritmo cardíaco, paralisia e levar a óbito se não houver tratamento (CETESB, 2012). A dose letal de carbonato de Ba (BaCO₃) é de 57 mg kg⁻¹ de peso corporal, e de cloreto de Ba. (BaCl₂) de 11,4 mg kg⁻¹ (OLIVEIRA et al., 2005).

O primeiro órgão ambiental brasileiro a estabelecer valores máximos de Ba em solos foi a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, em 2001 (CETESB, 2001). Em 2006, o Conselho Nacional do Meio Ambiente publicou os níveis máximos de Ba em lodos de esgoto ou produtos derivados (1300 mg kg⁻¹, base seca) para uma utilização segura na agricultura (CONAMA, 2006), e recentemente estabeleceu a resolução nº 420, que também dispõe sobre valores orientadores de Ba em solos agrícolas (CONAMA, 2009).

A resolução da CETESB (2001) e a do CONAMA (2009) ficaram estabelecidos os valores, de alerta para solos agrícolas de 150 mg kg⁻¹, como sendo a menor concentração a causadora de fitotoxicidade, e o valor de intervenção de 300 mg kg⁻¹. O risco ecotoxicológico, calculado para organismos do solo não foi considerado, pois esta informação não está disponível na literatura nacional (CETESB, 2001).

2.2 Indicadores de qualidade do solo

O solo, como habitat de organismos vivos, é heterogêneo, formado por diferentes estruturas físicas, e diferentes composições químicas e biológicas. A parte biológica do solo é responsável, de forma direta ou indireta pelas transformações dos elementos químicos e por processos como a decomposição da matéria orgânica. Estas características são interdependentes, visto que, quando se modifica

uma delas, também as outras são afetadas. Para ter melhor controle de qualidade do solo, busca-se utilizar atributos que integrem as três propriedades (físicas, químicas e biológicas).

Segundo Doran e Parkin (1994), a qualidade do solo é definida como a capacidade de funcionar dentro do ecossistema para sustentar a atividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde das plantas e animais. Estas podem ser mensuradas através do uso de indicadores que refletem o status ambiental ou a condição de sustentabilidade do ecossistema. Estes indicadores e podem ser classificados como físicos, químicos e biológicos (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007). No entanto, um único indicador não pode ser utilizado nos estudos de qualidade de um sistema.

Assim, um conjunto mínimo de atributos físicos, químicos e biológicos do solo deve ser utilizado para avaliar a sua qualidade e procedimentos estabelecidos para identificar alterações na qualidade destes atributos (MELLONI, 2007).

Um ponto negativo dos indicadores biológicos destacado por Tótola e Chaer (2002), são as dificuldades de interpretação, ou seja, saber quando os valores obtidos indicam que o solo é bom ou não. Isto não ocorre para os indicadores químicos de fertilidade do solo que já estão relativamente bem definidos para cada elemento e tipo de solo. É sabido, ainda, que os valores ideais podem variar conforme o tipo de solo, sistemas de manejo e condições climáticas.

Os microrganismos fazem parte do solo de maneira indissociável, sendo responsáveis por inúmeras reações bioquímicas relacionadas não só com a transformação da matéria orgânica, mas também com o intemperismo das rochas. Sendo assim, desempenham papel fundamental na gênese do solo e ainda atuam como reguladores de nutrientes, pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos elementos atuando, portanto, como fonte de nutrientes para o crescimento das plantas (ANDREOLA; FERNANDES, 2007).

Os microrganismos são responsáveis também por mediar processos no solo relacionados com o manejo (POWLSON; BROOKES; CHRISTESEN, 1987), de tal modo que podem ser indicadores de mudanças. Tais indicadores, por constituírem a parte viva da matéria orgânica do solo e atuarem em importantes processos biogeoquímicos, vêm sendo considerados em vários estudos como mais sensíveis

que os indicadores químicos e físicos para detectar, com antecedência, alterações que ocorrem no solo em função do seu uso e manejo (DORAN, 1980; DICK, 1994; TRASAR-CÈPEDA et al., 1998; MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2003).

Segundo Leita et al. (1995) a atividade microbiana em solos contaminados pode ser maior em decorrência do elevado consumo energético dos microrganismos para garantir a sua sobrevivência e, em alguns casos, alterações na população e na atividade microbiana podem preceder a mudanças nas propriedades químicas e físicas, refletindo um claro sinal na melhoria ou na degradação do solo (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007), assim é interessante sempre utilizar um conjunto de variáveis biológicas para que se tenha melhor e maior compreensão do que esta ocorrendo no solo.

Alterações na atividade microbiana do solo podem ser determinadas por meio de análises na atividade microbiana do solo por meio da biomassa respiração basal; quociente metabólico (qCO_2) e atividade enzimática (ANDERSON e DOMSCH, 1990; BAATH, 1989; BROOKES, 1995; DICK, 1994; GILLER, WITTER e MCGRATH, 1998; TRANNIN, SIQUEIRA, MOREIRA, 2007).

2.2.1 Atividade Enzimática

Enzimas são proteínas responsáveis pela catalisação de reações químicas específicas. Segundo Moreira e Siqueira (2006) elas podem ser divididas em endocelulares e abiônicas (incluindo as extracelulares) e são relacionadas à decomposição de resíduos, à fertilidade do solo, à eficiência de uso dos fertilizantes e à presença de poluentes no solo. Enzimas extracelulares são aquelas secretadas por organismos vivos ou liberadas por células lisadas, e realizam reações fora do organismo que a secretou. Enzimas intracelulares são aquelas que realizam síntese no interior de um organismo.

As enzimas têm participação essencial nos processos relacionados à qualidade do solo. As condições que favorecem a atividade da biota também favorecem a atividade enzimática, tais como: adubação orgânica, presença de vegetação (rizosfera) e rotação de culturas. Por serem muito sensíveis às mudanças no solo, as enzimas são consideradas bons indicadores de qualidade (MOREIRA;

SIQUEIRA, 2006). Algumas enzimas respondem mais rapidamente às mudanças do solo do que outros atributos de avaliação. Portanto, é interessante avaliar o efeito do maior número possível de enzimas possíveis, visto que cada uma é responsável por uma determinada função.

2.2.1.1 Amilases

As amilases estão inseridas no grupo das hidrolases e ligadas ao ciclo biológico do carbono. Essas enzimas promovem a hidrólise do polissacarídeo amido, liberando unidades de maltose e, em seguida, glicose (BRITO, 1999).

Segundo Melo (1988), as raízes de plantas são citadas como fonte de algumas enzimas, entre elas as amilases. Cordeiro (2012), em experimento com solo rizosférico e solo não rizosférico, observou que a atividade das amilases foram maiores no solo rizosférico que no solo não rizosférico da sequência soja/soja.

Kumari e Singaram (1995) observaram correlação positiva entre a produção de biomassa e a atividade enzimática, possivelmente em decorrência do aumento da mineralização de nutrientes e da fertilidade do solo. Em acordo com esta afirmação, Sanomiya e Nahas (2004) constataram que a adição de adubo fosfatado também aumentou a atividade das amilases.

Em experimento com lodo de esgoto contaminado com cádmio, Frade Junior (2007) observou que as fontes CdCl_2 e CdSO_4 inibiram o metabolismo das amilases, possivelmente em consequência da maior solubilidade destas fontes avaliadas. Kuperman e Carreiro, (1997) também reportaram que a diminuição da amilase pode ocorrer por vários fatores, dentre eles a presença de metais pesados.

Sendo assim, a atividade das amilases pode ser importante indicador da atividade biológica devido à sua susceptibilidade às alterações nos substratos orgânicos (STROO; JENKES, 1985).

2.2.1.2 Arilsulfatases

Arilsulfatase é uma enzima extracelular que catalisam a hidrólise de ésteres de enxofre ou de sulfato orgânico, liberando sulfato disponível (BAKER; WHITE;

PIERZYNSKI, 2011). Elas correlacionam-se positivamente com o teor de matéria orgânica, mas não com o teor de enxofre (MELO, 2010).

Segundo Matsuoka, Mendes e Loureiro (2003), práticas de manejo e a presença da gramínea *Eleusine indica*, como cobertura viva, influenciam as propriedades microbiológicas do solo, contribuindo para o aumento do C mineralizável e da atividade da arilsulfatase. Pinto e Nahas (2002) também observaram correlação significativa entre a atividade da arilsulfatase e o teor de Carbono (C) orgânico total. Os autores sugerem que os microrganismos produtores dessa enzima necessitam de uma fonte de C e de energia.

A atividade das arilsulfatases foi considerada, por alguns autores, a mais sensível à poluição com lodo de pirita (DICK, 1997; HINOJOSA, 2008). A susceptibilidade desta enzima ao efeito tóxico dos elementos traços foi verificada em estudo com lodo de esgoto, quando doses altas foram aplicadas (MARSCHNER; FU; RENGEL, 2003). Sendo assim, a atividade enzimática pode variar em função do material orgânico disponível para a biota, bem como pela presença de elementos traços no ambiente em que a enzima se encontra.

As arilsulfatases estão entre as enzimas que respondem mais rapidamente às mudanças na fertilidade do solo, o que as habilita como indicadores da qualidade do solo (TEJADA; HERNANDEZ; GARCIA, 2006). Portanto, a atividade das arilsulfatases pode ser considerada um indicador útil de qualidade de solos contaminados com alguns elementos.

2.2.1.3 Urease

As ureases catalisam a hidrólise da molécula de ureia com produção de amônia e gás carbônico. São enzimas de grande importância, pois a ureia é hoje uma das principais formas de fertilizante nitrogenado (MELO et al. , 2010).

Cordeiro, Corá e Nahas (2012) avaliaram a atividade da urease em experimento com diferentes coberturas vegetais e observaram que a atividade foi maior no SR do que no SNR na maioria das coberturas. A existência de cobertura vegetal e as perdas de carbono devido à mineralização são a chave para a redução da atividade enzimática, haja vista que solos com maior tempo de repouso

apresenta menor atividade dessas enzimas (PASCUAL, 2000).

Pascual (1998) afirma que a atividade da urease é variável de acordo com o tipo de composto utilizado e o tempo de incubação. Onyezili (1981) observou que a atividade da urease pareceu ser dependente da concentração de substrato disponível à enzima no seu microambiente, não sendo diretamente proporcional sobre a concentração de substrato no sistema.

García-Gil et al. (2000) estudaram lodo de esgoto com elevados teores de metais e de N-NH₄⁺, constatando diminuição de 21 e 28% na atividade da urease quando aplicadas 20 e 80 t ha⁻¹, respectivamente. Resultados contraditórios foram encontrados por Trannin, Siqueira e Moreira (2007), que verificaram aumento da atividade enzimática em resposta às doses de lodo de esgoto.

Portanto observa-se que a urease pode apresentar diferentes respostas a um mesmo resíduo, e para substratos diferentes, de acordo com sua concentração, podendo ser bom indicativo de atividade de acordo com essas variações.

2.2.1.4 Fosfatases

Fosfatase é o nome genérico para um amplo grupo de enzimas extracelulares que catalisam a hidrólise dos ésteres e anidridos de ácido fosfórico (MELO et al., 2010). Essas enzimas podem ser divididas em fosfatases ácidas e alcalinas. Além das fontes das enzimas, o que diferencia as duas fosfatases é o pH ótimo. Para a fosfatase ácida este valor é entre 5,0 e 6,0 e, para a fosfatase alcalina, o pH ótimo é de 8,8 a 9,0. Entretanto, Neuman (1968) observou outras diferenças nos mecanismos de reação das duas enzimas, sendo que fosfatase ácida requereu um oxigênio entre o radical e o fosfato para a sua atividade. Chaimovich e Nome (1970) relacionaram a atividade das fosfatases ácidas com ausência de cátions mono e bivalentes, enquanto que as fosfatases alcalinas precisam principalmente de Mg²⁺ para sua atividade.

A produção das fosfatases é favorecida pela baixa disponibilidade de P às plantas e aos microrganismos, podendo ser inibida por altas concentrações de fosfato inorgânico no solo (NANNIPIERIET et al., 1979). García-Gil et al. (2000) observaram que a aplicação de 80 t ha⁻¹ de lodo compostado em solo arenoso

reduziu em 62% a atividade da fosfatase ácida, devido ao aumento de P solúvel e à quantidade de metais pesados do resíduo.

Pascual et al. (2000) evidenciaram a importância das fosfatases na mineralização do P-orgânico em áreas sob vegetação permanente, onde a matéria orgânica é a principal fonte de nutrientes. É preciso considerar também que os microrganismos bem como exsudatos radiculares contribuem para a atividade das fosfatases, sendo maior em solos com cobertura vegetal (DICK; JUMA; TABATABAI, 1983).

Metais e fontes de resíduos orgânicos podem influenciar na atividade das fosfatases, que reagem de forma diferente a cada composto. Por isso essas enzimas podem ser bons indicadores da atividade microbiana.

2.2.2 Atividade biológica

2.2.2.1 *Desidrogenases*

As desidrogenases são enzimas endocelulares que catalisam a oxidação de substratos orgânicos pela remoção de elétrons e hidrogênios, os quais são recebidos por uma coenzima como NAD^+ ou FAD^+ (MELO et al., 2010). A atividade das desidrogenases no solo reflete a atividade oxidativa total da microbiota, e como são enzimas endocelulares, de baixa atividade quando em estado livre no solo, podem atuar como um bom indicador da atividade biológica (COSTA, 1997; GARCIA; HERNANDEZ).

Araujo, Gil e Tiritan (2009) utilizaram a atividade das desidrogenases como indicador de estímulo na atividade microbiana em solo que recebeu lodo de esgoto. Essas enzimas podem ser estimuladas pela adição de resíduos orgânicos ao solo ou por contaminantes presentes no resíduo. Em solos contaminados a atividade da microbiota pode ser maior em decorrência do maior consumo energético para garantir a sobrevivência (FRASER et al., 1988). Segundo Melo (2006) a presença de metais pesados contidos no lodo de esgoto pode afetar os processos bioquímicos que ocorrem no solo, os quais desempenham papel fundamental nas plantas.

Goyal et al. (1992) mostraram que a atividade das desidrogenases aumentou

com a adição de fertilizante orgânico e inorgânico, exceto em solo que recebeu nitrato, visto que esse serve como aceptor de elétrons. Nahas, Delfino e Assis (1997) verificaram aumento na atividade enzimática com a aplicação de doses de enxofre, em particular de gesso agrícola.

Desse modo, as desidrogenases têm sido consideradas um indicador sensível da atividade biológica em resposta às mudanças impostas pelo uso e manejo do solo (ROLDÁN et al., 2005; CECCANTI et al., 1994).

2.2.2.2 Biomassa microbiana

Biomassa microbiana é a parte viva da matéria orgânica do solo, excluídas as raízes e animais maiores que $5 \times 10^3 \mu\text{m}$, representada por fungos, bactérias, actinomicetos, leveduras e representantes da microfauna como os protozoários, sendo assim um dos componentes que controla funções-chaves no solo, como a decomposição e o acúmulo de matéria orgânica, ou ainda transformações envolvendo os nutrientes das plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A biomassa microbiana representa uma reserva considerável de nutrientes, que são continuamente assimilados durante os ciclos de crescimento dos diferentes organismos que compõem o ecossistema. Consequentemente, os solos que mantêm alto conteúdo de biomassa microbiana são capazes não só de estocar, mas de ciclar mais nutrientes no sistema (GREGORICH et al., 1994).

A biomassa microbiana é a principal fonte de enzimas no solo, sendo responsável pela quase totalidade de sua atividade biológica, catalisando as transformações bioquímicas, representando fonte de C e regulando a troca de nutrientes entre a atmosfera e o ecossistema solo-planta-organismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A quantificação da biomassa microbiana compreendendo a fração ativa da matéria orgânica do solo é considerada o atributo mais sensível às mudanças iniciais no conteúdo total de matéria orgânica do solo, podendo ser utilizada para indicar o nível de degradação em função do sistema de manejo utilizado (JENKINSON; RAYNER, 1977; POWLSON; BROOKES; CHRISTESEN, 1987).

Como variável ecológica, a avaliação da biomassa microbiana permite ainda:

detectar mudanças causadas por cultivos ou por devastação de florestas; medir regeneração dos solos após a remoção da camada superficial; e avaliar os efeitos dos poluentes como metais pesados e pesticidas (FRIGHETTO; VALARINI, 2000).

O carbono da biomassa microbiana é considerado um possível indicador de qualidade do solo. Esse indicador representa a fração ativa e biodegradável da matéria orgânica e reflete tendências de mudanças que estão ocorrendo no sistema em médio e longo prazos (FEIGL et al., 1995). Pode ser usado, por exemplo, para indicar mudanças na comunidade microbiana do solo sob estresse de metais pesados ou manejo (ANDRADE; SILVEIRA, 2004).

A redução da biomassa microbiana do solo e o aumento do quociente metabólico são características típicas de solos contaminados por metais pesados (BROOKES, 1995). O grau de inibição da atividade enzimática pode variar com a concentração do metal pesado agregado e também com o tipo de solo e enzima envolvida (NANNIPIERI, 1994).

A utilização da biomassa microbiana como método de avaliação da atividade dos microrganismos não representa a atividade real da microbiota, visto que podem existir no solo elevadas quantidades de biomassa inativa. Portanto, outros parâmetros são importantes para a avaliação da parte ativa no solo, tais como respiração basal e o quociente metabólico (qCO_2) (TOTOLA; CHAER, 2002).

2.2.2.3 Respiração basal do solo

A respirometria é um método que determina a quantidade de carbono liberado na forma de CO_2 , resultante da decomposição da matéria orgânica pela comunidade microbiana do solo. A respiração basal do solo representa a oxidação da matéria orgânica a CO_2 e H_2O pelos microrganismos aeróbios, ocupando posição importante no ciclo do carbono nos ecossistemas. A avaliação da atividade metabólica da microbiota do solo é feita pela quantificação de C pela liberação de CO_2 ou pelo consumo de O_2 (ALEF; NANNIPIERI, 1995).

Por meio da taxa de respiração basal do solo é possível obter também índices que permitem avaliar a dinâmica da matéria orgânica do solo (GAMA-RODRIGUES; GUERRA; ALMEIDA, 1994), sendo indicador sensível da decomposição de

resíduos, do giro metabólico do carbono orgânico do solo e de distúrbios no ecossistema (TÓTOLA; CHAER, 2002).

A avaliação da respiração basal do solo é uma das técnicas mais frequentes para quantificar a atividade microbiana e relaciona-se com o conteúdo de matéria orgânica (ALEF; NANNIPIERI, 1995). Insam e Domsch (1988) relatam que, na medida em que determinada biomassa microbiana se torna mais eficiente, menos carbono é perdido como CO₂ pela respiração basal e uma fração significativa de carbono é incorporada à biomassa microbiana.

Aumento na respiração basal pode ser indicativo da adição de grande quantidade de matéria orgânica prontamente disponível, ou ainda um alto nível de produtividade do ecossistema (TÓTOLA; CHAER, 2002). Entretanto, o aumento na respiração basal da comunidade microbiana do solo pode ser o primeiro sinal de estresse. Durante um estresse há direcionamento de mais energia para a manutenção celular, de forma que uma proporção de carbono da biomassa será perdida como CO₂ (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007). Dessa forma, uma biomassa microbiana “eficiente” teria menor taxa de respiração basal em relação a uma biomassa “ineficiente” (CARVALHO, 2005).

Diminuições significativas na liberação de CO₂ em solos contaminados com metais pesados têm sido encontradas por vários autores (DOELMAN; HAANSTRA, 1984; HATTORI, 1989). Entretanto, a influência de metais pesados na respiração basal do solo é pouco clara, tanto que outros autores verificaram aumentos da liberação de CO₂ em solos contaminados com metais pesados (LEITA et al., 1995; FLIEßBACH; MARTENS; REBER, 1994; BARDGETT; SAGGAR, 1994).

Ohya et al. (1988) sugeriram que a respiração basal está muitas vezes relacionada com o carbono da biomassa e com a comunidade metabolicamente inativa ou em estado de dormência. Para melhor entendimento do que acontece com os microrganismos faz-se uso do coeficiente metabólico (qCO₂), que é a relação entre a respiração basal e a biomassa microbiana. A respiração basal e o quociente metabólico associados ao carbono da biomassa constituem um bom indicador da funcionalidade do sistema, portanto um bom indicador da qualidade do solo (CARVALHO, 2005)

2.2.2.5 Quociente metabólico (qCO_2)

O quociente metabólico (qCO_2) é a relação entre a quantidade de CO_2 liberado do solo por unidade do carbono da biomassa microbiana e por unidade de tempo. Por isso, pode ser um claro indicativo da qualidade e eficiência dos microrganismos do solo (ANDERSON; DOMSCH, 1993). O qCO_2 altamente influenciado por atributos químicos e físicos, pelas características climáticas e manejo do solo (FRANÇA, 2007), podendo ser utilizado na avaliação dos efeitos ambientais, antropogênicos e na atividade microbiana do solo, sendo um possível indicador de estresse ambiental.

Altos valores de qCO_2 podem indicar comunidades microbianas em estágios iniciais de desenvolvimento, com maior proporção de microrganismos ativos em relação aos inativos, ou ainda, um indicativo de populações microbianas sob algum tipo de estresse metabólico, com alta demanda de energia da comunidade microbiana para se manter (ANDERSON; DOMSCH, 1993). Existem ainda, maiores perdas de C para a atmosfera na forma de CO_2 por unidade de biomassa microbiana produzida (ANDERSON, 2003).

Menores valores de qCO_2 indicam biomassa eficiente, que se encontra num ambiente equilibrado, podendo estar relacionados com áreas de maior diversidade vegetal (ANDERSON, 2003). A biomassa microbiana “eficiente” tem menor taxa de respiração basal em relação à biomassa microbiana “ineficiente” (WARDLE, 1994).

Khan e Scullion (2000), avaliando alterações microbianas em decorrência de contaminações por metais pesados, sugerem que a utilização desse índice como indicativo de estresses ou distúrbios é limitada, atribuindo alguns resultados discrepantes a alterações na estrutura da comunidade microbiana, como por exemplo, um incremento na proporção de fungos na comunidade microbiana dos solos.

Entretanto, Berton et al. (2006) afirma que o qCO_2 foi indicador adequado do grau de estresse sobre a comunidade microbiana em solo com a adição de níquel. Outros autores também encontraram relações positivas entre a concentração de metais no solo e qCO_2 (BARDGETT; KHAN; SCULLION, 1999; SAGGAR, 1994). Valsecchi; Gigliotti; Farini (1995) observaram que a aplicação de lodo de esgoto rico

em metais pesados teve efeito adverso na comunidade microbiana de 16 solos, provocando aumento do qCO_2 .

Enfim, o quociente metabólico pode ser um claro indicativo da eficiência da biomassa microbiana no sistema, fornecendo maior entendimento da dinâmica e eficiência dessa no ambiente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de condução do experimento

O experimento foi instalado em casa de vegetação localizada no Departamento de Tecnologia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP, no município de Jaboticabal, SP (21°15'20"S, 48°10'02"W, 579 m de altitude), no período de maio a dezembro de 2011.

3.2 Solo

O solo utilizado é o Latossolo Vermelho, solo este muito comum na região e em todo o Estado de São Paulo. A amostra para o experimento foi coletada na Fazenda de Ensino e Pesquisa da FCAV/UNESP, na camada de 0-20 cm.

Para caracterização química, uma amostra composta por 3 subamostras de solo foi seca ao ar e na sombra, destorroada, passada em peneira com 2 mm de abertura de malha, e submetida a análises para avaliação do nível de fertilidade conforme métodos descritos em Raij et al., (1987), apresentando os seguintes resultados: P-resina= 10,0 mg dm⁻³; MO= 16,0 g dm⁻³; pH (CaCl₂)= 5,0; K⁺= 1,5; Ca²⁺= 14,0; Mg²⁺= 7,0; H+Al= 31,0; SB= 23,0 e CTC= 54 em mmol_c dm⁻³ e V= 42%. Na mesma amostra, também foram determinadas as concentrações de carbono orgânico Dabin, (1976); N, pelo método de Kjeldahl Melo (1974); P, K, S, Ca, Mg, Na, Ba, Fe, Mn, Zn, Al e Cr por ICP-OES e Cu, B, Mo, Co, Cd, Ni e Pb, por espectrofotometria de absorção atômica no extrato da digestão com HNO₃ em forno de micro-ondas segundo método 3051A da EPA USEPA (2007); e os resultados foram: carbono orgânico= 10,62; N= 0,51; P= 0,18; K= 0,13; S= 0,08; Ca= 0,36; Mg= 0,30; Na= 0,12 em g kg⁻¹; Ba= 7,36; Cu= 9.033,01; Fe= 32.728,54; Mn= 304,86; Zn= 5,60; *B<11,60; *Mo<0,05; Al= 48.537,92; Co= 5,81; Cd= 1,31; Cr=84,71 e Pb= 11,12 em mg kg⁻¹.

* Concentração do elemento abaixo do limite de detecção do aparelho. O limite de detecção para os elementos analisados foi determinado pelo método preconizado pela IUPAC (1997), na média da concentração do elemento no extrato da prova em branco (11 leituras consecutivas) somada a três vezes o desvio-padrão das determinações.

3.3 Planta teste

A planta teste foi o sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench), pertencente à família Gramineae/Poaceae, híbrido BRS 310 da EMBRAPA, e com o uso de vasos com capacidade para 10 kg de solo, é possível conduzir a cultura até a produção de grãos.

3.4 Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi conduzido em duas etapas.

A etapa I foi desenvolvida em delineamento experimental em blocos casualizados. Nessa etapa foram avaliadas 2 fontes de Ba (BaSO_4 e BaCl_2) em 3 doses, com 4 repetições. Pela falta de informações disponíveis, optou-se por contaminar o solo com esses dois sais de bário de diferentes solubilidades, para obter comportamentos diferenciados do elemento traço no sistema solo-planta. Assim, enquanto a solubilidade do BaCl_2 é de 31g/100 mL, o BaSO_4 é considerado insolúvel (0,0002448 grama por 100 mL de água a 20°C).

As doses de Ba foram estabelecidas de acordo com os valores orientadores para solos do Estado de São Paulo (CETESB, 2001) e orientação federal do (CONAMA, 2009), considerando-se o valor de intervenção para solos agrícolas que é de 300 mg kg⁻¹ de Ba. Assim, as doses de Ba foram de 150, 300 e 600 mg kg⁻¹ solo, base seca. Existiu, ainda, um tratamento testemunha, que recebeu apenas fertilização mineral, de acordo com Melo et al. (1998).

Desta forma, os tratamentos na etapa I foram:

- B0 = testemunha, sem adição de Ba e com fertilização mineral (MELO et al., 1998)
- SB1 = 150 mg kg⁻¹ Ba na forma de BaSO_4
- SB2 = 300 mg kg⁻¹ Ba na forma de BaSO_4
- SB3 = 600 mg kg⁻¹ Ba na forma de BaSO_4
- CB1 = 150 mg kg⁻¹ Ba na forma de BaCl_2
- CB2 = 300 mg kg⁻¹ Ba na forma de BaCl_2
- CB3 = 600 mg kg⁻¹ Ba na forma de BaCl_2

O experimento foi instalado em duplicata, sendo um conjunto para a análise foliar e análise de solo no momento da diagnose foliar e um para chegar até a produção de grãos. No caso dos tratamentos B0 e CB2 foram usados mais 8 vasos de cada, para uso na etapa II do projeto.

A etapa II foi desenvolvida em delineamento experimental inteiramente casualizado, com o objetivo de avaliar a liberação de Ba pela biodegradação das plantas de sorgo, bem como a distribuição do Ba no solo. Foram usados 6 tratamentos, como descrito a seguir, em 5 repetições. Fez-se uso dos solos e da matéria seca das plantas de sorgo produzidas na etapa I.

Desta forma, os tratamentos foram:

- S0A0R0= testemunha 1 (apenas o solo dos vasos do tratamento testemunha do experimento prévio)
- S0A0R1= solo do tratamento testemunha do experimento prévio + raízes das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg^{-1} de Ba na forma de BaCl_2 do experimento prévio
- S0A1R1= solo do tratamento testemunha do experimento prévio + planta inteira (raízes + parte aérea das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg^{-1} de Ba na forma de BaCl_2 do experimento prévio)
- S1A0R0= testemunha 2 (apenas o solo dos vasos do tratamento com 300 mg kg^{-1} de Ba na forma de BaCl_2 do experimento prévio)
- S1A0R1= solo do tratamento com 300 mg kg^{-1} de Ba na forma de BaCl_2 do experimento prévio + raízes das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg^{-1} de Ba na forma de BaCl_2 do experimento prévio
- S1A1R1= solo do tratamento com 300 mg kg^{-1} de Ba na forma de BaCl_2 do experimento prévio + planta inteira (raízes + parte aérea das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg^{-1} de Ba na forma de BaCl_2 do experimento prévio).

Os tratamentos propostos se devem ao fato de, tentar representar o que acontece no campo em locais onde há produção de sorgo. Em alguns lugares somente a parte aérea é utilizada, deixando no campo somente as raízes, em outros somente a panícula é retirada deixando no campo a raiz e a parte aérea da planta.

3.5 Preparo do solo

As amostras de solo coletadas na camada de 0-20 cm foram secas ao ar, destorroadas, passadas em peneira com 5 mm de abertura de malha e submetidas à calagem, utilizou-se 54 g de calcário calcinado, PRNT= 130%, para cada 100 kg de solo, para elevação da saturação de bases a 70% (RAIJ et al., 1997). O calcário foi incorporado a porções de 50 kg de solo utilizando-se uma betoneira para garantir a maior homogeneização possível (Figura 1). As amostras foram mantidas a 60% da capacidade de retenção de água (CRA), (MELO et al.,1998) durante 29 dias e posteriormente foram secas ao ar, sendo então usadas para o enchimento de 80 vasos com capacidade para 10 kg de solo.

3.6 Instalação e condução dos experimentos

3.6.1 Etapa I

Os fertilizantes minerais (adubação inicial) e os sais de Ba (nas respectivas fontes e doses de cada tratamento), ambos na forma sólida, foram incorporados a porções de 40 kg de solo (29 dias após a calagem) com o auxílio de uma betoneira para garantir máxima homogeneidade. Em seguida, cada vaso foi preenchido com 10 kg de solo. Para evitar perda de solo pelos furos de escoamento de água existentes no fundo dos vasos, os mesmos foram cobertos com papel de filtro antes da adição do solo.

Na adubação inicial, foram adicionados, por kg de solo, 50 mg de N, 300 mg de P e 75 mg de K, sendo utilizados como fontes desses nutrientes o sulfato de amônio (20% N), o superfosfato simples (18% P_2O_5 ou 7,86% P) e o cloreto de potássio (60% K_2O ou 49,79% K). Quatro dias após a incorporação dos sais de Ba e dos fertilizantes foi realizado o transplante de 4 mudas previamente produzidas por vaso. Após o transplante, a umidade foi mantida em 60% da CRA por meio de pesagens periódicas e reposição da água evapotranspirada com água destilada.

Quinze dias após o transplante das mudas (DAT), quando as plantas atingiram aproximadamente 15 cm de altura, foi realizado desbaste mantendo-se apenas uma planta por vaso, a qual foi conduzida até o final do ciclo, de acordo com

as recomendações para a cultura no Estado de São Paulo. As plantas cortadas foram colocadas na superfície de cada vaso, para garantir que os nutrientes e o metal pesado por elas absorvidos não fossem removidos do sistema (MELO et al., 1998).

Foram realizadas duas adubações de cobertura: a primeira aos 24 DAT adicionando-se, por vaso, 75 mg de N (na forma de sulfato de amônio; 20% N), 75 mg de K (na forma de cloreto de potássio; 60% K_2O ou 49,79% K), 60 mL de uma solução contendo $0,96 \text{ g L}^{-1} H_3BO_3$; $1,97 \text{ g L}^{-1} CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $3,08 \text{ g L}^{-1} MnSO_4 \cdot 4H_2O$; $0,09 \text{ g L}^{-1} NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ e $7,33 \text{ g L}^{-1} ZnSO_4$ (MELO et al., 1998), e 20 mL de uma solução de Fe-EDTA (MELO et al., 1998) contendo $24,98 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato ferroso heptahidratado; $33,20 \text{ g L}^{-1}$ EDTA e 80 mL de solução de NaOH 1 mol L^{-1} ; a segunda ocorreu aos 36 DAT onde foram adicionados 75 mg de N por vaso, sendo utilizado o sulfato de amônio (20% N) como fonte desse nutriente.

Aos 56 DAT, por ocasião do emborrachamento das plantas, foi realizada a amostragem de folhas para fins de diagnose foliar, sendo coletadas as folhas medianas das plantas (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Na mesma ocasião, foi realizada uma amostragem de solo. Para tal, a parte aérea e as raízes foram inicialmente removidas, seguindo-se a secagem ao ar e à sombra, o destorroamento e a tamisagem em peneira com 2 mm de abertura de malha.

No final do ciclo da cultura (101 DAT), as plantas dos 16 vasos que foram conduzidos a mais do tratamento com 300 mg kg^{-1} Ba (na forma de $BaCl_2$), foram usadas na instalação da etapa II do projeto.

As amostras de solo dos tratamentos que receberam apenas fertilização mineral e dose de 300 mg kg^{-1} de Ba na forma de $BaCl_2$ foram usadas para a etapa II do projeto. Optou-se pelo tratamento com $BaCl_2$ por ser este o sal mais solúvel e o valor de 300 mg kg^{-1} por ser o definido pela CETESB (2001) como valor orientador para intervenção em solos agrícolas.

3.6.2 Etapa II

O solo dos vasos dos tratamentos testemunha (apenas fertilização mineral) e do tratamento que recebeu 300 mg kg^{-1} de Ba (BaCl_2) do experimento prévio, após a remoção cuidadosa da parte aérea (sem os grãos) e de todo o sistema radicular das plantas, foi seco ao ar (por 3 dias), destorroado e usado para preencher vasos com 10 kg de capacidade.

Nos tratamentos em que houve apenas o uso de raízes, o solo dos vasos foi removido e o sistema radicular intacto, como removido dos vasos que receberam 300 mg kg^{-1} de Ba (BaCl_2) na etapa I, realocando no vaso e, em seguida, o solo (do tratamento testemunha ou do tratamento que recebeu 300 mg kg^{-1} de Ba - BaCl_2 do experimento prévio) foi repostado.

Nos tratamentos que também incluíram a parte aérea das plantas de sorgo, a biomassa vegetal obtida no final do ciclo da cultura na etapa I do projeto (colmo+folhas), devidamente seca e moída (grosseiramente), foi distribuída, uniformemente, na superfície do solo, sem incorporação.

A cada vaso foi adicionada água destilada de modo a elevar a umidade para 60% da CRA, sendo irrigados diariamente com água destilada suficiente para repor a umidade perdida por evaporação (MELO et al., 1998).

Amostragens de solo foram realizadas aos 15, 30 e 90 dias após a instalação da segunda tapa, sendo retiradas 3 amostras simples de cada vaso (formando uma amostra composta) com a utilização de trado holandês com aproximadamente 5 cm de diâmetro e alcançando toda a profundidade do vaso. Parte do solo amostrado foi separado e o restante devolvido ao vaso.

3.7. Destinação dos resíduos gerados

O solo e plantas contaminados com Ba, que não foram utilizados para análises químicas, foram encaminhados para a “Comissão de Resíduos” da UNESP Campus Jaboticabal, para receber uma destinação final adequada. Segundo tal comissão, esses resíduos foram descartados no aterro sanitário da universidade.

3.8 Preparo das amostras de solo para análises de Ba

Todas as amostras de solo foram secas ao ar e à sombra, destorroadas, passadas em peneira com 2 mm de abertura de malha, acondicionadas em sacos de polietileno devidamente identificados e armazenadas em caixas de polietileno hermeticamente fechadas até o momento das análises.

3.9 Preparo das amostras de solo para análises biológicas

As amostras foram peneiradas úmidas (peneira de 2 mm), acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas sob refrigeração (4°C) até o momento das análises, quando sua umidade foi ajustada para 60% da CRA. Na etapa II o solo foi coletado com a auxílio de trado cilíndrico, também sendo acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas sob refrigeração (4°C) até o momento das análises.

3.10 Avaliações nas amostras de solo

3.10.1 Teores extraíveis de Ba no solo

Para determinar os teores extraíveis de Ba foi utilizado o extrator mehlich-3, conforme método proposto por Mehlich (1984), sendo esse extrator uma solução com as seguintes características: CHOOH (0,20 mol L⁻¹), NH_4NO_3 (25g L⁻¹), NH_4F (0,015 mol L⁻¹), HNO_3 (0,013 mol L⁻¹) e EDTA (0,01 mol L⁻¹). Os teores de Ba foram determinados em ICP-OES.

3.10.2 Atividade enzimática

3.10.2.1 Amilase

A atividade da amilase foi determinada pela metodologia proposta por Ross (1965) e modificado por Melo et al., (1983). O método consiste em incubar a amostra de solo na presença do substrato amido avaliando-se, em seguida, a quantidade de açúcares redutores produzidos.

3.10.2.2 Arilsulfatase

O método utilizado foi o proposto por Tabatabai e Bremner (1970). O método consiste em incubar a amostra de solo com o substrato p-nitrofenil sulfato de potássio, na presença de toluol, avaliando-se, após a incubação, a quantidade de p-nitrofenol formada.

3.12.2.3 Urease

A determinação da atividade da urease nas amostras de solo foi determinada pelo método proposto por (MAY; DOUGLAS, 1976). O método consiste em incubar as amostras de solo em temperatura constante de 30°C, na presença de ureia (substrato) por 1 hora. A amônia liberada pela hidrólise da ureia é avaliada, posteriormente, segundo metodologia descrita por Bremner e Keeney (1965).

3.10.2.4 Fosfatase ácida e alcalina

As atividades das fosfatases ácida e alcalina foram avaliadas pela metodologia proposta por Alef e Nannipieri, (1995). O método consiste em incubar as amostras de solo com o substrato p-nitrofenil fosfato de sódio, avaliando-se, ao final do período de incubação a quantidade de p-nitrofenol formada.

3.10.3 Atividade biológica

3.10.3.1 Desidrogenase

A desidrogenase foi determinada por método proposto por Alef e Nannipieri (1995). O método consiste em incubar amostra de solo com TTC (cloridrato de trifeniltetrazólio), avaliando-se, após o período de incubação, a quantidade de TPF (trifenilformazan).

3.10.3.2 Carbono da biomassa microbiana

A biomassa microbiana foi determinada por metodologia proposta por Vance; Brookes e Jenkinson (1987). O método consiste em pesar em duplicata, 25g da amostra de solo, sendo designadas de ANF (amostra não fumigada com clorofórmio) e AF (amostra fumigada com clorofórmio), e coloca-las em becker de 50ml. As amostras ficam incubadas a 5° C por 24 horas.

3.10.3.3 Respiração basal

A estimativa da atividade respiratória foi determinada segundo Alef e Nannipieri (1995). O método consiste em incubar as amostras de solo por 3 dias a 25° C. As amostras de solo foram acondicionadas no fundo de um frasco hermético fechado, contendo solução de NaOH (0,05N).

3.10.3.4 Cálculo do qCO₂

O cálculo do qCO₂ foi feito com base em Anderson e Domsch (1993) cuja fórmula segue abaixo.

$$qCO_2 \text{ (mgC-CO}_2\text{.g}^{-1}\text{BMS-C.h}^{-1}\text{)} = \frac{\text{RBS (mgC - CO}_2\text{.kg}^{-1}\text{solo.h}^{-1}\text{)}}{\text{BMS - C (mgC.kg}^{-1}\text{solo).10}^{-3}}$$

Em que: RBS = Respiração basal do solo

BMS = Biomassa microbiana do solo

3.11 Análise dos resultados

Os resultados obtidos na etapa I de experimentação foram submetidos a análise de variância segundo esquema fatorial 2x3 mais 1 tratamento - testemunha sem contaminação do solo com Ba (2 fontes de Ba, 3 doses do metal e 1 tratamento - testemunha, totalizando, 7 tratamentos).

Os resultados obtidos na etapa II foram submetidos à análise de variância segundo esquema de parcelas subdivididas (sendo os tratamentos principais os testados durante as etapas de experimentação e os tratamentos secundários as

épocas de amostragem do solo em cada etapa).

Em todas as análises de variância, nos casos em que o teste F foi significativo a 1 ou 5% de probabilidade, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação de médias (PIMENTEL-GOMES; GARCIA, 2002). Para a comparação da média do tratamento testemunha com a média de cada um dos demais tratamentos, foi utilizado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Etapa I

4.1.1 Atividade biológica nas amostras de solo

A atividade biológica foi influenciada pelos diferentes sais. Na Tabela 1 observa-se que o carbono da biomassa microbiana foi menor nos tratamentos com BaCl_2 . A respiração basal do solo e o $q\text{CO}_2$ foram menores no tratamentos com BaSO_4 e as desidrogenases não foram influenciadas pelos diferentes sais de Ba (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade biológica em Latossolo Vermelho contaminado com cloreto e sulfato de Ba e cultivado com sorgo granífero.

Sais de Bário	Atividades biológicas			
	Desidrogenases	CBM	RBS	qCO ₂
	(µg TPF/g TFSE /24 horas)	(mg C/kg TFSE)	(CO ₂ (mg/g TFSE/hora)	(mg de C-CO ₂ g/ BMS-C/hora)
BaCl ₂	16,71 b	85,56b	0,30 a	3,52 a
BaSO ₄	21,90 a	278,07 a	0,20 b	0,99b
Teste F	77,24**	223,01**	19,44**	107,90**
DMS (5%)	1,24	31,10	0,05	0,51
Dose (mg kg ⁻¹)				
150	18,05 b	235,29 a	0,23 a	1,84 b
300	19,95 a	84,37 b	0,26 a	3,35 a
600	19,92 a	225,79 a	0,28 a	1,58 b
Teste F	4,52*	57,31**	1,55 ns	20,61**
DMS (5%)	1,85	46,17	0,07	0,76
Interação Sais x Doses	8,50**	48,75**	10,37**	3,41 ns
Fatorial x testemunha	6,20*	0,24ns	155,73**	11,01**
Testemunha	17,36	190,13	0,62	3,31
Média dos fatores	19,31	181,82	0,26	2,25
CV (%)	7,60	17,25	17,66	24,75

CBM= carbono da biomassa microbiana. RBS= respiração basal do solo. Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). DMS= diferença mínima significativa. ns= não significativo. ** significativo a 1% de probabilidade. * significativo a 5% de probabilidade.

Observou-se que as desidrogenases apresentaram aumento da atividade nas maiores doses de BaSO_4 (300 e 600 mg kg^{-1}) tendo sido superior à testemunha para os mesmos tratamentos (Tabela 2). Isso pode ter ocorrido à aplicação do BaSO_4 , mas também à adubação utilizada, que apresentava S na composição. Desse modo, pode ter ocorrido um deslocamento do sulfato da solução a fase sólida, para equilíbrio de cargas no solo, podendo considerar que o sulfato que ficou disponível na solução interferiu na atividade dos microrganismos, resultando em aumento da atividade das desidrogenases.

Nahas, Delfino e Assis (1997) também verificaram aumento na atividade das desidrogenases com a aplicação de doses de S, em particular na forma de gesso agrícola. Fraser et al. (1988) afirmam que a atividade de desidrogenases é decorrente da atividade microbiana, sendo estimulada pela adição de matéria orgânica ao solo, mas também pode ser afetada pelos contaminantes presentes no resíduo, uma vez que em solos contaminados com metais pesados a atividade da microbiota tende a maior consumo energético.

Ao contrário das desidrogenases, o carbono da biomassa microbiana foi influenciado pelos sais de Ba (Tabela 1), apresentando menor atividade para o BaCl_2 (Tabela 1). Em comparação com a testemunha, foram observados menores valores nas doses 150 e 600 mg kg^{-1} de Ba na forma de BaSO_4 . Os menores valores de atividade foram determinados na dose 300 mg kg^{-1} de Ba na forma de BaSO_4 e nos tratamentos com BaCl_2 (Tabela 2).

Considerando a maior solubilidade do BaCl_2 em relação ao BaSO_4 , podendo disponibilizar grande quantidade de Ba, esse pode ter influenciado a diminuição da atividade microbiana nos tratamentos com este sal, visto que o carbono da biomassa microbiana pode refletir mudanças na microbiota do solo sob estresse de metais pesados (ANDRADE; SILVEIRA, 2004).

A maior taxa de respiração basal do solo foi observada com os tratamentos de BaCl_2 , não sendo observadas diferenças entre as doses testadas na forma de BaSO_4 (Tabela 1). Em comparação com a testemunha, todas as doses de sais avaliadas apresentaram taxa de respiração inferior. Entre as fontes, observou-se que a taxa mais elevada foi para o BaCl_2 em relação ao BaSO_4 e dentro das doses avaliadas de BaCl_2 , o valor mais alto de respiração basal foi obtido na dose de 300

mg kg⁻¹ de bário (Tabela 2).

Insam e Domsch (1988) relataram que na medida em que a biomassa microbiana se torna mais eficiente, menos carbono é perdido como CO₂ pela respiração basal e uma fração de carbono é incorporada à biomassa microbiana. Logo, uma biomassa “eficiente” teria menor taxa de respiração basal em relação a uma biomassa “ineficiente” (CARVALHO, 2005). Os tratamentos com BaCl₂ em comparação com os de BaSO₄, tiveram maior taxa de respiração, podendo ser um indicativo de estresse causado nessa biomassa.

Concordando com o aumento na liberação de CO₂ em solos contaminados com metais pesados, diversos autores também verificaram maiores taxas de respiração (BARDGETT; SAGGAR, 1994; FLIEßBACH; MARTENS; REBER, 1994; LEITA et al., 1995).

O quociente metabólico (qCO₂), assim como a respiração basal do solo, apresentaram maiores valores nos tratamentos com BaCl₂ (Tabela 1), ao contrário do carbono da biomassa microbiana. Os maiores valores de qCO₂ foram observados na dose de 300 mg kg⁻¹ e os menores valores nas doses de 150 e 600 mg kg⁻¹ (Tabela 2).

O qCO₂ é uma relação entre a quantidade de CO₂ liberado do solo e a unidade de carbono da biomassa microbiana, por unidade de tempo. A perda de C na forma CO₂ significa menor incorporação do carbono no tecido microbiano indicando ambiente estressado. Isso pode ser um claro indicativo da qualidade e eficiência dos microrganismos do solo (ANDERSON; DOMSCH, 1993). Os menores valores de qCO₂ nos tratamentos com BaSO₄ mostram uma biomassa mais eficiente, em comparação com a testemunha e com BaCl₂, uma vez que foi observado menor perda de CO₂ pela biomassa do solo.

Avaliando agroecossistemas durante 21 anos, Mäder et al. (2002) também atribuíram valores de qCO₂ baixo a uma maior diversidade da comunidade microbiana e maior eficiência no uso da energia. Esse desempenho indica que o sistema entra em equilíbrio, otimizando os efeitos da atividade microbiana e liberando menos CO₂ para a atmosfera (GAMA-RODRIGUES; GAMA-RODRIGUES; BARROS, 1997).

Quando comparados os tratamentos com Ba e a testemunha, observou-se

menores valores de qCO_2 nos tratamentos com $BaSO_4$ e maiores no tratamento 300 $mg\ kg^{-1}$ de Ba na forma de $BaCl_2$. Altos valores de qCO_2 podem indicar comunidades microbianas em estágios iniciais de desenvolvimento, com maior proporção de microrganismos ativos em relação aos inativos. Pode também ser, um indicativo de populações microbianas sob algum tipo de estresse metabólico, refletindo uma alta demanda de energia da comunidade microbiana para se manter (ANDERSON; DOMSCH, 1993). Implicando assim, em maiores perdas de C para a atmosfera na forma de CO_2 por unidade de biomassa microbiana produzida (ANDERSON, 2003).

Tabela 2. Valores médios da interação significativa, entre sais e doses de Ba, da análise de variância referente a atividade biológica em Latossolo Vermelho contaminado com sais de Ba de diferentes solubilidades.

Sais de Ba (SB)	Doses * (DB)		
	150	300	600
Desidrogenases ($\mu\text{g TPF/g TFSE /24 horas}$)			
BaCl ₂	16,75 bA	15,72 bA	17,67 bA
BaSO ₄	19,36 aB	24,18 aA (+)	22,19 aA (+)
Testemunha = 17,36		DMS (testemunha) = 0,20	
DMS coluna (5%) = 2,15		DMS linha (5%) = 2,61	
Carbono da Biomassa Microbiana (mg C/kg TFSE)			
BaCl ₂	78,43 bA (-)	76,05 aA (-)	102,20 bA (-)
BaSO ₄	392,16 aA (+)	92,70 aB (-)	349,38 aA (+)
Testemunha = 190,14		DMS = 73,19	
DMS (SB dentro DB) = 46,89		DMS coluna (5%) = 46,89	
Respiração basal do solo CO₂ (mg/g TFSE/hora)			
BaCl ₂	0,27 aB (-)	0,37 aA (-)	0,27 aB (-)
BaSO ₄	0,19 aAB (-)	0,14 bB (-)	0,28 aA (-)
Testemunha = 0,62		DMS = 0,11	
DMS (SB dentro DB) = 0,08		DMS (DB dentro SB) = 0,10	
qCO₂(mg de C-CO₂ g⁻¹ BMS-C.hora⁻¹)			
BaCl ₂	3,18 Ab	4,96 aA (+)	2,43 aB
BaSO ₄	0,49 bB (-)	1,74 bA (-)	0,74 bAB(-)
Testemunha = 3,33		DMS = 1,19	
DMS (SB dentro DB) = 0,89		DMS (DB dentro SB) = 1,08	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). DMS= diferença mínima significativa. ns= não significativo. ** significativo a 1% de probabilidade. * significativo a 5% de probabilidade. Sendo letras minúsculas comparação entre colunas, e letras maiúsculas entre linhas.

4.1.2 Atividade enzimática

Os sais e as doses de Ba promoveram alterações na atividade da maioria das enzimas avaliadas (Tabela 3). As doses não influenciaram a atividade de amilases e de fosfatases ácidas.

Foram observadas diferenças entre testemunha e fatores em quase todas as enzimas, exceto para as amilases (Tabela 4).

As atividades das enzimas amilases, fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas foram menores quando se utilizou BaCl₂. Arilsulfatases e ureases foram menos

ativas quando se utilizou BaSO_4 (Tabela 3 e 4).

Com exceção da fosfatases ácidas, interações significativas entre sais e doses foram observadas para as demais (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Atividade enzimática em Latossolo Vermelho contaminado com cloreto e sulfato de Ba e cultivado com sorgo granífero.

Fontes	Atividades enzimáticas				
	Amilases (mg glicose/10g TFSE (terra fina seca em estufa) /24 horas)	Arilsulfatases (mg p-nitrofenol/hora/kg TFSE)	Uréases (mg NH ₄ ⁺ /kg TFSE /h)	Fosfatases Ácidas (µg p-nitrofenol/g TFSE / hora)	Fosfatases Alcalinas (µg p-nitrofenol/g TFSE / hora)
BaCl ₂	0,97 b	2,09 a	40,46 a	472,85 b	52,77 b
BaSO ₄	1,27 a	0,84 b	17,79 b	575,64 a	101,38 a
Teste F	43,57**	104,14**	61,64**	16,50**	208,09**
DMS (5%)	0,096	0,26	6,06	53,12	7,07
Dose (mg kg⁻¹)					
150	1,08 a	2,15 a	28,96 b	513,01 a	60,18 c
300	1,15 a	1,09 b	40,60 a	525,88 a	78,51 b
600	1,12 a	1,16 b	17,80 c	533,84 a	92,55 a
Teste F	0,76 ns	31,49**	20,79**	0,23 ns	30,95 **
DMS (5%)	0,14	0,38	9,02	79,11	10,53
Interação Sais x Doses	5,40*	22,69**	24,29**	0,61ns	13,98**
Fatorial x testemunha	1,56 ns	10,10**	5,09*	19,30 **	6,95*
Testemunha	1,04	0,95	37,74	377,14	65,33
Média dos fatores	1,12	1,47	29,12	524,24	77,08
CV (%)	10,07	21,58	23,30	12,32	10,95

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). DMS= diferença mínima significativa. ns= não significativo. ** significativo a 1% de probabilidade. * significativo a 5% de probabilidade.

As amilases apresentaram menor atividade para o BaCl_2 , não tendo as doses influenciado na atividade desta enzima.

A correlação negativa entre a quantidade de Ba extraível do solo e a atividade da amilase (Tabela 4) pode ser efeito do metal nos microrganismos produtores da enzima, visto que, o BaCl_2 é mais solúvel que o BaSO_4 , e pode por isso disponibilizar maior quantidade de Ba na solução do solo. O efeito tóxico do BaCl_2 nos microrganismos produtores desta enzima pode ser o fator limitante na atividade dessa enzima.

Frade Junior (2007) em experimento com lodo de esgoto contaminado com sais de cádmio de diferentes solubilidades, observou devido à maior solubilidade e possível aumento na toxidez, que as fontes CdCl_2 e CdSO_4 inibiram o metabolismo dos microrganismos, podendo representar efeito tóxico também desse metal na atividade dessa enzima.

Observou-se que, as ureases, ao contrário das amilases, apresentaram menor atividade com o BaSO_4 e na dose de 600 mg kg^{-1} de BaCl_2 (Tabela 3).

García-Gil et al. (2000) observaram redução na atividade da urease em solo arenoso com aplicação de 80 t ha^{-1} de lodo compostado, reduzindo 28% da atividade da urease, em razão dos altos teores de metais pesados. Entretanto Trannin, Siqueira e Moreira (2007) observaram em experimento com lodo de esgoto que na dose máxima (24 t ha^{-1}), houve aumento da atividade ureolítica em resposta às doses aplicadas no solo, obtendo valor quatro vezes superior ao obtido no tratamento controle, também sendo justificado em função dos altos teores de metais presentes no tratamento. Considerando os experimentos anteriores, quando temos uma maior dose de lodo aplicada também temos uma maior quantidade de metal pesado, levando isso em consideração, podemos observar que em função dessas quantidades a urease comporta-se de forma diferente. Isso pode ser observado, também, nos tratamentos do experimento (Tabela 4).

A maior atividade das ureases foi encontrada na dose 300 mg kg^{-1} , na forma de BaCl_2 , onde o valor foi superior à testemunha. Na dose 600 mg kg^{-1} do Ba na forma de BaCl_2 e nas doses de 150, 300 e 600 mg kg^{-1} na forma de BaSO_4 , a atividade dessa enzima foi inferior à testemunha.

Assim como as ureases e as arilsulfatases tiveram sua atividade diminuída

para o BaSO_4 , tendo apresentado menor atividade nas doses 150 e 600 mg kg^{-1} na forma de BaSO_4 (Tabela 4). Considerando que essa é uma enzima extracelular que catalisa a hidrólise de ésteres de sulfato orgânico, liberando sulfato disponível (BAKER; WHITE; PIERZYNSKI, 2011), e levando em consideração, que o tratamento com BaSO_4 foi o que causou diminuição na atividade dessa enzima, de alguma forma, o íon sulfato pode ter sido complexado, afetando assim, a atividade dos microrganismos responsáveis pela produção da enzima.

Em comparação à testemunha, as arilsulfatases apresentaram diferenças entre sais e doses, sendo sua atividade superior à testemunha para o BaCl_2 nas doses 150 e 600 mg kg^{-1} do Ba (Tabela 3).

As fosfatases ácidas e alcalinas, assim como as amilases, apresentaram menor atividade na maior dose de BaCl_2 (Tabela 3). As fosfatases ácidas apresentaram atividade superior à testemunha em todas as doses de BaSO_4 , e não apresentaram diferenças entre as doses. Já a atividade das fosfatases alcalinas foi superior nas duas maiores doses (300 e 600 mg kg^{-1}) de BaSO_4 , e inferiores na dose de 150 mg kg^{-1} de BaCl_2 (Tabela 4). A atividade das duas enzimas comparadas às testemunhas se mostraram mais sensíveis tendo maior atividade no solo contaminado com BaSO_4 .

Tabela 4. Valores médios da interação significativa, entre sais e doses de Ba, da análise de variância referente a atividade enzimática em Latossolo Vermelho contaminado com sais de Ba de diferentes solubilidades.

Sais de Ba (SB)	Doses * (DB)		
	150	300	600
Amilases (mg glicose/10g TFSE /24 horas)			
BaCl ₂	1,02 aA	0,90 bA	0,98 bA
BaSO ₄	1,15 aB	1,40 aA*(+)	1,25 aAB
Testemunha = 1,04	DMS = 0,22		
DMS (SB dentro DB) = 0,17	DMS (DB dentro SB) = 0,20		
Arilsulfatases (mgp-nitrofenol/ hora/kg TFSE)			
BaCl ₂	3,21 aA (+)	1,16 aC	1,91 aB(+)
BaSO ₄	1,10 bA	1,02 aA	0,40 bB
Testemunha = 0,95	DMS = 0,60		
DMS (SB dentro DB) = 0,45	DMS (DB dentro SB) = 0,54		
Ureases (mg NH₄/ kg TFSE / hora)			
BaCl ₂	39,97 aB	64,42 aA (+)	16,98 aC (-)
BaSO ₄	17,95 bA (-)	16,78 bA (-)	18,62 aA (-)
Testemunha = 37,74	DMS = 14,15		
DMS (SB dentro DB) = 10,50	DMS (DB dentro SB) = 12,77		
Fosfatases Ácidas (µg p-nitrofenol/g TFSE hora)			
BaCl ₂	475,21 aA	480,03 aA	475,21 bA
BaSO ₄	550,80 aA (+)	571,73 aA(+)	550,80 aA (+)
Testemunha = 377,14	DMS = 124,04		
DMS (SB dentro DB)= 92,05	DMS coluna (5%) = 92,05		
Fosfatases Alcalinas (µg p-nitrofenol/g TFSE / hora)			
BaCl ₂	47,05 bA (-)	53,66 bA	57,62 bA
BaSO ₄	73,30 aC	103,36 aB (+)	127,47 aA (+)
Testemunha = 65,33	DMS = 16,52		
DMS (SB dentro DB)= 12,26	DMS (DB dentro SB) = 4,88		

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). DMS= diferença mínima significativa. Sendo letras minúsculas comparação entre colunas, e letras maiúsculas entre linhas.

4.1.3 Correlações entre atividades enzimáticas, biológicas e bário extraível.

Foram observadas correlações entre as atividades enzimáticas e biológicas, bem como entre as atividades biológicas e o Ba extraível (Tabela 5).

O carbono da biomassa microbiana correlacionou-se negativamente com o Ba extraível presente no solo. Como na maioria das enzimas também houve correlação negativa, evidenciando assim a diminuição da quantidade de microrganismos presentes no solo (Tabela 5).

Não houve correlação entre o carbono da biomassa microbiana e a respiração basal do solo. Já entre o carbono da biomassa e o qCO_2 houve correlação negativa (Tabela 5), mostrando que houve redução na microbiota, diminuindo assim sua eficiência na biodegradação de compostos. A correlação positiva existente entre a respiração e o qCO_2 evidenciou que o aumento do quociente metabólico foi devido à diminuição da quantidade de microrganismos e não em consequência da diminuição da respiração.

Trannin, Siqueira e Moreira (2007) em experimento por dois anos consecutivos de aplicação de doses de lodo de esgoto (com metais pesados em sua composição), também observaram correlação inversa entre o qCO_2 e o carbono da biomassa microbiana, indicando que a microbiota permaneceu ativa na biodegradação dos compostos orgânicos e eficiente na utilização desses substratos para obtenção de energia.

Em relação ao Ba extraível e as atividades enzimáticas, as respostas de diferentes enzimas para o mesmo poluente podem variar grandemente e a mesma enzima pode responder de forma diferente aos diferentes poluentes (HE et al., 2003; LI et al., 2009).

Ekenler e Tabatabai (2002) explicaram o efeito adverso de metais pesados sobre as enzimas do solo, onde íons metálicos podem inativar enzimas por reação com os grupos sulfidrilo de enzimas para a formação de sulfuretos de metais. Grupos sulfidrila de enzimas podem servir como parte integrante dos sítios ativos catalíticos ou como grupos envolvidos na manutenção da correta relação estrutural de proteína enzimática (ZHANG et al., 2010). Metais pesados podem também inibir as enzimas por meio da complexação do substrato, ou por reação com o complexo enzima-substrato (HINOJOSA et al., 2004).

Para o qCO_2 em relação ao Ba extraível houve correlação positiva, ou seja, que quanto maior a quantidade de Ba disponível no solo, menor a eficiência dos microrganismos nele existentes (Tabela 5).

A correlação negativa entre o Ba extraível, o carbono da biomassa microbiana e a maioria das enzimas, evidencia a diminuição dos microrganismos com o aumento do Ba no solo. Em solos contaminados microrganismos precisam de mais energia para sobreviver em condições desfavoráveis, e, portanto, mais energia é

perdida e menores quantidades de C, N e P são incorporados aos componentes orgânicos (MIKANOVA, 2006). Esta hipótese é suportada pelo maior qCO_2 em solos contaminados o que, também foi observado por ZHANG et al. (2008).

Tabela 5. Correlação entre atividades enzimáticas, biológicas e Ba extraível de um Latossolo Vermelho contaminado com cloreto e sulfato de Ba.

Características	Amilase	Arilsulfatases	Urease	F. ácida	F. Alcalina	Desidrogenase	CBM	Resp.	qCO ₂	Ba extraível*
Amilase	-									
Arilsulfatase	-0,3907*	-								
Urease	-0,4594*	ns	-							
F. Ácida	0,4208*	ns	ns	-						
F. Alcalina	0,7027**	-0,6566**	-0,4715*	0,6081**	-					
Desidrogenase	ns	ns	ns	ns	-0,4908**	-				
CBM	ns	-0,4935**	-0,3845*	ns	0,5152**	ns	-			
Resp.	-0,4282*	ns	0,4883**	ns	ns	ns	ns	-		
qCO₂	-0,5660**	ns	0,7317**	-0,4374*	-0,5764**	ns	-0,7153**	0,5271**	-	
Mehlich 3	-0,5669**	0,5284**	ns	ns	-0,5588**	-0,5206**	-0,5886**	ns	0,4955**	-

F. ácida = Fosfatase ácida; F. alcalina = Fosfatase alcalina; CBM = Carbono da biomassa microbiana; Resp. = Respiração basal do solo; qCO₂ = Quociente metabólico; * Ba extraível com extrator Mehlich 3; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns= não significativo.

4.2 Etapa II

4.2.2. Atividade biológica

Considerando as desidrogenases, observou-se maior atividade na primeira amostragem de solo (15 dias após início do experimento). Somente para alguns tratamentos (S0A1R1 e S1A0R0) não houve diferença em relação à última coleta (Tabela 06). Na coleta do 15° observaram-se maiores atividades nos tratamentos que não possuíam solo contaminado, e somente o tratamento S1A1R1, dentre os tratamentos com solo contaminado, apresentou elevada atividade. Considera-se que, até determinada dose, o Ba pode interferir na atividade desta enzima e, no tratamento S1A1R1, por possuir grande quantidade de material orgânico, o efeito do metal tenha sido minimizado. Para esta mesma amostragem foi verificada maior atividade nos tratamentos sem solo contaminado e com material orgânico (S0A1R1 e S1A1R1) (Tabela 06). O tratamento sem parte aérea (S0A0R1) proporcionou menor atividade das desidrogenases, em função da menor quantidade de material vegetal fornecido.

Segundo Fraser et al. (1988) a ação das desidrogenases é decorrente da atividade microbiana, sendo estimulada pela adição de matéria orgânica ao solo, mas também podendo ser um efeito dos contaminantes presentes no resíduo, uma vez que, em solos contaminados, a atividade da microbiota pode ser maior em decorrência do maior consumo energético para garantir a sobrevivência.

Na Tabela 06, observa-se que a maior atividade foi aos 90 dias, considerando-se que com o tempo, ocorre aumento na população de microrganismos produtores dessa enzima. Nas demais épocas de amostragem não houve diferenças entre os tratamentos.

A quantidade de carbono da biomassa microbiana também respondeu de maneira diferente aos tratamentos de acordo com a época de amostragem. Aos 15 dias, os tratamentos que apresentaram maiores valores foram os que possuíam maior quantidade de material orgânico disponível (S0A1R1 e S1A1R1) (Tabela 06).

Aos 30 dias a atividade foi maior nos tratamentos que possuíam menor quantidade de metal (S0A0R0, S0A0R1 e S0A1R1). Em trabalho com lodo de esgoto Chander e Brookes (1991) relataram que a biomassa microbiana diminuiu em

solos tratados com lodos enriquecidos com metais pesados, sendo que essa redução foi maior em solo argiloso.

Ao contrário do carbono da biomassa microbiana, a taxa de respiração do solo apresentou maior valor no 15° no tratamento S1A0R1 (Tabela 06) se comparado aos demais tratamentos que possuíam solo contaminado (S1A0R0 e S1A1R1). Entre as épocas de amostragem as menores taxas de respiração foram verificadas no dia 15 (primeiro dia de amostragem), tendo sua taxa diminuída com o tempo somente no tratamento com maior quantidade de Ba e menor de material vegetal (S1A0R0).

O aumento na atividade microbiana, avaliada pela respiração basal do solo, tem sido justificado pelo acúmulo de matéria orgânica (VARGAS; SCHOLLES, 2000). Ohya et al. (1988) observaram que, em solos poluídos com metais pesados, a respiração basal do solo correlacionou-se negativamente com a concentração de metais e que esse efeito inibitório depende da concentração de matéria orgânica do solo.

Assim, o aumento na respiração basal da comunidade microbiana do solo pode ser o primeiro sinal de estresse, uma vez que a reparação dos danos causados por distúrbios no solo requerem desvio de energia do crescimento e reprodução para a manutenção celular. Durante um estresse haverá direcionamento de mais energia para a manutenção celular de forma que uma proporção de carbono da biomassa será perdida como CO₂ (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

A adição de resíduos orgânicos aumenta a liberação de CO₂ atribuída, principalmente, às populações metabolicamente ativas que são as mais afetadas pelo excesso de metais pesados no solo (INSAM; HUTCHINSON; REBER, 1996).

Para o qCO₂ (Tabela 06), quando comparadas as épocas de amostragem, observou-se aumento nos tratamentos S0A0R1 e S0A1R1. Somente o S0A0R0 sem nenhum contaminante permaneceu igual em todas as amostragens e com valores inferiores aos demais tratamentos.

Menores valores de qCO₂ indicam biomassa eficiente, que se encontra num ambiente equilibrado, podendo estar relacionados com áreas de maior diversidade vegetal (ANDERSON, 2003). Uma biomassa microbiana “eficiente” tem menor taxa de respiração basal em relação a uma biomassa microbiana “ineficiente” (WARDLE,

1994).

Comparando os tratamentos com solo contaminado, os tratamentos que possuíam partes contaminadas das plantas, tiveram aumento no valor do qCO_2 .

Quando comparados os tratamentos, foram obtidos maiores valores com o tratamento S0A1R1, aos 90 dias e com o tratamento S1A0R1 aos 15 e 30 dias (Tabela 06), mas nas últimas amostragens houve diminuição desses valores. Calgaro et al. (2008), em trabalho com uso de resíduos orgânicos como condicionantes de subsolo degradado, em que foram feitas cinco amostragens em intervalos de 60 dias, observaram variação das taxas de qCO_2 . Na primeira época de amostragem, foram verificadas altas taxas de qCO_2 , que como citado anteriormente, foi devido a quantidade de material orgânico ou à situação de estresse.

Tabela 06. Atividade biológica em Latossolo Vermelho contaminado com cloreto de Ba e/ou com restos culturais de plantas de sorgo granífero também contaminadas com cloreto de Ba em diferentes épocas de amostragem.

Tratamentos	Desidrogenases(ug TPF/g TFSE /24 horas)					CV%	
	Época de amostragem			Média	Par.		
	Dia 15	Dia 30	Dia 90				
S0A0R0	2,42 bA	0,6020 cB	1,19 bB	1,04			
S0A0R1	4,48 aA	2,24 aB	2,90 aB	3,21			
S0A1R1	3,84 aA	1,02 cC	2,13 abB	2,33	20,19	28,38	
S1A0R0	1,05 cB	2,09abA	2,26 aA	1,80			
S1A0R1	0,58 cAB	0,30 cB	1,24 bA	0,70			
S1A1R1	2,68 bA	1,17 bcB	1,16 bB	1,67			
Média	2,51	1,24	1,81				
Carbono da biomassa microbiana(mg C/kg TFSE)							
S0A0R0	161,62 bB	213,90 aAB	278,07aA	217,86			
S0A0R1	206,77 bA	158,64 aA	178,25 bcA	181,22			
S0A1R1	346,99 aA	163,99 aB	54,66 dc	188,55	26,12	27,95	
S1A0R0	163,99 bA	192,51 aA	117,64 cdA	158,05			
S1A0R1	46,91 cB	42,78 bB	142,60 cdA	78,43			
S1A1R1	256,68 abA	37,43 bB	256,68 abA	183,60			
Média	197,66	134,88	171,32				
Respiração basal do solo (CO ₂ (mg/g TFSE/hora)							
S0A0R0	1,58 bA	0,59 cA	1,08 cA	1,08			
S0A0R1	0,47 bA	0,55 cA	1,50 bcA	0,84			
S0A1R1	0,70 bB	0,66 cB	6,24 aA	2,53	31,40	34,40	
S1A0R0	1,70 bAB	0,83 cB	2,12 bcA	1,54			
S1A0R1	5,03 aA	4,42 bA	2,60 bB	4,02			
S1A1R1	0,50 bB	6,15 aA	1,08 cB	2,58			
Média	1,66	2,20	2,43				
qCO ₂ (mg de C-CO ₂ g ⁻¹ BMS-C.hora ⁻¹)							
S0A0R0	0,0015 bA	0,008 bA	0,0013 bA	0,00117			
S0A0R1	0,0005 bB	0,0010 bAB	0,0025 bA	0,00133			
S0A1R1	0,0005 bB	0,0008 bB	0,0055 aA	0,00225			
S1A0R0	0,0018 bA	0,0018 bA	0,0025 bA	0,00200	45,09	40,41	
S1A0R1	0,0050 aA	0,0048 aA	0,0030 bB	0,00425			
S1A1R1	0,0003 bB	0,0060 aA	0,0018 bB	0,00267			
Média	0,00158	0,00250	0,00275				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula para épocas de amostragem (na horizontal) e demesma letra minúscula para tratamentos (na vertical) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). CV= coeficiente de variação. Par. = parcelas e Subp. = subparcelas. S0A0R0= solo dos vasos do tratamento testemunha do experimento da primeira etapa (T); S0A0R1= T + R (raízes das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg⁻¹ de Ba na forma de BaCl₂ do experimento da primeira etapa); S0A1R1= T + R + A (parte aérea das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg⁻¹ de Ba na forma de BaCl₂ do experimento da primeira etapa); S1A0R0= solo dos vasos do tratamento com 300 mg kg⁻¹ de Ba na forma de BaCl₂ do experimento da primeira etapa (S300); S1A0R1= S300 + R; S1A1R1= S300 + R + A

4.2.1 Atividade enzimática

Considerando a atividade das amilases, observou-se que em todos os tratamentos houve diminuição da atividade com o aumento de contato entre solo e resíduos (Tabela 7). Entretanto, a atividade foi maior na última amostragem (90 dias após início do experimento) para os tratamentos S0A0R1, S0A1R1 e S1A1R1 (Tabela 7). A atividade das amilases pode ser um importante indicador da atividade biológica devido a sua susceptibilidade às alterações nos substratos orgânicos (STROO; JENKES, 1985). Kuperman e Carreiro (1997) reportaram ainda que a diminuição da amilase pode ocorrer por vários fatores sendo um deles a presença de metais pesados.

Segundo Melo (1988) as raízes de plantas são fonte de algumas enzimas, entre elas as amilases. Cordeiro (2012) em experimento com solo rizosférico e solo não rizosférico também observou que a atividade das amilases foi maior no solo rizosférico do que no não rizosférico. Considerando que as amilases são enzimas responsáveis pela degradação de resíduos vegetais, o mais esperado seria esse aumento da atividade com a maior quantidade de material vegetal. Entretanto, na primeira amostragem, 15°, a menor atividade da enzima ocorreu nos tratamentos com solo contaminado com Ba (S1A0R1, S1A1R1) (Tabela 7), podendo ser um efeito dos contaminantes que ainda prevaleciam sobre o efeito positivo da quantidade de matéria vegetal disponível, tendo este efeito diminuído com o passar dos dias, devido a maior decomposição do material vegetal e aumento da quantidade de substrato para as enzimas, favorecendo a multiplicação e excreção dessas enzimas pelas raízes.

Ao contrário das amilases que tiveram diminuição da atividade nos tratamentos (S0A1R1 e S1A1R1) a atividade das arilsulfatases foi maior no tratamento S1A1R1 90° (Tabela 7), favorecida talvez, pelo aumento de material vegetal em decomposição, visto que sua atividade foi superior em outros tratamentos que também possuíam maior quantidade de material vegetal (raízes + parte aérea) (Tabela 7). Pinto e Nahas (2002) observaram correlação significativa entre a atividade das arilsulfatases e o teor de C orgânico total, sugerindo que os

microrganismos produtores dessa enzima necessitam de uma fonte de C e de energia e que é possível que solos com C orgânico disponível influencie na alta atividade desta enzima.

Segundo Matsuoka, Mendes e Loureiro (2003), práticas de manejo diferenciadas, na entrelinha do parreiral, e a presença da gramínea *Eleusine indica*, como cobertura viva, influenciam as propriedades microbiológicas do solo, aumentando C mineralizável e a atividade da arilsulfatases. Tejada, Hernandez e Garcia (2006), afirmam que as arilsulfases estão entre as enzimas que respondem mais rapidamente às mudanças na fertilidade do solo do que outros parâmetros de avaliação, o que as habilita como indicadores da qualidade do mesmo.

A atividade das arilsulfatases pode variar em função tanto do material orgânico disponível, como em função na presença de elementos traços presentes no ambiente em que ela se encontra visto que, em outro experimento foi verificado uma correlação positiva entre sua atividade e a quantidade de Ba disponível.

Na Tabela 6 verifica-se que a atividade da urease foi menor em todos os tratamentos nas amostragens aos 30 dias, voltando a aumentar aos 90 dias. Pascual (1998) afirma que a atividade da urease é variável podendo ser maior ou menor de acordo com o tipo de composto utilizado e o tempo de incubação.

Onyezili e Onitiri (1974) observou que a atividade da urease foi diminuída, alterando as taxas de fluxo de seus substratos através do tubo de ensaios. Assim, a atividade urease parece ser dependente da concentração de substrato disponível à enzima no seu micro-ambiente, em vez de diretamente sobre a maior concentração no sistema. Este efeito do micro-ambiente no comportamento da enzima mostra as limitações que ela impõe na medida em que não se dá a devida atenção ao nível de substrato em uma dada amostra (ONYEZILI; ONITIRI, 1981).

Assim a atividade dessa enzima pode ter sido menor na coleta dos 30 dias devido à falta de substrato para o número elevado de enzimas, o que veio a causar a morte dessas pela falta de substrato, e voltando a subir, devido a um novo aumento da população na última amostragem.

Assim como as arilsulfatases o tratamento que as fosfatases ácidas apresentaram maior atividade foi no S0A1R1, onde havia maior quantidade de material vegetal e menor quantidade de contaminantes disponíveis (Tabela 7).

Também foi observado por Pascual et al. (2000) maior atividade das fosfatases ácidas em áreas sob vegetação permanente, onde a matéria orgânica é a principal fonte de nutrientes para crescimento das plantas, evidenciando assim a importância desta enzima na mineralização do P-orgânico.

É preciso considerar ainda, que a atividade das fosfatases reflete tanto a contribuição de microrganismos como de exsudatos radiculares, sendo maior em solos com cobertura vegetal (DICK et al., 1983).

As fosfatase alcalinas apresentaram maior atividade no tratamento S1A0R1 e considerando as épocas de amostragem, a menor atividade foi no 30°, o que pode ser justificado devido à falta de substrato para enzima, que pode ter ocasionado morte de algumas com posterior elevação no 90° seguindo o mesmo princípio das ureases.

Tabela 07. Atividade enzimática em Latossolo Vermelho distrófico contaminado com cloreto de Ba e/ou com restos culturais de plantas de sorgo granífero também contaminadas com cloreto de Ba em diferentes épocas de amostragem.

Tratamentos	Amilase (mg glicose/10g TFSE /24 horas)					
	Época de amostragem			Média	CV%	
	Dia 15	Dia 30	Dia 90		Par.	Subp.
S0A0R0	5,81 aA	3,90 bB	1,97 cC	3,89		
S0A0R1	6,28 aA	3,20 bcB	2,21 bcC	3,90		
S0A1R1	6,05 aA	5,41 aA	3,16 abB	4,87	14,28	11,35
S1A0R0	4,28 bA	2,53 cB	2,20 bcB	3,00		
S1A0R1	4,07 bA	3,82 bA	1,86 cB	3,25		
S1A1R1	5,76 aA	6,36 aA	3,29 aB	5,14		
Média	5,38	4,20	2,45			
	Ariisulfatases(p-nitrofenol (mg)/hora/kg TFSE)					
S0A0R0	0,25 bA	0,52 cA	0,47 bA	0,41		
S0A0R1	0,84 abAB	1,33 bA	0,63 bB	0,94		
S0A1R1	1,17 aA	1,27 bA	0,96 bA	1,13	46,48	33,54
S1A0R0	0,57 abA	0,52 cA	0,32 bA	0,47		
S1A0R1	0,67 abB	2,75 aA	0,34 bB	1,25		
S1A1R1	0,40 bC	1,36 bB	1,96 aA	1,24		
Média	0,65	1,29	0,78			
	Ureases (mg NH ₄ kg ⁻¹ TFSE. h ⁻¹)					
S0A0R0	4,01 cA	0,77 aA	3,98 bA	2,92		
S0A0R1	14,18 bA	0,78 aB	4,51 bB	6,49		
S0A1R1	11,71 bA	0,69 aC	4,78 bB	5,72		
S1A0R0	14,98 bA	0,59 aC	5,48 bB	7,01	38,80	32,37
S1A0R1	25,15 aA	0,91 aC	14,98 aB	13,68		
S1A1R1	15,11 bA	0,83 aC	5,77 bB	7,24		
Média	14,19	0,76	6,58			
	Fosfatase Ácida (ug p-nitrofenol/g TFSE / hora)					
S0A0R0	1,68 bA	1,35 bA	1,60 bcA	1,54		
S0A0R1	0,47 cB	2,68 aA	2,44 bA	1,86		
S0A1R1	2,88 aB	2,74 aB	3,89 aA	3,16	26,99	25,14
S1A0R0	1,10 bcB	1,58 bB	2,55 bA	1,75		
S1A0R1	0,48 cB	1,86 abA	1,18 cAB	1,17		
S1A1R1	0,85 bcB	2,85 aA	2,45 bA	2,05		
Média	1,24	2,17	2,34			
	Fosfatase Alcalina (ug p-nitrofenol/g TFSE / hora)					
S0A0R0	4,77 dA	0,77 aB	3,98 dA	3,17		
S0A0R1	15,86 bA	0,54 aC	5,08 cdB	7,16		
S0A1R1	11,71 cA	0,71 aC	4,15 cdB	5,52	15,00	14,79
S1A0R0	12,55 cA	0,85 aC	6,51 bcB	6,64		
S1A0R1	26,99 aA	0,73 aC	16,67 aB	14,79		
S1A1R1	16,31 bA	0,83 aC	7,87 bB	8,33		
Média	14,68	0,74	7,37			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula para épocas de amostragem (na horizontal) e de mesma letra minúscula para tratamentos (na vertical) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). CV= coeficiente de variação. Par. = parcelas e Subp. = subparcelas. S0A0R0= solo dos vasos do tratamento testemunha do experimento da primeira etapa (T); S0A0R1= T+ R (raízes das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg⁻¹ de Ba na forma de BaCl₂ do experimento da primeira etapa); S0A1R1= T + R + A (parte aérea das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg⁻¹ de Ba na forma de BaCl₂ do experimento da primeira etapa); S1A0R0= solo dos vasos do tratamento com 300mg kg⁻¹ de Ba na forma de BaCl₂ do experimento da primeira etapa (S300); S1A0R1= S300 + R; S1A1R1= S300 + R + A

4.2.3 Correlações bário extraível, atividades enzimáticas e biológicas

Considerando as épocas de amostragem, somente aos 15 dias houve correlação entre as atividades enzimáticas e o teor de Ba extraível pelo extrator Mehlich 3 (Tabela 08). Não houve relação entre o Ba extraível e o carbono da biomassa microbiana, mas ocorreu correlação entre esse e a respiração basal do solo. A correlação pode ser em função do aumento da atividade devido a um estresse causado pelo Ba, visto que o número de microrganismos não variou, mas a respiração sim.

Na amostragem aos 30 dias apenas as atividades biológicas apresentaram correlação com o Ba extraível, tendo este apresentado correlação negativa com o carbono da biomassa microbiana, e positiva com a respiração basal do solo e com o qCO_2 . Evidenciou-se, assim, maior consumo de CO_2 pelos microrganismos, visto que o número de microrganismos diminuiu e a respiração e o qCO_2 aumentaram.

Tabela 08. Correlação entre bário extraível e atividades biológicas e enzimáticas de um Latossolo Vermelho contaminado com cloreto de Ba e/ou com restos culturais de plantas de sorgo também contaminadas com cloreto de Ba em diferentes épocas de amostragem.

Correlação	Coeficiente de Correlação (r)		
	DIA 15	DIA 30	DIA 90
Mehlich3 x Amilases	-0,7050**	ns	ns
Mehlich3 x Arilsulfatases	ns	ns	ns
Mehlich3 x Urease	0,6015**	ns	ns
Mehlich3 x Fosfatase Ácida	-0,4354*	ns	ns
Mehlich3 x Fosfatase Alcalina	ns	ns	ns
Mehlich3 x Desidrogenas	-0,7214**	ns	ns
Mehlich3 x CBM	ns	-0,5316**	ns
Mehlich3 x RBS	0,4687*	0,4318*	ns
Mehlich3 x qCO_2	ns	0,6201**	ns

RBS= Respiração basal solo; CBM=Carbono da biomassa microbiana; qCO_2 = quociente metabólico** significativo ao nível de 1% de probabilidade;* significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns= não significativo.

Observando as correlações mostradas na Tabela 09, entre as atividades biológica e enzimática, notou-se que a maioria das correlações ocorreu com o carbono da biomassa microbiana, onde observa-se na amostragem aos 15 dias correlação positiva do carbono com a atividade das amilases e fosfatases ácidas.

Tem-se assim que a maior parte das enzimas aumentou em função do aumento da massa microbiana. Nessa época observou-se ainda correlação com a respiração basal do solo e com o qCO_2 , onde evidencia-se maior taxa de respiração em função do aumento dos microrganismos e maior eficiência microbiana aos 15 dias.

Para a maioria dos parâmetros avaliados não foram observadas correlações.

Tabela 09. Correlação entre atividades enzimáticas e biológicas de um Latossolo Vermelho distrófico, contaminado com cloreto de Ba e/ou com restos culturais de plantas de sorgo também contaminadas com cloreto de Ba, em várias épocas de amostragem.

Correlação	Coeficiente de Correlação (r)		
	DIA 15	DIA 30	DIA 90
CBM X Amilase	0,5218**	ns	ns
CBM X Arilsulfatase	ns	-0,6331**	ns
CBM X Urease	ns	-0,4283*	ns
CBM X Fosfatase Ácida	0,5448**	ns	-0,4402*
CBM X Fosfatase Alcalina	ns	ns	ns
CBM X Desidrogenase	ns	ns	-0,4340*
CBM X RBS	-0,5003*	ns	ns
CBM X QCO ₂	-0,6985**	-0,8006**	-0,6302**
QCO ₂ X Amilase	-0,6176**	ns	ns
QCO ₂ X Arilsulfatase	ns	0,4131*	-0,2585ns
QCO ₂ X Urease	0,4981*	ns	ns
QCO ₂ X Fosfatase Ácida	ns	ns	ns
QCO ₂ X Fosfatase Alcalina	ns	ns	ns
QCO ₂ X Desidrogenase	-0,6159**	ns	0,4039*
QCO ₂ X CBM	-0,6985**	-0,8006**	-0,6302**
QCO ₂ X RBS	0,6721**	0,5360**	ns
RBS X Amilase	-0,7522**	ns	ns
RBS X Arilsulfatase	ns	ns	-0,4448*
RBS X Urease	ns	ns	ns
RBS X Fosfatase Ácida	ns	ns	ns
RBS X Fosfatase Alcalina	ns	ns	ns
RBS X Desidrogenase	-0,7643**	ns	ns
RBS X CBM	-0,5003*	ns	ns
RBS X QCO ₂	0,6721**	0,5360**	ns

RBS= Respiração basal solo; CBM=Carbono da biomassa microbiana; qCO_2 = quociente metabólico ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; * significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns= não significativo.

5 CONCLUSÕES

Com a adição do bário mostra que, em resposta ao estresse, os microrganismos do solo podem aumentar a atividade metabólica, o que ocasiona aumento na atividade de algumas enzimas, sem o correspondente aumento na biomassa. As enzimas que assim se comportam também podem ser boas indicadoras da presença do fator causador do estresse.

As amilases, as fosfatases ácidas e as fosfatases alcalinas tiveram sua atividade diminuída com a utilização de BaCl_2 . Também houve diminuição da biomassa microbiana com a utilização desse mesmo sal.

As arilsulfatases e as ureases tiveram aumento da atividade nos tratamentos com BaCl_2 , mostrando que os microrganismos são menos sensíveis à presença desse metal.

Correlação negativa foi observada entre a biomassa e o bário extraível, mostrando que a biomassa é sensível à presença do Ba.

Considerando o $q\text{CO}_2$ em relação ao Ba extraível, houve correlação positiva. Mostrando que a eficiência dos microrganismos é afetada pela quantidade de Ba disponível no solo.

No tratamento com maior quantidade de material vegetal houve menor correlação entre o bário extraível e a atividade biológica e enzimática.

6 REFERÊNCIAS

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. Ed. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. New York: Academic Press, 1995. p.232 – 233.

ANDERSON, T.H. Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. **Agriculture, ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.98, p.285-293, 2003.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Application of eco-physiological quociente (qCO₂ and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.251-255, 1990.

ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) 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**, Oxford, 393-395, 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 Brasileiras**, Brasília, v.39, p.1191-1198, 2004.

ANDREOLA, F.; FERNANDES, S.A.P. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. eds. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. p. 21-39.

ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v.23, p.66-75, 2007.

ARAUJO, F.F.; GIL, F.C.; TIRITAN, C.S. Lodo de esgoto na fertilidade do solo, na nutrição de *brachiariadecumbens* e na atividade da desidrogenase. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.39, p.1-6, 2009.

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

BAKER, L.R., WHITE, P.M., PIERZYNSKI, G.M. Changes in microbial properties after manure, lime, and bentonite application to a heavy metal-contaminated mine waste, **Applied Soil Ecology**, v. 48, p. 1–10, 2011.

BARDGETT, R.D.; SAGGAR, S. Effects of heavy metal contamination on the short- term decomposition of labeled (^{14}C) glucose in a pasture soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.727-733, 1994.

BERTON, R.S.; PIRES, A.M.M.; ANDRADE, S.A.L.; ABREU, C.A. AMBROSANO, E.J.; SILVEIRA, A.P.D. Toxicidade do níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.1305-1312, 2006.

BREMNER, J. M. & KEENEY, D. R. Steam-distillation methods for determination ammonium, nitrate and nitrite. In: BLACK, C. A. (Ed.) *Methods of soil analysis: Part 2*. Madison: **American Society of Agronomy**, 1965. p. 1191-1206.

BRITO, O.R. **Efeitos da manipueira nas atividades química, biológica e bioquímicas do solo e em plantas de milho**. 1999. 125 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 1999.

BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.19, p.269-279, 1995.

CALGARO, H.F. CASSIOLATO, A.M.R. VALÉRIO FILHO W.V., FERNANDES F.M.; MALTONI K.L. Resíduos orgânicos como condicionante de subsolo degradado e efeitos na atividade microbiana e fertilidade em cultivo de barbatimão. **Revista Árvore**, Viçosa, v.32, p.1069-1079, 2008.

CARVALHO, F. **Atributos bioquímicos da qualidade de solo em florestas de araucária angustifolia (Bert.) O. Ktze. No estado de São Paulo**. 2005. 79 f. Dissertação (mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CECCANTI, B.; PEZZAROSSA, B.; GALLARDO-LANCHO, F.J. e MASCIANDARO, G. Bio-tests as markers of soil utilization and fertility. **Geomicrobiology Journal**, v. 11, p. 309-316, 1994.

CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL). **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2001, 247p.

CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL). **Ficha de informação toxicológica do Bário**. São Paulo: CETESB, 2012, Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/bario.pdf>>

Acesso em: 10 de fev. 2013.

CHAIMOVICH, H.; NOME, F. Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain. **Archives Of Biochemistry and Biophysics**. v. 139, p. 9-16, 1970

CHANDER, K.; BROOKES, P.C. Effects of heavy metals from past applications of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam U.K. soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, p.927-932, 1991.

CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE). Regulamentação do uso agrícola de lodo de esgoto. **Resolução nº 375**, de 29 de agosto de 2006. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>. Acesso em 02/07/2012.

CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE). **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>. Acesso em: 10 ago. 2012.

CORDEIRO, M. A. S.; CORÁ, J. E. NAHAS, E. Atributos bioquímicos e químicos do solo rizosférico e não rizosférico de culturas em rotação no sistema de semeadura direta. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1794-1803, 2012.

CUNHA, F.G.; MACHADO, G. J. **Estudos de geoquímica ambiental e o impacto na saúde pública no município de São Gonçalo do Piauí, estado do Piauí**. Programa Nacional de Pesquisa em Geoquímica Ambiental e Geologia Médica "PGAGEM". CPRM – Serviço Geológico do Brasil. 2004, 37 p. http://www.cprm.gov.br/gestao/estudo_geq_amb.pdf. Acesso em: 23 de mar. 2013.

DABIN, B. **Curso sobre matéria orgânica do solo. Parte 1. Análise dos compostos húmicos do solo**. Piracicaba: CENA, 1976. 115p.

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**, Amsterdam, v.19, p237-248, 2002.

DICK, W.A.; JUMA, N.G. & TABATABAI, M.A. Effects of soils on acid phosphatase and inorganic pyrophosphatase of corn roots. **Soil Science**, v. 136, p. 19-25, 1983.

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

DICK RP. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, (Ed). **Biological indicators of soil health**. Wellingford: **CAB International**; p. 121–56. 1997.

DOELMAN, P.; HAANSTRA, L. Long-term and short-term effects of cadmium chromium and zinc on soil microbial respiration in relation to abiotic soil factors. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.79, p.317-327, 1984.

DORAN, J.W. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.44, p.765-771, 1980.

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B.A. Ed **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124. (Special Publication number, 35)

EKENLER, M., TABATABAI, M.A., Effects of trace elements on b-glucosaminidase activity in soils. **Soil Biology Biochemistry**. v 34, p. 1829–1832, 2002.

FEIGL, B.J.; SPARLING, G.P.; ROSS, D.J.; CERRI, C.C. Soil microbial biomass in Amazonian soils: evaluation of methods and estimates of pool sizes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, p.1467-1472, 1995.

FLIEßBACH, A.; MARTENS, R.; REBER, H.H. Soil microbial biomass and microbial activity in soil treated with heavy metal contaminated sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.1201-1205, 1994.

FRADE JUNIOR, E.F. **Atividade enzimática em lodo de esgoto contaminado com cádmio e uso em solo cultivado com sorgo**. / Elizio Ferreira Frade Junior. – Jaboticabal, 2007. 63 f.: il.; 28 cm Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

FRANÇA, L.V. **Efeitos de fertirrigação nitrogenada no carbono da biomassa microbiana do solo e dos componentes de produção de genótipos de cevada**. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e

Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

FRASER, D.G.; DORAN, J.W.; SAHS, W.W.; LESOING, W. Soil microbial populations and activities under conventional and organic management. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.17, p.585-590, 1988.

FRIGHETTO, R.T.S. & VALARINI, P.J., coords. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**. Jaguariúna, EMBRAPA, 2000. p.157-166.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; BARROS, N.F. Biomassa microbiana de carbono e de nitrogênio de solos sob diferentes coberturas florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.21, p.361-365, 1997.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. et al. Biomassa microbiana de carbono de solo de Itaguaí (RJ): Comparação entre métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.21. p.361-365, 1994.

GARCIA, T.C; HERNANDEZ, T.; COSTA, F. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.28, p.123-134, 1997.

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**, Oxford, v.32, p.1907-1913, 2000.

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

GOYAL, S.; MISHRA, M.M.; HOODA, I.S.; SINGH, R. Organic matter-microbial biomass relationships in field experiments under tropical conditions: effects of inorganic fertilization and organic amendments. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, p.1081-1084, 1992.

GREGORICH, E.G.; CARTER, M.R.; ANGERS, D.A.; MONREAL, C.M.; ELLERT, B.H. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v.74, p.367-385, 1994.

HATTORI, H. Influence of heavy metals on soil microbial activities. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.39, p.657-662, 1989.

HE, Z.L., YANG, X.E., BALIGAR, V.C., CALVERT, D.V. Microbiological and biochemical indexing systems for assessing acid soil quality. **Advances In Agronomy**, V. 78, p. 89–138, 2003.

HINOJOSAA, M. B., CARREIRA, J. A., RODRÍGUEZ-MAROTO, J. M., GARCÍA-RUÍZ, Roberto. Effects of pyrite sludge pollution on soil enzyme activities: Ecological dose–response model. **Science of the Total Environment**, v. 396, p. 89–99, 2008.

HINOJOSA, M.B., CARREIRA, J.A., GARCÍA-RUÍZ, R., DICK, R.P. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metalcontaminated and reclaimed soils. **Soil Biology Biochemistry**. v. 36,p. 1559–1568, 2004.

INSAM, H.; DOMSCH, K.H. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. **Microbial Ecology**, New York, v.15, p.177-188, 1988.

INSAM, H.; HUTCHINSON, T.C.; REBER, H.H. Effectsos heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.28, p.691-694, 1996.

IUPAC – INTERNACIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Compendium of chemicalterminology.2.ed. 1997. (IUPAC Golden Book). Disponívelem: <[http://old.iupac.org/publications/compendium/ L.html](http://old.iupac.org/publications/compendium/L.html)>. Acessoem: 15 nov. 2011.

JENKINSON, D.S.; RAYNER, J.H.The turnover of soil organic matter in some of the Rothamsted Classical Experiments. **Soil Science**, Baltimore, v.123, p,298-305, 1977.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soil and plants**. 2.ed. Florida: CRC Press, 1992. 365 p.

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

KHAN, M.; SCULLION, J. Microbial activity in grassland soil amended with

sewage sludge containing varying rates and combinations of Cu, Ni and Zn. **Biology Fertility of Soils**, Berlin, v.30, p.202-209, 1999.

KUMARI, K.K.; SINGARAM, P. Relationship among soil chemical, biochemical properties and enzyme activities. **Madras Agricultural Journal**. Coimbatore, v.82, p.69-70, 1995.

KUPERMAN, R.G.; CARREIRO, M.M. SOIL, HEAVY METAL Concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 179-190. 1997.

LEITA, L.; DeNOBILI, M.; MUHLBACHOVA, G.; MONDINI, C.; MARCHIOL, L.; ZERBI, G. Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.19, p.103-108, 1995.

LI, Y.T., ROULAND, C., BENEDETTI, M., LI, F.B., PANDO, A., Lavelle, P., Dai, J., 2009. Microbial biomass, enzyme and mineralization activity in relation to soil organic C, N and P turnover influenced by acid metal stress. **Soil Biology and Biochemistry**. 41, 969–977.

MAY, P. B.; DOUGLAS, L. A. Assay for soil urease activity. **Plant and Soil**, the Hageu, v. 45, p.301-5, 1976.

MÄDER, P. FLIEßBACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, Washington, v.296, p.1694-1697, 2002.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo**, 1997. 319p.

MARSCHNER P, FU QL, RENGEL Z. Manganese availability and microbial populations in the rhizosphere of wheat genotypes differing in tolerance to Mn deficiency. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 166, p. 712–718, 2003.

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**, Viçosa, v.27, p.425-433, 2003.

MAY, P. B. e DOUGLAS, L. A. Assay for soil urease activity. **Plant and soil**, Dondrecht, v.45, p.760-764, 1976.

MEHLICH, A. Mehlich-3 soil test extractant: a modifications of Mehlich-2 extractant. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1409-1416, 1984.

MELLONI, R. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. eds. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 312 p, p.119-238.

MELO, W. J.; Melo, G M. P.; ARAÚJO, A. S. F.; MELO, V.P. Avaliação da atividade enzimática em amostras de solo. Marcia Vale Barreto Figueiredo, Hélio Almeida Burity, José de Paula Oliveira, Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, Newton Pereira Stamford. (Ed.) **Biotecnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília, DF:Embrapa informações tecnológicas; Recife, PE: Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010.

MELO, V.P. **Carbono, nitrogênio e atividade biológica em latossolos cultivados com milho, no sexto ano de aplicação de lodo de esgoto**. 2006. 93 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

MELO, W.J. ;MELO, G.M.P.; BERTIPAGLIA, L.M.; MELO, V.P. **Experimentação sob condições controladas**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. 82p.

MELO, W.J. Enzimas do solo. MONIZ, A.C. et al. (eds). A responsabilidade social daCiênciadoSolo. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência dosolo, 1988. p. 365-378. Disponível em: <http://www.ambientenet.eng.br/TEXTOS/ENZIMA.pdf> Acesso em 01 de maio de 2013.

MELO, W.J. Amilase em solos do município de Jaboticabal (SP). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.7, n.2, p.213-215, 1983.

MELO, W.J. **Variação do N-amoniacal e N-nítrico em um Latossolo Roxo cultivado com milho (Zeamays L.) e com labe-labe (Dolichoslalab L.)**. 1974. 104f. Tese (Doutorado).

MERLINO, L.C.S. **Disponibilidade de bário para plantas de sorgo cultivadas em solo contaminado com o elemento** / Luciana Cristina Souza

Merlino. – Jaboticabal, 2013. 73 p.; 28 cm. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

MIKANOVA, O., 2006. Effects of heavy metals on some soil biological parameters. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 88, p. 220–223, 2006.

MOREIRA F.M.S.; SIQUEIRA J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

NANNIPIERI, P. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: PANKHURST, C.E.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R. & GRACE, P.R., eds. *Soil Biota: Management in sustainable farming systems*. Melbourne, CSIRO, 1994. p.238-244,1994.

NANNIPIERI, P.; PECHOZZINI, F.; ARCADA, P.G. e PIORANELLI, C. Changes in amino acids, enzyme activities and biomass during soil microbial growth. **Soil Science**, v. 127, p. 24-36, 1979.

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 Agricola**. Piracicaba, v.54, n.3, 1997.

NEUMAN, H. Substrat selectivity in the action of alkaline and acid phosphatase. **Journal Biology Biochemistry**, v. 243, p. 4671 - 4676, 1968.

NOGUEIRA, T. A. R.; MELO, W. J.; FONSECA, I. M.; MARQUES, M. O.; HE, Z. Barium uptake by maize plants as affected by sewage sludge in a long-term field study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, p. 1148–1157, 2010.

OHYA, H.; FUJIWARA, S.; KOMAI, Y.; YAMAGUCHI, M. Microbial biomass and ctivity in urban soils contaminated with Zn and Pb. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 6, p. 9-13, 1988.

OLIVEIRA, R. B.; CUNHA, L. C., VALADARES, M. C.; FILHO, M. J. P.; ARAÚJO, D. M. Acidente celobar: a toxicologia experimental como ferramenta no estabelecimento de nexo causal de intoxicação medicamentosa maciça. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 140-142, 2005.

ONYEZILI, F.N., and ONITIRI A. C. The effects of substrate flow-rate on

immobilized urease assays. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 659, p. 244-248, 1981.

ONYEZILI, F. N. and ONITIRI, A. C. Immobilization of Invertase on Modified Nylon Tubes. **Analytical Biochemistry**, v. 113,203-206 (1974).

PASCUAL, J.A.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; MORENO, J.L. & DA ROS, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. **Soil Biology Biochemistry**, v. 32, p. 1877-1883, 2000.

PASCUAL, J.A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; AYUSO, M. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: laboratory experiment. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 131-138, 1998.

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C.H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: Exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos**. Piracicaba, FEALQ, 2002. 309p.

PINTO, C.R.O., NAHAS, E. Atividade e população microbiana envolvida nas transformações do enxofre em solos com diferentes vegetações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 12, p. 1751-1756, dez. 2002.

POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C; CHRISTESEN, B.T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v.19, p.159-164, 1987.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLAN, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed., rev. atual. Campinas: Instituto Agrônômico, 1997. 285p. (Boletim Técnico, 100).

RAIJ, B.van; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M.E.; LOPES, A.S. & BATAGLIA, O.C. **Análise química do solo para fins de fertilidade**. Campinas, Fundação Cargill, 1987. 170p.

REDDY, G.N.; PRASAD, M.N.V. Heavy metal-binding proteins/ peptides: Occurrence, structure, synthesis and functions. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.30, p.251-264, 1990.

ROLDÁN, A.; SALINAS-GARCIA, J.R.; ALGUACIL, M.M.; DÍAZ, E & CARAVACA, F. Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillage

practices in sorghum cultivation under subtropical conditions. **Geoderma**, 129:178-185, 2005.

ROSS, D.J. A seasonal study of oxygen uptake of some pasture soils and activities of enzymes hydrolyzing sucrose and starch. **Journal Soil Science**, Oxford, v.16, p. 73-85, 1965.

SANOMIYA, L.T.; NAHAS, E. Atividade enzimática do solo influenciada pela espécie de planta, adubação fosfatada e calagem. **Científica**, Jaboticabal, v.32, p. 75-81, 2004.

SIMS, J.L.; PATRICK JR. W.H. The distribution of micronutrient cations in soil under conditions of varying redox potential and pH. **Soil Science Society of America Journal**. Madison, v.42, p.258-262, 1978.

SIMS, J.T. Soil pH effects on the distribution and plant availability of manganese, copper, and zinc. **Soil Science Society of America Journal**., Madison, v.50, p.367-373, 1986.

STROO, H.F.; JENCKES, E.M. Effects of sewage sludge on microbial activity in a old abandoned mine soil. **Journal Environment Quality**. Madison, v.14, p.301-304.1985.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Arilsulphatase activity of soils. **Soil Science Society American Proceedings**, Madison, v.34, n.2, p.225-229, 1970

TEJADA, M.; HERNANDEZ, M.T.; GARCIA, C. Application of Two Organic Amendments on Soil Restoration: Effect on the Soil Biological Properties. **Journal of Environmental Quality**, v. 35, p. 1010 - 1017. 2006.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. In: ALVAREZ, V.H.; SCHAEFEER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W. Ed. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2002. v.2, p. 195-276.

TRANNIN, I.C.B.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.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**, Viçosa, v.31, p.1173-1184, 2007.

TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, C.; GIL-SOTRE, F.; SEOANE, S. Towards biochemical quality index for soils: An expression relating several biological and

biochemical properties. **Biology and Fertility of Soils**. Berlin, v.26, p.100-106, 1998.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological soil screening levels for barium**. Washington: EPA, 2005. 80p. Disponível em: http://rais.ornl.gov/homepage/eco-ssl_barium.pdf. Acesso em: 23 de mar. 2013.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3051a: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils**. Washington: EPA, 2007. 30p. Disponível em: < <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf> >. Acesso em: 23 de mar. 2013.

VALSECCHI, G.; GIGLIOTTI, C.; FARINI, A. Microbial biomass, activity and organic matter accumulation in soils contaminated with heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**. Berlin, v.20, p.253-259, 1995.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v.19, p.703-707, 1987.

VARGAS, L.K.; SCHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N mineral em um Podzólico Vermelho-Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v.24, p.35-42, 2000.

WARDLE, D.A. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa 1994, 542p.

ZHANG, Y., ZHANG, H.W., SU, Z.C., ZHANG, C.G., 2008. Soil microbial characteristics under long-term heavy metal stress: a case study in Zhangshi wastewater irrigation area, Shenyang. **Pedosphere**, v. 18, 1–10.

APÊNDICES

Apêndice A - Teores extraíveis de Ba, com extrator Mehlich 3, de um Latossolo Vermelho contaminado com sais de Ba de diferentes solubilidades.

Apêndice B - Teores de Ba extraíveis com extrator Mehlich 3 de um Latossolo Vermelho contaminado ou não com cloreto de Ba e/ou com restos culturais de plantas de sorgo contaminadas com cloreto de Ba, em várias épocas de amostragem.

Apêndice A - Teores extraíveis de Ba, com extrator Mehlich 3, de um Latossolo Vermelho contaminado com sais de Ba de diferentes solubilidades.

Tratamentos	Épocas de Amostragem		CV	
	56 DAT	101 DAT	Par.	Subp.
	mg kg ⁻¹		%	
B0	2,37 ± 0,07 dA	1,97 ± 0,13 cA		
SB1	2,55 ± 0,15 dA	2,70 ± 0,04 cA		
SB2	2,74 ± 0,19 dA	2,73 ± 0,18 cA		
SB3	3,52 ± 0,56 dA	2,38 ± 1,59 cA	9,29	19,72
CB1	12,09 ± 0,93 cA	13,12 ± 1,11 bA		
CB2	15,61 ± 0,81 bB	18,42 ± 1,51 aA		
CB3	20,91 ± 3,09 aA	13,33 ± 2,11 bB		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula para épocas de amostragem (na horizontal) e de mesma letra minúscula para tratamentos (na vertical) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Par. = parcelas e Subp. = subparcelas. DAT= dias após o transplante. B0= testemunha (sem adição de Ba e com fertilização mineral), SB1= 150, SB2= 300, SB3= 600 mg kg⁻¹ Ba na forma de BaSO₄, CB1= 150, CB2= 300, CB3= 600 mg kg⁻¹ Ba na forma de BaCl₂.

Fonte: Merlino, 2013

Apêndice B - Teores de Ba extraíveis com extrator Mehlich 3 de um Latossolo Vermelho contaminado ou não com cloreto de Ba e/ou com restos culturais de plantas de sorgo contaminadas com cloreto de Ba, em várias épocas de amostragem

Tratamentos	Épocas de Amostragem					Média	CV	
	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90		Par.	Subp.
	mg kg ⁻¹						%	
S0A0R0	2,65 ± 0,38 cA	2,91 ± 0,70 bA	1,92 ± 0,30 bA	2,54 ± 0,50 bA	1,98 ± 0,17 bA	2,40		
S0A0R1	2,77 ± 0,29 cA	3,27 ± 0,58 bA	2,35 ± 0,47 bA	3,03 ± 0,47 bA	2,61 ± 0,22 bA	2,81		
S0A1R1	2,31 ± 0,35 cA	3,06 ± 0,26 bA	2,22 ± 0,55 bA	3,21 ± 0,53 bA	2,63 ± 0,36 bA	2,69		
S1A0R0	12,21 ± 1,40 bA	12,09 ± 1,54 aA	10,20 ± 1,19 aA	10,15 ± 1,62 aA	12,48 ± 1,85 aA	11,43	18,96	17,28
S1A0R1	14,39 ± 2,57 abA	12,22 ± 0,83 aAB	10,45 ± 0,94 aB	11,47 ± 1,87 aB	10,65 ± 1,01 aB	11,84		
S1A1R1	15,26 ± 3,53 aA	12,34 ± 1,22 aB	11,17 ± 2,28 aB	11,76 ± 1,68 aB	12,64 ± 0,64 aB	12,64		

CV= coeficiente de variação. Par.= parcelas e Subp.= subparcelas. Médias seguidas de mesma letra maiúscula para épocas de amostragem (na horizontal) e de mesma letra minúscula para tratamentos (na vertical) não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). S0A0R0= solo dos vasos do tratamento testemunha do experimento da primeira etapa (T); S0A0R1= T + R (raízes das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg⁻¹ de Ba na forma de BaCl₂ do experimento da primeira etapa); S0A1R1= T + R + A (parte aérea das plantas cultivadas no solo com 300 mg kg⁻¹ de Ba na forma de BaCl₂ do experimento da primeira etapa); S1A0R0= solo dos vasos do tratamento com 300 mg kg⁻¹ de Ba na forma de BaCl₂ do experimento da primeira etapa (S300); S1A0R1= S300 + R; S1A1R1= S300 + R + A.

Fonte: Merlino, 2013