

Atividade de enzimas ligadas ao ciclo do nitrogênio em solo submetido a frequentes aplicações de lodo de esgoto

CÉLIA MARIA MAGANHOTTO SOUZA E SILVA⁽¹⁾, **ROSANA FARIA VIEIRA**⁽¹⁾,
ELKE SIMONI DIAS VILELA⁽²⁾, **VINICIUS PEREIRA CARNEIRO DA SILVA**⁽³⁾ &
JOICE MARIA LEITE⁽⁴⁾

RESUMO: Grande proporção do nitrogênio no solo está na forma de material protéico, cuja quebra é regulada pela atividade de proteases extracelulares. Outra enzima envolvida no ciclo do nitrogênio, a urease, é responsável pela hidrólise da uréia a amônia e CO₂. Neste trabalho, avaliou-se o efeito da suplementação do solo com diferentes doses e tipos de lodo (ETE de Barueri e ETE de Franca) na atividade das enzimas protease e urease. As aplicações de lodo ao solo iniciaram-se em 1999 a taxas que variaram na dose recomendada, tomando-se como base os requerimentos da planta em N, até uma taxa 8 vezes maior. Nos anos de 2004 e 2005 os lodos não foram aplicados. Em 2006 e 2007 somente foi aplicado o lodo de Franca. Os resultados deste trabalho referem-se às coletas de solo feitas no ano agrícola 2007/2008. A atividade da protease aumentou com o aumento da dose de lodo de Franca. Por outro lado, houve decréscimo da atividade da protease com o aumento da dose do lodo de Barueri. Na maior dose deste lodo a atividade foi semelhante à obtida no tratamento com fertilização mineral. A menor atividade daquela enzima foi obtida no tratamento testemunha. A atividade da urease foi maior nos tratamentos com o lodo de Franca independentemente da dose aplicada. A atividade das duas enzimas envolvidas no ciclo do nitrogênio foram sensíveis indicadores da qualidade de solo tratado com lodo de esgoto.

Palavras-Chaves: (lodo de esgoto, urease, protease)

Introdução

Lodo de esgoto é um resíduo rico em matéria orgânica gerado durante o tratamento das águas residuárias nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). O tratamento eficiente do esgoto resulta num efluente com baixa carga orgânica e na produção do lodo orgânico (biossólido). Este resíduo apresenta inicialmente natureza líquida, com teor de sólidos em torno de 2%, e a preocupação inicial é com sua estabilização, podendo ser desidratado, parcialmente, visando diferentes destinos. Quando desidratado, o lodo apresenta consistência semelhante à do esterco ou

a um adubo orgânico e apresenta significativa quantidade de matéria orgânica além de nitrogênio, fósforo e micronutrientes essenciais às plantas.

A principal opção para reciclagem de biossólidos é o seu uso como condicionador de solos agrícolas. Vários estudos no Brasil já comprovaram a sua eficácia para uso agrícola, entretanto, a possível presença de poluentes como metais pesados, patógenos e compostos orgânicos persistentes, são fatores que podem provocar impactos ambientais negativos. O nitrato também representa um problema devido à falta de sincronismo entre a mineralização do N orgânico e a absorção pelas plantas, resultando em risco de contaminação do lençol freático (Pires, 2009). Uma vez adicionados ao solo, alguns dos poluentes podem entrar na cadeia alimentar ou acumular-se no próprio solo, no ar, nas águas superficiais, nos sedimentos e nas águas subterrâneas.

A influência do lodo de esgoto sobre os processos bioquímicos que envolvem os nutrientes do complexo solo/planta e sobre a população de organismos de solo ainda é pouco estudada nas condições brasileiras (Ferreira & Nishiyama, 2003). No entanto, os efeitos sobre as características físico-químicas e os organismos do solo muitas vezes não podem ser dissociados dos efeitos primários das propriedades químicas e físicas do solo. Como o comportamento da microbiota do solo depende da qualidade e da quantidade dos resíduos que estão sendo adicionados ao mesmo, é indispensável a realização de estudos sobre o efeito do lodo de esgoto na atividade microbiana do solo, com a finalidade de aumentar os conhecimentos sobre as alterações que venham a causar no ciclo de nutrientes. A atividade de hidrolases do solo, como protease e urease, tem sido citadas como sensíveis indicadores de mudanças induzidas pelo manejo devido às suas fortes relações com o conteúdo e qualidade da matéria orgânica do solo (Tejeda et al., 2006).

Material e Métodos

O experimento vem sendo conduzido desde 1999 em uma área experimental da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP, em Latossolo Vermelho

⁽¹⁾ Primeira e segunda autoras são pesquisadoras na área de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, CP 69, Jaguariúna, SP, CEP 13820-000. E-mail: :rosana@cnpma.embrapa.br.

⁽²⁾ Segunda autora é Química e trabalha no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente CP 69, Jaguariúna, SP, CEP 13820-000.

⁽³⁾ Terceiro autor é bolsista da FAPESP na área de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

⁽⁴⁾ Quarta autora é bolsista da Embrapa na área de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

distroférico, textura média/argilosa. Dois tipos de lodos de esgoto são aplicados periodicamente. O lodo de Barueri (LB) recebe tanto esgotos domésticos como industriais, enquanto o lodo de Franca (LF) é predominantemente doméstico. As aplicações de lodo foram feitas em abril e novembro de 1999 e em novembro de 2000, 2001, 2002 e 2003. Em 2004, 2005, 2006 e 2007 não foi aplicado o lodo de Barueri. O lodo de Franca foi reaplicado em 2006 e 2007. As amostras de solo deste trabalho foram coletadas no ano agrícola 2007/2008 em todos os tratamentos..

O experimento foi montado em delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições e os seguintes tratamentos: testemunha, sem aplicação de fertilizantes ou lodo de esgoto (T), aplicação de fertilizantes minerais (FM) e doses 1, 2, 4 e 8 de lodo de esgoto. A dose 1 foi calculada considerando o N recomendado para a cultura do milho AG4051. As doses 2, 4 e 8 foram duas, quatro e oito vezes maiores que a dose 1. Doses suplementares de K foram adicionadas devido ao baixo teor deste elemento nos lodos. Os compostos foram sempre uniformemente distribuídos na superfície do solo e incorporados à profundidade de 0-20 cm. Cada parcela experimental (20 m x 10 m) é constituída por 12 linhas de milho espaçadas de 0.9 m com aproximadamente 5 sementes por metro. Foram retiradas cinco subamostras por parcela, nas profundidades de 0-10 e 10-20 cm, no final do ciclo do milho, que foram homogeneizadas para formar uma amostra composta.

As atividades das enzimas protease e urease foram quantificadas pelos métodos descritos por Alef & Nannipieri (1995a e b). Resumidamente, a atividade da protease foi medida após a incubação de 1gr de solo com caseinato de sódio em tampão-Tris, pH = 8,1, por 2 h, a 50°C. O reagente Folin-fenol reagiu com a tirosina liberada formando um complexo azul, que foi determinado espectrofotometricamente a 700 nm. A atividade da protease foi expressa em mmol tirosina g⁻¹ h⁻¹. A atividade da urease foi determinada medindo-se o amônio liberado após a incubação do solo com uréia. O amônio foi quantificado pelo método de destilação a vapor (Tedesco et al., 1985). A atividade da urease foi expressa em µg NH₄⁺-N g⁻¹ h⁻¹.

Resultados

A análise de solo realizada em todos os tratamentos, no período de florescimento pleno do milho, no ano agrícola 2007-2008, a 0-20 cm de profundidade, é apresentada na Tabela 1.

A atividade da protease, a 0-10 cm de profundidade, foi maior no tratamento 2LF seguido do tratamento 1LB e 1LF. A menor atividade desta enzima foi obtida no tratamento testemunha. A 10-20 cm de profundidade, as maiores atividades se mantiveram nos tratamentos 1LF, 2LF e 1LB, com o menor valor obtido no tratamento testemunha (Tabela 2).

A atividade da urease, na menor profundidade de solo, foi maior nos tratamentos com o lodo de Franca, independentemente da dose, seguido pelo tratamento FM e pelos tratamentos com o lodo de Barueri. Conforme ocorreu com o lodo de Franca não houve

efeito das doses do lodo de Barueri na atividade da urease. Em relação ao tratamento testemunha, as atividades da urease foram, em média, 208 % e 108 %, maiores nos tratamentos com o lodo de Franca e o lodo de Barueri, respectivamente. Na profundidade de 10-20 cm, não houveram diferenças significativas na atividade desta enzima em todos os tratamentos, a exceção da testemunha, onde foi obtido o menor valor.

Discussão

Nos organismos vivos a maioria do N orgânico está na forma de proteína (Kögel-Knaber, 2006). Estima-se que cerca de 40% do N total do solo é material proteináceo que inclui proteínas, glicoproteínas, peptídeos e aminoácidos. As proteases que são produzidas por extensa gama de bactérias, actinomicetos e fungos (Kumar & Takagi, 1999) hidrolizam as proteínas do solo para peptídeos e aminoácidos. Devido à abundância de proteínas e peptídeos no solo, as proteinases, provavelmente, suprem grande parte do N biodisponível. A maior atividade da protease no tratamento 2LF pode estar relacionada ao maior teor de material proteináceo encontrado neste tratamento. Segundo Geisseler & Horwath (2008) o aumento na atividade da protease em decorrência da adição de proteína ao solo é dependente da quantidade adicionada e também de sua solubilidade. Deste modo, no caso do lodo de Franca, a menor atividade da protease na menor dose pode ser decorrente da menor quantidade de material proteináceo, o que não poderia ser sugerido para o lodo de Barueri. Neste caso, com o aumento da dose de lodo, em ambas as profundidades, as atividades da protease diminuíram indicando que algum outro fator biótico ou abiótico pode estar influenciando a atividade desta enzima na maior dose do lodo. O lodo de Barueri, por ser de origem industrial, apresenta maiores teores de metais pesados e pode conter compostos orgânicos que são prejudiciais à atividade dos microrganismos. Poucas informações ainda são disponíveis sobre os vários reservatórios de C e N que governam a produção de enzimas extracelulares na complexa comunidade microbiana do solo (Geisseler & Horwath, 2008).

As atividades da urease foram bem maiores nos tratamentos com lodo do que a atividade obtida no tratamento testemunha. Resultados similares foram obtidos por Alvarenga et al. (2009). Ao contrário, porém, estes autores verificaram que a atividade da urease aumentou com a dose de lodo, o que não foi verificado no presente trabalho. Tal fato pode estar relacionado ao período de tempo que se passou entre a adição do lodo ao solo e a retirada das amostras. No presente estudo a aplicação mais recente de lodo foi feita há mais de 120 dias e, neste caso, o solo já poderia ter atingido um certo grau de equilíbrio, sem o efeito do fluxo inicial de C facilmente degradável, que aumenta a atividade microbiana.

É interessante observar que mesmo sem a aplicação do lodo de Barueri desde 2004 (em 2003 foi feita a última aplicação), na maior dose, tanto a atividade da protease como a atividade da urease foram maiores que as observadas no tratamento testemunha,

demonstrando que de certa forma, a dose aplicada no tratamento 2LB também contribuiu para aumentar o 'status' bioquímico do solo. Necessário se faz que os fatores responsáveis pelos decréscimos na atividade destas hidrolases no solo suplementado com o lodo de Barueri, sejam identificados e considerados como parâmetros adicionais na recomendação de doses de lodo ao solo.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a atividade da protease e da urease foram sensíveis indicadores de qualidade de solo tratado com lodo de esgoto. Estudos futuros são necessários para melhor caracterizar a composição orgânica dos lodos, assim como a quantidade de metais totais e disponíveis para melhor entendimento dos resultados encontrados.

Referências

- [1] ALEF, K.; NANNIPIERI, P. 1995a. Protease activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Eds). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, p. 313-315.
- [2] ALEF K, NANNIPIERI, P. 1995b. Urease activity. In: ALEF K.; NANNIPIERI, P. (Eds) *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London, p. 316-317.
- [3] ALVARENGA, P.; PALMA, P.; GONÇALVES, A.P.; FERNANDEZ, R.M.; de VARENNES, A.; VALLINI, G.; DUARTE, E.; CUNHA-QUEDA, A.C. 2009. Organic residues as immobilizing agents in aided

phytostabilization: (II) Effects on soil biochemical and ecotoxicological characteristics. *Chemosphere*, 47:1301-1308.

- [4] FERREIRA, R.A.R.; NISHIYAMA, L. 2003. [Online]. Uma revisão sobre a disposição controlada de lodo de esgoto no solo.
- [5] GEISSELER, D.; HORWATH, W.R. 2008. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, 40:3040-3048.
- [6] PIRES, A. 2009. [Online]. Lodo de Esgoto. http://ambientes.ambientebrasil.com.br/residuos/artigos/lodo_de_esgoto.htm. Homepage: <http://www.ig.ufu.br/2srg/3/3-200.pdf>.
- [7] KÖGEL-KNABER, I. 2006. Chemical structure of organic N and organic P in soil> In NANNIPIERI, P.; SMALLA, K. (Eds.). *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Academic Press, London, p. 1-42.
- [8] KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17:561-594.
- [9] TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEN, H. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. Porto Alegre: UFRGS, 1985, p.2.54-2.64. (Boletim Técnico, 5).
- [10] TEJEDA, M.; HERNANDEZ, M.T.; GARCIA, C. 2006. Application of two organic amendments on soil restoration: effects on the soil biological properties. *Journal of Environmental Quality*, 35:1010-1017.

Tabela 1. Análise química dos solos dentro de cada tratamento.

Tratamentos	pH (CaCl ₂)	MO (%)	P	Cu mg dm ⁻³	Zn
T	5,40	2,20	4,00	0,60	0,60
FM	4,93	2,60	21,00	0,80	1,77
1LF	5,30	2,57	28,00	1,33	3,83
2LF	5,10	2,83	61,00	2,00	7,40
1LB	5,10	2,60	33,00	3,57	12,13
2LB	5,07	2,50	58,00	6,10	21,57

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste LSD (P<0,05). T, testemunha, FM, fertilização mineral, 1LF, dose 1 do lodo de Franca; 2LF, duas vezes a dose 1LF; 1LB, dose 1 do lodo de Barueri; 2LB, duas vezes a dose 1LB.

Tabela 2. Atividade da protease e da urease nos solos dos tratamentos.

Tratamentos	Atividade da protease (mmol tirosina g ⁻¹ h ⁻¹)		Atividade da urease (µg NH ₄ ⁺ g ⁻¹ h ⁻¹)	
	0-10 cm	10-20 cm	0-10 cm	10-20 cm
T	9,53 c	11,77 c	10,71 d	24,31 b
FM	12,33 bc	13,03 bc	29,01 ab	31,64 ab
1LF	13,63 b	16,17 ab	34,11 a	33,33 a
2LF	18,27 a	17,37 a	31,87 a	34,42 a
1LB	15,33 ab	17,60 a	20,74 c	26,88 ab
2LB	12,83 bc	12,87 bc	23,74 bc	34,46 a
Erro padrão	1,31	1,11	1,89	2,70

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada coluna, não diferem entre si pelo teste LSD (P<0,05). T, testemunha, FM, fertilização mineral, 1LF, dose 1 do lodo de Franca; 2LF, duas vezes a dose 1LF; 1LB, dose 1 do lodo de Barueri; 2LB, duas vezes a dose 1LB.