



**André Lopes
Fernandes**

**Efeito da cinza de biomassa na fertilidade de um
solo florestal**



**André Lopes
Fernandes**

**Efeito da cinza de biomassa na fertilidade de um
solo florestal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica do Doutor José de Jesus Figueiredo da Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro e da Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto PTDC/AAC-AMB/098112/2008, “(Bias-to-soil) Cinzas de biomassa: Características em relação à sua origem, tratamento e aplicação no solo”, financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo incansável apoio e pela força que me têm dado. A maior lição de vida e de amor é me dada todos os dias em casa por vocês, Amo-vos.

o júri

Presidente

Professor Doutor Luís António da Cruz Tarelho
Professor auxiliar da Universidade de Aveiro

Vogais

Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
Equiparado a investigador Auxiliar da Universidade de Aveiro

Professor Doutor José de Jesus Figueiredo da Silva
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Apresento os meus sinceros agradecimentos:

Ao orientador Prof. Doutor José de Jesus Figueiredo da Silva e coorientadora Prof.^a Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira por toda a dedicação e apoio prestado ao longo do trabalho laboratorial, pela partilha de conhecimento, pelas críticas e sugestões levantadas ao longo da redação da dissertação, pelos bons momentos de convívio vividos.

Agradeço a preciosa colaboração da Prof.^a Rosa Freitas, que foi incansável na ajuda de tratamentos de dados, e não podia esquecer o incansável Paulo Cardoso e Eng. David Silva que tanto me ajudaram e me aturaram nos laboratórios respetivos.

Às duas fantásticas técnicas de laboratório do Departamento de Ambiente e Ordenamento pela ajuda no decorrer do trabalho laboratorial.

Aos meus professores, em especial ao Prof. Doutor Jorge Ventura Ferreira Cardoso, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pelas palavras amigas e pela motivação e encorajamento que sempre transmitiu para o prosseguimento com os estudos de mestrado.

Aos meus pais José Fernandes e Maria Fernandes, e à minha irmã Annabelle Fernandes pela paciência e pelos diversos apoios prestados durante todo o meu percurso académico.

Às minhas colegas de laboratório Joana Pires e Isabel Alves que foram uma muito boa companhia no trabalho árdua de laboratório.

Agradeço do fundo do coração a preciosa ajuda e a simples presença ao meu lado nestes momentos angustia, à Andreia Pereira. Sem o seu apoio moral e sentimental este trabalho seria impossível.

Aos meus amigos do primeiro direito que sempre estiveram do meu lado nas horas mais complicadas, demonstrando o carinho e consideração que têm pela minha pessoa.

Não podia deixar de agradecer a todos os AMIGOS que comigo conviveram na linda aventura de Vila Real, onde fizeram crescer muito a minha pessoa.

palavras-chave

central bioelétrica, enzimas do solo, microbiota do solo, catalase, fosfatase, FDA, bactérias, fungos

resumo

A biomassa florestal é um recurso natural com grande potencial calorífico sendo atualmente aproveitado, à escala mundial, para a produção de energia elétrica. O crescimento da população mundial e o impacto ambiental causado obrigou à pesquisa de novas tecnologias mais amigas do ambiente.

Em Portugal, estão atualmente ativas dezanove termoelétricas exclusivas a biomassa. Assim, a cinza de biomassa tornou-se mais um problema para o qual é necessário encontrar uma solução. A cinza de biomassa florestal é um resíduo industrial, sólido, proveniente da incineração e combustão incompleta de madeira e cascas.

Neste trabalho foi usada cinza resultante da combustão de resíduos do abate florestal, principalmente casca, ramos e bicadas de eucalipto, que são recolhidos e vendidos para serem usados numa caldeira de leito fluidizado anexa a uma fábrica de pasta de papel. Com o intuito de dar uso e aproveitar os benefícios da cinza de biomassa, o presente trabalho de investigação tem como objetivo clarificar as vantagens da utilização destas cinzas em solo florestal, avaliando a sua capacidade para aumentar a fertilidade do solo. Foram estudadas as alterações em parâmetros biológicos de fertilidade do solo. O trabalho de investigação foi realizado entre os meses de fevereiro e julho na beira litoral.

Os parâmetros relacionados com a fertilidade do solo utilizados na avaliação do estudo foram a catalase, a fosfatase ácida e alcalina, a hidrólise do diacetato de fluoresceína (HFDA) e o número de bactérias e fungos do solo.

Os resultados obtidos no geral elucidaram um efeito positivo na fertilidade do solo. Aumentou a atividade bacteriana e o pH do solo, diminuíram os fungos e as enzimas do solo. Mesmo diminuindo a atividade enzimática foram observados aumentos na microbiota do solo. A quantidade de 5 ton/ha em campo foi diminuta e com 10 ton/ha nos ensaios de laboratório o efeito foi mais notório. O trabalho evidencia a necessidade de avaliar melhor a influência da aplicação de cinzas de biomassa quer em ensaios de laboratório quer em ensaios de campo, de modo a desenvolver práticas agrícolas e silvícolas que aproveitem da melhor forma as potencialidades de um recurso disponível e económico.

keywords

bioelectric central, soil enzymes, soil microbiota, catalase, phosphatase, FDA, bacteria, fungi

abstract

Forest biomass is considered a natural resource with great calorific potential, used globally to produce electricity. The increasing of world population and consequent impact suggest the search of new technologies environmental friendly.

Currently, in Portugal there are nineteen biomass exclusive thermoelectrics. Therefore, the ashes from biomass became a problem and a solution is required. The ashes from forest biomass are an industrial waste, arising from incineration and incomplete combustion of wood and bark.

In this work were used ashes from combustion of forest waste slaughter, like bark and eucalypt branches, which are collected and sold to be used in a bubbling fluidized bed attached to a paper pulp factory.

The purposes of this work is clarify the advantages of using biomass ashes in forest soil and assess their ability to increase soil fertility. Were studied the visible changes in biological parameters soil fertility. The work was conducted between February and June in the coastal border region.

The relating parameters with fertility of the soil used in the evaluation of the study were catalase, acid and alkaline phosphatase, fluorescein diacetate hidrolisis (HFDA) and the number of bacteria and soil fungi.

The results obtained in general have elucidated a positive effect on fertility. It increased the bacterial activity and the pH of the soil but reduced the fungi and the enzymes. Even decreasing the enzyme activity increases were observed in the soil microdiota. A quantity of 5 ton / ha in the field was tiny, with 10 ton / ha in laboratory tests the effects were more marked. This work highlights the need to better assess the influence of the application of ash from biomass either in laboratory tests or in field trials in order to develop agricultural and forestry practices that leverage the best capabilities of an available resource and economic.

Índice

Índice de Figuras	v
Índice de tabelas.....	vii
Nomenclatura	viii
Organização da tese.....	ix
Plano de trabalho.....	x
1. Introdução.....	1
1.1 Motivação da investigação	1
1.2 Normas relativas à exploração florestal e a centrais bioelétricas.....	3
1.3 Objetivos do trabalho	5
1.4 Aplicação de cinza no solo	5
2. Metodologia	9
2.1 Descrição do local e caso de estudo	9
2.2 Cinza de biomassa.....	10
2.2.1 Origem de cinza	10
2.2.2 Caracterização da cinza	11
2.2.3 Aplicação da cinza.....	12
2.3 Calendarização do trabalho.....	13
2.4 Amostragem de solo	13
2.5 Ensaio da aplicação de cinza em laboratório	14
2.6 Armazenamento e codificação de amostras.....	15
2.7 Parâmetros inorgânicos e ambientais	16
2.7.1 Voláteis e M.O.	16
2.7.2 pH.....	17
2.7.3 Fósforo	17
2.7.4 Precipitação e temperatura ambiente na área de estudo	18
2.8 Parâmetros biológicos.....	19
2.8.1 Bactérias	20
I. Método da determinação da atividade bacteriana.....	21
2.8.2 Fungos	21
II. Método da determinação da atividade fúngica.....	22
2.9 Parâmetros bioquímicos.....	23

2.9.1	Fosfatase ácida e alcalina	23
III.	Método da determinação da fosfatase ácida e alcalina.....	24
2.9.2	Catalase	25
IV.	Método da determinação da catalase	26
2.9.3	HFDA.....	28
V.	Método da Hidrólise do Diacetato de fluorescina (HFDA)	29
2.10	Metodologia da análise de dados	30
3.	Resultados e discussão	31
3.1	Caracterização físico-química do solo	31
3.1.1	Amostras de laboratório.....	31
3.1.2	Amostras de campo.....	33
3.2	Avaliação da fertilidade do solo em amostras de laboratório	34
3.2.1	Parâmetros biológicos	34
3.2.1.1	Bactérias	34
3.2.1.2	Fungos	35
3.2.1.3	Discussão dos parâmetros biológicos	35
3.2.2	Parâmetros bioquímicos	36
3.2.2.1	Fosfatase ácida e alcalina.....	36
3.2.2.2	Catalase.....	38
3.2.2.3	HFDA	38
3.2.2.4	Discussão dos parâmetros bioquímicos	39
3.3	Avaliação da fertilidade do solo em ensaios de campo	39
3.3.1	Parâmetros biológicos	40
3.3.1.1	Bactérias	40
3.3.1.2	Fungos	41
3.3.1.3	Discussão dos parâmetros biológicos	41
3.3.2	Parâmetros bioquímicos	42
3.3.2.1	Fosfatase ácida e alcalina.....	42
3.3.2.2	Catalase.....	43
3.3.2.3	HFDA	44
3.3.2.4	Discussão dos parâmetros bioquímicos	44
4.	Discussão e conclusões gerais.....	45
	Bibliografia.....	47

Anexo A.....	51
Anexo B.....	53
Anexo C.....	57
Anexo D.....	59
Anexo E.....	67
Anexo F.....	92

Índice de Figuras

Figura 1: Imagem Google Earth da cidade de Aveiro e Estarreja.....	9
Figura 2: Imagem Google Earth de parte da Freguesia de Fernelã e do local de amostragens.....	9
Figura 3: Esquema básico do processo de remoção de cinza da instalação de combustão de biomassa.....	11
Figura 4: Core para extração das amostras em campo e exemplar de amostra de solo.....	14
Figura 5: Ilustração do core para extração das amostras de solo.....	14
Figura 6: Equipamento do ensaio de laboratório (Legenda: 1- suporte; 2- ampola de decantação; 3- tubo de acrílico; 4- recipiente de plástico; 5- elástico; 6- tecido; 7- saco de plástico).....	15
Figura 7: Dados da precipitação de uma miniestação hidrográfica perto do local de amostragem.....	18
Figura 8: Dados da temperatura média de um miniestação meteorológica perto do local de amostragem.....	19
Figura 9: Hidrólise do FDA [43].....	28
Figura 10: a. Percentagem de voláteis nas amostras de laboratório; b. Matéria Orgânica (M.O.); c. pH (Fonte: Joana Pires); d. Fósforo, sem e com tratamento (aplicação de cinza de biomassa).....	31
Figura 11: a. Percentagem de voláteis nas amostras de campo; b. Matéria orgânica (M.O.); c. pH (Fonte: Joana Pires); d. Fósforo, com e sem tratamento (aplicação de cinza de biomassa).....	33
Figura 12: Ensaio de laboratório referente ao número de bactérias (unidades formadoras de colónias por grama de solo), com e sem aplicação de cinza de biomassa.....	34
Figura 13: Ensaio de laboratório referente ao número de fungos (unidades formadoras de colónias por grama de solo), com e sem colocação de cinza de biomassa.....	35
Figura 14: Resultados das amostras de laboratório no ensaio da fosfatase ácida com e sem adição de cinza de biomassa.....	36
Figura 15: Resultados das amostras de laboratório no ensaio da fosfatase alcalina com e sem colocação de cinza de biomassa.....	37
Figura 16: Comparação entre a fosfatase ácida e fosfatase alcalina no ensaio de laboratório com e sem tratamento.....	37
Figura 17: Resultados das amostras de laboratório no ensaio de catalase com e sem colocação de cinza de biomassa.....	38
Figura 18: Resultados das amostras de laboratório no ensaio do HFDA com e sem colocação de cinza de biomassa.....	38

Figura 19: Resultados das amostras de campo no ensaio bacteriológico com e sem colocação de cinza de biomassa.	40
Figura 20: Resultados das amostras de campo no ensaio dos fungos com e sem colocação de cinza de biomassa.	41
Figura 21: Resultados das amostras de campo no ensaio de fosfatase ácida com e sem colocação de cinza de biomassa.....	42
Figura 22: Resultados das amostras de campo no ensaio de fosfatase alcalina com e sem colocação de cinza de biomassa.....	42
Figura 23: Resultados das amostras de campo no ensaio da catalase com e sem colocação de cinza de biomassa.	43
Figura 24: Resultados das amostras de campo no ensaio do HFDA com e sem aplicação de cinza de biomassa.	44
Figura 25: Localização das termoeletricas exclusivas a biomassa em Portugal [50]..	52

Índice de tabelas

Tabela 1: Valores máximos admissíveis para os teores «totais» (*) de metais pesados nos fertilizantes orgânicos (reportados à matéria seca) e quantidades máximas que se podem incorporar anualmente nos solos, bem como valores máximos admissíveis de concentração de microrganismos patogénicos nos fertilizantes (valores reportados à matéria fresca) [10].	4
Tabela 2: Valores máximos admissíveis dos teores «totais» (*) de metais pesados nos solos (reportados à matéria seca) em que se pretenda aplicar o fertilizante orgânico [10].	4
Tabela 3: Percentagem dos elementos da cinza de biomassa utilizada no trabalho de investigação (Fonte: David Silva e [11]).	12
Tabela 4: Codificação de amostras.	15
Tabela 5: Dados da humidade média das amostras de campo.	19
Tabela 6: Material e reagentes utilizadas na determinação da atividade bacteriana.	21
Tabela 7: Variação das populações de bactérias e fungos consoante o pH do solo [25].	22
Tabela 8: Material e reagentes utilizados para análise fúngica.	22
Tabela 9: Material e reagentes utilizados para analisar a fosfatase.	24
Tabela 10: Material e reagentes utilizados na análise da catalase.	26
Tabela 11: Elaboração dos padrões de Formadeído para a catalase.	27
Tabela 12: Material e reagentes para a elaboração do protocolo do HFDA.	29
Tabela 13: Legenda da análise de significância com o programa PERMANOVA.	30
Tabela 14: Exemplos da metodologia de análise de dados.	30
Tabela 15: Lista de termoelétricas exclusivas a biomassa em Portugal [49].	51

Nomenclatura

A	Área	[m ²]
C	Concentração	[ton/ha]
CQO	Carência química de oxigénio	[mg O ₂ /L]
H _T	Humidade total	[%]
M.O.	Matéria orgânica	[%]
M	Massa molar	[g/mol]
m	Massa	[g]

Índices:

bs	base seca
btq	base tal e qual

Abreviaturas

APCER	Associação Portuguesa de Certificação
cc	com cinza
CQO	Carência Química de Oxigénio
Cu	Cobre
FDA	3,6 – Diacetato de fluoresceína
FSC	Forest Stewardship Council
HFDA	Hidrolise do Diacetado de Fluoresceína
M.O.	Matéria Orgânica
P	Fosforo
Pb	Chumbo
PEFC	<i>Programme of Endorsement for Forest Certification Schemes</i>
R.C.	Resultados de campo
R.L.	Resultados laboratoriais
sc	sem cinza
Zn	Zinco

Organização da tese

A dissertação desenvolvida foi dividida em 4 capítulos:

O capítulo 1, a Introdução, é composto por uma apresentação das motivações que levaram à elaboração desta dissertação, uma apresentação das normas relativas à exploração florestal, a centrais bioelétricas e à utilização de cinzas. Neste capítulo são também traçados os objetivos propostos nesta dissertação, um estado da arte abrangendo os estudos em relação à cinza de biomassa.

O capítulo 2, a Metodologia, é dividido em 10 subcapítulos. É feita uma abordagem generalista ao estudo e uma descrição da área geográfica. É identificada a tecnologia que dá origem às cinzas de biomassa, as características da cinza, o método de colocação da cinza. É identificada a calendarização seguida durante a elaboração da dissertação. É de seguida identificado qual o método utilizado na amostragem do solo, como foi realizado o ensaio de laboratório e a codificação utilizada durante o trabalho de laboratório e análise de dados. De seguida são expostos os métodos que caracterizam o solo como os voláteis, a matéria orgânica e o fósforo. Apresentam-se também os dados de pluviosidade, humidade do solo e temperatura de uma miniestação meteorológica nas proximidades.

São ainda identificados os parâmetros estudados (a quantidade de bactérias no solo, a quantidade de fungos, a atividade das fosfatases ácida e alcalina, a atividade da catalase e da hidrolise do diacetato de fluoresceína), identificadas as metodologias laboratoriais utilizadas para as medições dos parâmetros nas amostras de campo e laboratório, fazendo uma introdução a cada parâmetro e identificador biológico e bioquímico de fertilidade. O último subcapítulo, descreve como foi realizada a análise estatística dos dados e qual a sua função.

No capítulo 3 são apresentados os resultados na análise dos parâmetros obtidos nas amostras de laboratório e nas amostras de campo. Este capítulo é dividido em três subcapítulos, o primeiro relata os resultados dos parâmetros inorgânicos, o segundo os resultados biológicos e bioquímicos das amostras de laboratório e o terceiro subcapítulo relata os resultados dos ensaios das amostras de campo.

No capítulo 4 é feita a discussão dos resultados e são tiradas as principais conclusões do trabalho. Neste capítulo são também abordadas algumas ideias para trabalhos futuros.

Plano de trabalho

O plano de trabalho seguido na preparação desta dissertação foi dividido em três partes. A primeira parte resumiu-se a uma revisão teórica, para conhecer estudos já existentes e práticas já utilizadas. A segunda parte foi exclusivamente prática, realizada no local de amostragem e nos laboratórios do departamento de ambiente e de biologia. A terceira e última parte, foi dividida em 2 pontos: análise dos resultados e discussões. Os pontos mais importantes do plano de trabalho incluíram:

- Revisão da literatura sobre indicadores de fertilidade do solo e os possíveis efeitos da aplicação de cinza de biomassa em solo florestal.
- Preparação do terreno, primeira recolha de amostras de solo e aplicação de cinza.
- Acompanhamento e recolha de amostras ao longo do tempo a fim de detetar os efeitos da cinza aplicada no solo florestal.
- Execução do ensaio de laboratório.
- Realização de ensaios para medir indicadores de fertilidade do solo; determinação de pH, de carbono orgânico, de fósforo disponível, contagem de microrganismos e determinação da atividade de enzimas do solo.
- Análise dos resultados e discussões.

1. Introdução

O capítulo introdutório irá apresentar a importância e motivações que levaram a elaboração desta dissertação, os principais objetivos para os quais esta se propõe, as normas e certificações adequadas à exploração florestal, às centrais bioelétricas e à utilização de cinzas de biomassa no solo. Seguidamente irá ser elaborado um estado da arte relativo a todos os estudos com o objetivo geral de dar uso ao resíduo, cinza de biomassa. Por fim é dada informação sobre o plano de trabalho e a organização da dissertação.

1.1 Motivação da investigação

O constante crescimento da população mundial, que aumentou em 50 anos (de 1950 a 2000) de 2,5 mil milhões para mais de 6 mil milhões [1], obriga ao aumento de infraestruturas e bens essenciais a fim de proporcionar o bem-estar humano. Este aumento, que impõe maior pressão sobre os ecossistemas, obriga também ao aumento da produção elétrica, para acompanhar o aumento proporcional dos gastos da eletricidade. Para este efeito torna-se evidente um desenvolvimento sustentável, para evitar o término dos recursos presentes no planeta. No que diz respeito à produção energética, novas formas de aproveitamento de recursos renováveis são essenciais para a convivência e sobrevivência de uma população tão numerosa no planeta Terra. A evolução nesse sentido necessita de aproveitar os recursos renováveis disponíveis de uma forma sustentável de modo a não prejudicar as gerações vindouras. Para este efeito a legislação europeia tem contribuído para minorar os pontos negativos do aumento populacional, tentando assim que toda a população possa usufruir de bens essenciais.

Uma das maiores consequências do aumento populacional, e que é muito importante para os ecossistemas e também para o bem-estar humano, é a desflorestação. Segundo a Organização das Nações Unidas desaparecem 13 milhões de hectares de floresta por ano devido ao desenvolvimento não controlado [2]. Para lutar contra este problema a Comissão Europeia propôs parar a diminuição da cobertura arbórea do planeta até 2030 e reduzir a desflorestação tropical em pelo menos 50 % até 2020 [2].

A desflorestação é hoje em dia um dos grandes problemas da nossa sociedade quando sabemos que a floresta é responsável por uma grande parte da formação do oxigénio que nos é essencial para viver, pela prevenção da erosão do solo e pela purificação da água e pelo armazenamento de CO₂ [2]. A desflorestação é difícil de travar devido à dependência já adquirida pelo homem na elaboração de bens já tornados essenciais (papel, madeira e derivados), que provêm das árvores. Na Europa a exploração florestal é originada principalmente para a produção de energia elétrica, produção de celulose e a produção de madeira para obra.

Na produção de celulose nem todas as partes da árvore são aproveitadas, dando origem a resíduos. Atualmente, há já uma consciencialização por parte das empresas para os efeitos que a sua atividade introduz na floresta. Há várias medidas

que são tomadas de modo a minorar o impacto do corte de árvores, como a reflorestação e o corte sustentável, originando plantações com diferentes “idades”, o que evita a degradação intensiva dos solos. Há também cuidados para não serem utilizadas árvores provenientes de explorações ilegais, e assim diminuir o abate não sustentável [2].

A produção de celulose cria resíduos (cascas e restos de árvores) aos quais, como todos os resíduos, é aconselhável dar um uso ou um fim de vida apropriado. Estudos que ajudem a dar uso a estes resíduos e ao mesmo tempo ajudem o crescimento florestal para contrapor a desflorestação, são portanto essenciais. Em 100 toneladas de celulose produzida, originam-se 48 toneladas de resíduo, durante o desmantelamento *in situ* da biomassa e durante a fabricação da celulose [3].

O crescimento da indústria de papel, tem provocado nas últimas décadas a geração de elevadas quantidades de resíduos sólidos, tanto no local de extração dos materiais como no local de produção.

A utilização de biomassa florestal para a produção de energia, tem sido uma solução adotada em Portugal pela indústria de celulose em geral, visto ser uma fonte de energia barata, com origem num resíduo por eles produzido. Entende-se por biomassa florestal uma diversidade de produtos como: matos, resíduos de exploração florestal (ramos e folhas), a própria madeira e seus subprodutos (cascas, serrim) [4]. A biomassa florestal, não era até há bem pouco tempo aproveitada, tanto os restos originados na desflorestação como as arbustivas presentes nas matas em Portugal (Exemplo: tojo, codesso etc.). Esta biomassa era abandonada nas matas. Para além de utilizar um resíduo ao qual não era dado uso, a sua utilização, reduz o risco de incêndio no local de extração.

As centrais bioelétricas utilizam a biomassa, um resíduo da exploração florestal, para produzir eletricidade, formando outro resíduo, a cinza. O resíduo originado na queima de resíduos oriundos da desflorestação tem na sua constituição elementos muito importantes para o crescimento e desenvolvimento de espécies arbóreas, como por exemplo o fósforo, o potássio, o magnésio e o cálcio, entre outros.

A motivação para este estudo é avaliar a aplicação de um resíduo sem qualquer utilidade no solo de forma adequada (doses certas) evitando a sua colocação em aterro onde poderia em concentrações elevadas ser nocivo ao solo. O estudo poderá assim contribuir para a valorização de este resíduo.

O resíduo formado, a cinza de biomassa, exige cuidados especiais. Apesar de poder ser muito benéfico ao solo, em concentrações elevadas pode originar danos muito severos por contaminar o meio ambiente com metais pesados. Mesmo estando presentes em pequenas concentrações, os metais pesados, podem originar danos severos [3]. É portanto necessário estudar quais as quantidades a serem aplicadas. Este processo será desenvolvido neste trabalho de dissertação. Para isso, é necessário conhecer algumas características da cinza aplicada e igualmente as do solo que a vai receber.

1.2 Normas relativas à exploração florestal e a centrais bioelétricas

No que respeita a normas e legislação adequada, irão ser abordadas três vertentes, as normas em relação à exploração florestal, normas relativas às centrais termoelétricas ou bioelétricas e normas relativas à utilização das cinzas e nutrientes no solo.

Para abordar a primeira parte, referente à exploração florestal, é dado um exemplo de uma empresa que gere todo o seu património em conformidade com a Norma Portuguesa NP 4406 [5], de Gestão Florestal Sustentável, e com os Princípios e Critérios do FSC (Forest Stewardship Council). Os objetivos referentes a esta gestão são a contribuição para uma gestão florestal sustentável, eficiente e responsável.

Para a certificação neste ramo da atividade existe o FSC [6], que é uma organização independente, não-governamental, sem fins lucrativos. Esta organização tem como objetivo promover a gestão responsável das florestas do mundo inteiro encontrando soluções, para todas as comunidades que destas dependem, utilizando critérios para promover produções ambientalmente sustentáveis, economicamente viáveis e socialmente benéficas.

Existe também a certificação PEFC (*Programme of Endorsement for Forest Certification Schemes*), em português, Programa para o Reconhecimento da Certificação Florestal, que é o maior sistema mundial de certificação florestal. Com a certificação PEFC os produtores asseguram, no seu país e no estrangeiro, a possibilidade de comercializar os seus produtos tendo o reconhecimento de que estes são provenientes de explorações geridas de forma sustentável. Em Portugal o primeiro organismo acreditado para certificar produtores que utilizam a floresta como fonte de rendimento foi a APCER (Associação Portuguesa de Certificação) [7, 8]. Estas certificações trazem variados benefícios aos produtores [8]. Um dos mais importantes é assegurarem, no seu país e no estrangeiro, o reconhecimento de que os seus produtos são provenientes de explorações sustentáveis, o que significa na prática que a biodiversidade dos ecossistemas florestais é conservada ou aumentada, são mantidas funções essenciais de regulação do ciclo da água, sequestro e armazenamento de carbono e prevenção da erosão do solo, são mantidos os habitats existentes, e são respeitados os direitos dos povos indígenas, etc....

Um bom exemplo de gestão e certificação por estas duas entidades a nível nacional, é o Grupo Portucel, que adota todas as medidas sugeridas pelas entidades competentes. O Grupo Portucel redigiu também um código de boas práticas florestais que constitui, para os colaboradores, um documento onde referencia as boas práticas silvícolas, disponível no relatório de sustentabilidade de 2010/2011.

No que diz respeito à legislação Portuguesa correspondente, a utilização de biomassa florestal em centrais dedicadas à geração de energia elétrica, está neste momento vigente o Decreto-Lei n.º5/2011 de 10 de Janeiro [9].

A Tabela 15 e Figura 25 do anexo A mostram o número de termoelétricas exclusivas a biomassa em funcionamento em Portugal e qual é a potência gerada por cada uma delas.

No que respeita à utilização de cinza de biomassa a legislação ainda não específica nada de concreto para o seu uso, mas a Portaria n.º 631/2009 de 9 de Junho limita a quantidade de metais pesados nos fertilizantes orgânicos (Tabela 1) e os valores máximos admissíveis dos teores de metais pesados nos solos em que se pretenda aplicar o fertilizante orgânico (Tabela 2).

Tabela 1: Valores máximos admissíveis para os teores «totais» (*) de metais pesados nos fertilizantes orgânicos (reportados à matéria seca) e quantidades máximas que se podem incorporar anualmente nos solos, bem como valores máximos admissíveis de concentração de microrganismos patogénicos nos fertilizantes (valores reportados à matéria fresca) [10].

Elemento (*)/parâmetro	Valores máximos admissíveis nos fertilizantes orgânicos (miligramas por quilograma de matéria seca).	Valores máximos das quantidades que se podem incorporar por ano nos solos (gramas por hectare e por ano) (**).
Cádmio (<i>Cd</i>)	5	30
Chumbo (<i>Pb</i>)	600	2 250
Cobre (<i>Cu</i>)	500	3 000
Crómio (<i>Cr</i>)	300	3 000
Mercúrio (<i>Hg</i>)	5	30
Níquel (<i>Ni</i>)	200	900
Zinco (<i>Zn</i>)	1 500	7 500
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25 g de matéria fresca	–
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	1000 células por grama de matéria fresca	–

Tabela 2: Valores máximos admissíveis dos teores «totais» (*) de metais pesados nos solos (reportados à matéria seca) em que se pretenda aplicar o fertilizante orgânico [10].

Elemento	Valores máximos admissíveis no solo (miligramas por quilograma)		
	$5 \leq pH < 6$	$6 \leq pH < 7$	$pH \geq 7$
Cádmio (<i>Cd</i>)	0,5	1	1,5
Chumbo (<i>Pb</i>)	50	70	100
Cobre (<i>Cu</i>)	20	50	100
Crómio (<i>Cr</i>)	30	60	100
Mercúrio (<i>Hg</i>)	0,1	0,5	1
Níquel (<i>Ni</i>)	15	50	70
Zinco (<i>Zn</i>)	60	150	200

(*) Fracção solúvel em água-régia.

1.3 Objetivos do trabalho

A investigação desenvolvida neste trabalho de mestrado tem como objetivo principal avaliar o efeito de uma cinza de biomassa oriunda de um electrofiltro sobre a fertilidade do solo. Esta avaliação passa por analisar vários parâmetros indicadores da fertilidade do solo. Os principais objetivos são:

- Avaliar o efeito da aplicação de cinza de biomassa nos parâmetros biológicos do solo.
- Avaliar os efeitos da aplicação de cinza de biomassa nos parâmetros químicos do solo mais relacionados com a atividade microbiana.
- Avaliar o efeito da aplicação de cinza de biomassa em ensaios de campo e em ensaios de laboratório.

Esta investigação permitirá aumentar o conhecimento sobre os efeitos da cinza de biomassa na fertilidade do solo, contribuindo para avaliar um novo método de adubação que poderá aumentar o crescimento de espécies florestais e ao mesmo tempo diminuir a deposição deste resíduo em aterro.

1.4 Aplicação de cinza no solo

Os nossos antepassados, já aproveitavam as cinzas da lareira para colocar sobre a terra do jardim na primavera seguinte, por ser bom para as plantas.

Por volta de 1700 começaram a queimar madeira com o fim de obter a cinza que era usada como fonte de potássio para adubação [11]. Em 1900 deixou de se usar esta fonte por já existir formas mais baratas para a produção de potássio. Durante anos tratou-se a cinza de biomassa como resíduo, sendo colocada em aterros [11]. A cinza especialmente produzida na combustão de carvão foi durante muitos anos considerada um problema, sendo, um dos resíduos sólidos que mais inconvenientes tinha, devido à sua carga em metais pesados [12]. A aplicação de cinzas de carvão para fertilizar os solos, levou à “queima” dos solos e das plantas, devido à exagerada quantidade aplicada e há não monitorização de parâmetros que avaliam a fertilidade dos solos [12]. A aplicação de cinzas em quantidades excessivas pode ter consequências nefastas em vários aspetos da fertilidade do solo, a nível da composição física, química e biológica, mas também nos recursos hídricos.

Há algumas décadas e com o crescimento da preocupação sobre as emissões de CO₂ e o aquecimento global, tornou evidente a adoção de medidas mais sustentáveis e mais amigas do ambiente na produção de energia [13]. Começou então a utilizar-se a biomassa como combustível para a produção de energia visto ser uma energia renovável e barata. Com o crescente aparecimento deste resíduo em massa, começaram então a aparecer estudos para dar um fim-de-vida mais apropriado e rentável à cinza de biomassa [13]. É de realçar que a cinza de biomassa não tem sempre a mesma composição, esta depende da espécie de biomassa queimada (exemplo: eucalipto ou pinheiro), das características do solo em que cresceu e da forma como é queimada, isto é, a tecnologia utilizada para o efeito.

Na queima de biomassa alguns nutrientes ficam retidos na composição da cinza, logo a sua aplicação no solo é vista como uma reciclagem de nutrientes. Estudos realizados sobre a aplicação de cinza no solo referem que as cinzas de biomassa são ricas em nutrientes para as plantas, possuindo elementos minerais tais como o K, Na, Zn, Ca, Mg e Fe, e que a sua aplicação poderia produzir mudanças importantes nas propriedades químicas e físicas do solo [14, 15], como a correção da acidez do solo e o aumento da fertilidade [4].

Estudos revelaram que a colocação de cinza de biomassa pode ser responsável por um aumento da microbiota do solo [16, 17]. A aplicação de 5 ton/ha de cinza de biomassa faz aumentar o pH em mais de 1 valor, e foi também observado um aumento da comunidade microbiana [17]. A aplicação de cinzas em plantações de eucalipto, são alternativas técnicas e economicamente viáveis, aumentando a fertilidade do solo, e influenciando o desenvolvimento das plantas [3]. Saarsalmi et al. [18] também verificaram que além de aumentar a percentagem de alguns elementos presentes no solo a aplicação da cinza também aumenta o pH do solo, o que é um aspeto muito positivo quando nos deparamos com solos muito ácidos. Os mesmos autores referiram que a cinza de biomassa é uma solução admissível para combater e acidez dos solos. Estudos revelam que a utilização deste resíduo em agricultura ou silvicultura é uma boa forma de aumentar o pH e nutrientes como P, K, Mg e Ca [19]. Bellote et al. [3] realizaram um estudo onde concluíram que resíduos de celulose e cinza de caldeira na dose de 50 ton/ha melhoram a porosidade e a capacidade de retenção de água, aumentam o pH e os teores de P, K, Mg e Ca do solo.

Estudos mais recentes, baseados em experiências de curta duração, concluíram que há uma ampla margem para a utilização segura de cinzas volantes, unicamente ou, em combinação com adubo químico para melhorar a fertilidade do solo, ocorrendo maiores aumentos no rendimento quando aplicados em conjunto com adubo do que separadamente [20]. Esta segurança, na utilização das cinzas volantes nos solos é confirmada num trabalho realizado na Finlândia que refere que a cinza tem facilidade em libertar K, Na, e B, enquanto alguns metais pesados são altamente insolúveis [21]. Pandey e Singh [12] referem que a cinza volante pode ser introduzida no solos, mas é necessário ter em atenção a bioacumulação de metais nas plantas. Todos estes estudos realçam também que é necessário arranjar um destino a este resíduo, cinza de biomassa, que cada vez é mais frequente devido ao aumento da utilização da tecnologia que o produz.

Os estudos que referem os efeitos da aplicação da cinza de biomassa sobre a microbiota são mais escassos e relativamente recentes. A composição em nutrientes das cinzas, depende da composição da biomassa, e vai influenciar o impacto das cinzas na fertilidade do solo. Algumas cinzas são apenas utilizadas para aumentar o pH do solo, uma vez que a maioria das culturas agrícolas ou silvícolas apresentam maior crescimento a valores de pH entre 6 e 7, devido a maior disponibilidade de nutrientes [12]. O efeito do cálcio é também desejado e quando está presente nas cinzas interage com os ácidos presentes no solo e disponibiliza nutrientes [12]. Muitos parâmetros do solo podem limitar a colonização de microrganismos, como a salinidade, o pH, a humidade, etc... [12]. No entanto a escassez de carbono e azoto são os maiores responsáveis pelo número de microrganismos num solo [12]. Vários estudos já evidenciaram que ocorre um aumento da atividade microbiológica após a

adição de cinza e que a cinza não tem efeitos nocivos a longo prazo quando comparado com a aplicação de adubos químicos [22].

De modo a colmatar as deficiências nutricionais das cinzas, especialmente em azoto, têm sido desenvolvidos estudos de modo a encontrar a mistura ideal num combinado de “adubos”. Alguns trabalhos de investigação estudaram a aplicação conjunta de cinzas e adubos azotados, com resultados positivos no aumento da biomassa microbiana [22]. Outros estudaram o efeito de uma pequena percentagem de cinza misturada com compostos orgânicos [23]. Estes estudos mostram que a cinza de biomassa é eficaz para além de ser um composto economicamente rentável e ambientalmente saudável [23].

2. Metodologia

2.1 Descrição do local e caso de estudo

Para o trabalho realizado no âmbito desta dissertação, foi escolhido um terreno florestal situado na freguesia de Fermelã no distrito de Aveiro (Figura 1 e Figura 2). O local/terreno em causa tem uma inclinação de 30%, abaixo deste localiza-se um pequeno curso de água e na parte superior estão situados campos agrícolas. O local foi limpo superficialmente, isto é, foram cortados os arbustos e retirada a biomassa florestal existente, de modo a facilitar a colocação da cinza sobre o solo.



Figura 1: Imagem Google Earth da cidade de Aveiro e Estarreja

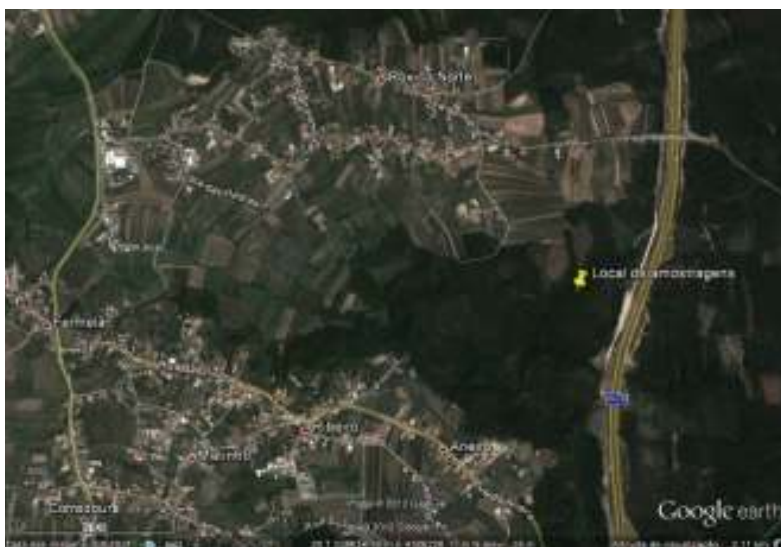


Figura 2: Imagem Google Earth de parte da Freguesia de Fermelã e do local de amostragens

Para a realização do estudo, foi escolhida uma área, dividida em duas parcelas, cada uma de 80 m², tendo as parcelas as mesmas características exteriores, quanto à cobertura vegetal e inclinação. Numa das parcelas (A), não foi aplicada cinza e na outra (B) foi aplicada cinza.

Para a realização dos ensaios de campo foi calculada uma média de cinzas aplicadas noutros estudos [3, 4, 11, 15, 20]. Tendo-se optado pela concentração de 5 ton/ha.

Os parâmetros biológicos escolhidos para analisar o impacto da cinza de biomassa sobre a fertilidade do solo foram: número de microrganismos (fungos e bactérias) presentes no solo; parâmetros bioquímicos: fosfatases ácida e alcalina, catalase e HFDA. Durante 5 meses (fevereiro a julho) foram acompanhadas as alterações dos diversos parâmetros em 4 amostragens espaçadas de aproximadamente 1 mês e meio.

Para além do estudo de campo, foi também realizado um ensaio de laboratório de 7 dias. É de realçar que o estudo de laboratório foi realizado com o solo retirado do mesmo local do ensaio de campo, na mesma altura da última amostragem. No estudo de laboratório foi utilizada uma quantidade de cinza correspondente à gama alta, de 10 ton/ha [3, 4, 11, 15, 20].

2.2 Cinza de biomassa

2.2.1 Origem de cinza

A cinza de biomassa usada neste estudo provém de uma central bioelétrica ou central termoelétrica de biomassa florestal, situada no Centro Litoral. As cinzas são provenientes de um electrofiltro, portanto são cinzas volantes. A biomassa é queimada num leito fluidizado com areia, os gases de exaustão que saem desta operação são tratados por um electrofiltro que dá origem à cinza volante (Figura 3). Na Figura 3 está assinalado um ponto (*1) à saída da caldeira onde também são recolhidas cinzas, que por vezes são misturadas com as cinzas volantes recolhidas no eletrofiltro, por terem as mesmas características.

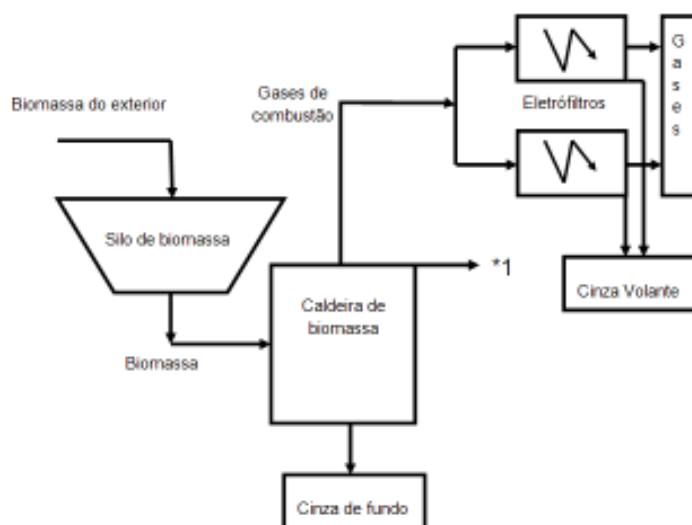


Figura 3: Esquema básico do processo de remoção de cinza da instalação de combustão de biomassa

A cinza utilizada foi uma mistura homogeneizada da cinza recolhida ao longo de um ano da instalação de combustão, em leito fluidizado, de uma central bioelétrica. Isto é, foi retirada uma amostra representativa todos os meses durante um ano, sendo estas misturadas para a colocação em campo. Foi utilizada a mesma mistura no ensaio de laboratório. A cinza volante tem como característica geral ser fina (na gama dos micrómetros).

Em centrais como esta, anexa a uma fábrica de celulose, é frequente colocar os resíduos da fabricação misturados com a biomassa florestal. Neste caso a cinza utilizada é unicamente oriunda de queima de biomassa florestal (casca e ramos).

2.2.2 Caracterização da cinza

Os resíduos provenientes de abate e de operações de limpeza, ou seja a biomassa florestal, levam à exportação de elementos. Parte, permanecem incorporados nas cinzas resultantes da combustão destes resíduos florestais. Esses elementos são então aproveitados para aplicação no solo, de modo a aumentar a sua fertilidade.

A cinza de biomassa utilizada neste trabalho de investigação tem características aproximadamente idênticas às cinzas descritas na bibliografia existente. Na Tabela 3 estão expressas as características da cinza usada, e também valores referidos na bibliografia. A cinza usada nesta dissertação tem um pH muito alcalino, aproximadamente 12 (média na bibliografia está entre 9 e 13,5), devido à presença de 3 elementos químicos que a tornam alcalina, são estes, o cálcio, o sódio e o magnésio [11, 13]. As quantidades de alumínio e sódio mais elevadas do que o descrito na bibliografia, presentes na cinza de biomassa, podem dever-se à proximidade do mar e à elevada acidez do solo de onde é proveniente a biomassa ou, à quantidade elevada de solo misturado na queima do resíduo com origem nos processos de abate florestal.

A flora tem diferentes quantidades de nutrientes consoante o local onde cresce, sendo o pH do solo uma das características que altera a acumulação de nutrientes [11, 13].

Tabela 3: Percentagem dos elementos da cinza de biomassa utilizada no trabalho de investigação (Fonte: David Silva e [11])

Elementos	Cinza de biomassa	
	(média da bibliografia)	Desvio Padrão
Maioritários		
Silício (%)	22.01	3.31
Alumínio (%)	8.43 (0.5-3.2)	1.73
Cálcio (%)	9.29 (2.5-33)	3.53
Potássio (%)	3.83(0.1-13)	0.41
Ferro (%)	3.47	0.58
Magnésio (%)	1.54 (0.1-2.5)	0.27
Sódio (%)	0.95 (0-0.54)	0.21
Fósforo (%)	0.57 (0.1-1.4)	0.13
Titânio (%)	0.45	0.09
Manganês (%)	0.22 (0-1.3)	0.08
Enxofre (%)	1.03	0.66
Cloro (%)	1.20	1.03
Oxigénio (%)	45.60	1.09
Carbono (%)	1.14	0.67
Minoritários		
Crómio (ppm)	142.6	-
Cobre (ppm)	83.4	-
Zinco (ppm)	218.8	-

2.2.3 Aplicação da cinza

Para a aplicação da cinza de biomassa na experiência de campo foi necessário ter em atenção as quantidades a colocar, visto estas poderem, no caso de serem em demasia, originar colmatação dos solos e desequilíbrios nutricionais [24]. No caso de ser em pouca quantidade, seria difícil observar o benefício da sua aplicação no solo, como é pretendido [24]. Também foi necessário ter atenção às quantidades devido ao pequeno curso de água a jusante, a fim de evitar uma possível lixiviação. A aplicação foi realizada manualmente com ajuda de um peneiro para espalhar a cinza sobre a superfície do solo. A dose de cinza aplicada nas experiências de campo, foi de 5 ton/ha. Esta quantidade foi calculada a partir de uma média feita em alguns estudos já realizados e que mostram resultados positivos [3, 4, 11, 15, 20].

Quanto à aplicação em laboratório foi apenas colocada a cinza na parte superior do core, sobre a superfície do solo, e este foi penetrando no solo com ajuda da água de percolação (que representa a precipitação). Nos testes de laboratório, com uma duração curta (7 dias), optou-se por aplicar uma carga de cinza na gama alta para que os eventuais efeitos observados fossem mais acentuados. A carga aplicada foi de 10 ton/ha [3, 4, 11, 15, 20].

2.3 Calendarização do trabalho

A preparação da metodologia foi realizada entre os meses de dezembro de 2011 e Janeiro de 2012, sendo que a primeira amostra de solo foi efetuada a 10 de fevereiro de 2012 em ambas as parcelas (dia 0). No dia seguinte foi colocada a cinza de biomassa na parcela B (parcela A é sem tratamento ou sem cinza). Efetuaram-se mais 3 amostragens, para cada parcela, a segunda no dia 16 de abril de 2012 (dia 66), a terceira no dia 27 de maio de 2012 (dia 101) e a quarta e última amostragem no dia 02 de julho de 2012 (dia 143).

No que diz respeito à amostragem para o ensaio de laboratório, esta realizou-se com o solo, da parcela A (sem cinza) do dia 02 de julho de 2012 e o ensaio teve um tempo de duração de 7 dias.

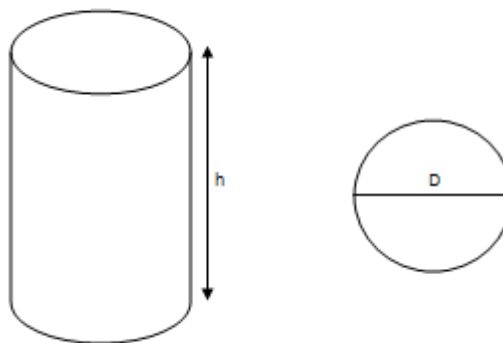
A realização dos ensaios para a medição dos parâmetros químicos, biológicos e bioquímicos (M.O., fósforo, bactérias, fungos, catalase, fosfatases, HFDA), foi realizada nas 4 amostragens.

2.4 Amostragem de solo

Para a extração das amostras de solo foi usado um corer com 10 cm de diâmetro e 30 cm de altura, em aço inox (Figura 4 e Figura 5), de modo a retirar sempre o mesmo volume de solo e com a mesma profundidade. Para as amostras de campo, após a extração, o solo foi colocado em sacos de plástico, e devidamente identificado. No final de cada amostragem o solo foi crivado com um peneiro de 2 mm e armazenado no frigorífico a 4 ou 14°C, de acordo com as análises a efetuar. Para as amostras de laboratório o processo de extração foi idêntico. Os coreres foram também usados para a recolha do solo para o ensaio de laboratório, e foram obtidos no mesmo local do ensaio de campo (Parcela A). No laboratório as amostras foram transferidas para tubos de dimensões iguais em acrílico.



Figura 4: Core para extração das amostras em campo e exemplar de amostra de solo.



Altura do core (h) = 298 [mm]; Diâmetro (D) = 99 [mm]

Figura 5: Ilustração do core para extração das amostras de solo

2.5 Ensaio da aplicação de cinza em laboratório

Para o ensaio de laboratório foram recolhidas 4 amostras testemunhas, isto é sem tratamento de cinza, todas retiradas da mesma área (parcela A do ensaio de campo). O ensaio consistiu em transferir o cilindro de solo com 20 cm (Figura 4) para um tubo de acrílico. Na parte inferior do tubo colocou-se um tecido amarrado com um elástico de modo a manter a estrutura da amostra. De seguida colocou-se o corer num recipiente de plástico, a fim de recolher a água. Colocou-se num suporte uma ampola de decantação com água para alimentar o corer e assim simular a água da chuva (Figura 6). De início foi colocada a cinza de biomassa e foi gradualmente adicionada uma quantidade de água, após os 7 dias as amostras foram guardadas e analisadas num processo idêntico ao adotado para as amostras de campo.

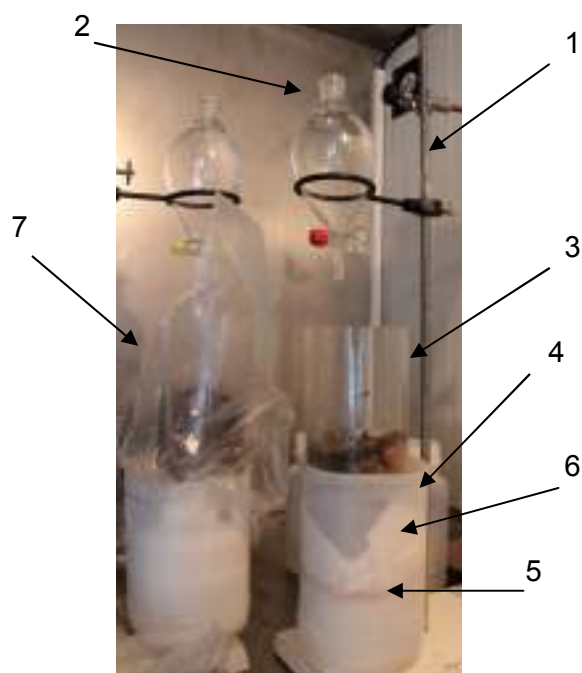


Figura 6: Equipamento do ensaio de laboratório (Legenda: 1- suporte; 2- ampola de decantação; 3- tubo de acrílico; 4- recipiente de plástico; 5- elástico; 6- tecido; 7- saco de plástico)

2.6 Armazenamento e codificação de amostras

Após a extração, as amostras de solo foram colocadas em sacos de plástico numa câmara refrigerada (4°C) e de seguida foram crivadas para as análises. Para o fósforo disponível, a CQO (M.O.), pH e voláteis, as amostras foram armazenadas numa câmara refrigerada a 14 °C. As amostras de solo para os restantes ensaios foram guardadas a 4 °C.

Para facilitar o trabalho de laboratório e a fim de não confundir as amostras procedeu-se inicialmente a uma codificação fácil de interpretar. Na tabela 4 é possível observar a codificação usada.

Tabela 4: Codificação de amostras

Parâmetros físico-químicos		Parâmetros biológicos	
Fósforo	Fo	Bactérias	Ba
Voláteis	Vo	Fungos	Fu
M.O.	MO	Hidrólise do FDA	HFDA
		Catalase	Ca
		Fosfatase Ácida	Fac
		Fosfatase Alcalina	Fal

À identificação realizada nos parâmetros (Tabela 4) foi adicionada uma letra A ou B, que identifica a parcela A sem cinza e B com cinza. De seguida a identificação temporal da colheita (tempo 1, 2, 3 4). As réplicas para cada amostragem foram também identificadas (1 e 2 as amostras sem cinza, e 3 e 4, as amostras com cinza).

Para ajudar a percepção da codificação utilizada apresentam-se dois exemplos:

É importante referir que para não haver confusões com as amostras de campo e laboratório, as amostras de laboratório foram identificadas como amostra 5.

Fosfatase Alcalina na Parcela A, no tempo 1, réplica 2 = Fal A 1.2

Fungos da Parcela B, no tempo 3, réplica 1 = Fu B 3.3

Bactérias do laboratório, sem cinza réplica 1 = Ba 5.1

Para a análise de dados realizada no programa PERMANOVA, na codificação é acrescentado sc para as amostras sem cinza (sem tratamento) e cc para as com cinza (com tratamento).

2.7 Parâmetros inorgânicos e ambientais

O acompanhamento *in situ* do estudo de amostras em campo, torna importante a análise de alguns parâmetros inorgânicos e ambientais, como a percentagem de voláteis do solo, a matéria orgânica, o pH, a precipitação, a humidade e a temperatura. Todos estes parâmetros têm a sua importância porque podem explicar algumas alterações observadas nas amostras, e também evidenciar se a cinza é responsável ou não por algumas das alterações observadas.

2.7.1 Voláteis e M.O.

No solo para além da parte geológica, está presente uma parte orgânica de origem biológica. A matéria orgânica (M.O.) tem várias fontes até ser incorporada no solo [25]. Esta é composta por celulose, proteínas, provenientes de animais mortos [25]. Um solo rico em M.O. é um solo que tem uma atividade biológica elevada [25]. É de todo essencial medir este parâmetro para este trabalho de investigação.

A medição de voláteis consistiu em secar a amostra de solo numa estufa a 105°C entre 12h a 24h. Após o solo estar completamente seco e arrefecido, este foi pesado e colocado numa mufla durante 2h a 550°C. Os voláteis são então calculados pela equação 1.

$$\% \text{ de Voláteis} = \left(\frac{\text{Massa}_{\text{antes da mufla}} - \text{Massa}_{\text{após a mufla}}}{\text{Massa}_{\text{antes da mufla}}} \right) * 100 \text{ (Eq. 1)}$$

No que diz respeito a percentagem de matéria orgânica nas amostras, esta pode ser calculada por duas formas. Pode ser calculada pela equação 1 ou a partir do cálculo da carência química de oxigénio (CQO).

A Carência Química de Oxigénio (CQO) é usada como uma medida de oxigénio equivalente à fração orgânica da amostra suscetível de ser oxidada por um oxidante químico. O processo utilizado foi o método da titulação do dicromato com

FAS (Ferrous Ammoniacal Sulphate) que está disponível no anexo B. Para calcular a M.O. utilizou-se o método da CQO que é mais fiável.

A quantidade de M.O. a partir da CQO é calculada da seguinte forma:

Calcular CQO a partir do método do anexo B em [mg de O₂/L]. De seguida calcular a percentagem de oxigénio pela equação 2.

$$\% \text{ de } O_2 = \frac{CQO * 0,1 L}{500 \text{ mg de solo}} \quad (Eq. 2)$$

Admitiu-se que a matéria orgânica era composta apenas por celulose (C₆H₁₀O₅) por ser maioritária na composição da M.O., calculando-se pela equação 3. O cálculo da percentagem da matéria orgânica neste trabalho, foi realizado pelo método do CQO.

$$\% \text{ de M.O.} = \% \text{ de } O_2 \frac{162}{192} \quad (Eq. 3)$$

2.7.2 pH

Nas amostras de solo o pH foi determinado no trabalho realizado pela Joana Pires, que decorreu em paralelo a este trabalho. O método utilizado envolveu a lixiviação de amostras de solo e a medição do pH da solução aplicando um método eletrométrico.

O pH num estudo como este é um parâmetro muito importante, visto ser a acidez dos solos uma das propriedades que se pode alterar graças à colocação de cinzas de biomassa no solo. As quantidades em cálcio e magnésio influenciam o pH do solo, sem adição de cálcio os solos acidificam, diminuindo a assimilação de nutrientes pelas plantas, podendo levar à toxicidade [24]. A percentagem de Ca encontrada na cinza sob forma de CaO (cal viva) origina CaCO₃ na presença de CO₂ [26]. Na presença de água, o óxido de cálcio forma hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), que é cal extinta [26]. Na presença de hidróxido de cálcio o pH do solo torna-se mais básico, tendo um efeito neutralizante no solo.

2.7.3 Fósforo

Uma das boas características, da cinza de biomassa, já identificadas por estudos neste sentido, é a quantidade de elementos nutrientes valiosos como o fósforo. As cinzas são usadas para recuperar os nutrientes que vêm do solo e se mantêm nas cinzas[13]. No caso do fósforo, o preço deste tem aumentado imenso e a solução das cinzas é muito bem-vinda para este efeito [13], a cinza torna-se então uma boa forma de fertilizar os solos. O mineral apatite é uma das principais matérias-primas para a fabricação de fertilizantes, a descoberta de métodos sustentáveis para reciclar o fósforo torna-se ainda mais importante quando se sabe que este recurso se tem tornado escasso [13]. O fósforo é um nutriente essencial ao solo e não é

renovável, não sendo possível a sua substituição, torna-se essencial determinar formas de o reciclar [13].

Para a medição deste parâmetro utilizou-se o método Mehlich III para a extração do fósforo disponível das amostras de solo, seguindo a análise do fósforo solúvel pelo método do ácido ascórbico (Anexo C). O método de extração de Mehlich III tem sido o método mais utilizado nos últimos anos, por ser um método de extração eficiente [26]. O método de Mehlich III revelou-se eficiente e fácil de realizar.

2.7.4 Precipitação e temperatura ambiente na área de estudo

A precipitação pode proporcionar alterações significativas nos parâmetros medidos nesta dissertação, por arrastar as cinzas em caso de chuvas fortes (Figura 7). Contudo a água que percola o solo, em resultado da chuva, tem um papel importante na mobilização dos constituintes da cinza aplicada que ao entrarem no solo alteram a atividade dos microrganismos envolvidos na reciclagem de nutrientes [27]. Costa [27] indica que a humidade excessiva, reduzindo o arejamento, reduz a atividade microbiana.

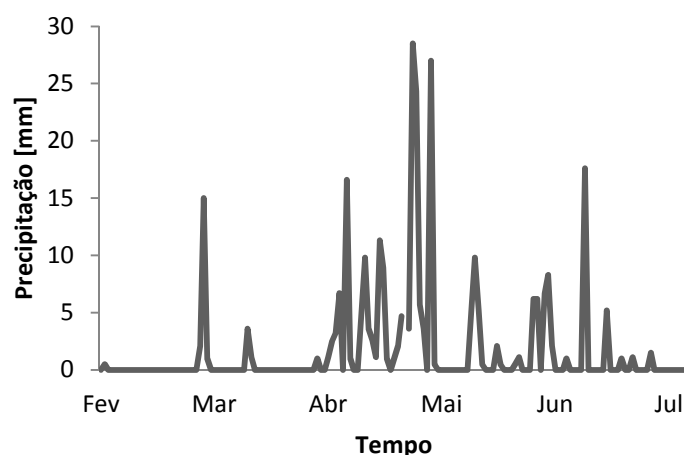


Figura 7: Dados da precipitação de uma miniestação hidrográfica perto do local de amostragem.

A humidade das amostras utilizadas para a realização do estudo no campo, é um dado que pode ajudar a entender alterações nos parâmetros medidos e autentica os dados da precipitação. Para a realização dos ensaios de voláteis, CQO e fósforo foi necessário secar as amostras de solo (base seca - bs), A partir desse processo pode tirar-se a informação sobre a humidade das amostras. As amostras não foram secas ao ar, mas sim diretamente na estufa a 105°C até ficarem totalmente secas. Para esse processo a amostra é colocada 24 horas numa estufa (inicialmente), depois mais 12 horas. Se a massa estiver igual, não se coloca mais tempo, e é sinal que a amostra está completamente seca, caso contrário coloca-se mais 1h, isto até darem duas massas iguais, antes e depois da secagem.

A massa de amostra utilizada para este processo foi de 30 gramas em caixa de Petri. A humidade perdida na secagem a 105°C na estufa é estabelecida como a razão entre a massa de água perdida do solo e a massa de amostra antes de ser introduzida

na estufa (Eq.4; foi realizado através de um método descrito pela ISO 11465:1993 - Soil quality - Determination of dry matter and water content on a mass basis - Gravimetric method).

$$H_T = \left(\frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \right) * 100 \text{ (Eq.4)}$$

H_T - Humidade total

m_1 - Massa da caixa de Petri [g]

m_2 - Massa da amostra antes da estufa [g btq]

m_3 - Massa da amostra após a estufa [g bs]

A partir da Tabela 5 observam-se às humidades totais médias das amostras de campo.

Tabela 5: Dados da humidade média das amostras de campo.

Amostra	1	2	3	4
H_T média (%)	22,68	22, 24	27,62	12,62

Como a precipitação, a temperatura (Figura 8) tem também muita importância para a atividade dos parâmetros biológicos medidos. Os microrganismos têm temperaturas que otimizam a sua atividade, logo é de todo importante saber qual a evolução da temperatura ao longo do trabalho. Costa [27] refere que a decomposição da M.O. é tanto mais baixa quanto mais baixa é a temperatura, entre 5°C e 30°C, devido a atividade dos microrganismos.

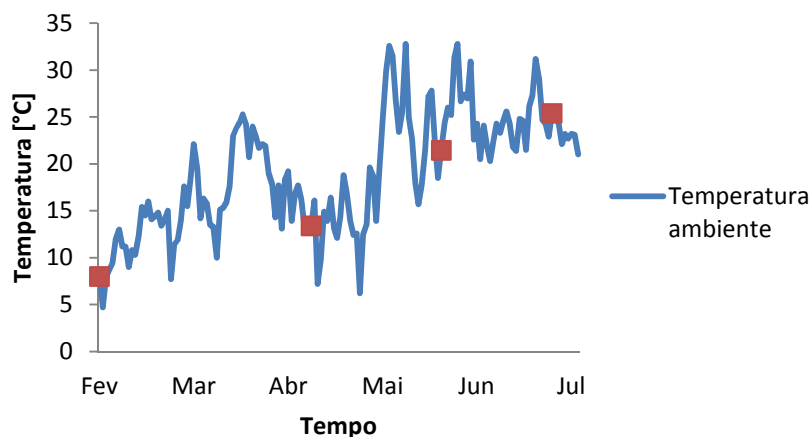


Figura 8: Dados da temperatura média de um miniestação meteorológica perto do local de amostragem.

2.8 Parâmetros biológicos

Para o estudo do efeito da cinza de biomassa na fertilidade de um solo florestal foram escolhidos alguns parâmetros diretamente ligados a fertilidade. A parcela A sem cinza e a parcela B com cinza, são essenciais para efetuar comparações.

Para este trabalho foram escolhidos dois parâmetros biológicos, o número de bactérias e fungos. Os microrganismos do solo são componentes essenciais na manutenção do equilíbrio físico-químico e biológico do mesmo e exercem importantes funções que incluem a degradação de resíduos de plantas e animais e a liberação de nutrientes na cadeia alimentar [25, 27]. Os microrganismos presentes no solo dependem de alguns fatores ambientais, como a temperatura, o pH, a quantidade e tipo de nutrientes disponíveis e a humidade do solo, daí a importância de ter esta informação disponível [25, 27]. A microbiologia do solo é uma das componentes mais importantes no que diz respeito à qualidade do mesmo [28]. Desempenham um papel importante na fertilidade e produção primária através da decomposição da M.O. e nos ciclos de nutrientes [28]. Foram escolhidos estes dois parâmetros biológicos (microrganismos) por serem uns dos mais abundantes no solo, serem fáceis de identificar e estarem ligados diretamente à fertilidade do solo.

2.8.1 Bactérias

As bactérias representam a maior percentagem da população microbiana do solo, em todos os sentidos. As bactérias são mais representativas em número e diversidade. A contagem de bactérias no solo é uma tarefa complicada porque estas têm uma grande variedade nos tipos de nutrição, logo no cultivo não crescem todas elas, havendo de certeza ainda algumas por identificar [25].

O método escolhido é um dos mais utilizados a nível de pesquisa e trabalho universitários, este consiste resumidamente em colocar o solo num meio de extração (soro fisiológico), colocando de seguida num meio de crescimento próprio para bactérias [25]. Quando realizadas as técnicas de crescimento das culturas, somente parte da população microbiana será capaz de crescer no meio escolhido, Pelczar [25] indica que mesmo se forem utilizados meios de cultura diferentes é sempre muito difícil estimar a população microbiana total. Este problema deve-se às necessidades dos tipos de microrganismos, uns não podem entrar em contacto com o ar atmosférico, devido às diferentes temperaturas de crescimento, uns necessitam de luz, devido ao tempo de crescimento, etc...[25]. Para as bactérias foi escolhido o meio PCA (Plate Count Agar). Foi a partir do método descrito em I (Método da determinação da atividade bacteriana) que foram realizados os ensaios bacteriológicos.

I. Método da determinação da atividade bacteriana

Método de sementeira por incorporação

- **Material e reagentes:**

Tabela 6: Material e reagentes utilizadas na determinação da atividade bacteriana

Material	Reagentes
Balança	Soro fisiológico (NaCl a 0,9%)
Espátulas	Meio de crescimento para bactérias (PCA)
Recipientes de vidro com rolha	
Placas de Petri	
Pipetas e pontas estéreis	
Falcons	
Provetas (50 mL e 10 mL)	

- **Preparação de soluções (utilizar Tabela 6):**

1. Soro fisiológico. NaCl a 0,9%. Esterilizar.
2. Meio de crescimento (PCA) misturar com soro fisiológico (1L aproximadamente para 90 placas). Esterilizar.
3. Colocar 0,5 g de solo e perfazer 50 mL (falcons estéreis) com soro fisiológico (diluição para 10^{-2}).
4. Realizar diluição até 10^{-3} e 10^{-4} . Colocar 1mL da diluição anterior num falcon de com 9 mL de soro fisiológico e assim sucessivamente.

- **Procedimento:**

1. Em ambiente estéril colocar 0,5 mL de amostra nas placas de Petri;
2. Colocar meio de cultura nas placas (deixar arrefecer meio);
3. Colocar numa estufa à temperatura de 28 °C;
4. Contar colónias passado 72 horas.

- **Armazenamento de Amostras:**

Manter amostras a 4°C em falcons.

2.8.2 Fungos

Os fungos são abundantes no solo, havendo milhões de diferentes espécies. Estes microrganismos estão presentes em maior percentagem na superfície do solo,

porque a maioria necessitam de oxigênio [25]. Apesar de estar presente em menor número no solo do que as bactérias, a massa total de fungos é superior à das bactérias [27]. Na sua maioria são decompositores de lenhina, alguns vivem em simbiose com as raízes de plantas superiores e são na sua maioria benéficas, mas podem não sê-lo [27]. O pH é uma condição, para além de outras, que afeta as populações deste microrganismo. Apesar de afetados estes não são tão exigentes como as bactérias neste aspeto (Tabela 7) [25]. Para os fungos foi escolhido o meio de crescimento CRBA (chloramphenicol rose bengal agar). Foi a partir do método descrito em II (Método de determinação da atividade fúngica) que foram realizados os ensaios fúngicos.

Tabela 7: Variação das populações de bactérias e fungos consoante o pH do solo [25].

pH do solo	Bactérias (milhões/g)	Fungos (milhares/g)
7,5	95	180
7.2	58	190
6,9	57	235
4,7	41	966
3,7	3	280
3,4	1	200

Como é visível na Tabela 7 o pH afeta mais as bactérias do que o fungos. Os fungos apesar de não perderem tanta população com a acidez do solo, têm um pH ótimo. Os fungos têm o pH de 4,7 como ótimo, verificando-se diminuições na população tanto nas descidas como subidas de pH.

II. Método da determinação da atividade fúngica.

Método de sementeira por incorporação.

Tabela 8: Material e reagentes utilizados para análise fúngica

Material	Reagentes
Balança	Soro fisiológico (NaCl a 0,9%)
Espátulas	Meio de crescimento para fungos (CRBA)
Recipientes de vidro com rolha	
Placas de Petri	
Pipetas e pontas estéreis	
Falcons	
Provetas (50 mL e 10 mL)	

- **Preparação de soluções (utilizar Tabela 8):**

1. Soro fisiológico. NaCl a 0,9%. Esterilizar.

2. Meio de crescimento (CRBA) misturar com soro fisiológico (1L aproximadamente para 90 placas). Esterilizar.
3. Colocar 0,5 g de solo em falcon estéril e perfazer com 50 mL de soro fisiológico (diluição para 10^{-2}).
4. Realizar diluição até 10^{-3} . Colocar 1mL da diluição anterior num falcon com 9 mL de soro fisiológico.

- **Procedimento:**

1. Em ambiente estéril colocar 0,5 mL de amostra nas placas de Petri;
2. Colocar meio de cultura nas placas (deixar arrefecer meio);
3. Colocar numa estufa à temperatura de 28 °C;
4. Contar colónias passado 7 dias.

- **Armazenamento de Amostras:**

Manter amostras a 4°C em falcons.

2.9 Parâmetros bioquímicos

Para a realização do trabalho foram escolhidos quatro parâmetros bioquímicos sendo estas enzimas do solo (fosfatase ácida e alcalina, catalase e HFDA).

As enzimas do solo têm duas funções muito importantes, no que respeita a fertilidade do solo. São estas, a decomposição da matéria orgânica (M.O.) e o apoio no ciclo dos nutrientes [29, 30]. Vários autores apontam as enzimas como ótimos indicadores para estudar o impacto, a nível microbiológico, de solos poluídos ou tratados [31]. Os critérios para escolher as enzimas foram a sua importância no ciclo de nutrientes, a sua relação direta com a fertilidade do solo e com a M.O., a sensibilidade a alterações (neste caso à colocação da cinza de biomassa), a rapidez e facilidade de análise [29, 32]. Como possível efeito negativo à colocação de cinzas de biomassa, é importante realçar que a atividade enzimática pode ser inibida por metais pesados que desnaturam a proteína e interagem com os grupos aditivos da enzima [33]. As cinzas de biomassa têm na sua constituição pequenas percentagens de metais pesados (ppm – parte por milhão) que podem prejudicar a atividade enzimática (ver Tabela 3).

2.9.1 Fosfatase ácida e alcalina

A fosfatase é um grupo de enzimas com funções catalisadoras na hidrólise do fosfato [34] estando ligadas ao ciclo do fosfato. Estas libertam fosfato inorgânico que é muito importante para as plantas e microrganismos [35], mineralizam o fósforo orgânico. Esta enzima necessita de pH otimizado de 6,5 ou 11, dependendo se é ácida ou alcalina, para realizar a atividade ou função catalisadora [36].

A fosfatase ácida é responsável pela mineralização do fosfato orgânico em solos ácidos. Alguns autores mostram que nos solos deficientes em fósforo esta enzima está mais ativa a fim de contrariar a falta deste elemento [37, 38].

O método utilizado na análise da fosfatase foi descrito por Eivazi e Tabatabai [34], com umas pequenas alterações (III).

III. Método da determinação da fosfatase ácida e alcalina

Tabela 9: Material e reagentes utilizados para analisar a fosfatase

Material	Reagentes
Balança	Ácido cítrico
Espátulas	KH_2PO_4
Recipientes de vidro com rolha	Tetraborato de sódio. $10\text{H}_2\text{O}$
Pipetas e pontas	Tris
Falcons	KCl
Provetas (50 mL e 10 mL)	<i>p</i> -nitrofenil fosfato disódico
Centrifuga	CaCl_2
Estufa com agitação	NaOH
Espectrofotómetro	<i>p</i> -nitrofenol
	Água destilada

- **Preparação de soluções (utilizar Tabela 9):**

1. Tampão universal

Diluir 9,604 g de ácido cítrico, 6,78 g de KH_2PO_4 , 19,07 g de tetraborato de sódio. $10\text{H}_2\text{O}$, 6,054 g de Tris, 3,73 g de KCl, em 500 mL de água destilada, sendo o pH 6,5 ou pH 11 consoante a determinação de fosfatase ácida ou alcalina, respetivamente.

2. *p*-nitrofenil fosfato disódico.

Diluir 0,2 g *p*-nitrofenil fosfato disódico em 100 mL (Stock 20 mg/mL). Diluir 100 vezes para 200 µg/mL em água destilada.

3. CaCl_2 (0,5 M)

Diluir 2,94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 40 mL de água destilada.

4. NaOH (0,5 M)

Diluir 0,8 g de NaOH em 40 mL de água destilada.

5. Padrões de *p*-nitrofenol.

Escala de padrões constituídos por tampão universal e 1 mL de *p*-nitrofenol. (3 réplicas): 2, 4, 8, 16, 32, 64 µg/mL.

- **Procedimento:**

1. Pesar 0,5 g de solo fresco;
2. Adicionar 2 mL tampão universal;
3. Adicionar 1 mL de *p*-nitrofenil fosfato disódico;
4. Centrifugar amostras durante 10 min a 10000 g a temperatura ambiente;
5. Diluir 0,1 mL (alcalina) e 0,5 mL (ácida) de amostra com 1,5 mL de tampão universal;
6. Medir absorvância (420 nm);
7. Incubar amostras durante 60 minutos à temperatura de 37 °C em estufa com agitação;
8. Medir absorvância (420 nm).

- **Armazenamento de Amostras:**

Manter amostras a 4°C em falcons.

2.9.2 Catalase

A catalase é uma enzima intracelular, encontrada na maioria das bactérias aeróbias [32, 36]. A atividade da catalase nos solos é considerada um indicador da atividade microbiana aeróbia e tem sido relacionado tanto com o número de microrganismos aeróbios como com a fertilidade do solo [32, 36]. Nos animais e vegetais, acredita-se que a função delas é proteger os tecidos contra os efeitos tóxicos da água oxigenada. Os metabolismos aeróbios produzem um produto tóxico, um tipo de oxigênio reativo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a catalase tem como função a remoção deste [32].

Esta enzima catalisa a conversão de duas moléculas de H_2O_2 reduzindo em oxigênio molecular e água. A catalase também evidencia atividade de peroxidação, onde álcoois de baixo peso molecular podem servir como dadores de elétrons, produzindo água e formaldeído de baixo peso molecular, que oxida o Purpald [36].

A enzima reage com o metanol na presença de uma concentração otimizada de H_2O_2 [32, 36]. O formaldeído produzido é medido com espectrofotometria e padrões de Purpald. O Purpald (incolor na base), quando é oxidado, torna-se púrpura sendo assim possível medir a atividade enzimática da catalase [32, 36]. Segundo Belyaeva et al.[39], o Pb, Zn e Cu influenciam negativamente a enzima, isto é, reduzem a atividade desta [40, 41]. O método utilizado está descrito abaixo em IV (método da determinação da catalase).

O método utilizado para a determinação da catalase foi descrito por Johansson e Borg [42].

IV. Método da determinação da catalase

Tabela 10: Material e reagentes utilizados na análise da catalase

Material	Reagentes
Balança	K ₂ HPO ₄
Espátulas	KH ₂ PO ₄
Recipientes de vidro com rolha	EDTA-Na ₂
Microtubos	HCl e NaOH
Pipetas e pontas	Formaldeído
Falcons	KOH
Estufa com agitação	H ₂ O ₂ (30%)
Espectrofotômetro	Purpald
	HCl
	Metanol

- **Preparação de soluções (utilizar Tabela 10):**

1. K₂HPO₄ (1 M)

Dissolver 2,283 g de K₂HPO₄ em H₂O para um volume de 10 mL.

2. KH₂PO₄ (1 M)

Dissolver 1,3612 g de KH₂PO₄ em H₂O para um volume de 10 mL.

3. EDTA (100 mM)

Dissolver 0,3772 g de EDTA-Na₂ em H₂O para um volume de 10 mL.

4. Tampão de Reação: 50mM Fosfato de Potássio (pH 7.0)

Juntar 9,23 mL de K₂HPO₄ (1 M), 5.78 mL de KH₂PO₄ (1 M), perfazer com água destilada até aproximadamente 300 mL.

Acertar pH com ácido ou base (HCl ou NaOH).

5. Tampão de diluição: Fosfato de potássio (50 mM e pH 7,5)

Adicionar 1 mL de EDTA (100 mM) num balão volumétrico e perfazer 100 mL com tampão de reação.

6. Formaldeído (4,25 M)

Diluir 0,345 mL de formaldeído (37%) em 0,655 mL de tampão de diluição.

7. Formaldeído (4,25 mM)

Pipetar 50 µL de Formaldeído 4,25 M em 49,95 mL tampão de diluição.

8. KOH (10 M)

Dissolver 5,611 g de KOH em H₂O para um volume de 10 mL.

9. H₂O₂ (35,28 mM) (duração de vida - 2 h)

Diluir 40 µL de H₂O₂ (30%) em 9,96 mL de H₂O.

10. Purpald (34,2 mM)

Dissolver 0,05 g de Purpald em HCl 0,5M e perfazer o volume de 10 mL.

11. HCl 0,5M

Dissolver 3,2 mL de HCl (37%) em H₂O até prefazer 100 mL.

12. KOH 0,5 M

Dissolver 1,403 g de KOH em H₂O para um volume de 50 mL.

13. Periodato de Potássio (65,2 mM)

Dissolver 0,7498 g de periodato de potássio em KOH (0,5 M) para um volume de 50 mL.

14. Metanol

Retirar diretamente do frasco.

15. Padrões (Tabela 11)

Tabela 11: Elaboração dos padrões de Formadeído para a catalase.

Padrão	Tampão reação (µL)	Formaldeído 4,25 mM (µL)
0	1000	0
150	965	35
300	930	70
600	860	140
900	790	210
1200	715	285

• **Procedimento:**

1. Diluir 0,5 g de amostra em 2 mL de tampão de reação;
2. Centrifugar durante 10 minutos à temperatura de 4 °C (10000 g) e recolher o sobrenadante em microtubos de 1,5 mL;
3. Em cuvetes, adicionar 250 µL de tampão de reação, 75 µL de metanol e 50 µL de padrão/amostra;
4. Iniciar a reação adicionando, a cada cuvete, 50 µL H₂O₂ (35,28 mM) o mais rapidamente possível;

5. Incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente num agitador;
6. Para terminar a reação adicionar, a cada cuvete, 75 μL de KOH (10 M) e 75 μL de Purpald
7. Incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente com agitação;
8. Adicionar 25 μL de periodato de potássio a cada cuvete;
9. Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente com agitação;
10. Ler a absorvância a 540 nm das amostras e padrões (Tabela 11).

- **Armazenamento de Amostras:**

Manter amostras a 4°C em falcons.

2.9.3 HFDA

A HFDA é utilizada para determinar a atividade microbiana geral e como indicador de qualidade do solo [43]. O FDA é hidrolisado por algumas enzimas (proteases, lipases, esterases) como pode observar-se na Figura 9 [43]. Quando na presença de certas enzimas o FDA hidrolisa formando fluoresceína. Para medir essa hidrólise utilizam-se padrões de fluoresceína e assim se obtém informação sobre a quantidade de enzimas ativas [44].

Para esta dissertação a HFDA, é um bioindicador que revela alta importância visto ser considerado muito valioso em casos de solos submetidos a reflorestação ou monitoração ambiental [44].

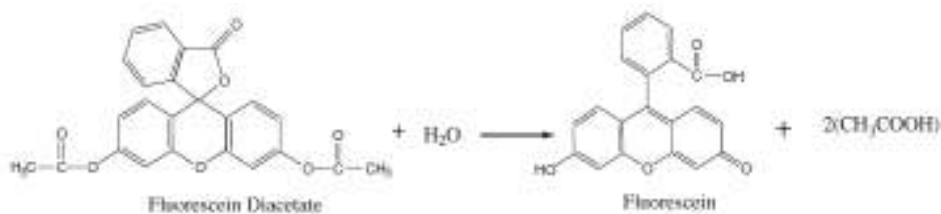


Figura 9: Hidrólise do FDA [43].

O método utilizado para a determinação da HFDA foi descrito por Adam e Duncan [44].

V. Método da Hidrólise do Diacetato de fluoresceína (HFDA)

Tabela 12: Material e reagentes para a elaboração do protocolo do HFDA.

Material	Reagentes
Balança	Fosfato monossódico
Espátulas	Fosfato disódico
Recipientes de vidro com rolha	Diacetato de fluoresceína
Microtubos	Fluoresceína
Pipetas e pontas	Acetona
Falcons	Álcool
Agitador	Água destilada
Centrífuga	
Espectrofotômetro	

- **Preparação de soluções (utilizar Tabela 12):**

1. Tampão fosfato de sódio (pH 7,6);

Solução A: Dissolver 7,2 g de NaH_2PO_4 num litro de água destilada (0,06 M).

Solução B: Dissolver 8,52 g de Na_2HPO_4 num litro de água destilada (0,06 M).

2. Diacetato de fluoresceína (4,8 mM);

Dissolver 19,98mg de diacetato de fluoresceína em 10 mL de acetona.

3. Acetona;

Retirar diretamente do frasco.

4. Álcool;

Retirar diretamente do frasco.

5. Realizar solução com a concentração máxima e de seguida fazer 3 réplicas da escala de padrões de fluoresceína (0, 40, 80, 160, 320, 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sendo o branco, 50 μL de álcool). Procedimento igual às amostras a partir do ponto 5.

- **Procedimento:**

1. Pesar 0,5 g de solo fresco;
2. Adicionar 5 mL de 60mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,6);
3. Homogeneizar durante 10 min num agitador (condições de agitação - 150 rpm);
4. Adicionar 50 μL de diacetato de fluoresceína;
5. Incubar amostras 40 min à temperatura de 25 °C. (condições de agitação - 150 rpm);
6. Retirar 750 μL para um microtubo de 2 mL;

7. Adicionar 750 μL de acetona e centrifugar amostras durante 10 minutos a temperatura ambiente (condições de centrifugação - 8000 g);
8. As quantidades de FDA são determinadas através da leitura da absorvância (490 nm).

- **Armazenamento de Amostras:**

Manter amostras a 4°C em falcons.

2.10 Metodologia da análise de dados

Para analisar a exatidão dos dados utilizou-se um programa de análise de significância de resultados. As diferenças significativas dos resultados obtidos são determinadas com o programa PERMANOVA através da análise de variância. O programa realiza comparações entre amostras, dando a informação se as diferenças entre os resultados obtidos são ou não significativas. Foram realizadas comparações entre todas as amostras independentemente de serem sem ou com cinza (Amostra X Amostra; Anexo E), e ainda comparações consoante o tempo e condição de amostragem (Tempo X Condição; Anexo D), comparando apenas as amostras de tempo e condição diferentes (condição = ter ou não ter cinza). De seguida são dados alguns exemplos e legendas da metodologia utilizada (Tabela 13 e Tabela 14).

Tabela 13: Legenda da análise de significância com o programa PERMANOVA.

	Diferença dos valores obtidos	Legenda
$P > 0,05$	Não significativo	+
$P < 0,05$	Significativo	*
$P < 0,01$	Muito significativo	**

Exemplo 1:

A diferença entre as análises da primeira amostra (dia 0), em relação ao parâmetro bactérias, só podem ter diferenças significativas devido a heterogeneidade do solo, visto estas amostras serem efetuadas antes da colocação da cinza.

Ba - 1 sc Vs 1 cc -> +

Resultado indica que o solo tem uma diferença não significativa na diferença de quantidades de bactérias por grama de solo.

Tabela 14: Exemplos da metodologia de análise de dados.

Ba - 1 sc Vs 2 sc -> **	Ca - 1.1 sc VS 4.1 sc -> *	Fu - 1 sc Vs 2 cc -> **
Fac - 1.1 sc Vs 2.3 cc -> *	Fu - 1sc Vs 2 cc -> +	FDA - 5 sc Vs 5 cc -> +

3. Resultados e discussão

Como foi evidenciado no capítulo anterior os ensaios de laboratório foram realizados com o solo proveniente do mesmo local dos ensaios de campo: Também foi realizada aplicação de cinza, no entanto a quantidade das cinzas colocadas foi diferente. No que corresponde aos resultados obtidos em laboratório, estes irão ser analisados em 3 subcapítulos separados: caracterização físico-química dos solos, avaliação de fertilidade dos solos em ensaios com amostras de laboratório e de campo.

3.1 Caracterização físico-química do solo

3.1.1 Amostras de laboratório

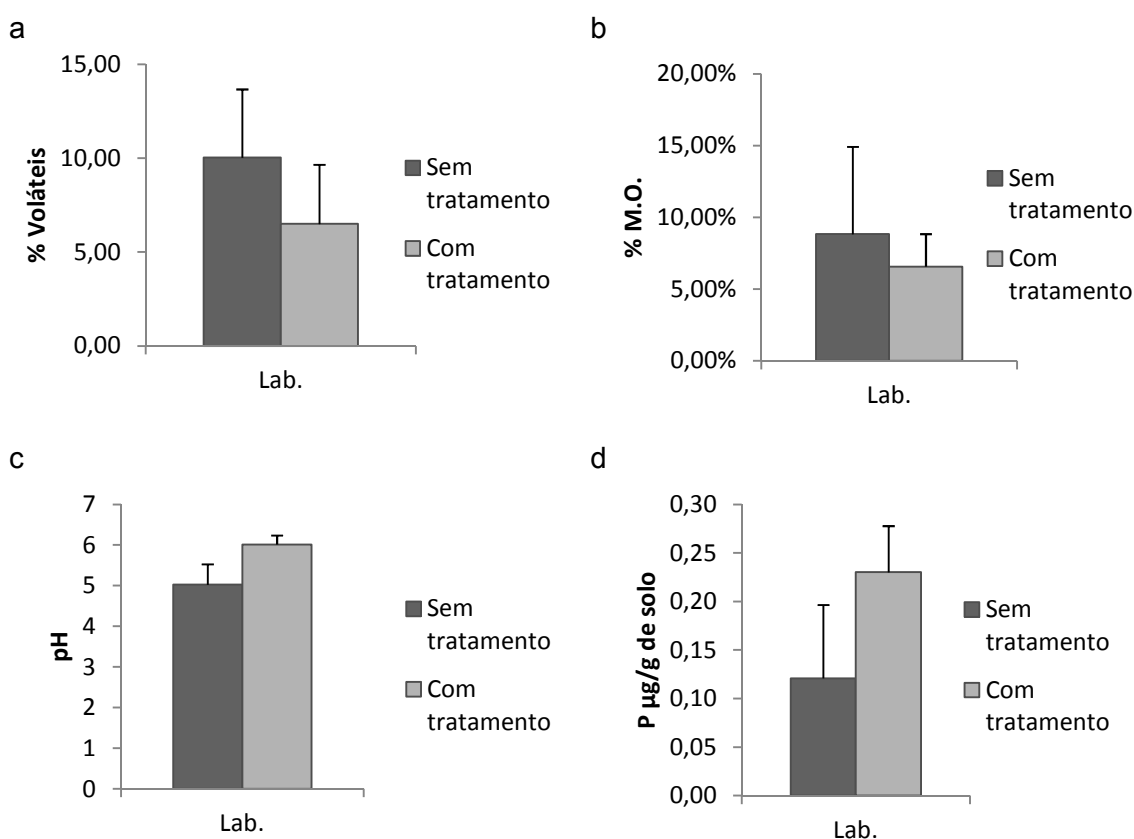


Figura 10: a. Percentagem de voláteis nas amostras de laboratório; b. Matéria Orgânica (M.O.); c. pH (Fonte: Joana Pires); d. Fósforo, sem e com tratamento (aplicação de cinza de biomassa).

Os solos amostrados para este trabalho de investigação têm valores muito altos de M.O. quando comparados com o normal amostrado nesta zona de Portugal, não havendo explicação para tal. O pH é bastante ácido, varia dos 4 aos 5. Em solos habitualmente ácidos a percentagem de matéria orgânica estima-se por volta dos 3,4% na camada superior (0-30 cm) [45].

Pela análise dos resultados obtidos no ensaio relativo aos voláteis nas amostras de laboratório (Figura 10a), visualiza-se que há uma percentagem 3,5 % inferior nas amostras com cinza em comparação com as amostras não tratadas.

Tal como nos voláteis, a % de M.O. (Figura 10b) diminui quando recebe tratamento. Este resultado quando analisado pelo PERMANOVA resulta em diferenças não significativas (Anexo D Tabela 8; Anexo E Tabela 8).

Os valores das percentagens de voláteis calculados, correspondem a uma estimativa para a percentagem de M.O. e foram aproximadamente iguais aos calculados pelo método do CQO (M.O.) da Figura 10b. O resultado desta análise pode evidenciar a heterogeneidade do solo no que respeita a este parâmetro, isto é, o solo já dele tem valores muito díspares no que diz respeito à percentagem de matéria orgânica.

A Figura 10c evidencia o efeito da aplicação da cinza no pH do solo observa-se que as amostras que receberam tratamento têm um pH mais elevado. Apesar de estatisticamente não significativas as diferenças, observa-se uma alteração neste parâmetro de 1 valor, tornando o solo menos ácido. A acidez é um facto importante na fertilidade do solo, visto que condiciona a disponibilidade de nutrientes, influencia o crescimento da microbiota, bem como dos poluentes. O pH do solo não tratado (cerca de 5) limita o crescimento de certas bactérias bem como de algumas plantas. Na Figura 10d pode observar-se um aumento de aproximadamente 0,6 µg de fósforo por g de solo.

Os resultados evidenciam que a aplicação de cinza de biomassa tem pouca influência nestes parâmetros, excetuando no pH onde é identificada uma alteração significativa, o que é apoiado nos resultados da bibliografia que indicam que a cinza de biomassa torna os solos menos ácidos ou tende a não os deixar acidificar [12].

3.1.2 Amostras de campo

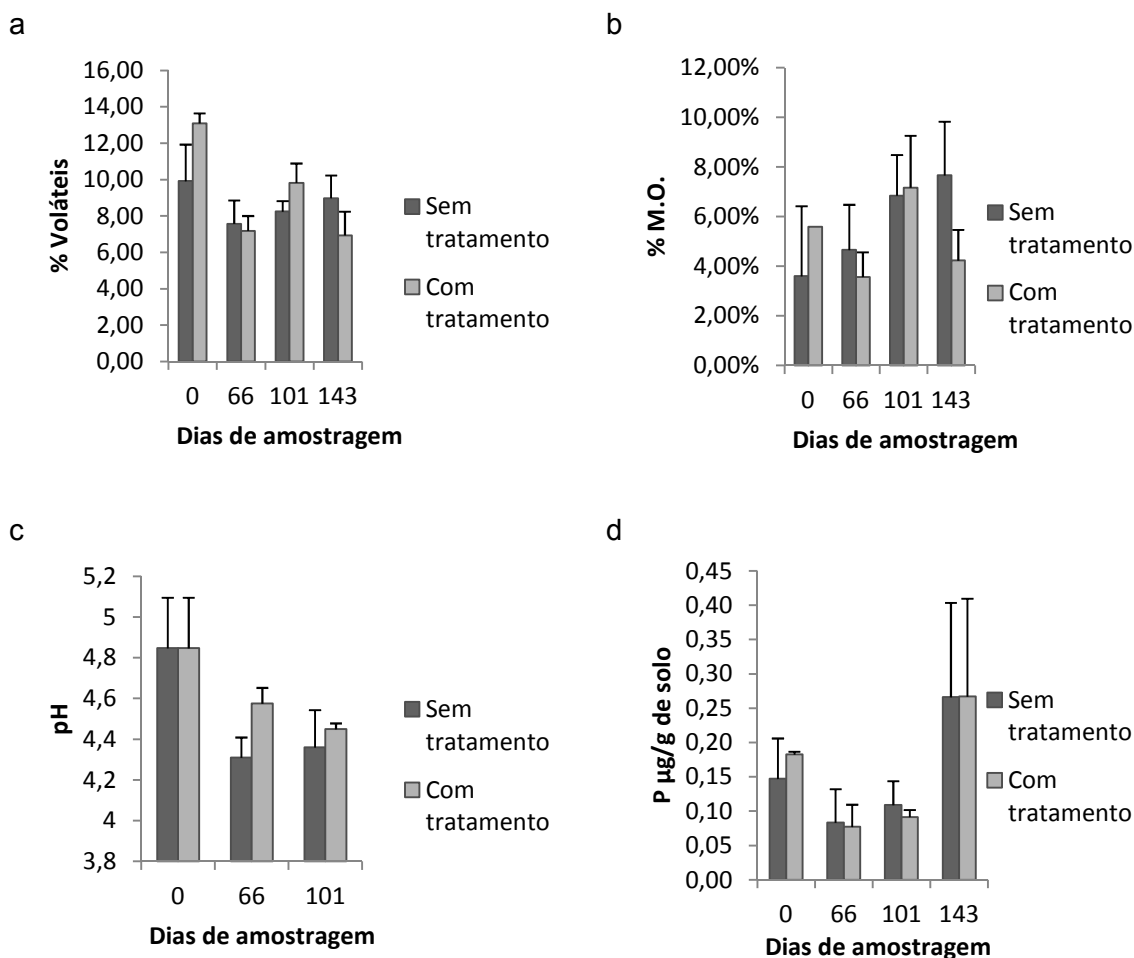


Figura 11: a. Percentagem de voláteis nas amostras de campo; b. Matéria orgânica (M.O.); c. pH (Fonte: Joana Pires); d. Fósforo, com e sem tratamento (aplicação de cinza de biomassa).

Nas amostras de campo (Figura 11) verificam-se diferentes percentagens de voláteis visto que no dia 0 a cinza ainda não tinha sido colocada e há diferenças de aproximadamente 3% entre os 2 locais. Assim pelas diferenças observadas entre a parcela A e B, após 66, 101, 143 dias de tratamento, verifica-se que não há grande influência da cinza de biomassa neste parâmetro do solo

A análise estatística dos resultados, mostra que as diferenças observadas na Figura 11b não são significativas, o que mostra que a cinza não tem influência direta na percentagem de M.O. ($P > 0,05$, Anexo D Tabela 8; Anexo E Tabela 8).

Na Figura 11c verifica-se a descida do valor de pH das amostras do dia 0, para as restantes, no entanto as amostras que receberam tratamento têm pH ligeiramente mais elevado.

Na Figura 11d há um aumento de significativo do fósforo de fevereiro (dia 0) para julho (dia de amostragem 143). É observável que apesar de haver diferenças nas amostras ao longo do tempo, as diferenças não são importantes quando se comparam

as amostras de parcelas diferentes do mesmo dia de amostragem. Estes resultados indicam que a concentração de fósforo no solo não é influenciada pela presença de cinza de biomassa neste caso, devido há pouca quantidade colocada.

Deste modo os 4 parâmetros analisados em amostras de campo evidenciam que a aplicação da cinza teve pouca (pH) ou nenhuma (% voláteis, % M.O., e fósforo) influência nos parâmetros físico-químicos do solo.

3.2 Avaliação da fertilidade do solo em amostras de laboratório

Neste subcapítulo são apresentados os resultados biológicos e bioquímicos dos ensaios das amostras de laboratório. A apresentação dos resultados é seguida da análise e consequente discussão com base nos conhecimentos teóricos da revisão realizada.

3.2.1 Parâmetros biológicos

3.2.1.1 Bactérias

Os resultados obtidos estão expressos na Figura 12. É claramente identificado um aumento do número de bactérias nas amostras que receberam tratamento, em relação à parcela não tratada. A comparação entre amostras evidencia um aumento significativo (maior 2x) do número de bactérias presentes no solo (Anexo D Tabela 1; Anexo E Tabela 1).

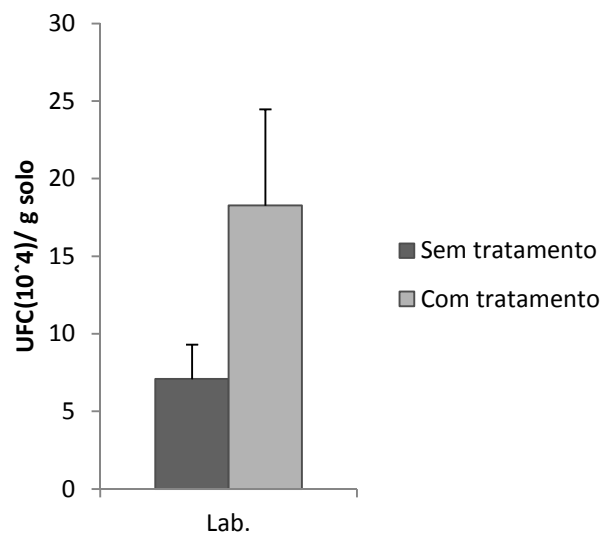


Figura 12: Ensaio de laboratório referente ao número de bactérias (unidades formadoras de colônias por grama de solo), com e sem aplicação de cinza de biomassa.

3.2.1.2 Fungos

Pela Figura 13 observa-se uma diminuição do número de fungos no solo que foi tratado com cinza, embora esta diferença não seja significativa ($P > 0,05$; Anexo D Tabela 2; Anexo E Tabela 2).

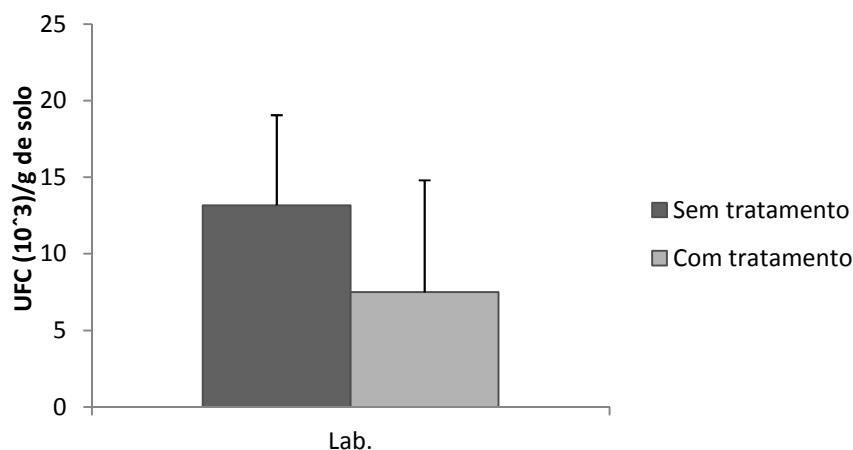


Figura 13: Ensaio de laboratório referente ao número de fungos (unidades formadoras de colônias por grama de solo), com e sem colocação de cinza de biomassa.

3.2.1.3 Discussão dos parâmetros biológicos

Como já referido a cinza é constituída por variados nutrientes (Tabela 3) que são importantes para o desenvolvimento dos microrganismos do solo [46].

Os resultados obtidos indicam que a cinza de biomassa provoca alterações nos parâmetros biológicos. O número de bactérias é afetado por valores de pH muito ácidos, disponibilidade de nutrientes e variações de temperatura e humidade. O resultado indica um aumento da atividade bacteriana, nas amostras que foram tratadas com cinza, este resultado poderá ser relacionado com a subida do pH ou com a adição de nutrientes inorgânicos provenientes das cinzas. A colocação de cinzas estimula o crescimento de bactérias em consequência da subida de pH ou da maior disponibilidade de nutrientes. Na Tabela 7 é possível observar que as bactérias reagem positivamente a subida do pH. O ensaio de laboratório foi realizado a temperatura constante ($\pm 14^{\circ}\text{C}$) e a "pluviosidade", simulada pela adição de água, foi também constante e igual para todas as amostras com cinza ou sem cinza. O aumento de atividade bacteriana no solo acarreta um aumento de fertilidade do solo, uma vez que aumenta a mineralização de compostos orgânicos, disponibilizados para o crescimento das plantas [27].

No que diz respeito à atividade fúngica, a aplicação de cinzas de biomassa e o consequente aumento do pH (padrão) implicaram a diminuição desta atividade. Os resultados obtidos serão influenciados pela subida de pH observada. Os fungos têm um pH ótimo por volta dos 4,7 [25], ou seja o máximo do pH do solo sem tratamento observado. Com a subida do pH para 6, a atividade fúngica diminui. Os fungos conseguem decompor muitos materiais que a maioria dos organismos não consegue

usar como fonte de energia, como a celulose, no entanto muitas espécies são fito patogénicas e a aplicação de cinzas, ao diminuir o seu crescimento, tem uma ação fito sanitária. No entanto as micorrizas podem ser benéficas ao crescimento da flora [27].

Deste modo a aplicação de cinzas revela-se benéfica, uma vez a que atividade bacteriana do solo, aumenta os nutrientes disponíveis e diminui a atividade de fungos no solo, podendo ser um modo de controlar a ataque de fungos patogénicos para as plantas.

3.2.2 Parâmetros bioquímicos

3.2.2.1 Fosfatase ácida e alcalina

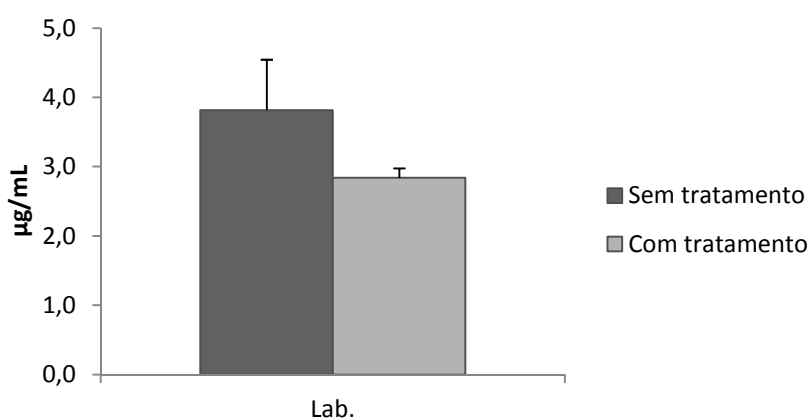


Figura 14: Resultados das amostras de laboratório no ensaio da fosfatase ácida com e sem adição de cinza de biomassa.

Como é verificado na Figura 14 a atividade da fosfatase ácida é significativamente menor ($P < 0,01$) na amostra onde foi colocada cinza de biomassa (Anexo D Tabela 3; Anexo E Tabela 3).

Os valores da fosfatase alcalina são contrários aos da fosfatase ácida (Figura 14). A fosfatase alcalina aumenta nas amostras com cinza de biomassa. De facto o pH ótimo de atividade da fosfatase alcalina é 10 enquanto o da fosfatase ácida está entre de 4 e 6 pelo que o tratamento alterando o pH do solo, irá interferir com a atividade das fosfatases presentes no solo.

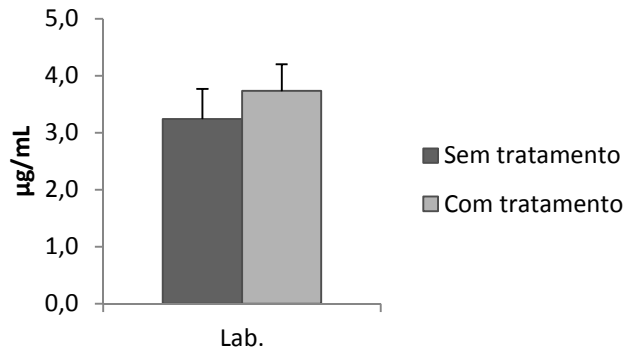


Figura 15: Resultados das amostras de laboratório no ensaio da fosfatase alcalina com e sem colocação de cinza de biomassa.

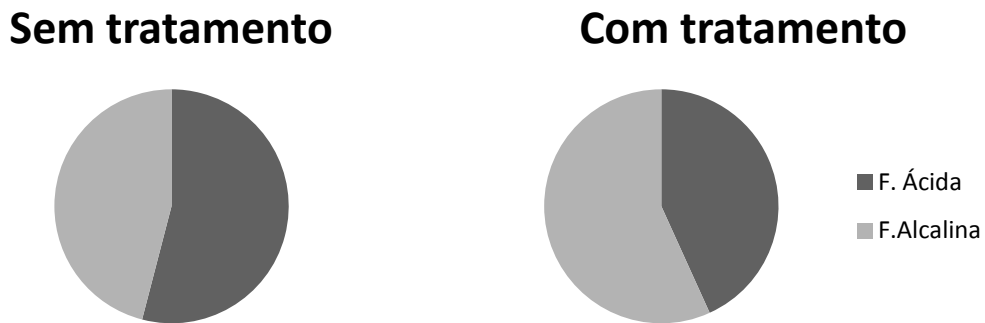


Figura 16: Comparação entre a fosfatase ácida e fosfatase alcalina no ensaio de laboratório com e sem tratamento.

As Figuras 14 a 16 evidenciam que a atividade total de fosfatase é idêntica nos 2 tratamentos, no entanto varia a proporção das 2 enzimas. No solo sem tratamento é predominante a atividade da fosfatase ácida (54%) enquanto no solo com cinza passa a predominar a atividade da fosfatase alcalina (57%).

3.2.2.2 Catalase

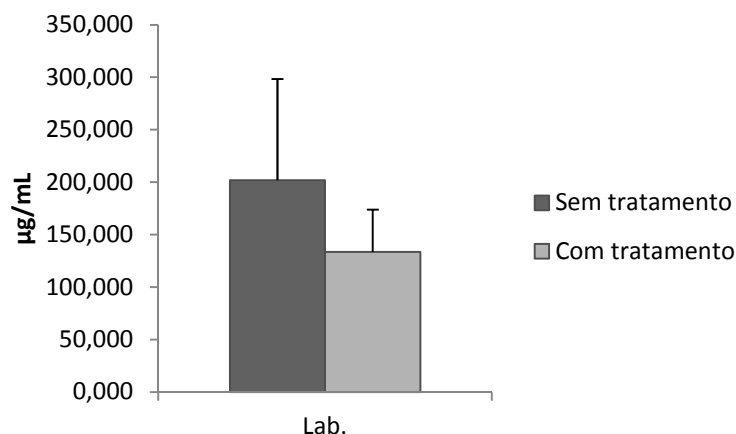


Figura 17: Resultados das amostras de laboratório no ensaio de catalase com e sem colocação de cinza de biomassa.

A atividade da catalase, nas amostras com tratamento de cinza de biomassa, diminui (Figura 17). Embora essa diminuição não seja estatisticamente significativa (Anexo D Tabela 5; Anexo E Tabela 5) pode concluir-se que a cinza não tem grande influência neste parâmetro.

3.2.2.3 HFDA

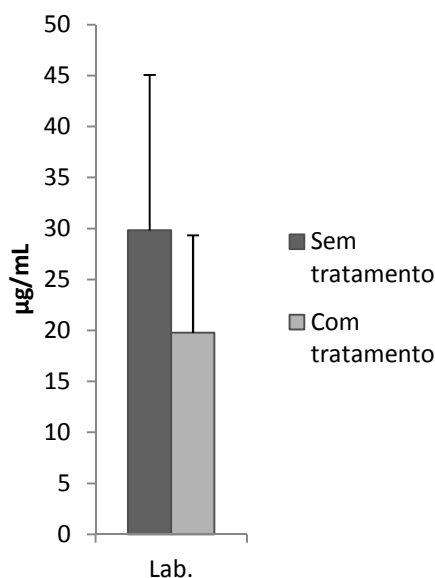


Figura 18: Resultados das amostras de laboratório no ensaio do HFDA com e sem colocação de cinza de biomassa.

A HFDA é uma medida da atividade microbiana total. Os resultados obtidos na Figura 18 indicam um decréscimo desta atividade, não significativo pela análise estatística ($P > 0,05$; Anexo D Tabela 6; Anexo E Tabela 6).

3.2.2.4 Discussão dos parâmetros bioquímicos

As propriedades bioquímicas têm vindo a ser utilizadas em estudos recentes, na avaliação da qualidade do solo [47, 48]. A justificação para este fato é a maior sensibilidade destes parâmetros a pequenas alterações no solo, sejam elas naturais ou antropogénicas [47, 48]. No que diz respeito aos quatro parâmetros bioquímicos escolhidos para estimar a variação da fertilidade nas amostras de laboratório, os resultados foram pouco esclarecedores.

De acordo com Eivazi e Tabatabai [34] a fosfatase ácida é predominante em solos ácidos e a fosfatase alcalina em solos básicos, sendo que a primeira diminui quando aumenta o pH. Gianfreda et al. [49] adianta mais e diz, que a atividade enzimática em geral, está diretamente relacionada com o pH do solo. Observa-se nas amostras com tratamento um aumento da fosfatase alcalina devido à subida do pH e uma descida da fosfatase ácida.

A atividade da catalase não variou significativamente entre as amostra (Anexo D Tabela 5; Anexo E Tabela 5). No entanto verifica-se uma diminuição da atividade catalítica o que pode ter a ver com a presença de alguns metais pesados nas cinzas de biomassa, visto estas alterarem rapidamente a sua atividade na presença de contaminantes, por serem muito sensíveis, e o ensaio ter sido realizado com uma gama alta (percentagem elevada) de cinzas de biomassa [40, 41].

A hidrólise do diacetato de fluoresceína (HFDA) mostra uma tendência idêntica de diminuição de atividade na presença de solo adicionado com cinza. Este resultado indica uma diminuição geral da atividade microbiana no solo onde foi aplicada a cinza, embora o número de bactérias tenha aumentado e o número de fungos diminuído.

3.3 Avaliação da fertilidade do solo em ensaios de campo

Neste subcapítulo são apresentados os resultados biológicos e bioquímicos dos ensaios das amostras de campo. A apresentação dos resultados é seguida da análise e consequente discussão com base nos conhecimentos teóricos da revisão realizada.

3.3.1 Parâmetros biológicos

3.3.1.1 Bactérias

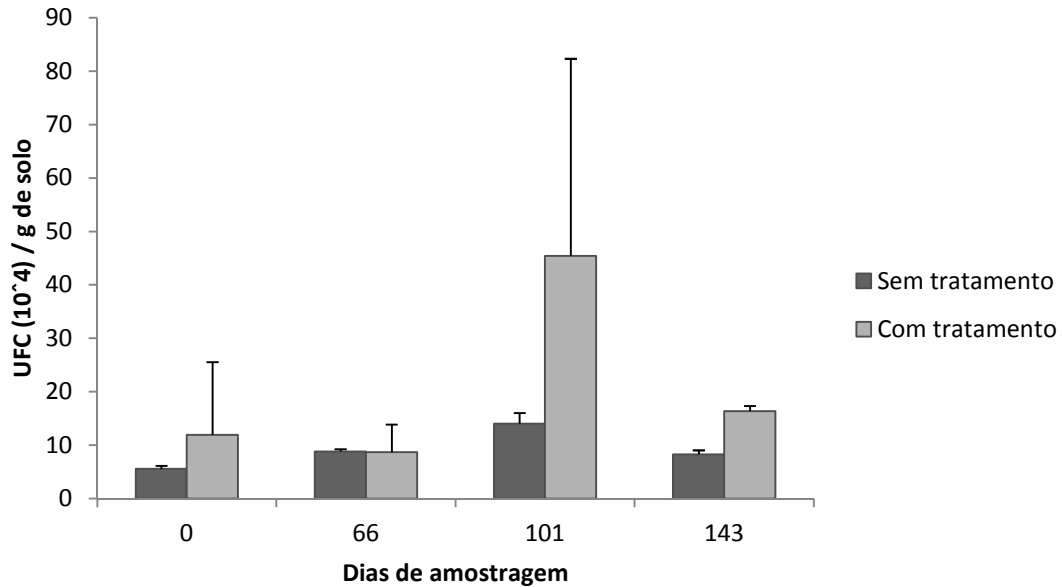


Figura 19: Resultados das amostras de campo no ensaio bacteriológico com e sem colocação de cinza de biomassa.

Ao longo do tempo ocorrem variações do número de bactérias no solo, os tratamentos também originam diferenças (Figura 19). Observa-se um crescimento muito superior na parcela tratada com cinza de biomassa (B) em especial aos 101 dias de amostragem.

3.3.1.2 Fungos

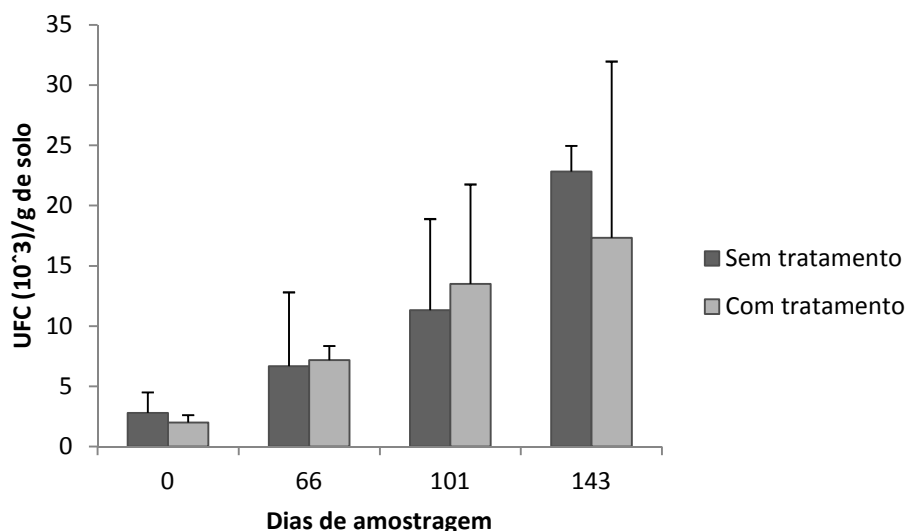


Figura 20: Resultados das amostras de campo no ensaio dos fungos com e sem colocação de cinza de biomassa.

Nos fungos (Figura 20) ocorre um aumento de colónias ao longo do tempo, no entanto o tratamento com cinza só evidencia diferenças no final, no dia de amostragem 143 (julho).

3.3.1.3 Discussão dos parâmetros biológicos

Os parâmetros biológicos são muito afetados pelas condições climáticas. O aumento do número de bactérias e fungos foi muito dependente da pluviosidade (Figura 7) e da temperatura (Figura 8). A atividade dos microrganismos em geral é maior quanto maior a temperatura (até aos 30°C) [27]. No caso das bactérias, em junho, apesar de haver um desvio padrão significativo realça-se uma grande diferença de valores entre a parcela sem e com adição de cinza de biomassa. Evidenciando que a influência da aplicação da cinza no crescimento bacteriano, quando estão presentes condições climáticas favoráveis, proporciona o seu crescimento.

O crescimento dos fungos foi mais afetado pelas condições climáticas do que pela adição da cinza, uma vez que se observou um aumento gradual do seu número entre fevereiro e julho. A influência do tratamento com cinza só se fez notar no mês em junho para as bactérias e na amostragem de julho para os fungos.

3.3.2 Parâmetros bioquímicos

3.3.2.1 Fosfatase ácida e alcalina

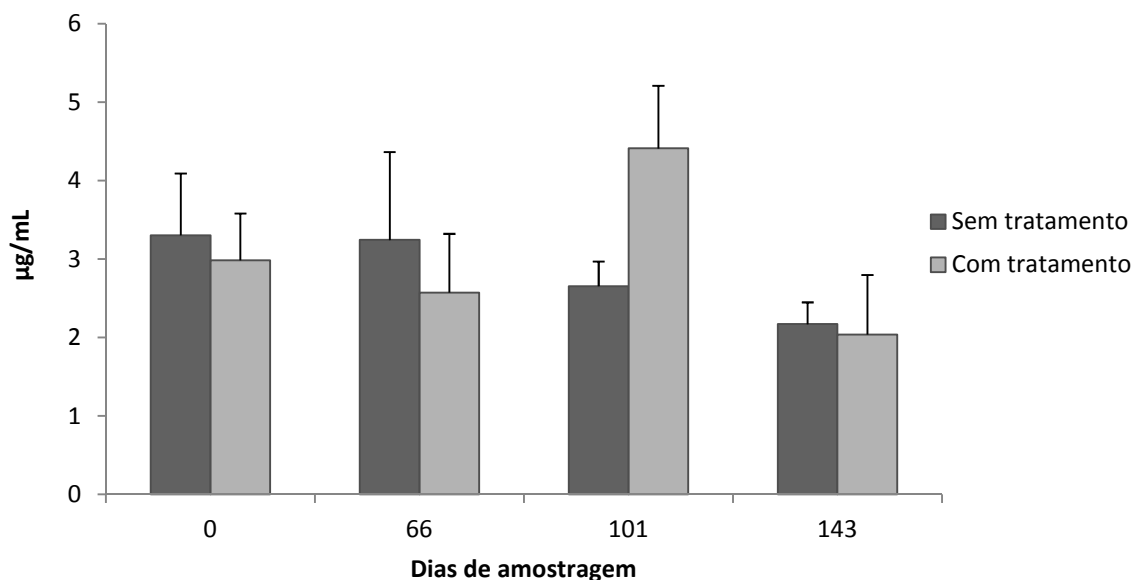


Figura 21: Resultados das amostras de campo no ensaio de fosfatase ácida com e sem colocação de cinza de biomassa.

Pelos resultados obtidos na Figura 21, pode observar-se no terceiro momento de amostragem (dia 101) um aumento da atividade da enzima (fosfatase ácida), no solo que recebeu tratamento.

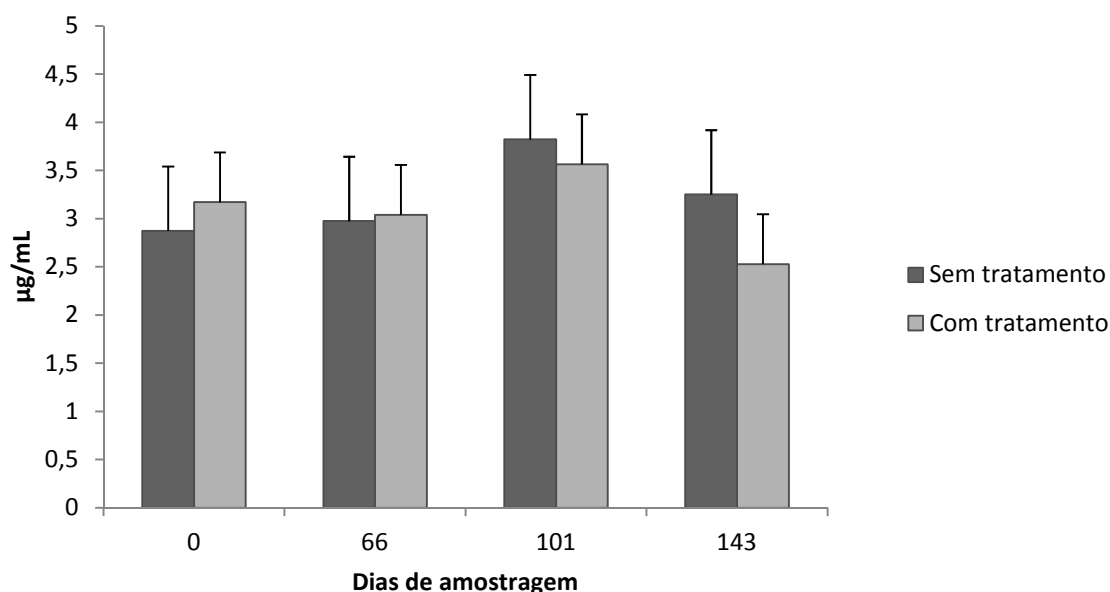


Figura 22: Resultados das amostras de campo no ensaio de fosfatase alcalina com e sem colocação de cinza de biomassa.

A Figura 22 mostra um aumento da atividade enzimática (fosfatase alcalina) no terceiro momento de amostragem (dia 101). A adição de cinzas não promove

diferenças embora se note ao longo do tempo que a aplicação da cinza induz a diminuição da atividade de fosfatase alcalina. As Figuras 21, 22 e o Anexo F evidenciam que a atividade total de fosfatase é idêntica nos 2 tratamentos, no entanto varia a proporção das duas enzimas.

3.3.2.2 Catalase

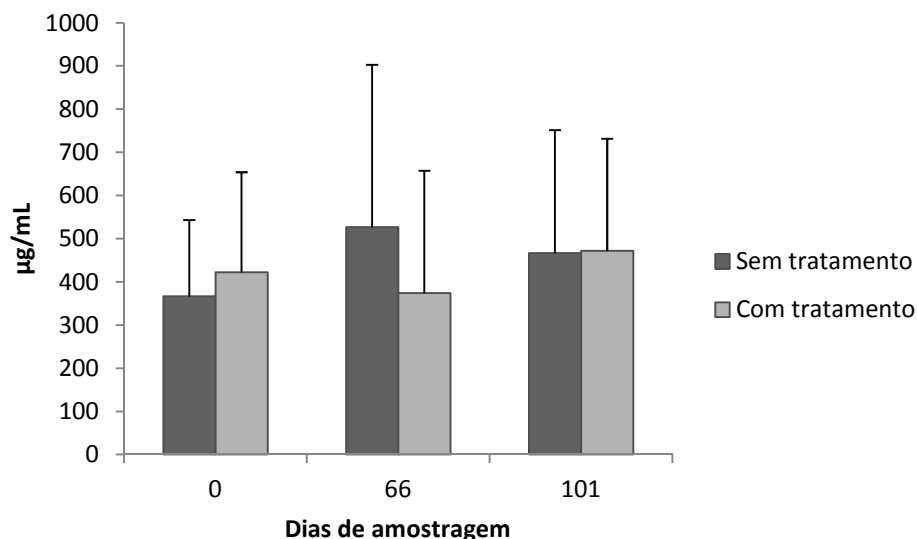


Figura 23: Resultados das amostras de campo no ensaio da catalase com e sem colocação de cinza de biomassa.

A atividade da catalase, não evidencia diferenças ao longo do tempo. Pelos resultados visíveis na Figura 23 é possível indicar que a cinza de biomassa apenas diminui a atividade da catalase, em Abril (66 dias) no entanto esta diferença não é significativa ($P > 0,05$; Anexo D Tabela 5; Anexo E Tabela 5). Neste parâmetro foi realizada a 4 amostra, mas os resultados foram irrealistas, dando sistematicamente valores negativos, deixando pensar que o método foi mal executado.

3.3.2.3 HFDA

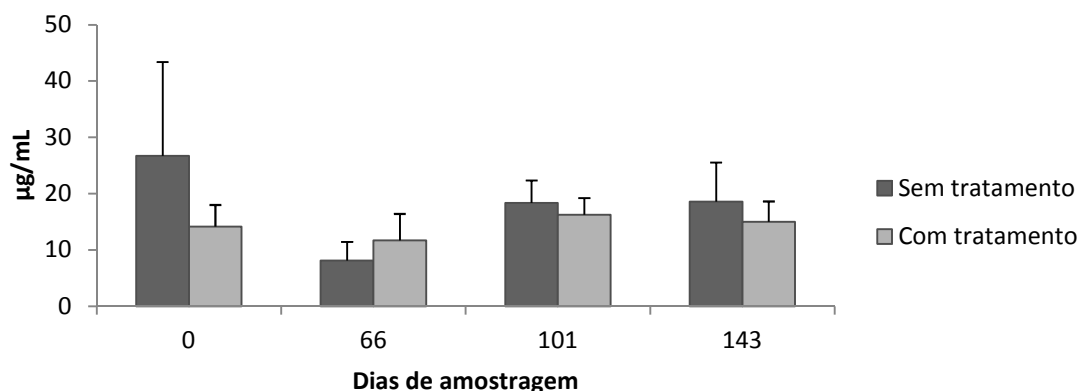


Figura 24: Resultados das amostras de campo no ensaio do HFDA com e sem aplicação de cinza de biomassa.

A Figura 24 evidencia, que a atividade microbiana geral do solo, deduzida pela atividade de hidrólise do FDA não foi muito influenciado pela adição da cinza. No entanto a diferença existente inicialmente entre os 2 solos, foi ultrapassada (dia 66 Abril) ou minorada (dia 101 e dia 143).

3.3.2.4 Discussão dos parâmetros bioquímicos

A partir dos resultados obtidos na fosfatase ácida é admissível que a cinza possa ter tido uma influência, mas retardada, isto é, distingue-se no dia 101 (amostra 3), um aumento significativo da fosfatase ácida. Estas enzimas, fosfatase ácida e alcalina, estão diretamente ligadas ao pH do solo sendo que este solo está mais propício ao desenvolvimento da atividade da fosfatase ácida (pH entre os 4 e 5).

A adição de cinza não foi suficiente para, no caso das amostras de campo, induzir diferenças de pH no solo que alterasse a atividade das fosfatases ácida e alcalina. O solo continua ácido e atividade da fosfatase ácida permaneça preponderante sobre a fosfatase alcalina.

4. Discussão e conclusões gerais

O objetivo deste ensaio foi clarificar a influência da cinza de biomassa nos parâmetros inorgânicos, biológicos e bioquímicos do solo. Em relação aos parâmetros inorgânicos, há um ligeiro aumento do fósforo e um aumento do pH do solo que sobe de pH=5 para pH=6 nas amostras de laboratório. Os parâmetros biológicos, avaliados pelo número de bactérias e fungos, evidenciam um claro aumento de números de bactérias e uma diminuição do número de fungos.

Os parâmetros bioquímicos também são afetados, ocorrendo a diminuição da fosfatase ácida e aumento da fosfatase alcalina nas amostras tratadas com cinza no laboratório. A subida registada no fosforo altera a atividade da fosfatase verificando assim o que foi observado na bibliografia [37, 38]. A atividade da catalase e da HFDA também diminui com a colocação da cinza de forma pouco acentuada nos ensaios de laboratório.

A diminuição da atividade destas enzimas pode significar uma diminuição da atividade microbiana, porque estes 2 parâmetros estão diretamente ligados, mas como é visível nos parâmetros biológicos isso não acontece. A aplicação da cinza de biomassa mostra globalmente um aumento do número de microrganismos no solo. A diminuição da atividade enzimática nas amostras com cinza pode estar relacionada com o aumento dos metais pesados presentes no solo, provenientes da adição de cinzas de biomassa (Tabela 3),

Este ensaio comprova que a cinza de biomassa torna os solos menos ácidos ou tende a não os deixar acidificar [12]. Os fungos são microrganismos que não são tão sensíveis às alterações de pH como as bactérias (Tabela 7), sendo que o ligeiro aumento do pH é mais visível no aumento do número de bactérias (Figura 13). Analisando o resultado dos fungos podemos afirmar que o aumento do pH nas amostras de laboratório é responsável pela diminuição da atividade fúngica, isto porque o pH original da amostra é ótimo para os fungos. No que diz respeito às amostras de campo, não se observam alterações significativas no pH devido a colocação das cinzas de biomassa, mas observa-se que o pH nas amostras com cinza é sempre superior.

Os resultados da atividade da catalase e da HFDA das amostras de campo não evidenciaram aumentos após a aplicação da cinza de biomassa, originando resultados idênticos ao longo do tempo. A quantidade de cinza de biomassa aplicada em campo pode ter sido insuficiente, não facilitando a observação de diferenças entre a parcela tratada e não tratada. Pelos resultados obtidos na primeira amostragem (dia 0) podemos concluir quanto à heterogeneidade do solo. Muitos dos parâmetros utilizados como identificação de fertilidade mostram resultados diferentes na primeira amostragem, o que evidencia a heterogeneidade de solo e dificulta assim, a elaboração do trabalho e de conclusões.

Foram observados alguns efeitos benéficos à colocação de cinza de biomassa, como o aumento de bactérias, o aumento de pH, visto serem solos muito ácidos. Comprovou-se o aumento do fósforo disponível nas análises de laboratório, Em contrapartida foram registadas diminuições de atividade em quase todas as enzimas (menos a fosfatase alcalina). Há registos que indicam que, aumento da atividade

enzimática (protéase desidrogenase) são ditos favoráveis para a atividade microbiana [12].

Os resultados de laboratório são mais esclarecedores do que os observados nas amostras de campo. A quantidade utilizada pode ser umas das responsáveis para este resultado, mas não é de todo lógico poder comparar os dois ensaios, isto por causa das quantidades e devido às condições de temperatura e pluviosidade.

A aplicação de cinzas na dose de 10 ton/ha provoca um aumento de alguns parâmetros relacionados com a fertilidade do solo, visto as bactérias serem importantes no aumento da fertilidade do solo e estarem relacionadas com a formação de húmus [25]. Este resultado coincide com a bibliografia observada [15]. A diminuição da atividade enzimática é pouco significativa e não teve influência na atividade bacteriana. O aumento da fosfatase ácida em junho acompanha o aumento da atividade bacteriana. O aumento do pH é outro responsável pelo possível aumento da fertilidade, visto grande parte das culturas vegetais terem pH ótimo entre 6 e 7 [12]. Devido à escassez de estudos sobre as alterações das propriedades bioquímicas do solo após colocação de cinza de biomassa, é complicado comparar resultados sobre o que acontece nesses parâmetros[12].

Com os resultados obtidos nas amostras podemos afirmar que a cinza de biomassa pode ter como influência positiva na fertilidade dos solos:

- ✓ Aumento do pH do solo
- ✓ Aumento da atividade bacteriana
- ✓ Diminuição da atividade fúngica (pode ser negativa ou positiva para a fertilidade, sendo positiva se inibir os fungos fito patogénicos).

Sugestões para trabalhos futuros.

- Para a realização de trabalhos futuros, e a fim de evidenciar a alteração na fertilidade, devem ser realizados testes de crescimento radicular ou de crescimento plantas. Para este processo podem ser utilizados mudas de eucalipto clones.
- O estudo deve ter um tempo superior, como era previsto inicialmente com início em setembro.
- Fazer vários ensaios com diferentes doses de cinza primeiro em laboratório e depois realizar em campo, e com amostras de solo o mais idênticas possível.

Bibliografia

1. <http://www.un.org/esa/population/publications/sixbillion/sixbillion.htm>. *The World at Six Billion*. 2011 [cited 15-09-2012].
2. http://europa.eu/legislation_summaries/environment/tackling_climate_change/ev0007_fr.htm. *Lutte contre le déboisement*. 2008 [cited 15-09-2012].
3. Bellote, A.S.H.F., Carlos; Andrade, Guilherme, *Resíduos da indústria de celulose em plantios florestais*, 1998. p. 99-106.
4. Horta, C.L., Samuel; Anjos, Ofélia; Almeida, José, *Assesment of two residues from forestry industry as fertilizers*, 2010: Escola Superior Agrária. p. 147- 159
5. http://www.ipq.pt/backfiles/prNP004406_2009.pdf. *Sistemas de gestão florestal sustentável Aplicação dos critérios pan-europeus para a gestão florestal sustentável*. 2009 [cited 20-10-2012].
6. http://www.pt.fsc.org/fsc_portugal.html. *FSC Portugal*. [cited 18-10-2012].
7. http://www.apcer.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=300&Itemid=452&lang=pt. *Sistemas de Gestão*. 2012 [cited 15-10-2012].
8. <http://www.pefc.pt/gestao-florestal/introducao>. *Certificação Florestal*. 2010 [cited 20-10-2012].
9. <http://dre.pt/pdf1sdip/2011/01/00600/0017300175.pdf>. *Decreto-Lei n.º 6/2011 de 10 de Janeiro*. 2011 [cited 20-10-2012].
10. <http://dre.pt/pdf1s/2009/06/11100/0358003594.pdf>. *Portaria n.º 631/2009 de 9 de Junho*. 2009 [cited 20-10-2012].
11. Risse, m.G., Julia, *Best management practices for wood ash as agricultural soil amendment*, 2002: the University of georgia.
12. Pandey, V.C. and N. Singh, *Impact of fly ash incorporation in soil systems*. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2010. 136(1–2): p. 16-27.
13. Tan, Z. and A. Lagerkvist, *Phosphorus recovery from the biomass ash: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2011. 15(8): p. 3588-3602.
14. Stappe, J.B., Edson, *O uso de resíduos da indústria de celulose como insumos na produção florestal*, 1988. p. 33- 37.
15. Gonçalves, J.M., Luiz, *Uso da "cinza" de biomassa florestal como fonte de nutrientes em povoamentos puros de Eucalyptus grandis* 1995. p. 28- 37.
16. Fritze, H.S., Aino; Levula, Teuvo; Kitunen, Veikko; Malkonen, Eino, *Wood-ash fertilization and fire treatments in a Scots pine forest stand: Effects on the organic layer, microbial biomass, and microbial activity*, 1994: Finnish Forest Research Institute, Department of Forest Ecology. p. 57- 63.
17. Bååth, E., et al., *Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils*. Soil Biology and Biochemistry, 1995. 27(2): p. 229-240.
18. Saarsalmi, A.M., Eino; Piirainen, Sirpa, *Effects of wood ash fertilization on forest soil chemical properties*, 2001: Finnish Forest Institute, Vantaa Research Centre. p. 355- 367.

19. Nkana, J.C.V., A. Demeyer, and M.G. Verloo, *Effect of wood ash application on soil solution chemistry of tropical acid soils: incubation study*. Bioresource Technology, 2002. 85(3): p. 323-325.
20. Mittra, B.N., et al., *Fly ash—a potential source of soil amendment and a component of integrated plant nutrient supply system*. Fuel, 2005. 84(11): p. 1447-1451.
21. Nieminen, M.P., Sirpa;Moilanen,Mikko, *Release of mineral nutrients and heavy metals from wood and peat ash fertilizers: Field studies in Finnish forest soils*, 2005: Scandinavian Journal of Forest Research. p. 146- 153.
22. Saarsalmi, A., et al., *30-Year effects of wood ash and nitrogen fertilization on soil chemical properties, soil microbial processes and stand growth in a Scots pine stand*. Forest Ecology and Management, 2012. 278(0): p. 63-70.
23. Bougnom, B.P., et al., *Designer compost with biomass ashes for ameliorating acid tropical soils: Effects on the soil microbiota*. Applied Soil Ecology, 2010. 45(3): p. 319-324.
24. Bois énergie, C., *La valorisation des cendres de bois*, 2005.
25. Pelczar, M.C., E.C.S;Krieg,Noel, *Microbiologia, Conceitos e aplicação*. Vol. 2. 1997. 306- 336.
26. Campanharo, M.M., P;Ribeiro,G;Pnho,L.G. da R., *Utilização de cinza de madeira como corretivo de solo*, 2008: FertBio.
27. Costa, J.B.D., *Caracterização e constituição do solo*, F.C. Gulbenkian, Editor 2004. p. 112- 188.
28. Oliveira, A. and M.E. Pampulha, *Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006. 102(3): p. 157-161.
29. Bandick, A.K. and R.P. Dick, *Field management effects on soil enzyme activities*. Soil Biology and Biochemistry, 1999. 31(11): p. 1471-1479.
30. Dick, W.A., L. Cheng, and P. Wang, *Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators*. Soil Biology and Biochemistry, 2000. 32(13): p. 1915-1919.
31. Giller, K.E., E. Witter, and S.P. McGrath, *Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review*. Soil Biology and Biochemistry, 1998. 30(10–11): p. 1389-1414.
32. García, C. and T. Hernández, *Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion*. Soil Biology and Biochemistry, 1997. 29(2): p. 171-177.
33. Aliasghar zad, N., A. Molaei, and S. Oustan, *Pollution Induced Community Tolerance (PICT) of Microorganisms in Soil Incubated with Different Levels of PB*, 2011: World Academy of Science, Engineering and Technology. p. 1189- 1193.
34. Eivazi, F. and M.A. Tabatabai, *Phosphatases in soils*. Soil Biology and Biochemistry, 1977. 9(3): p. 167-172.
35. Sobolev, D.B.M., *Effects of Heavy Metal Contamination upon Soil Microbes: Lead-induced Changes in General and Denitrifying Microbial*

- Communities as Evidenced by Molecular Markers*, 2008: International Journal of Environmental Research and Public Health. p. 450- 456.
36. Pereira, S.C., I;Figueira,E, *Are Rhizobium and soil enzyme activities good indicators of heavy metal soil contamination?*, 2007: Environmental Microbiology Research Trends. p. 237- 255.
 37. Karthikeyan, S.e.a., *Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters*. Plant Physiology, 2002: p. 221- 233.
 38. Versaw, W.H., M, *A Chloroplast Phosphate Transporter, PHT2;1, Influences Allocation of Phosphate within the Plant and Phosphate-Starvation Responses*, 2002: American Society of Plant Biologists. p. 1751- 1766.
 39. Belyaeva, O., R. Haynes, and O. Birukova, *Barley yield and soil microbial and enzyme activities as affected by contamination of two soils with lead, zinc or copper*, 2005: Biol Fertil Soils. p. 85- 94.
 40. Stepniewska, Z., A. Wolińska, and J. Ziomek, *Response of soil catalase activity to chromium contamination*. Journal of Environmental Sciences, 2009. 21(8): p. 1142-1147.
 41. Kızılkaya, R., et al., *Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals*. European Journal of Soil Biology, 2004. 40(2): p. 95-102.
 42. Johansson, L.H. and L.A. Håkan Borg, *A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples*. Analytical Biochemistry, 1988. 174(1): p. 331-336.
 43. Green, V.S., D.E. Stott, and M. Diack, *Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples*. Soil Biology and Biochemistry, 2006. 38(4): p. 693-701.
 44. Adam, G. and H. Duncan, *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 and Biochemistry, 2001. 33(7-8): p. 943-951.
 45. Zdruli, P., R. Jones, and L. Montanarella, *Organic matter in the soils of Southern Europe 2004*: European Soil Bureau Technical Report.
 46. Zimmermann, S. and B. Frey, *Soil respiration and microbial properties in an acid forest soil: effects of wood ash*. Soil Biology and Biochemistry, 2002. 34(11): p. 1727-1737.
 47. Hinojosa, M.B., et al., *Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils*. Soil Biology and Biochemistry, 2004. 36(10): p. 1559-1568.
 48. Pascual, J.A., et al., *Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes*. Soil Biology and Biochemistry, 2000. 32(13): p. 1877-1883.
 49. Gianfreda, L., et al., *Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution*. Science of The Total Environment, 2005. 341(1-3): p. 265-279.
 50. <http://e2p.inegi.up.pt/index.asp>. *Energia Endógenas de Portugal*. [cited 20-10-2012].

Anexo A

Tabela 15: Lista de termoelétricas exclusivas a biomassa em Portugal [49].

Nome	Potência instalada [MW]	Estado	Ano de entrada em funcionamento
AVEIRO			
● Coqeração Amorim	1,1	Em funcionamento	2004
● Coqeração de Cacia	35,1	Em funcionamento	2005
● Termoelétrica de Cacia	12,5	Em funcionamento	2009
● Termoelétrica Terras de Sta. Maria	10,8	Em funcionamento	2008
● Vinocor	0,2	Em funcionamento	1999
CASTELO BRANCO			
● PALSER	3,3	Em funcionamento	2010
● Termoelétrica Centroliva	3,5	Em funcionamento	1998
● Termoelétrica de Ródão	13	Em funcionamento	2007
COIMBRA			
● Coqeração da Figueira da Foz (Lavos)	95	Em funcionamento	2004
● Termoelétrica da Figueira da Foz	34,3	Em funcionamento	2009
PORTO			
● Vapinor	3	Em funcionamento	2011
SANTARÉM			
● Termoelétrica de Constância	13,7	Em funcionamento	2009
SETÚBAL			
● Coqeração de Setúbal	53,9	Em funcionamento	2004
● Termoelétrica de Setúbal	12,5	Em funcionamento	2009
VIANA DO CASTELO			
● Coqeração Portucel Viana	38,8	Em funcionamento	2002
VISEU			
● Coqeração SIAF	14,7	Em funcionamento	1996
● COSTA IBÉRICA	0,3	Em funcionamento	2011
● Termoelétrica de Belmonte	2	Em funcionamento	2010
● Termoelétrica de Mortáqua	9	Em funcionamento	1999



Figura 25: Localização das termoelétricas exclusivas a biomassa em Portugal [50].

Anexo B

Titulação do dicromato com FAS

(Adaptado do Método do Refluxo Tritrimétrico - SM 5220 B)

Material laboratorial:

- Tubos de digestão 30x 160 mm com condensador.
- Bloco de aquecimento para operar à temperatura 150 ± 2 °C.
- Pipetas volumétricas de 4, 7 e 10 ml.
- Bureta de 10 ml, com divisões de 0,05 ml e respectivo suporte.
- Copos de 100 ml.

Reagentes:

- Água destilada e bidestilada.
- Ácido sulfúrico concentrado
- Reagente de Ácido Sulfúrico com prata
- Solução padrão de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 0,27 M (com 33,3 g $HgSO_4$) *
- Solução padrão de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 0,0167 M (com $HgSO_4$)
- Solução indicadora de ferroína
- Solução padrão de sulfato ferroso amoniacal (FAS) aproximadamente 0,10 M

* Permite complexar até 30 mg de Cl^- na amostra

Limpeza inicial dos tubos de digestão:

- Colocar 21 ml de água bidestilada no tubo, adicionando ainda 12 ml de solução de digestão de dicromato de potássio e 30,0 ml de ácido sulfúrico concentrado;
- Colocar o tubo no digestor com uma temperatura de 150 °C e deixar digerir durante cerca de 30 minutos (não esquecendo no entanto de agitar passados ± 15 minutos);
- Limpar o tubo e o condensador com água bidestilada.
- entre digestões: lavar com água destilada e escorrer

Cálculos:

Normalidade de $K_2Cr_2O_7$ 0,0167 M = 0,100 N



Normalidade do FAS

$$N_{FAS} [eq / L] = \frac{V_{K_2Cr_2O_7} \text{ Titulado, mL}}{V_{FAS} \text{ Gasto, mL}} \times 0,10$$

[Eq.1]

Consumo Químico de Oxigénio pelo solo (CQO):

$$CQO[mgO_2] = \frac{(V_{FASBranco}, mL - V_{FASAmostra}, mL) \times N_{FAS} \times 8000}{V_{Amostratitulada}, mL(10)} \times V_{final}, L(0.1)$$

$$CQO[\%] = \frac{CQO[mgO_2]}{mg\ solo}$$

$$MO[\%] = CQO[\%] \times \frac{162}{192}$$

$$C[\%] = CQO[\%] \times \frac{72}{192}$$

A conversão em Matéria Orgânica e em Carbono orgânico admite composição de celulose para a MO.

Determinação da CQO:

Digestão em tubos 30x160 com condensador:

- Pesar 0.5 gr de solo seco contendo ou uma massa contendo o máximo de 40 mg de carbono
- Adicionar 10,0 ml de solução de digestão de dicromato de potássio 0,27 M;
- Colocar 15,0 ml do reagente de ácido sulfúrico de modo a formar uma camada no fundo (escorrer pelas paredes);
- Preparar um branco com as mesmas quantidades, substituindo a amostra por água bidestilada.
- Colocar o condensador e agitar o tubo até misturar completamente as duas camadas;
- Lavar a parede do tubo esguichando um pequeno volume de água bidestilada (até 10 mL)
- Colocar os tubos a digerir durante 2 horas no bloco digestor pré-aquecido a 150°C;
- Colocar num suporte e deixar arrefecer à temperatura ambiente;
- Transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e acertar
- Transferir 10 mL das amostras e do branco para copos para titular com FAS; adicionar 10 mL de H₂SO₄ e adicionar 10 mL H₂O até um volume aproximado de 30 mL
- Adicionar 2 gotas de ferroína;
- Agitar rapidamente e titular com a solução FAS 0,10 M numa bureta de 25 mL;
- O ponto termo é o ponto de viragem da cor azul-esverdeado para vermelho-acastanhado (o azul pode reaparecer poucos minutos depois).

Padronização da solução FAS com solução padrão de dicromato de potássio 0,0167 M:

- Adicionar 10,0 ml de água bidestilada a 6,0 ml de solução padrão dicromato de potássio 0,0167 e 14,0 ml de ácido sulfúrico (sem prata) num tubo de digestão;
- Arrefecer o tubo à temperatura ambiente e adicionar 2 gotas de indicador de ferroína;
- Titular com a solução FAS até ao aparecimento da cor vermelha-acastanhada.

Anexo C

Extração de P disponível no solo

(Método MEHLICH III)

- Solução stock 1,5M NH_4F + 0,1M EDTA: Num balão de 100mL contendo c. 60 mL dissolver 5.559 g de NH_4F ; adicionar 2.923 g de EDTA (FW 292.24) dissolver e completar a 100 mL. Armazenar em frasco de plástico.
- Solução de extração: Num balão de 1 L contendo c. 800 mL dissolver 20.01 g de NH_4NO_3 ; adicionar 10 mL da solução stock de F-EDTA + 11.5 mL de ácido acético + 0.82 mL de HNO_3 (concentração de 70%). Agitar e completar a 1L. Guardar em frasco de plástico.
- Pesar 5 g de solo seco (fração <2 mm) para frasco plástico de 100 mL
- Adicionar 50 mL da solução de extração (razão 1:10); rolar
- Imediatamente agitar manualmente durante 5 minutos
- Filtrar por um filtro de fibra vidro e recolher o filtrado no mesmo frasco enxaguado.
- Guardar para determinar P, K, Na, Ca, Mg e micronutrientes

Antes de determinar P:

- Pipetar um volume adequado (2 mL) para um balão de 50 mL; pipetar água para perfazer 25 mL.
- Adicionar uma gota de fenolftaleína e neutralizar com gotas de NaOH 10 M até cor rosa suave (se necessário contra titular com uma gota de H_2SO_4 5 N até desaparecer a cor)
- Adicionar 4 mL de reagente de cor (reagente combinado) para determinar o fósforo

Análise de fósforo solúvel pelo método do ácido ascórbico**Método do Ácido Ascórbico (SM 4500-P E)**Reagente Combinado (para 25 determinações)

- Misturar 50 ml de H_2SO_4 5N, 5 ml de tartarato de antimônio e potássio, 15 ml da solução de molibdato de amônio e 30 ml de Ácido Ascórbico.

- Agitar depois de cada adição.

Notas:

Deixar os reagentes atingirem a temperatura ambiente antes da mistura e adicioná-los pela ordem dada.

Se aparecer turbidez, agitar bem e deixar repousar alguns minutos até esta desaparecer.

Reagente estável durante 4h.

Determinação colorimétrica

- Pipetar 25 ml das amostras e dos padrões para balões volumétricos de 50 ml;
- Adicionar 4 ml de reagente combinado. Misturar cuidadosamente;
- Ler a absorvância a 880 nm num espectrofotômetro após 10 min e não mais de 30 min;
- Usar uma célula de 4 cm com os padrões e amostras de baixa concentração.

Notas:

Depois da adição do reagente combinado pode ser necessário diluir a amostra, caso se verifique que esta amostra está fora da gama dos padrões.

Anexo D**PERMANOVA, Significância “Tempo X Condição”****Anexo D Tabela 1: Bactérias amostras de Campo e laboratório**

Grupos de amostras	P(MC)
1SC, 1CC	0.1632
1SC, 2SC	0.0001
1SC, 2CC	0.1038
1SC, 3SC	0.0009
1SC, 3CC	0.0081
1SC, 4SC	0.0061
1SC, 4CC	0.0002
1CC, 2SC	0.521
1CC, 2CC	0.4615
1CC, 3SC	0.6717
1CC, 3CC	0.0245
1CC, 4SC	0.3877
1CC, 4CC	0.941
2SC, 2CC	0.6669
2SC, 3SC	0.2686
2SC, 3CC	0.0152
2SC, 4SC	0.0576
2SC, 4CC	0.0113
2CC, 3SC	0.3674
2CC, 3CC	0.0152
2CC, 4SC	0.8325
2CC, 4CC	0.0906
3SC, 3CC	0.0172
3SC, 4SC	0.0631
3SC, 4CC	0.2146
3CC, 4SC	0.0138
3CC, 4CC	0.0184
4SC, 4CC	0.0027
5SC, 5CC	0.1965

Anexo D Tabela 2: Fungos amostras de Campo e Laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1SC, 1CC	0.2004
1SC, 2SC	0.1131
1SC, 2CC	0.0002
1SC, 3SC	0.0085
1SC, 3CC	0.0025
1SC, 4SC	0.0001
1SC, 4CC	0.0133
1CC, 2SC	0.054
1CC, 2CC	0.0001
1CC, 3SC	0.005
1CC, 3CC	0.0014
1CC, 4SC	0.0001
1CC, 4CC	0.011
2SC, 2CC	0.8201
2SC, 3SC	0.1977
2SC, 3CC	0.0694
2SC, 4SC	0.0002
2SC, 4CC	0.075
2CC, 3SC	0.1505
2CC, 3CC	0.0437
2CC, 4SC	0.0001
2CC, 4CC	0.0649
3SC, 3CC	0.5717
3SC, 4SC	0.0049
3SC, 4CC	0.3056
3CC, 4SC	0.0174
3CC, 4CC	0.5055
4SC, 4CC	0.3149
5SC, 5CC	0.1332

Anexo D Tabela 3: Fosfatase ácida amostras de Campo e Laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1SC, 1CC	0.4393
1SC, 2SC	0.9175
1SC, 2CC	0.1312
1SC, 3SC	0.0966
1SC, 3CC	0.0361
1SC, 4SC	0.0066
1SC, 4CC	0.0193
1CC, 2SC	0.6281
1CC, 2CC	0.3174
1CC, 3SC	0.2565
1CC, 3CC	0.007
1CC, 4SC	0.013
1CC, 4CC	0.038
2SC, 2CC	0.2534
2SC, 3SC	0.2375
2SC, 3CC	0.0662
2SC, 4SC	0.0457
2SC, 4CC	0.0566
2CC, 3SC	0.8026
2CC, 3CC	0.0026
2CC, 4SC	0.2407
2CC, 4CC	0.2496
3SC, 3CC	0.0005
3SC, 4SC	0.0198
3SC, 4CC	0.0941
3CC, 4SC	0.0001
3CC, 4CC	0.0006
4SC, 4CC	0.6949
5SC, 5CC	0.0097

Anexo D Tabela 4: Fosfatase alcalina amostras de Campo e Laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1SC, 1CC	0.2968
1SC, 2SC	0.7422
1SC, 2CC	0.6252
1SC, 3SC	0.0406
1SC, 3CC	0.033
1SC, 4SC	0.2829
1SC, 4CC	0.2481
1CC, 2SC	0.5365
1CC, 2CC	0.7153
1CC, 3SC	0.1422
1CC, 3CC	0.2054
1CC, 4SC	0.8125
1CC, 4CC	0.0492
2SC, 2CC	0.8623
2SC, 3SC	0.0769
2SC, 3CC	0.0966
2SC, 4SC	0.4552
2SC, 4CC	0.1923
2CC, 3SC	0.1153
2CC, 3CC	0.1671
2CC, 4SC	0.606
2CC, 4CC	0.1691
3SC, 3CC	0.5529
3SC, 4SC	0.2321
3SC, 4CC	0.0103
3CC, 4SC	0.3949
3CC, 4CC	0.0058
4SC, 4CC	0.0618
5SC, 5CC	0.1174

Anexo D Tabela 5: Catalase, amostras de Campo e Laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1SC, 1CC	0.6363
1SC, 2SC	0.3637
1SC, 2CC	0.9598
1SC, 3SC	0.4812
1SC, 3CC	0.3016
1SC, 4SC	0.0003
1SC, 4CC	0.0011
1CC, 2SC	0.575
1CC, 2CC	0.7489
1CC, 3SC	0.7761
1CC, 3CC	0.636
1CC, 4SC	0.0007
1CC, 4CC	0.0018
2SC, 2CC	0.4515
2SC, 3SC	0.7647
2SC, 3CC	0.8016
2SC, 4SC	0.0035
2SC, 4CC	0.0075
2CC, 3SC	0.5806
2CC, 3CC	0.4562
2CC, 4SC	0.0052
2CC, 4CC	0.0083
3SC, 3CC	0.9162
3SC, 4SC	0.0014
3SC, 4CC	0.002
3CC, 4SC	0.0001
3CC, 4CC	0.0002
4SC, 4CC	0.0071
5SC, 5CC	0.0972

Anexo D Tabela 6: FDA, amostras de Campo e Laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1SC, 1CC	0.104
1SC, 2SC	0.0274
1SC, 2CC	0.0615
1SC, 3SC	0.2614
1SC, 3CC	0.1643
1SC, 4SC	0.2946
1SC, 4CC	0.1225
1CC, 2SC	0.016
1CC, 2CC	0.3477
1CC, 3SC	0.0841
1CC, 3CC	0.3063
1CC, 4SC	0.1963
1CC, 4CC	0.7122
2SC, 2CC	0.1606
2SC, 3SC	0.0009
2SC, 3CC	0.0015
2SC, 4SC	0.0074
2SC, 4CC	0.0071
2CC, 3SC	0.0217
2CC, 3CC	0.0701
2CC, 4SC	0.0705
2CC, 4CC	0.2004
3SC, 3CC	0.3166
3SC, 4SC	0.9496
3SC, 4CC	0.1499
3CC, 4SC	0.4598
3CC, 4CC	0.5103
4SC, 4CC	0.2902
5SC, 5CC	0.1992

Anexo D Tabela 7: Fosforo, amostras de Campo e Laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1SC, 1CC	0.4341
1SC, 2SC	0.1753
1SC, 2CC	0.1152
1SC, 3SC	0.3317
1SC, 3CC	0.1512
1SC, 4SC	0.1436
1SC, 4CC	0.145
1CC, 2SC	0.0297
1CC, 2CC	0.014
1CC, 3SC	0.045
1CC, 3CC	0.0125
1CC, 4SC	0.2657
1CC, 4CC	0.2631
2SC, 2CC	0.8459
2SC, 3SC	0.3958
2SC, 3CC	0.7619
2SC, 4SC	0.0332
2SC, 4CC	0.0345
2CC, 3SC	0.2247
2CC, 3CC	0.4664
2CC, 4SC	0.029
2CC, 4CC	0.0288
3SC, 3CC	0.2897
3SC, 4SC	0.0506
3SC, 4CC	0.0539
3CC, 4SC	0.0328
3CC, 4CC	0.0351
4SC, 4CC	0.9922
5SC, 5CC	0.028

Anexo D Tabela 8: M.O., amostras de Campo e Laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1SC, 1CC	0.433
1SC, 2SC	0.7058
1SC, 2CC	0.9895
1SC, 3SC	0.2904
1SC, 3CC	0.2904
1SC, 4SC	0.2463
1SC, 4CC	0.8031
1SC, 5SC	0.3858
1CC, 2SC	0.5468
1CC, 2CC	0.1055
1CC, 3SC	0.3918
1CC, 3CC	0.3945
1CC, 4SC	0.3056
1CC, 4CC	0.2624
2SC, 2CC	0.5303
2SC, 3SC	0.3332
2SC, 3CC	0.3302
2SC, 4SC	0.2673
2SC, 4CC	0.8076
2CC, 3SC	0.1359
2CC, 3CC	0.1638
2CC, 4SC	0.1369
2CC, 4CC	0.6121
3SC, 3CC	0.88
3SC, 4SC	0.7154
3SC, 4CC	0.2037
3CC, 4SC	0.8383
3CC, 4CC	0.2274
4SC, 4CC	0.1878
5SC, 5CC	0.6702

Anexo E**PERMANOVA, Significância “Amostra X Amostra”****Anexo E Tabela 1: Bactérias, amostras de Campo e Laboratório**

Grupos de amostras	P(MC)
1.1SC, 1.2SC	0.1677
1.1SC, 1.3CC	0.0006
1.1SC, 1.4CC	0.0771
1.1SC, 2.1SC	0.0113
1.1SC, 2.2SC	0.0074
1.1SC, 2.3CC	0.7355
1.1SC, 2.4CC	0.0021
1.1SC, 3.1SC	0.0047
1.1SC, 3.2SC	0.0168
1.1SC, 3.3CC	0.0001
1.1SC, 3.4CC	0.0014
1.1SC, 4.1SC	0.0243
1.1SC, 4.2SC	0.0741
1.1SC, 4.3CC	0.0047
1.1SC, 4.4CC	0.0156
1.2SC, 1.3CC	0.0001
1.2SC, 1.4CC	0.0007
1.2SC, 2.1SC	0.001
1.2SC, 2.2SC	0.0003
1.2SC, 2.3CC	0.1036
1.2SC, 2.4CC	0.0002
1.2SC, 3.1SC	0.0022
1.2SC, 3.2SC	0.0028
1.2SC, 3.3CC	0.0001
1.2SC, 3.4CC	0.0009
1.2SC, 4.1SC	0.0203
1.2SC, 4.2SC	0.1819
1.2SC, 4.3CC	0.0013
1.2SC, 4.4CC	0.0227
1.3CC, 1.4CC	0.0002
1.3CC, 2.1SC	0.0006
1.3CC, 2.2SC	0.0006
1.3CC, 2.3CC	0.0005
1.3CC, 2.4CC	0.0018

...Continuação	
1.3CC, 3.1SC	0.0026
1.3CC, 3.2SC	0.0008
1.3CC, 3.3CC	0.0001
1.3CC, 3.4CC	0.1447
1.3CC, 4.1SC	0.001
1.3CC, 4.2SC	0.001
1.3CC, 4.3CC	0.0017
1.3CC, 4.4CC	0.0109
1.4CC, 2.1SC	0.0001
1.4CC, 2.2SC	0.0001
1.4CC, 2.3CC	0.01
1.4CC, 2.4CC	0.0001
1.4CC, 3.1SC	0.0002
1.4CC, 3.2SC	0.0003
1.4CC, 3.3CC	0.0001
1.4CC, 3.4CC	0.0003
1.4CC, 4.1SC	0.0007
1.4CC, 4.2SC	0.004
1.4CC, 4.3CC	0.0004
1.4CC, 4.4CC	0.0041
2.1SC, 2.2SC	0.0013
2.1SC, 2.3CC	0.0027
2.1SC, 2.4CC	0.0004
2.1SC, 3.1SC	0.0095
2.1SC, 3.2SC	0.0556
2.1SC, 3.3CC	0.0001
2.1SC, 3.4CC	0.0021
2.1SC, 4.1SC	0.4743
2.1SC, 4.2SC	0.2646
2.1SC, 4.3CC	0.0169
2.1SC, 4.4CC	0.1011
2.2SC, 2.3CC	0.0013
2.2SC, 2.4CC	0.0007
2.2SC, 3.1SC	0.021
2.2SC, 3.2SC	0.0038
2.2SC, 3.3CC	0.0001
2.2SC, 3.4CC	0.0028
2.2SC, 4.1SC	0.136
2.2SC, 4.2SC	0.1208

...Continuação	
2.2SC, 4.3CC	0.0389
2.2SC, 4.4CC	0.1557
2.3CC, 2.4CC	0.0007
2.3CC, 3.1SC	0.0017
2.3CC, 3.2SC	0.0051
2.3CC, 3.3CC	0.0001
2.3CC, 3.4CC	0.0008
2.3CC, 4.1SC	0.0122
2.3CC, 4.2SC	0.0571
2.3CC, 4.3CC	0.0023
2.3CC, 4.4CC	0.0151
2.4CC, 3.1SC	0.8521
2.4CC, 3.2SC	0.0004
2.4CC, 3.3CC	0.0001
2.4CC, 3.4CC	0.0082
2.4CC, 4.1SC	0.005
2.4CC, 4.2SC	0.0108
2.4CC, 4.3CC	0.3558
2.4CC, 4.4CC	0.8038
3.1SC, 3.2SC	0.0067
3.1SC, 3.3CC	0.0001
3.1SC, 3.4CC	0.0129
3.1SC, 4.1SC	0.0136
3.1SC, 4.2SC	0.0186
3.1SC, 4.3CC	0.4236
3.1SC, 4.4CC	0.8888
3.2SC, 3.3CC	0.0001
3.2SC, 3.4CC	0.002
3.2SC, 4.1SC	0.8544
3.2SC, 4.2SC	0.5224
3.2SC, 4.3CC	0.0088
3.2SC, 4.4CC	0.0754
3.3CC, 3.4CC	0.0001
3.3CC, 4.1SC	0.0001
3.3CC, 4.2SC	0.0001
3.3CC, 4.3CC	0.0001
3.3CC, 4.4CC	0.0001
3.4CC, 4.1SC	0.0021
3.4CC, 4.2SC	0.0031

...Continuação	
3.4CC, 4.3CC	0.0077
3.4CC, 4.4CC	0.042
4.1SC, 4.2SC	0.5223
4.1SC, 4.3CC	0.0242
4.1SC, 4.4CC	0.0886
4.2SC, 4.3CC	0.03
4.2SC, 4.4CC	0.0701
4.3CC, 4.4CC	0.5674
5.1SC, 5.2SC	0.186
5.1SC, 5.3CC	0.0052
5.1SC, 5.4CC	0.0001
5.2SC, 5.3CC	0.0127
5.2SC, 5.4CC	0.0002
5.3CC, 5.4CC	0.0001

Anexo E Tabela 2: Fungos, amostras de Campo e Laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1.1SC, 1.2SC	0.0001
1.1SC, 1.3CC	0.0002
1.1SC, 1.4CC	0.0007
1.1SC, 2.1SC	0.025
1.1SC, 2.2SC	0.0105
1.1SC, 2.3CC	0.0001
1.1SC, 2.4CC	0.0029
1.1SC, 3.1SC	0.0036
1.1SC, 3.2SC	0.1252
1.1SC, 3.3CC	0.0049
1.1SC, 3.4CC	0.0001
1.1SC, 4.1SC	0.0044
1.1SC, 4.2SC	0.002
1.1SC, 4.3CC	0.0072
1.1SC, 4.4CC	0.0025
1.2SC, 1.3CC	0.7607
1.2SC, 1.4CC	0.0008
1.2SC, 2.1SC	0.0103
1.2SC, 2.2SC	0.0879
1.2SC, 2.3CC	0.0001
1.2SC, 2.4CC	0.0005
1.2SC, 3.1SC	0.0027

...Continuação	
1.2SC, 3.2SC	0.0127
1.2SC, 3.3CC	0.0009
1.2SC, 3.4CC	0.0001
1.2SC, 4.1SC	0.0029
1.2SC, 4.2SC	0.0011
1.2SC, 4.3CC	0.0008
1.2SC, 4.4CC	0.0022
1.3CC, 1.4CC	0.0029
1.3CC, 2.1SC	0.0101
1.3CC, 2.2SC	0.0836
1.3CC, 2.3CC	0.0001
1.3CC, 2.4CC	0.0002
1.3CC, 3.1SC	0.0032
1.3CC, 3.2SC	0.0108
1.3CC, 3.3CC	0.0009
1.3CC, 3.4CC	0.0001
1.3CC, 4.1SC	0.0026
1.3CC, 4.2SC	0.0015
1.3CC, 4.3CC	0.0009
1.3CC, 4.4CC	0.0023
1.4CC, 2.1SC	0.0139
1.4CC, 2.2SC	0.7864
1.4CC, 2.3CC	0.0001
1.4CC, 2.4CC	0.0002
1.4CC, 3.1SC	0.0024
1.4CC, 3.2SC	0.0238
1.4CC, 3.3CC	0.0017
1.4CC, 3.4CC	0.0001
1.4CC, 4.1SC	0.0031
1.4CC, 4.2SC	0.0014
1.4CC, 4.3CC	0.0015
1.4CC, 4.4CC	0.0026
2.1SC, 2.2SC	0.0124
2.1SC, 2.3CC	0.2074
2.1SC, 2.4CC	0.085
2.1SC, 3.1SC	0.1282
2.1SC, 3.2SC	0.0872
2.1SC, 3.3CC	0.1919
2.1SC, 3.4CC	0.0145

...Continuação	
2.1SC, 4.1SC	0.0444
2.1SC, 4.2SC	0.0162
2.1SC, 4.3CC	0.1242
2.1SC, 4.4CC	0.0133
2.2SC, 2.3CC	0.0003
2.2SC, 2.4CC	0.002
2.2SC, 3.1SC	0.0029
2.2SC, 3.2SC	0.0224
2.2SC, 3.3CC	0.0018
2.2SC, 3.4CC	0.0001
2.2SC, 4.1SC	0.0025
2.2SC, 4.2SC	0.0021
2.2SC, 4.3CC	0.002
2.2SC, 4.4CC	0.0023
2.3CC, 2.4CC	0.0073
2.3CC, 3.1SC	0.0169
2.3CC, 3.2SC	0.1209
2.3CC, 3.3CC	0.6376
2.3CC, 3.4CC	0.0001
2.3CC, 4.1SC	0.0115
2.3CC, 4.2SC	0.0028
2.3CC, 4.3CC	0.1579
2.3CC, 4.4CC	0.0045
2.4CC, 3.1SC	0.0096
2.4CC, 3.2SC	0.7667
2.4CC, 3.3CC	0.1509
2.4CC, 3.4CC	0.0001
2.4CC, 4.1SC	0.0068
2.4CC, 4.2SC	0.0033
2.4CC, 4.3CC	0.3797
2.4CC, 4.4CC	0.0036
3.1SC, 3.2SC	0.0121
3.1SC, 3.3CC	0.0163
3.1SC, 3.4CC	0.2978
3.1SC, 4.1SC	0.2783
3.1SC, 4.2SC	0.0914
3.1SC, 4.3CC	0.0146
3.1SC, 4.4CC	0.0574
3.2SC, 3.3CC	0.2357

...Continuação	
3.2SC, 3.4CC	0.0001
3.2SC, 4.1SC	0.0065
3.2SC, 4.2SC	0.0027
3.2SC, 4.3CC	0.4373
3.2SC, 4.4CC	0.004
3.3CC, 3.4CC	0.0004
3.3CC, 4.1SC	0.0094
3.3CC, 4.2SC	0.0053
3.3CC, 4.3CC	0.4943
3.3CC, 4.4CC	0.0045
3.4CC, 4.1SC	0.5464
3.4CC, 4.2SC	0.1389
3.4CC, 4.3CC	0.0002
3.4CC, 4.4CC	0.0761
4.1SC, 4.2SC	0.4965
4.1SC, 4.3CC	0.0106
4.1SC, 4.4CC	0.2318
4.2SC, 4.3CC	0.0027
4.2SC, 4.4CC	0.4965
4.3CC, 4.4CC	0.0047
5.1SC, 5.2SC	0.0127
5.1SC, 5.3CC	0.001
5.1SC, 5.4CC	0.4057
5.2SC, 5.3CC	0.0019
5.2SC, 5.4CC	0.3449
5.3CC, 5.4CC	0.0572

Anexo E Tabela 3: Fosfatase ácida, amostras de Campo e Laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1.1SC, 1.2SC	0.2349
1.1SC, 1.3CC	0.1048
1.1SC, 1.4CC	0.6286
1.1SC, 2.1SC	0.5515
1.1SC, 2.2SC	0.1217
1.1SC, 2.3CC	0.0262
1.1SC, 2.4CC	0.4323
1.1SC, 3.1SC	0.206
1.1SC, 3.2SC	0.077

...Continuação	
1.1SC, 3.3CC	0.2672
1.1SC, 3.4CC	0.5165
1.1SC, 4.1SC	0.0608
1.1SC, 4.2SC	0.0435
1.1SC, 4.3CC	0.1494
1.1SC, 4.4CC	0.0133
1.2SC, 1.3CC	0.3044
1.2SC, 1.4CC	0.3373
1.2SC, 2.1SC	0.0404
1.2SC, 2.2SC	0.3582
1.2SC, 2.3CC	0.0151
1.2SC, 2.4CC	0.2371
1.2SC, 3.1SC	0.9969
1.2SC, 3.2SC	0.1675
1.2SC, 3.3CC	0.0123
1.2SC, 3.4CC	0.1118
1.2SC, 4.1SC	0.1129
1.2SC, 4.2SC	0.0437
1.2SC, 4.3CC	0.5831
1.2SC, 4.4CC	0.0061
1.3CC, 1.4CC	0.11
1.3CC, 2.1SC	0.0107
1.3CC, 2.2SC	0.6462
1.3CC, 2.3CC	0.0011
1.3CC, 2.4CC	0.0025
1.3CC, 3.1SC	0.0878
1.3CC, 3.2SC	0.2843
1.3CC, 3.3CC	0.0037
1.3CC, 3.4CC	0.0607
1.3CC, 4.1SC	0.1939
1.3CC, 4.2SC	0.0161
1.3CC, 4.3CC	0.729
1.3CC, 4.4CC	0.0005
1.4CC, 2.1SC	0.2162
1.4CC, 2.2SC	0.1497
1.4CC, 2.3CC	0.0191
1.4CC, 2.4CC	0.7577
1.4CC, 3.1SC	0.2762
1.4CC, 3.2SC	0.07

...Continuação	
1.4CC, 3.3CC	0.0778
1.4CC, 3.4CC	0.2786
1.4CC, 4.1SC	0.0542
1.4CC, 4.2SC	0.0294
1.4CC, 4.3CC	0.1862
1.4CC, 4.4CC	0.0067
2.1SC, 2.2SC	0.0336
2.1SC, 2.3CC	0.0029
2.1SC, 2.4CC	0.0645
2.1SC, 3.1SC	0.0262
2.1SC, 3.2SC	0.0082
2.1SC, 3.3CC	0.4313
2.1SC, 3.4CC	0.7843
2.1SC, 4.1SC	0.0104
2.1SC, 4.2SC	0.0042
2.1SC, 4.3CC	0.0281
2.1SC, 4.4CC	0.0014
2.2SC, 2.3CC	0.3275
2.2SC, 2.4CC	0.1105
2.2SC, 3.1SC	0.3126
2.2SC, 3.2SC	0.9223
2.2SC, 3.3CC	0.0148
2.2SC, 3.4CC	0.07
2.2SC, 4.1SC	0.7733
2.2SC, 4.2SC	0.5798
2.2SC, 4.3CC	0.5714
2.2SC, 4.4CC	0.0887
2.3CC, 2.4CC	0.0004
2.3CC, 3.1SC	0.0021
2.3CC, 3.2SC	0.0171
2.3CC, 3.3CC	0.0012
2.3CC, 3.4CC	0.0209
2.3CC, 4.1SC	0.2303
2.3CC, 4.2SC	0.1479
2.3CC, 4.3CC	0.0344
2.3CC, 4.4CC	0.0132
2.4CC, 3.1SC	0.0563
2.4CC, 3.2SC	0.0047
2.4CC, 3.3CC	0.0158

...Continuação	
2.4CC, 3.4CC	0.1816
2.4CC, 4.1SC	0.0128
2.4CC, 4.2SC	0.0005
2.4CC, 4.3CC	0.0912
2.4CC, 4.4CC	0.0001
3.1SC, 3.2SC	0.0457
3.1SC, 3.3CC	0.0061
3.1SC, 3.4CC	0.1043
3.1SC, 4.1SC	0.0575
3.1SC, 4.2SC	0.0071
3.1SC, 4.3CC	0.4808
3.1SC, 4.4CC	0.0006
3.2SC, 3.3CC	0.0028
3.2SC, 3.4CC	0.0504
3.2SC, 4.1SC	0.4949
3.2SC, 4.2SC	0.1289
3.2SC, 4.3CC	0.3927
3.2SC, 4.4CC	0.0029
3.3CC, 3.4CC	0.8288
3.3CC, 4.1SC	0.0023
3.3CC, 4.2SC	0.002
3.3CC, 4.3CC	0.0088
3.3CC, 4.4CC	0.0007
3.4CC, 4.1SC	0.041
3.4CC, 4.2SC	0.0299
3.4CC, 4.3CC	0.0815
3.4CC, 4.4CC	0.012
4.1SC, 4.2SC	0.6741
4.1SC, 4.3CC	0.2389
4.1SC, 4.4CC	0.0296
4.2SC, 4.3CC	0.094
4.2SC, 4.4CC	0.0088
4.3CC, 4.4CC	0.0092
5.1SC, 5.2SC	0.0005
5.1SC, 5.3CC	0.069
5.1SC, 5.4CC	0.0616
5.2SC, 5.3CC	0.0004
5.2SC, 5.4CC	0.0002
5.3CC, 5.4CC	0.7053

Anexo E Tabela 4: Fosfatase alcalina, amostras de Campo e Laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1.1SC, 1.2SC	0.0404
1.1SC, 1.3CC	0.0929
1.1SC, 1.4CC	0.1479
1.1SC, 2.1SC	0.0377
1.1SC, 2.2SC	0.959
1.1SC, 2.3CC	0.5246
1.1SC, 2.4CC	0.0048
1.1SC, 3.1SC	0.0609
1.1SC, 3.2SC	0.0738
1.1SC, 3.3CC	0.0092
1.1SC, 3.4CC	0.0684
1.1SC, 4.1SC	0.2255
1.1SC, 4.2SC	0.0619
1.1SC, 4.3CC	0.1877
1.1SC, 4.4CC	0.0293
1.2SC, 1.3CC	0.9952
1.2SC, 1.4CC	0.8122
1.2SC, 2.1SC	0.5861
1.2SC, 2.2SC	0.0489
1.2SC, 2.3CC	0.0229
1.2SC, 2.4CC	0.1678
1.2SC, 3.1SC	0.2295
1.2SC, 3.2SC	0.5477
1.2SC, 3.3CC	0.1308
1.2SC, 3.4CC	0.8935
1.2SC, 4.1SC	0.8479
1.2SC, 4.2SC	0.847
1.2SC, 4.3CC	0.4153
1.2SC, 4.4CC	0.0071
1.3CC, 1.4CC	0.8321
1.3CC, 2.1SC	0.646
1.3CC, 2.2SC	0.1016
1.3CC, 2.3CC	0.0609
1.3CC, 2.4CC	0.2607
1.3CC, 3.1SC	0.2519
1.3CC, 3.2SC	0.5835
1.3CC, 3.3CC	0.1882

...Continuação	
1.3CC, 3.4CC	0.9113
1.3CC, 4.1SC	0.8562
1.3CC, 4.2SC	0.8783
1.3CC, 4.3CC	0.4944
1.3CC, 4.4CC	0.0217
1.4CC, 2.1SC	0.5243
1.4CC, 2.2SC	0.1645
1.4CC, 2.3CC	0.1043
1.4CC, 2.4CC	0.2118
1.4CC, 3.1SC	0.2148
1.4CC, 3.2SC	0.4903
1.4CC, 3.3CC	0.1524
1.4CC, 3.4CC	0.7464
1.4CC, 4.1SC	0.7577
1.4CC, 4.2SC	0.9215
1.4CC, 4.3CC	0.6605
1.4CC, 4.4CC	0.0358
2.1SC, 2.2SC	0.0441
2.1SC, 2.3CC	0.023
2.1SC, 2.4CC	0.5
2.1SC, 3.1SC	0.3403
2.1SC, 3.2SC	0.8429
2.1SC, 3.3CC	0.3006
2.1SC, 3.4CC	0.7179
2.1SC, 4.1SC	0.9134
2.1SC, 4.2SC	0.5038
2.1SC, 4.3CC	0.2442
2.1SC, 4.4CC	0.0095
2.2SC, 2.3CC	0.5537
2.2SC, 2.4CC	0.0055
2.2SC, 3.1SC	0.068
2.2SC, 3.2SC	0.0817
2.2SC, 3.3CC	0.0132
2.2SC, 3.4CC	0.0748
2.2SC, 4.1SC	0.2351
2.2SC, 4.2SC	0.0708
2.2SC, 4.3CC	0.222
2.2SC, 4.4CC	0.0495
2.3CC, 2.4CC	0.0019

...Continuação	
2.3CC, 3.1SC	0.0494
2.3CC, 3.2SC	0.0521
2.3CC, 3.3CC	0.0088
2.3CC, 3.4CC	0.0403
2.3CC, 4.1SC	0.1805
2.3CC, 4.2SC	0.0321
2.3CC, 4.3CC	0.1171
2.3CC, 4.4CC	0.0157
2.4CC, 3.1SC	0.4794
2.4CC, 3.2SC	0.7649
2.4CC, 3.3CC	0.519
2.4CC, 3.4CC	0.292
2.4CC, 4.1SC	0.6377
2.4CC, 4.2SC	0.1402
2.4CC, 4.3CC	0.0611
2.4CC, 4.4CC	0.0005
3.1SC, 3.2SC	0.4373
3.1SC, 3.3CC	0.7088
3.1SC, 3.4CC	0.2624
3.1SC, 4.1SC	0.3922
3.1SC, 4.2SC	0.2166
3.1SC, 4.3CC	0.1491
3.1SC, 4.4CC	0.0288
3.2SC, 3.3CC	0.4962
3.2SC, 3.4CC	0.6484
3.2SC, 4.1SC	0.8204
3.2SC, 4.2SC	0.4852
3.2SC, 4.3CC	0.2825
3.2SC, 4.4CC	0.0226
3.3CC, 3.4CC	0.1979
3.3CC, 4.1SC	0.458
3.3CC, 4.2SC	0.1137
3.3CC, 4.3CC	0.0601
3.3CC, 4.4CC	0.0038
3.4CC, 4.1SC	0.9078
3.4CC, 4.2SC	0.7669
3.4CC, 4.3CC	0.4095
3.4CC, 4.4CC	0.0133
4.1SC, 4.2SC	0.7742

...Continuação	
4.1SC, 4.3CC	0.5482
4.1SC, 4.4CC	0.1019
4.2SC, 4.3CC	0.5152
4.2SC, 4.4CC	0.0079
4.3CC, 4.4CC	0.0291
5.1SC, 5.2SC	0.0276
5.1SC, 5.3CC	0.0035
5.1SC, 5.4CC	0.0882
5.2SC, 5.3CC	0.2758
5.2SC, 5.4CC	0.5782
5.3CC, 5.4CC	0.1475

Anexo E Tabela 5: Catalase, amostras de campo e laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1.1SC, 1.2SC	0.3857
1.1SC, 1.3CC	0.7298
1.1SC, 1.4CC	0.0731
1.1SC, 2.1SC	0.3101
1.1SC, 2.2SC	0.4855
1.1SC, 2.3CC	0.5553
1.1SC, 2.4CC	0.3599
1.1SC, 3.1SC	0.863
1.1SC, 3.2SC	0.2227
1.1SC, 3.3CC	0.689
1.1SC, 3.4CC	0.0764
1.1SC, 4.1SC	0.0246
1.1SC, 4.2SC	0.0329
1.1SC, 4.3CC	0.0438
1.1SC, 4.4CC	0.0536
1.2SC, 1.3CC	0.2123
1.2SC, 1.4CC	0.2873
1.2SC, 2.1SC	0.7247
1.2SC, 2.2SC	0.7656
1.2SC, 2.3CC	0.1409
1.2SC, 2.4CC	0.7206
1.2SC, 3.1SC	0.3932
1.2SC, 3.2SC	0.4726
1.2SC, 3.3CC	0.4078

...Continuação	
1.2SC, 3.4CC	0.2551
1.2SC, 4.1SC	0.0084
1.2SC, 4.2SC	0.0083
1.2SC, 4.3CC	0.0148
1.2SC, 4.4CC	0.0197
1.3CC, 1.4CC	0.0355
1.3CC, 2.1SC	0.2093
1.3CC, 2.2SC	0.4015
1.3CC, 2.3CC	0.7808
1.3CC, 2.4CC	0.2666
1.3CC, 3.1SC	0.5408
1.3CC, 3.2SC	0.1649
1.3CC, 3.3CC	0.2918
1.3CC, 3.4CC	0.0365
1.3CC, 4.1SC	0.015
1.3CC, 4.2SC	0.0183
1.3CC, 4.3CC	0.0308
1.3CC, 4.4CC	0.0398
1.4CC, 2.1SC	0.6433
1.4CC, 2.2SC	0.8739
1.4CC, 2.3CC	0.0157
1.4CC, 2.4CC	0.7574
1.4CC, 3.1SC	0.0526
1.4CC, 3.2SC	0.9291
1.4CC, 3.3CC	0.0314
1.4CC, 3.4CC	0.8352
1.4CC, 4.1SC	0.0012
1.4CC, 4.2SC	0.0009
1.4CC, 4.3CC	0.002
1.4CC, 4.4CC	0.002
2.1SC, 2.2SC	0.9323
2.1SC, 2.3CC	0.1547
2.1SC, 2.4CC	0.9521
2.1SC, 3.1SC	0.3322
2.1SC, 3.2SC	0.6935
2.1SC, 3.3CC	0.3425
2.1SC, 3.4CC	0.5725
2.1SC, 4.1SC	0.0221
2.1SC, 4.2SC	0.0303

...Continuação	
2.1SC, 4.3CC	0.0311
2.1SC, 4.4CC	0.0392
2.2SC, 2.3CC	0.3608
2.2SC, 2.4CC	0.9663
2.2SC, 3.1SC	0.5164
2.2SC, 3.2SC	0.8464
2.2SC, 3.3CC	0.5387
2.2SC, 3.4CC	0.8136
2.2SC, 4.1SC	0.1232
2.2SC, 4.2SC	0.1306
2.2SC, 4.3CC	0.1561
2.2SC, 4.4CC	0.1641
2.3CC, 2.4CC	0.2217
2.3CC, 3.1SC	0.3383
2.3CC, 3.2SC	0.1365
2.3CC, 3.3CC	0.0999
2.3CC, 3.4CC	0.022
2.3CC, 4.1SC	0.0065
2.3CC, 4.2SC	0.0113
2.3CC, 4.3CC	0.0166
2.3CC, 4.4CC	0.027
2.4CC, 3.1SC	0.3776
2.4CC, 3.2SC	0.7686
2.4CC, 3.3CC	0.4106
2.4CC, 3.4CC	0.6805
2.4CC, 4.1SC	0.046
2.4CC, 4.2SC	0.0506
2.4CC, 4.3CC	0.0585
2.4CC, 4.4CC	0.0673
3.1SC, 3.2SC	0.23
3.1SC, 3.3CC	0.7662
3.1SC, 3.4CC	0.0582
3.1SC, 4.1SC	0.0056
3.1SC, 4.2SC	0.0075
3.1SC, 4.3CC	0.0117
3.1SC, 4.4CC	0.0179
3.2SC, 3.3CC	0.2407
3.2SC, 3.4CC	0.9731
3.2SC, 4.1SC	0.0313

...Continuação	
3.2SC, 4.2SC	0.0322
3.2SC, 4.3CC	0.0358
3.2SC, 4.4CC	0.0422
3.3CC, 3.4CC	0.0432
3.3CC, 4.1SC	0.0001
3.3CC, 4.2SC	0.0001
3.3CC, 4.3CC	0.0001
3.3CC, 4.4CC	0.0001
3.4CC, 4.1SC	0.0026
3.4CC, 4.2SC	0.0027
3.4CC, 4.3CC	0.0031
3.4CC, 4.4CC	0.0028
4.1SC, 4.2SC	0.3651
4.1SC, 4.3CC	0.0479
4.1SC, 4.4CC	0.0505
4.2SC, 4.3CC	0.1256
4.2SC, 4.4CC	0.1006
4.3CC, 4.4CC	0.3993
5.1SC, 5.2SC	0.021
5.1SC, 5.3CC	0.4136
5.1SC, 5.4CC	0.3999
5.2SC, 5.3CC	0.0091
5.2SC, 5.4CC	0.0017
5.3CC, 5.4CC	0.0045

Anexo E Tabela 6: FDA, amostras de campo e laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1.1SC, 1.2SC	0.0107
1.1SC, 1.3CC	0.0166
1.1SC, 1.4CC	0.0107
1.1SC, 2.1SC	0.0071
1.1SC, 2.2SC	0.0058
1.1SC, 2.3CC	0.0064
1.1SC, 2.4CC	0.0194
1.1SC, 3.1SC	0.0226
1.1SC, 3.2SC	0.0261
1.1SC, 3.3CC	0.0189
1.1SC, 3.4CC	0.0172

...Continuação	
1.1SC, 4.1SC	0.0256
1.1SC, 4.2SC	0.0586
1.1SC, 4.3CC	0.0083
1.1SC, 4.4CC	0.0224
1.2SC, 1.3CC	0.4966
1.2SC, 1.4CC	0.8332
1.2SC, 2.1SC	0.1921
1.2SC, 2.2SC	0.0316
1.2SC, 2.3CC	0.0369
1.2SC, 2.4CC	0.5495
1.2SC, 3.1SC	0.3119
1.2SC, 3.2SC	0.0055
1.2SC, 3.3CC	0.2942
1.2SC, 3.4CC	0.058
1.2SC, 4.1SC	0.3778
1.2SC, 4.2SC	0.184
1.2SC, 4.3CC	0.6741
1.2SC, 4.4CC	0.048
1.3CC, 1.4CC	0.5852
1.3CC, 2.1SC	0.2036
1.3CC, 2.2SC	0.0615
1.3CC, 2.3CC	0.106
1.3CC, 2.4CC	0.9332
1.3CC, 3.1SC	0.7764
1.3CC, 3.2SC	0.1721
1.3CC, 3.3CC	0.8002
1.3CC, 3.4CC	0.7296
1.3CC, 4.1SC	0.7819
1.3CC, 4.2SC	0.3834
1.3CC, 4.3CC	0.382
1.3CC, 4.4CC	0.4684
1.4CC, 2.1SC	0.1713
1.4CC, 2.2SC	0.0387
1.4CC, 2.3CC	0.0444
1.4CC, 2.4CC	0.6439
1.4CC, 3.1SC	0.3742
1.4CC, 3.2SC	0.0106
1.4CC, 3.3CC	0.3573
1.4CC, 3.4CC	0.1134

...Continuação	
1.4CC, 4.1SC	0.4284
1.4CC, 4.2SC	0.2064
1.4CC, 4.3CC	0.5457
1.4CC, 4.4CC	0.0724
2.1SC, 2.2SC	0.1172
2.1SC, 2.3CC	0.2493
2.1SC, 2.4CC	0.218
2.1SC, 3.1SC	0.1167
2.1SC, 3.2SC	0.0013
2.1SC, 3.3CC	0.1025
2.1SC, 3.4CC	0.0078
2.1SC, 4.1SC	0.1788
2.1SC, 4.2SC	0.1029
2.1SC, 4.3CC	0.2305
2.1SC, 4.4CC	0.0112
2.2SC, 2.3CC	0.2597
2.2SC, 2.4CC	0.0632
2.2SC, 3.1SC	0.0397
2.2SC, 3.2SC	0.0021
2.2SC, 3.3CC	0.0344
2.2SC, 3.4CC	0.0049
2.2SC, 4.1SC	0.0632
2.2SC, 4.2SC	0.0426
2.2SC, 4.3CC	0.0401
2.2SC, 4.4CC	0.0088
2.3CC, 2.4CC	0.1112
2.3CC, 3.1SC	0.0595
2.3CC, 3.2SC	0.0005
2.3CC, 3.3CC	0.0517
2.3CC, 3.4CC	0.0017
2.3CC, 4.1SC	0.1033
2.3CC, 4.2SC	0.0667
2.3CC, 4.3CC	0.0271
2.3CC, 4.4CC	0.0044
2.4CC, 3.1SC	0.7141
2.4CC, 3.2SC	0.1382
2.4CC, 3.3CC	0.7309
2.4CC, 3.4CC	0.6369
2.4CC, 4.1SC	0.7214

...Continuação	
2.4CC, 4.2SC	0.3502
2.4CC, 4.3CC	0.4306
2.4CC, 4.4CC	0.3879
3.1SC, 3.2SC	0.2642
3.1SC, 3.3CC	0.9647
3.1SC, 3.4CC	0.9703
3.1SC, 4.1SC	0.9762
3.1SC, 4.2SC	0.4889
3.1SC, 4.3CC	0.2252
3.1SC, 4.4CC	0.6666
3.2SC, 3.3CC	0.2052
3.2SC, 3.4CC	0.015
3.2SC, 4.1SC	0.3679
3.2SC, 4.2SC	0.9539
3.2SC, 4.3CC	0.0013
3.2SC, 4.4CC	0.1992
3.3CC, 3.4CC	0.9773
3.3CC, 4.1SC	0.942
3.3CC, 4.2SC	0.4528
3.3CC, 4.3CC	0.2049
3.3CC, 4.4CC	0.5961
3.4CC, 4.1SC	0.9458
3.4CC, 4.2SC	0.4087
3.4CC, 4.3CC	0.0144
3.4CC, 4.4CC	0.3716
4.1SC, 4.2SC	0.5306
4.1SC, 4.3CC	0.3015
4.1SC, 4.4CC	0.7495
4.2SC, 4.3CC	0.1417
4.2SC, 4.4CC	0.6065
4.3CC, 4.4CC	0.0236
5.1SC, 5.2SC	0.0081
5.1SC, 5.3CC	0.1568
5.1SC, 5.4CC	0.0988
5.2SC, 5.3CC	0.0012
5.2SC, 5.4CC	0.0663
5.3CC, 5.4CC	0.0211

Anexo E Tabela 7: Fosforo, amostras de campo e laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1.1SC, 1.2SC	0.2895
1.1SC, 1.3CC	0.9034
1.1SC, 1.4CC	0.9638
1.1SC, 2.1SC	0.3409
1.1SC, 2.2SC	0.115
1.1SC, 2.3CC	0.1219
1.1SC, 2.4CC	0.2543
1.1SC, 3.1SC	0.3757
1.1SC, 3.2SC	0.1615
1.1SC, 3.3CC	0.1737
1.1SC, 3.4CC	0.2003
1.1SC, 4.1SC	0.1649
1.1SC, 4.2SC	0.7551
1.1SC, 4.3CC	0.7
1.1SC, 4.4CC	0.1459
1.2SC, 1.3CC	0.2955
1.2SC, 1.4CC	0.2813
1.2SC, 2.1SC	0.8058
1.2SC, 2.2SC	0.233
1.2SC, 2.3CC	0.2823
1.2SC, 2.4CC	0.9056
1.2SC, 3.1SC	0.4652
1.2SC, 3.2SC	0.5514
1.2SC, 3.3CC	0.5584
1.2SC, 3.4CC	0.8499
1.2SC, 4.1SC	0.0672
1.2SC, 4.2SC	0.2682
1.2SC, 4.3CC	0.216
1.2SC, 4.4CC	0.0618
1.3CC, 1.4CC	0.9321
1.3CC, 2.1SC	0.3669
1.3CC, 2.2SC	0.101
1.3CC, 2.3CC	0.1152
1.3CC, 2.4CC	0.2533
1.3CC, 3.1SC	0.3929
1.3CC, 3.2SC	0.1595
1.3CC, 3.3CC	0.157

...Continuação	
1.3CC, 3.4CC	0.2026
1.3CC, 4.1SC	0.1447
1.3CC, 4.2SC	0.8519
1.3CC, 4.3CC	0.787
1.3CC, 4.4CC	0.126
1.4CC, 2.1SC	0.3458
1.4CC, 2.2SC	0.0977
1.4CC, 2.3CC	0.111
1.4CC, 2.4CC	0.2411
1.4CC, 3.1SC	0.3569
1.4CC, 3.2SC	0.149
1.4CC, 3.3CC	0.1506
1.4CC, 3.4CC	0.1951
1.4CC, 4.1SC	0.1543
1.4CC, 4.2SC	0.778
1.4CC, 4.3CC	0.7194
1.4CC, 4.4CC	0.1352
2.1SC, 2.2SC	0.1824
2.1SC, 2.3CC	0.2133
2.1SC, 2.4CC	0.7124
2.1SC, 3.1SC	0.6648
2.1SC, 3.2SC	0.4062
2.1SC, 3.3CC	0.3886
2.1SC, 3.4CC	0.6121
2.1SC, 4.1SC	0.078
2.1SC, 4.2SC	0.3481
2.1SC, 4.3CC	0.3017
2.1SC, 4.4CC	0.0613
2.2SC, 2.3CC	0.8114
2.2SC, 2.4CC	0.2185
2.2SC, 3.1SC	0.0231
2.2SC, 3.2SC	0.1161
2.2SC, 3.3CC	0.1186
2.2SC, 3.4CC	0.0602
2.2SC, 4.1SC	0.042
2.2SC, 4.2SC	0.0642
2.2SC, 4.3CC	0.0265
2.2SC, 4.4CC	0.0333
2.3CC, 2.4CC	0.268

...Continuação	
2.3CC, 3.1SC	0.0346
2.3CC, 3.2SC	0.1968
2.3CC, 3.3CC	0.1924
2.3CC, 3.4CC	0.103
2.3CC, 4.1SC	0.0432
2.3CC, 4.2SC	0.0679
2.3CC, 4.3CC	0.0357
2.3CC, 4.4CC	0.0361
2.4CC, 3.1SC	0.3281
2.4CC, 3.2SC	0.5962
2.4CC, 3.3CC	0.5991
2.4CC, 3.4CC	0.9644
2.4CC, 4.1SC	0.0693
2.4CC, 4.2SC	0.2189
2.4CC, 4.3CC	0.1573
2.4CC, 4.4CC	0.0522
3.1SC, 3.2SC	0.003
3.1SC, 3.3CC	0.0026
3.1SC, 3.4CC	0.0045
3.1SC, 4.1SC	0.0668
3.1SC, 4.2SC	0.3449
3.1SC, 4.3CC	0.17
3.1SC, 4.4CC	0.0593
3.2SC, 3.3CC	1
3.2SC, 3.4CC	0.0045
3.2SC, 4.1SC	0.048
3.2SC, 4.2SC	0.0974
3.2SC, 4.3CC	0.0331
3.2SC, 4.4CC	0.0398
3.3CC, 3.4CC	0.0034
3.3CC, 4.1SC	0.0514
3.3CC, 4.2SC	0.0926
3.3CC, 4.3CC	0.0302
3.3CC, 4.4CC	0.0418
3.4CC, 4.1SC	0.0549
3.4CC, 4.2SC	0.1297
3.4CC, 4.3CC	0.0491
3.4CC, 4.4CC	0.0439
4.1SC, 4.2SC	0.1056

...Continuação	
4.1SC, 4.3CC	0.0952
4.1SC, 4.4CC	0.9638
4.2SC, 4.3CC	0.9388
4.2SC, 4.4CC	0.0943
4.3CC, 4.4CC	0.0828
5.1SC, 5.2SC	0.017
5.1SC, 5.3CC	0.0143
5.1SC, 5.4CC	0.0149
5.2SC, 5.3CC	0.0517
5.2SC, 5.4CC	0.1768
5.3CC, 5.4CC	0.0955

Anexo E Tabela 8: M.O., amostras de campo e laboratório

Grupos de amostras	P(MC)
1.2SC, 1.4CC	0.42
1.2SC, 2.2SC	0.6987
1.2SC, 2.4CC	0.9886
1.2SC, 3.2SC	0.3077
1.2SC, 3.4CC	0.2849
1.2SC, 4.2SC	0.2453
1.2SC, 4.4CC	0.7992
1.4CC, 2.2SC	0.55
1.4CC, 2.4CC	0.1042
1.4CC, 3.2SC	0.3891
1.4CC, 3.4CC	0.3946
1.4CC, 4.2SC	0.3065
1.4CC, 4.4CC	0.2646
2.2SC, 2.4CC	0.5315
2.2SC, 3.2SC	0.3344
2.2SC, 3.4CC	0.3285
2.2SC, 4.2SC	0.2764
2.2SC, 4.4CC	0.8117
2.4CC, 3.2SC	0.135
2.4CC, 3.4CC	0.1616
2.4CC, 4.2SC	0.1341
2.4CC, 4.4CC	0.6262
3.2SC, 3.4CC	0.874
3.2SC, 4.2SC	0.7105
3.2SC, 4.4CC	0.2145
3.4CC, 4.2SC	0.8386
3.4CC, 4.4CC	0.2227
4.2SC, 4.4CC	0.1903
4.2SC, 5.2SC	0.8195
5.2SC, 5.4CC	0.6719

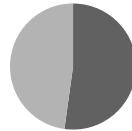
Anexo F

Sem tratamento

Dia 0



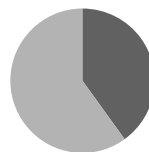
Dia 66



Dia 101



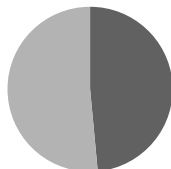
Dia 143



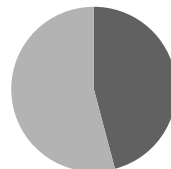
■ F. ácida
■ F. alcalina

Com tratamento

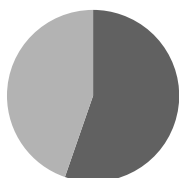
Dia 0



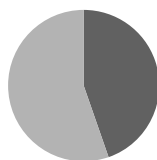
Dia 66



Dia 101



Dia 143



■ F. ácida
■ F. alcalina