

## **Avaliação da hidrólise de diacetato de fluoresceína em solos com aplicação de lodo <sup>(1)</sup>.**

**Leonardo Capeleto de Andrade <sup>(2)</sup>; Robson Andreazza <sup>(3)</sup>; Flávio Anastácio de Oliveira Camargo <sup>(4)</sup>**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do CNPq.

<sup>(2)</sup> Eng<sup>o</sup> Ambiental, mestre e doutorando em Ciência do Solo; Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Porto Alegre, RS. eng.capeleto@gmail.com; <sup>(3)</sup> Professor do Centro de Engenharias; Universidade Federal de Pelotas (UFPel). <sup>(4)</sup> Professor do Departamento de Solos, UFRGS.

**RESUMO:** A produção e destinação dos resíduos sólidos é historicamente um desafio para a sociedade. A disposição de resíduos orgânicos em solos pode ser recomendada, dado os potenciais corretivos e fertilizantes destes materiais. A aplicação em solo de lodo de Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) de aterro industrial pode afetar a atividade enzimática microbiana. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de doses de lodo de ETE de um aterro industrial, em solos sob cultivo de sorgo e girassol, na hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA). No ensaio foram utilizados dois argissolos e dois cultivos (sorgo e girassol), sob doses de lodo de ETE de aterro industrial. Avaliou-se a hidrólise do FDA, pH e condutividade elétrica (CE) do solo. A hidrólise do FDA apresentou grande variação entre os tratamentos com a aplicação de doses de lodo de ETE de um aterro industrial. Houve diferenças estatísticas entre os solos e plantas testados, não sendo significativa a interação destes fatores. O pH e a CE aumentaram com a aplicação de lodo. A aplicação do lodo e o desenvolvimento das plantas nos solos alteram a hidrólise do FDA.

**Termos de indexação:** FDA; atividade enzimática; bioindicador.

### **INTRODUÇÃO**

A produção de resíduos é historicamente um problema para a humanidade e a destinação adequada é ainda um dos grandes desafios da sociedade contemporânea. A disposição de resíduos orgânicos em solos pode ser recomendada, dado os potenciais corretivos e fertilizantes destes materiais, propiciando a redução na aplicação de insumos minerais e melhoria da qualidade do solo, visto que os resíduos orgânicos podem atuar como condicionadores de solo (Ferreira et al., 2003; Silva et al., 2014). Esta forma de disposição final atende aos pressupostos da disposição final ambientalmente adequada.

A indústria coureiro-calçadista, com significativa importância econômica no estado do Rio Grande do Sul (RS), gera diversos resíduos classificados como perigosos devido ao seu alto teor de cromo.

Entretanto, em função de seus grandes teores de matéria orgânica, nutrientes e neutralização, essas características conferem poder fertilizante e corretivo a esses resíduos (Gianello et al., 2011). Efeitos positivos e negativos, na aplicação de lodos com presença de cromo, em solos, podem ser observados, dependendo das doses utilizadas. Diferentes estudos demonstram que a adição de lodos de curtime em solos estimulou a atividade microbiana e não influenciou na população de microrganismos (Selbach et al., 1991; Ferreira et al., 2003; Cavallet & Selbach, 2008). Por outro lado, a adição de lodos e ou resíduos orgânicos contendo grandes teores de metais pesados pode diminuir a atividade microbiana do solo em função de sua toxicidade (Segatto et al., 2012).

O diacetato de fluoresceína (FDA) é um composto incolor que ao ser hidrolisado por enzimas - como proteases, lipases e esterases -, libera como produto da reação a fluoresceína, que é visível e colorida (Stubberfield & Shaw, 1990; Green et al., 2006). Segundo Swisher & Carroll (1980), as quantidades de fluoresceína liberadas são proporcionais a atividade da população microbiana do solo, podendo ser utilizado como bioindicador ambiental (Trannin et al., 2007; Silva et al., 2014).

A aplicação em solo de lodo de Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) de aterro industrial pode afetar a atividade enzimática microbiana. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de doses de lodo de ETE de um aterro industrial, em solos sob cultivo de sorgo e girassol, na hidrólise do FDA.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

O ensaio de Hidrólise do FDA foi conduzido no Laboratório de Biorremediação, Departamento de Solos, UFRGS.

#### **Amostras de solo**

As amostras de solo foram coletadas em experimento em vasos, conduzido em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia, UFRGS, com delineamento experimental em blocos ao acaso com seis tratamentos e três blocos. Os tratamentos (doses de lodo) utilizadas no estudo foram: 2; 5; 10 e 20 Mg ha<sup>-1</sup>; além de tratamento Controle negativo



(sem aplicação de lodo). Nos vasos houve cultivo de girassol (*Helianthus annuus L.*, cultivar Charrua) e sorgo (*Sorghum sp.*), plantadas em vasos com volume de 4 dm<sup>3</sup> de solo. As amostras de solo foram coletadas na camada de 0-5 cm, analisando-se a hidrólise do FDA, o pH (H<sub>2</sub>O 1:1) e a condutividade elétrica (CE) do solo (1:5), segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

Foram utilizados no ensaio os solos: Argissolo Vermelho Distrófico – Pvd, Unidade de Mapeamento (UM) São Jerônimo; e Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico espessarênico abruptico – Pvad, UM Itapuã. O solo Pvd (UM São Jerônimo) foi coletado na Estação Experimental Agrônômica (EEA/UFRGS), em Eldorado do Sul (RS), em área de campo nativo (30°05'32.6"S 51°40'32.9"W). O solo Pvad (UM Itapuã) foi coletado em Itapuã (30°10'48.0"S 50°59'47.2"W), distrito de Viamão (RS). Foi coletada a camada de 0-20 cm dos solos, sendo caracterizados conforme Tabela 1.

**Tabela 1** - Caracterização dos solos Pvd (UM São Jerônimo) e Pvad (UM Itapuã).

Atributos	Unidade	Pvd	Pvad
Argila	%	26	12
pH H <sub>2</sub> O (1:1)	-	5,4	5,2
SMP	-	6,1	6,5
M.O.	%	1,9	1,3
Al <sub>troc</sub>	cmolc/dm <sup>3</sup>	6,4	1,2
Ca <sub>troc</sub>	cmolc/dm <sup>3</sup>	2,3	1,0
Mg <sub>troc</sub>	cmolc/dm <sup>3</sup>	0,6	0,3
Al+H	cmolc/dm <sup>3</sup>	3,9	2,5
CTC	cmolc/dm <sup>3</sup>	7,5	3,4
Bases	% Sat. CTC	47	26
Al	% Sat. CTC	5,3	39,7
Ca/Mg	-	2,3	1,7
Ca/K	-	11	7
Mg/K	-	4,9	4,2
P	mg/dm <sup>3</sup>	5,5	2,9
K	mg/dm <sup>3</sup>	80	28
S	mg/dm <sup>3</sup>	7,4	6,2
Zn	mg/dm <sup>3</sup>	7,7	3,9
Cu	mg/dm <sup>3</sup>	1,1	0,5
Mn	mg/dm <sup>3</sup>	35	21
Na	mg/dm <sup>3</sup>	5	6

O lodo utilizado neste estudo foi coletado nos leitos de secagem da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) de um aterro industrial localizado no município de Estância Velha (29°40'36.7"S 51°12'45.3"W), região metropolitana de Porto Alegre (RS), em área de grande concentração de empresas do ramo coureiro-calçadista. O material foi seco (65°C), tamisado (2 mm) e caracterizado: C<sub>org</sub> (7,3 %); N (3,9%), P (0,2 %); K (0,3%); Ca (20%); Mg (0,8%); S (1,2%); Fe (4,7%); Na (2,6%);

Cu (23 mg kg<sup>-1</sup>); Zn (32 mg kg<sup>-1</sup>); Mn (658 mg kg<sup>-1</sup>); Cd (0,3 mg kg<sup>-1</sup>); Cr<sup>+3</sup> (602 mg kg<sup>-1</sup>); Cr<sup>+6</sup> (<1 mg kg<sup>-1</sup>); Ni (38 mg kg<sup>-1</sup>); As (12 mg kg<sup>-1</sup>); Hg (0,01 mg kg<sup>-1</sup>); Poder de neutralização (49%); pH<sub>H<sub>2</sub>O</sub> (7,9); CE (12,8 dS m<sup>-1</sup>). A caracterização do lodo e solo foi realizada no Laboratório de Análises de Solo, da Faculdade de Agronomia, UFRGS, segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). As quantificações ocorreram por ICP-OES.

### Hidrólise do diacetado de fluoresceína (FDA)

Para avaliação da hidrólise do FDA foi utilizada metodologia descrita por Schnürer & Rosswall (1982), modificada por Adam & Duncan (2001). Foram utilizados 2 (dois) g de solo, com adição de 0,2 mL de FDA (1000 µg mL<sup>-1</sup>) e 15 mL de Tampão Fosfato (60 mM; pH 7,6). Os tubos foram incubados em agitador orbital por 20 minutos (30°C). Após a incubação foram adicionados 15 mL de solução clorofórmio/metanol (2:1 v/v) para cessar a reação de hidrólise. Os valores, mensurados por absorbância (490 nm), foram calculados pela diferença entre os valores dos frascos com e sem adição de FDA.

### Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância e, quando significativos a 5% de probabilidade, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey (considerando os fatores "dias" e "doses" como quantitativos), utilizando o programa estatístico ASSISTAT v.7.7 beta. Para modelos gráficos utilizou-se o programa SigmaPlot v.11.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) apresentou grande variação (0,53 a 5,22 µg FDA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) entre os tratamentos com a aplicação de doses (0; 2; 5; 10; 20 Mg ha<sup>-1</sup>) de lodo de estação de tratamento de efluentes (ETE) de um aterro industrial, no decorrer do tempo (15, 30, 60 e 90 dias após aplicação do lodo), nos solos Pvd (Argissolo Vermelho Distrófico) e Pvad (Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico espessarênico abruptico), sob cultivo de sorgo e girassol (Figura 1). Houve diferenças estatísticas significativas (p<0,05) entre os solos e plantas testados para a Hidrólise do FDA, com valores para o solo Pvd (2,40 µg FDA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) superiores ao solo Pvad (2,08 µg FDA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e para o cultivo de sorgo (2,37 µg FDA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) superiores ao girassol (2,10 µg FDA g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), não sendo significativa a interação destes fatores.

O pH, na camada de 0-5 cm, variou no solo Pvd de 4,6 a 8,3 e no solo Pvad de 5,1 a 8,4. Os valores de pH apresentaram diferenças estatísticas

significativas ( $p < 0,05$ ) entre os solos e plantas testados, com médias para o solo Pvd (6,9) inferiores ao solo Pvad (7,1) e para o cultivo de sorgo (6,9) inferiores ao girassol (7,1), sendo significativa a interação destes fatores. A Condutividade Elétrica (CE), na camada de 0-5 cm, variou no solo Pvd de 1,24 a 0,03  $\text{dS m}^{-1}$  e no solo Pvad de 0,89 a 0,02  $\text{dS m}^{-1}$ . Os valores de CE não apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ) para as plantas, contudo tendo diferenças para os solos, com médias para o solo Pvd (0,28  $\text{dS m}^{-1}$ ) superiores ao solo Pvad (0,23  $\text{dS m}^{-1}$ ), não sendo significativa a interação destes fatores. O solo Pvad, tendo menor CTC que o solo Pvd (Tabela 1), apresenta assim menores valores de CE, lixiviando mais rapidamente os íons.

Trannin et al. (2007) encontram valores de hidrólise do FDA variando de 76 a 632  $\mu\text{g FDA g}^{-1} \text{h}^{-1}$ , com aumento linear na aplicação de doses (6; 12; 18 e 24  $\text{Mg ha}^{-1}$ ) de biossólido em solo. Santos et al. (2011) encontraram valores de, aproximadamente, 25 a 10  $\mu\text{g FDA g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (em solo arenoso) e 40 a 20  $\mu\text{g FDA g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (em solo argiloso), em estudo com disposição de doses de lodo de curtume em solos (0; 7,5; 15; 30 e 60  $\text{Mg ha}^{-1}$ ), havendo redução do FDA hidrolisado com as doses de lodo. Segundo Trannin et al. (2007), o aumento da atividade hidrolítica do FDA correlaciona-se positivamente com o carbono orgânico ( $C_{\text{org}}$ ) do solo. E segundo Santos et al. (2011), a redução na hidrólise do FDA, com aplicação de lodo de curtume em solos, ocorreu devido ao aumento de metais pesados (como Cu, Cd e Cr). Estes resultados corroboram com as alterações da atividade enzimática com a aplicação de lodo (Figura 1).

## CONCLUSÕES

A aplicação do lodo e o desenvolvimento das plantas influenciam na hidrólise do FDA.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); ao Programa de Pós Graduação em Ciências do Solo (PPGCS) e ao Departamento de Solos, UFRGS.

## REFERÊNCIAS

ADAM, G. & DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 33:943-951, 2001.

CAVALLET, L.E. & SELBACH, P.A. Populações microbianas em solo agrícola sob aplicação de lodos de curtume. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32:2863-2869, 2008.

FERREIRA, A.S. et al. Alterações de atributos químicos e biológicos de solo e rendimento de milho e soja pela utilização de resíduos de curtume e carbonífero. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27:755-763, 2003.

GIANELLO, C. et al. Viabilidade do uso de resíduos da agroindústria coureiro-calçadista no solo. *Ciência Rural*, 41:242-245, 2011.

GREEN, V.S.; STOTT, D.E. & DIACK, M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology & Biochemistry*, 38:693-701, 2006.

SANTOS, J.A. et al. Tannery sludge compost amendment rates on soil microbial biomass of two different soils. *European Journal of Soil Biology*, 47:146-151, 2011.

SCHNÜRER, J. & ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 43:1256-1261, 1982.

SEGATTO, M.P. et al. Decomposição de resíduos industriais no solo. *Ciência e Natura*, 34:49-62, 2012.

SELBACH, P.A. et al. Descarte e biodegradação de lodos de curtume no solo. *Revista do couro, Estancia Velha*, 17:51-62, 1991.

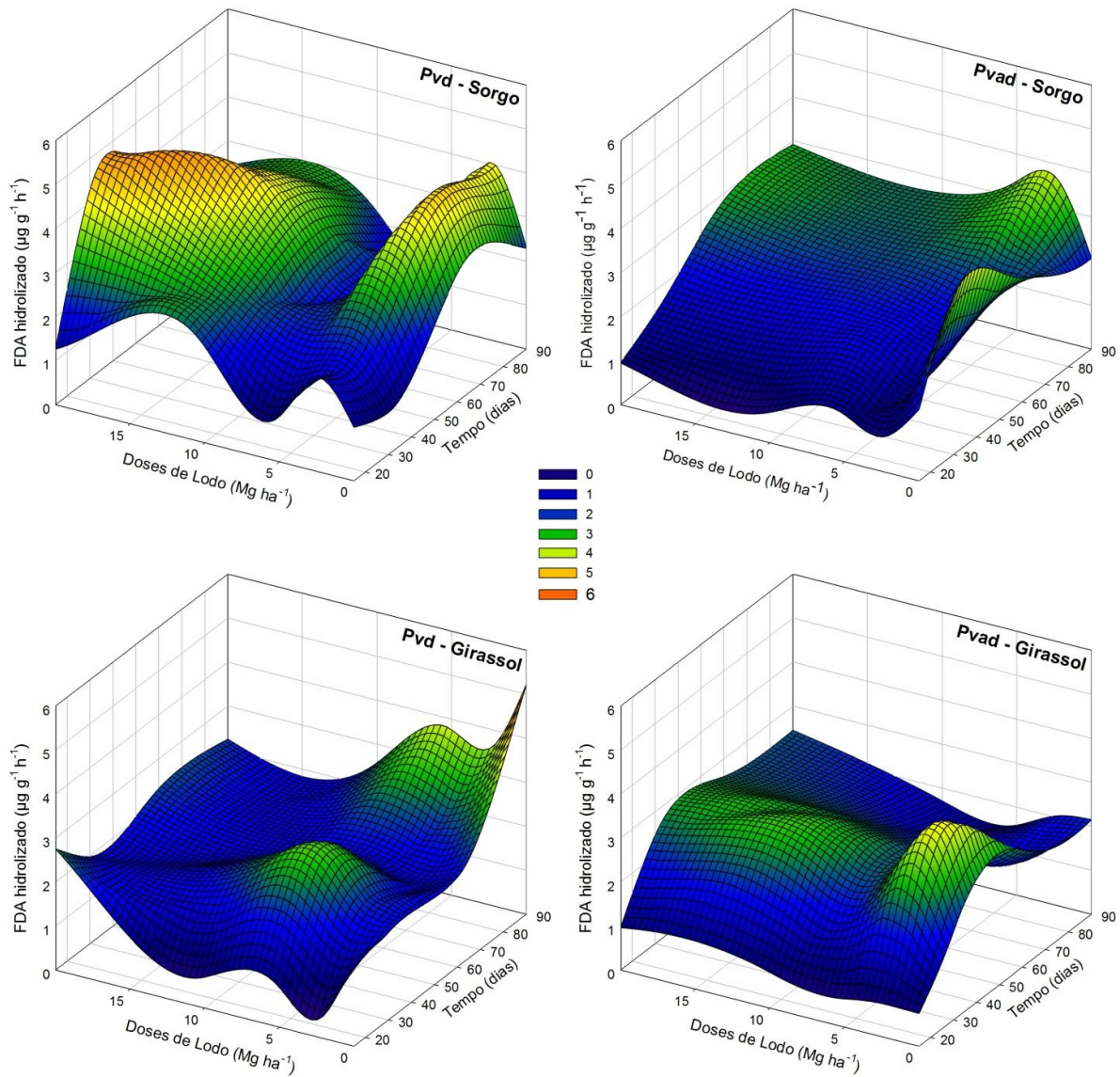
SILVA, M.D.M. et al. Soil Microbial Biomass After Three-Year Consecutive Composted Tannery Sludge Amendment. *Pedosphere*, 24:469-475, 2014.

STUBBERFIELD, L. C. F. & SHAW, P. J. A. A comparison of tetrazolium reduction and FDA hidrolisis with other measures of microbial activity. *Journal of Microbiological Methods*, 12:151-162, 1990.

SWISHER, R. & CARROLL, C.G. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surface. *Microbial Ecology*, 6:217-226, 1980.

TEDESCO M.J. et al. Análises de solos, plantas e outros materiais. 2ª ed. Porto Alegre, UFRGS, Departamento de Solos. *Boletim Técnico*, 5. 1995. 174p.

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*, 31:1173-1184, 2007.



**Figura 1** - FDA hidrolizado ( $\mu\text{g FDA g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) nos solos Pvd e Pvad (com cultivo de Sorgo e Girassol) sob doses de lodo (2; 5; 10 e 20  $\text{Mg ha}^{-1}$ ) de ETE de aterro industrial, aos 15, 30, 60 e 90 dias após aplicação.