



**Daniela Gomes
Fernandes**

**Características bioquímicas de solos degradados de
áreas mineiras – efeitos da reabilitação**



**Daniela Gomes
Fernandes**

**Características bioquímicas de solos degradados de
áreas mineiras – efeitos da reabilitação**

Tese 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 da Doutora Ana Paula Duarte Gomes, Professora Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro e coorientação científica do Doutor Flávio Gonzaga Castro Santos Silva, Investigador Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento e Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro

Este trabalho foi realizado no âmbito das atividades do projeto “No Waste – Management of biomass ash and organic waste in the recovery of degraded soils: A pilot project set in Portugal”
LIFE14 ENV/PT/000369.
Este projeto recebeu fundos da União Europeia.

Ao meu avô, que sempre acreditou no futuro promissor dos seus netos

o júri

presidente

Professor Doutor Mário Miguel Azevedo Cerqueira
Professor auxiliar da Universidade de Aveiro

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

Doutor Flávio Gonzaga Castro Santos Silva
Investigador Doutorado (nível 1) da Universidade de Aveiro (co-orientador)

agradecimentos

A conclusão desta etapa tão importante da minha vida não teria sido possível sem o amor e apoio de algumas pessoas, às quais estou eternamente grata:

Sem dúvida, um grande obrigado pela co-orientação e apoio incondicional do Doutor Flávio, que esteve sempre ao meu lado ao longo destes meses e tanto me ensinou,

À professora Paula pelo carinho e orientação dada ao longo deste trabalho,

Aos meus pais, por todos os sacrifícios que fizeram para me proporcionar a oportunidade de chegar até aqui,

Ao meu irmão, por nunca duvidar das capacidades da mana,

Às amigas que esta universidade me deu, que vou levar comigo para a vida, e sem as quais este percurso não seria o mesmo

Às amigas que vêm comigo desde sempre, e que me ajudaram a seguir em frente mesmo quando achava que era impossível

Finalmente, um obrigado muito especial às minhas meninas: Gabi, Jessie, Mônica e Joaquina. Vocês foram, sem dúvida, o melhor apoio que podia ter tido ao longo destes anos!

palavras-chave

reabilitação de solos degradados, atividade mineira, cinza de combustão de biomassa, lamas biológicas, respiração basal, biomassa microbiana

resumo

O solo desempenha funções importantes no contexto dos atuais desafios ambientais, incluindo a regulação dos ciclos biogeoquímicos. Uma das principais fontes de degradação dos solos é a atividade mineira e posterior abandono, sendo esta responsável pela deterioração da sua qualidade e fertilidade, nomeadamente através da depleção de nutrientes, matéria orgânica e atividade microbiana.

O presente estudo teve por objetivo contribuir para o projeto LIFE No_Waste (LNW) que se encontra a testar novas soluções para os problemas de degradação dos solos associados à atividade mineira em Portugal, visando a reabilitação de algumas funções do solo. O efeito de dois aditivos - cinzas de biomassa e lamas biológicas provenientes da indústria da pasta de papel (combinados ou separados, estabilizados e não estabilizados) - aplicados na regeneração de três solos de minas degradadas na Faixa Piritosa Ibérica foi avaliado *ex situ* em amostras recolhidas no projecto-piloto, nomeadamente por quantificação sazonal da respiração basal, biomassa microbiana, conteúdo de carbono e de macronutrientes enquanto indicadores de recuperação dos solos. A aplicação dos aditivos teve um efeito positivo na respiração basal (RB) e na biomassa microbiana (BCM) (aumento até 82% e 70% respetivamente com aplicação de cinza granulada e lama compostada). As concentrações de todos os macronutrientes também aumentaram quando comparadas com o controlo, ainda que a sua biodisponibilidade tenha diminuído ao longo do tempo. Os tratamentos contendo apenas cinzas não permitiram aumentar o conteúdo de azoto dos solos. A concentração de carbono solúvel em água quente (HWC) aumentou com aplicação de aditivos, sendo a aplicação de lamas e cinzas a mais eficaz no aumento do conteúdo de carbono (entre 2 e 18 vezes mais do que nos talhões de controlo) O teor de carbono solúvel em água fria (WSC) também aumentou com a aplicação de lamas e cinzas tal e qual (entre 3 e 7 vezes mais). Verificou-se ainda uma correlação aproximadamente linear entre a RB do solo e os teores de BCM, WSC/HWC e N.

Finalmente, a sazonalidade das amostragens teve efeito notório nas concentrações das diferentes variáveis, e não se verificaram diferenças significativas entre o comportamento bioquímico dos diferentes solos.

Este trabalho permitiu demonstrar que a aplicação de cinzas de biomassa é benéfica na reabilitação de solos degradados de minas - refletido pelo aumento dos indicadores testados e pela diminuição do quociente metabólico (qCO_2) - e ainda que a incorporação de aditivos orgânicos (lamas biológicas) permitiu aumentar significativamente a resposta microbiológica e os *stocks* de nutrientes.

keywords

rehabilitation of degraded soils, mining activity, biomass ashes, biological sludge, basal respiration, microbial biomass

abstract

Soil plays important roles in context of current environmental challenges, including the regulation of biogeochemical cycles. One of the main sources of soil degradation is mining activity and its subsequent abandonment, which is responsible for the deterioration of soil quality and fertility, namely through depletion of nutrients, organic matter and microbial activity.

This study aims to contribute to the LIFE No_Waste (LNW) project, which is testing new solutions for soil degradation associated with mining activity in Portugal, aiming at the rehabilitation of some soil functions. The effect of two additives - biomass ashes and biological sludge from the pulp and paper industry (combined or separated, stabilized and unstabilized) applied for regeneration of three soils from degraded mines in the Iberian Pirite Belt was evaluated *ex situ* in samples collected in the pilot project, namely by seasonal quantification of basal respiration, microbial biomass, carbon and macronutrients content as indicators of soil recovery.

The application of the additives had a positive effect on basal respiration and on microbial biomass (up to 82% and 70% respectively with application of granulated ash and composted sludge). The concentrations of all macronutrients also increased when compared to the control, although their bioavailability has decreased over time. Treatments containing ash only did not allow increase the nitrogen content of the soils. Hot water soluble carbon (HWC) concentration increased with the application of the additives, with ash and sludge application most contributing for the increase in carbon content (c.a. 2- to 18-fold as compared with the control plots). Water soluble carbon (WSC) content also increased with the addition of ash and sludge not stabilized (c.a. 3- to 7-fold). An approximately linear correlation between soil RB and the content of BCM, WSC/HWC and N was also verified.

Finally, the seasonality of sampling had a notorious effect on the concentration of the different variables and there were non-significant differences between the biochemical behavior of the three different soils.

This study allowed to demonstrate that the application of biomass ash is beneficial in the rehabilitation of degraded mining soils of mines – reflected by the increase in the indicators tested and decrease in the metabolic quotient (qCO_2) - as also the incorporation of organic additives (biological sludge) allowed to significantly increase the microbiological response and the nutrient stocks.

Índice

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas.....	x
Abreviaturas	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Problemática dos solos degradados em áreas mineiras.....	2
1.2. Objetivos	3
1.3. Estrutura da dissertação	3
2. Revisão bibliográfica.....	5
2.1. Papel da microbiologia na qualidade do solo e nos ciclos de carbono e nutrientes....	5
2.2. Atividade mineira como fonte de degradação das funções do solo e sua qualidade ..	8
2.3. Utilização dos aditivos (cinzas e lamas biológicas) para reabilitação de solos degradados	10
3. Metodologia	13
3.1. Desenho experimental.....	13
3.2. Recolha e processamento de amostras	15
3.3. Métodos analíticos	15
3.4. Tratamento de resultados	22
4. Resultados e discussão	25
4.1. Respiração basal (RB).....	25
4.2. Biomassa C-microbiana (BCM) e biomassa N-microbiana (BNM).....	29
4.3. Carbono solúvel em água fria (WSC) e carbono solúvel em água quente (HWC)...	35
4.4. Macronutrientes disponíveis	39
5. Conclusões	49
6. Sugestões para trabalhos futuros	51
7. Referências bibliográfica.....	53

Índice de Figuras

Figura 1: Talhões experimentais desenvolvidos pelo projeto LIFE_No Waste, em minas de São Domingos, Maio de 2018 Fonte: (LIFE No_Waste, 2019).	13
Figura 2: Esquema do projeto-piloto LIFE_No Waste.	14
Figura 3: Determinação da respiração basal dos solos - sistema Oxitop	17
Figura 4: Fumigação das amostras com clorofórmio	18
Figura 5: Equipamento utilizado para determinação de HWC, WSC e Biomassa C-microbiana.	19
Figura 6: Unidade de digestão FOSS (esquerda), unidade scrubber (centro) e unidade de destilação VELP (direita)	20
Figura 7: Passos metodológicos para determinação de HWC e WSC (Fonte: Ghani, Dexter, & Perrott (2003))	21
Figura 8: Equipamento para extração de WSC e HWC: Agitador horizontal (esquerda); filtração da fração líquida das amostras (centro); banho quente (direita)	21
Figura 9: Curvas de respiração (expressas em $\mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ ss}$) na segunda campanha de amostragem.	27
Figura 10: Taxa de RB do solo nas três campanhas de amostragem	29
Figura 11: Concentração de BCM nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março	30
Figura 12: Quociente metabólico para os diferentes solos e campanhas	32
Figura 13: BCM, BNM e correspondente razão mássica	35
Figura 14: Evolução temporal dos valores obtidos de carbono solúvel em água quente	36
Figura 15: Evolução temporal dos valores obtidos de carbono solúvel em água fria	37
Figura 16: Relação entre carbono solúvel em água quente e a BCM.	38
Figura 17: Relação entre RB e carbono solúvel em água quente	39
Figura 18: Concentração de azoto nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março	40
Figura 19: Relação entre HWC e macronutriente N.	40
Figura 20: Relação entre RB e nutriente N.	42
Figura 21: Concentração de fósforo para os diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março	43
Figura 22: Concentração de cálcio nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março	44
Figura 23: Concentração de magnésio nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março	45
Figura 24: Concentração do sódio nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março	46
Figura 25: Concentração do potássio nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março	47

Índice de Tabelas

Tabela 1: Valores de pH medidos nas amostras recolhidas em outubro	14
Tabela 2: Variáveis determinadas e respetivo método analítico/protocolo utilizado.....	16
Tabela 3: Capacidade de retenção de água para os diferentes solos e tratamentos.....	25
Tabela 4: Análise de variância da concentração de BCM (raiz quadrada de BCM)	31
Tabela 5: Resumo Valores de RB, BCM e qCO ₂ teóricos e obtidos neste estudo;.....	33
Tabela 6: Análise de variância da concentração de WSC e HWC (ln(WSC) e ln(HWC))	37
Tabela 7: Análise de variância da concentração de N.....	42
Tabela 8: Análise de variância da concentração de P (raiz quadrada de P).....	43
Tabela 9: Análise de variância da concentração de cálcio e do magnésio (Mg ao quadrado).....	46
Tabela 10: Análise de variância da concentração do sódio (sem(Na)) e do potássio (sem(K))	47

Abreviaturas

LNW	Projeto LIFE No_Waste
A	Solo da mina de Aljustrel
L	Solo da mina de Lousal
SD	Solo da mina de São Domingos
WHC	Capacidade de retenção de água (<i>Water Holding Capacity</i>)
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
BCM	Biomassa C-microbiana
BNM	Biomassa N-microbiana
WSC	Carbono solúvel em água fria (<i>Water Soluble Carbon</i>)
HWC	Carbono solúvel em água quente (<i>Hot Water Extractable Carbon</i>)
ss	Solo seco

1. Introdução

Os sistemas vivos da Terra são suportados pelos recursos ar, água, solo e energia solar. O solo é essencial para a vida na terra, pois é a sua capacidade de sustentar os ciclos de carbono e nutrientes que permite o subsequente estabelecimento e manutenção de uma comunidade de plantas permanente e estável (Ingram et al., 2003). Definido como a interface entre a crosta terrestre, o ar e a água, (Comissão das Comunidades Europeias, 2006) – o solo engloba grande parte da biosfera, desempenhando um papel-chave nos atuais desafios ambientais, que incluem a redução da poluição da água, a mitigação das alterações climáticas e o controlo da perda de biodiversidade, assim como na provisão de alimentação e recursos necessários para a vida humana. Globalmente, todos os ecossistemas são direta ou indiretamente afetados pelos processos do solo (Weil & Brady, 2007).

A principal diferença entre a poluição do ar, da água e do solo é que, no ar e na água, a poluição tende a ser diluída, enquanto no solo a poluição tende a acumular-se. O solo age como um sumidouro de poluentes tóxicos, devido à sua capacidade de sorção de compostos químicos, exercendo um efeito tampão capaz de restringir a lixiviação de poluentes para as águas subterrâneas. O solo deixa de conseguir ter esse efeito quando as suas propriedades se alteraram a ponto de comprometer o exercício das suas funções de forma eficaz (Loureiro, 2004). Uma das atividades antropogénicas que mais contribui para a contaminação dos solos, com conseqüente degradação da qualidade e funções, é a atividade mineira, representando cerca de 2% da degradação do solo na Europa (LIFE No_Waste, 2019).

Ao longo desta dissertação, foi analisada a possibilidade de recuperar a qualidade de solos que ficaram abandonados e degradados após o fim da atividade de exploração mineira, através da reutilização de resíduos industriais (cinzas da queima de biomassa florestal e lamas biológicas provenientes da indústria de pasta de papel) como corretivos das propriedades do solo. Esta abordagem de valorização e reutilização de resíduos pode ser uma boa alternativa à sua deposição em aterros (Gómez-Rey et al., 2012).

1.1. Problemática dos solos degradados em áreas mineiras

A atividade mineira, conhecida por gerar resíduos de metais pesados e lixiviados ácidos, é uma das que mais impacte tem nos ecossistemas, uma vez que acarreta efeitos ambientais e socioeconómicos associados a todo o seu ciclo de vida e em todas as fases da mineração: exploração, projeto, planeamento e construção das minas, produção, transporte, fim-de-vida e recuperação (The 5 Stages of the Mining Life Cycle, 2015). Durante a fase de exploração de uma mina, ocorre o descarte e deposição de resíduos (escombreiras) na área envolvente, frequentemente sem controlo ou tratamento eficaz. Adicionalmente, a fase de recuperação é muitas vezes negligenciada, tornando a reabilitação do solo mais difícil (Silva et al., 2018).

Embora represente importantes benefícios económicos, a atividade mineira acarreta impactes ambientais que alteram significativamente a qualidade do solo, causando problemas ambientais, nomeadamente a contaminação das águas superficiais e subterrâneas, comprometendo a fauna e a flora. A depleção de matéria orgânica é outra consequência desta atividade, assim como mudanças prejudiciais na estrutura do solo conduzindo a fenómenos de erosão (Rolda, 2005). Desta forma, é urgente encontrar soluções sustentáveis, eficazes e economicamente viáveis que permitam a reabilitação dessas áreas e a preservação das funções do solo, nomeadamente aquelas respeitantes à depuração de água, regulação do ciclo hidrológico, fornecimento de matérias-primas e de nutrientes essenciais à produção vegetal e habitat de seres vivos.

O presente estudo desenvolveu-se no âmbito do projeto LIFE No_Waste (LNW), que em conformidade com a Estratégia Temática para Proteção do Solo COM(2006)231 (Comissão das Comunidades Europeias, 2006), está a testar novas soluções para os problemas de degradação dos solos associados à atividade mineira metalífera situada na Faixa Piritosa Ibérica do sul de Portugal. Este projeto visa a reabilitação de algumas das funções do solo, através da incorporação de resíduos industriais (cinzas volantes da queima de biomassa florestal e lamas biológicas provenientes da indústria de pasta de papel) para correção do pH, aporte de matéria orgânica e de nutrientes e aumento da capacidade de retenção de água do solo (LIFE No_Waste, 2019).

A avaliação dos efeitos dessas novas soluções de reabilitação é uma peça fundamental do referido projeto e, nesse sentido, o presente estudo debruça-se em particular sobre a atividade microbiológica do solo antes e depois da aplicação dos corretivos.

1.2. Objetivos

Esta dissertação teve como objetivo geral avaliar o efeito da aplicação de dois aditivos - cinzas volantes de biomassa e lamas provenientes da indústria da pasta de papel (combinados ou separados, estabilizados e não estabilizados) – utilizados para regeneração de solos de mina degradados – na resposta bioquímica do solo, visando a melhoria da sua qualidade/fertilidade.

Para isso, foram definidos alguns objetivos específicos, para os quais se pretendeu obter resposta nesta dissertação:

- Averiguar diferenças entre comportamentos bioquímicos de três solos degradados (solos das minas de Aljustrel, Lousal e São Domingos);
- Avaliar a resposta respirométrica e da biomassa microbiana presente nos solos recorrendo a diferentes tratamentos e em campanhas de amostragem distintas após a aplicação dos aditivos;
- Correlacionar a resposta microbiana com os teores de macronutrientes disponíveis em cada solo.

1.3. Estrutura da dissertação

A presente dissertação é constituída por 6 capítulos, sendo que inicialmente foi feita uma introdução e contextualização do tema, a sua interligação com o projeto LNW e a definição dos objetivos (Capítulo 1). No Capítulo 2 é apresentada uma revisão bibliográfica que se focou em trabalhos de investigação desenvolvidos sobre os principais pontos abordados neste estudo: microbiologia do solo, a atividade mineira como fonte de degradação, ciclos de N e C e a potencialidade de utilizar resíduos industriais como aditivos para regeneração das funções do solo. No Capítulo 3 é apresentada uma breve descrição do projeto-piloto (a decorrer na mina de São Domingos), dos métodos de recolha de amostras, da metodologia

analítica e tratamento dos resultados adotado para responder aos objetivos definidos. Os resultados obtidos e respectiva discussão são apresentados no Capítulo 4, as principais conclusões resumidas no Capítulo 5 e o Capítulo 6 dedicado à proposta de trabalhos futuros.

2. Revisão bibliográfica

Ao longo das secções deste capítulo foca-se a importância da microbiologia e do ciclo de nutrientes na qualidade do solo, salienta-se como a atividade mineira pode alterar estas propriedades do solo e como é possível a reabilitação de solo degradado através da incorporação de resíduos de origem industrial.

2.1. Papel da microbiologia na qualidade do solo e nos ciclos de carbono e nutrientes

Considerando a importância do solo enquanto recurso natural, e todas as funções que este assegura quando se encontra em condições naturais de qualidade e fertilidade, a sua proteção e manutenção devem ser uma prioridade. No entanto, devido ao desenvolvimento excessivo da população, este recurso tem vindo a ser degradado, resultando num desequilíbrio ecológico e, conseqüentemente, da qualidade natural do solo. A investigação científica tem vindo a reforçar a importância de estudar a bioquímica e a dinâmica da matéria orgânica associadas à atividade microbiana e à estrutura do solo como formas de avaliar a sua qualidade (Rolda, 2005).

A atividade microbiológica desempenha um papel chave nos ciclos biogeoquímicos do solo, uma vez que promove a decomposição e mineralização de matéria orgânica, o que permite manter os ciclos ecológicos naturais (Silva et al., 2018), tais como os ciclos de carbono, azoto e fósforo, por exemplo (Loureiro, 2004). A interação e compreensão destes ciclos são vitais para promover a qualidade do solo, a sua boa gestão, e uso mais racional de fertilizantes, prevenindo a poluição do ar e da água com origem no solo (Loureiro, 2004). Segundo Silva et al. (2018), os parâmetros microbiológicos são bioindicadores sensíveis da qualidade do solo, tendo vindo a ser utilizados para avaliar a reabilitação de solos degradados pela atividade de extração de minerais, de carvão e bauxite.

Na sua matriz, o solo é composto por frações sólidas, líquidas e gasosas. A fração sólida determina o volume disponível para as outras duas fases (solo-ar e solo-água). Um solo arenoso tem mais volume disponível para ser ocupado por ar e água, o que lhe confere uma maior capacidade de percolação e evaporação da água, com mudanças de humidade e

conteúdo de oxigênio. Em contraste, os solos argilosos têm poros capilares que retêm mais água, o que significa menos oxigênio e menor circulação de água. Estas propriedades afetam os microrganismos do solo, uma vez que influenciam o equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos e a distribuição desse tipo de organismos no solo: solos com um conteúdo elevado de oxigênio, por exemplo, apresentam também uma maior atividade microbiana (Buscot & Varma, 2005). Microrganismos como *Archaea*, *Bacteria*, *Algae e Fungi* têm o seu habitat no solo, o que lhe confere uma elevada complexidade em termos de diversidade microbiológica (Rolda, 2005).

Relativamente ao carbono, os solos são o principal reservatório natural deste elemento, contendo cerca de três quartos do carbono terrestre do planeta, a maioria do qual é retido pela vegetação, contribuindo assim de forma notável para o ciclo global do carbono (Johnston et al., 2004). A dinâmica do ciclo de carbono é uma relação entre a matéria orgânica do solo gerada pela vegetação e a sua decomposição, que devolve o carbono de volta à atmosfera na forma de CO₂ (Curiel Yuste et al., 2007). O ciclo de carbono inicia-se com a absorção de CO₂ presente na atmosfera pela vegetação, que é posteriormente processado através de processos fotossintéticos, levando à formação de compostos orgânicos contendo C, H, O, N e P (Loureiro, 2004). As plantas absorvem parte desses compostos, permitindo assim que estas respirem e se desenvolvam. As moléculas orgânicas residuais são armazenadas no solo, como parte da vegetação existente, tornando-se parte da matéria orgânica do solo e da deposição das raízes (Weil & Brady, 2007). Os animais, por sua vez, alimentam-se das plantas existentes nos solos enquanto fonte de energia. Através dos processos de excreção, ou até mesmo da decomposição dos animais após a sua morte, cerca de metade do carbono é devolvido à atmosfera na forma de CO₂. Os processos de decomposição são assegurados pelos microrganismos do solo que, metabolizando matéria orgânica complexa, libertam também carbono para a atmosfera na forma de CO₂ (Weil & Brady, 2007).

O azoto tem também um ciclo estreitamente relacionado com o solo. O azoto existe na atmosfera na forma molecular de N₂, contendo uma ligação tripla que lhe confere elevada estabilidade. Aliado a isso, é um gás não reativo, o que implica que as plantas não conseguem ter acesso direto a este nutriente (Loureiro, 2004). Assim, o azoto do solo é obtido através da fixação microbiana do azoto molecular pela adição de amónia, nitrato ou nitrito pela água da chuva, e/ou devido à deposição de matéria orgânica (tal como o

estrupe utilizado nas práticas agrícolas), permitindo assim que as plantas obtenham este elemento através da solução do solo ou através de permuta iónica. O solo perde azoto através da renovação das culturas, da lixiviação ou da volatilização. O ciclo completa-se com a desnitrificação biológica, que devolve nitrato e/ou nitrito na forma molecular de N_2 ou N_2O (Loureiro, 2004).

O fósforo é um nutriente de elevada importância para o crescimento das plantas, sendo relevante conhecer também o seu balanço no solo. O ciclo do fósforo envolve interações entre plantas e microrganismos. O fósforo existente na solução do solo (fração líquida) está em equilíbrio com o fósforo orgânico. À medida que este é absorvido pelas plantas ou imobilizado pelos microrganismos, ocorre uma solubilização do fósforo inorgânico. Ao contrário dos ciclos de C e N, o ciclo de P não tem uma componente gasosa, o que faz com que as trocas de fósforo entre solo e atmosfera sejam de menor importância. Além disso, este nutriente não é perdido por lixiviação, sendo a sua mobilização resultante de fatores como o pH ou a temperatura do solo (Loureiro, 2004).

A importância dos microrganismos do solo nestes ciclos é evidente, o que torna essencial conhecer as condições ideais em que estes se desenvolvem. Existem várias condições que podem afetar a atividade dos microrganismos do solo, e em última análise, o equilíbrio dos ciclos destes elementos: pH, humidade do solo, temperatura e teor de oxigénio (Weil & Brady, 2007).

Relativamente ao pH, se o solo for ácido, tal como os solos degradados de áreas mineiras, tanto as propriedades químicas como biológicas do solo serão afetadas, influenciando a capacidade de as raízes das plantas absorverem nutrientes e compostos tóxicos presentes no solo. Independentemente da temperatura, da humidade e do teor de oxigénio do solo, a diversidade microbiana tende a aumentar à medida que o pH também aumenta, geralmente até um valor máximo de 9 (Weil & Brady, 2007). Apesar de alguns procariontes poderem sobreviver em qualquer condição química, a acidez do solo determina o tipo de microrganismos que o constituem: por exemplo, as bactérias só se começam a desenvolver em solos com um pH superior a 5,5, enquanto que os fungos se distribuem de igual forma pelos valores de pH pertencentes à gama 4 a 9 (Weil & Brady, 2007).

Em suma, existem várias funções benéficas associadas à existência de organismos vivos no solo, destacando-se, por exemplo (Weil & Brady, 2007):

- Transformação da matéria orgânica e reciclagem de nutrientes (como o azoto e o fósforo): os microrganismos do solo utilizam esses nutrientes e, em seguida, devolvem-nos ao solo na sua forma inorgânica, convertendo formas de nutrientes organicamente ligadas em formas minerais, que são facilmente absorvidas pelas plantas.
- Absorção de compostos tóxicos que atingem o solo: esses compostos, que muitas vezes são introduzidos no solo por meio de atividades humanas, como a aplicação de agroquímicos, permanecem no solo, levando à sua contaminação (e dos corpos hídricos existentes), pondo em causa o desenvolvimento e a atividade dos microrganismos do solo devido a condições químicas adversas

2.2. Atividade mineira como fonte de degradação das funções do solo e sua qualidade

Entende-se por qualidade do solo a capacidade que este tem de desempenhar as suas funções dentro dos limites dos ecossistemas, garantindo a produtividade das plantas e animais e mantendo a qualidade do ar e água. Por outras palavras, qualidade do solo integra propriedades físicas, químicas e biológicas, o que permite que este desempenhe as suas funções de forma adequada, destacando-se a capacidade do solo assimilar, armazenar e reciclar água, nutrientes e energia (Vezzani & Mielniczuk, 2009).

Existem vários serviços de ecossistema desempenhados pelo solo de relevância para o equilíbrio e desenvolvimento da sociedade: provisionamento, regulação e suporte. Os serviços de provisionamento dizem respeito aos recursos que são fornecidos pelo solo, e que contribuem para a prosperidade e sobrevivência das populações: a vegetação do solo é uma fonte natural de bens essenciais como água, medicamentos, alimentos, fibras utilizadas em madeiras, papel e roupas. Apesar de algumas destas fibras poderem ser fabricadas a partir de polímeros sintéticos, esse tipo de material é baseado em recursos não renováveis (como os derivados de petróleo), o que não é sustentável a longo prazo. Desta forma, a Humanidade continuará a recorrer aos recursos naturais fornecidos pelo solo para suprir todas as suas necessidades (Weil & Brady, 2007).

Além disso, o solo contribui de forma significativa para a regulação do sistema hidrogeológico, uma vez que desempenha processos naturais de purificação de água e a

incorpora como humidade na sua constituição. É também neste compartimento que ocorre a decomposição e assimilação de resíduos provenientes, por exemplo, da morte de plantas e animais, em compostos mais simples que ficam disponíveis para serem reutilizados por outras formas vivas, tais como plantas e microrganismos. O solo ajuda ainda no controle de pragas e modifica a composição da atmosfera, uma vez que captura e liberta grandes quantidades de CO₂ e O₂ (Weil & Brady, 2007).

Com a crescente contaminação dos solos, a sustentabilidade destes serviços que suportam o bem-estar humano e o equilíbrio dos ecossistemas fica comprometida devido à degradação cada vez mais intensiva do solo. Ao contrário do que acontece com a poluição do ar e da água, a poluição dos solos não é, na maioria dos casos, visível, e por isso é frequentemente menosprezada. Apesar de o impacto visual não ser tão evidente, esta contaminação é tão ou mais perigosa, visto que põe em causa o crescimento de plantas e a sobrevivência dos animais, podendo ainda levar ao desenvolvimento de doenças nos seres humanos quando em contacto com solo contaminado.

Tal como foi referido, uma das atividades que mais contribui para esta degradação, tanto a nível físico como ecológico, é a extração mineira. Após o fim de vida das minas, o solo permanece desnutrido e com baixo valor de matéria orgânica e de pH. A acidez dos solos resulta da drenagem ácida que se forma e infiltra no solo devido ao contato da chuva com as várias substâncias tóxicas acumuladas no solo. Por sua vez, a alteração dos valores de pH limita a quantidade e diversidade de microrganismos que habitam o solo, tendo consequências em todas as funções principais asseguradas pelo solo, nomeadamente os ciclos de C, N e conteúdo de oxigénio (Weil & Brady, 2007).

O caso das minas de São Domingos, atualmente desativadas, onde se encontra a decorrer o projeto-piloto objeto desta dissertação, é um exemplo das alterações que ocorrem nos solos e no meio envolvente. A sua extensão mineira era de 600 ha, tendo sido extraídas cerca de 25 Mt de minério para a produção de ácido sulfúrico e de cobre. Com o fim de vida desta mina, resultaram diversas escombrelas e antigas áreas industriais abandonadas, assim como barragens e lagoas de águas ácidas e contaminadas por metais pesados (EDM, 2018)

Na atualidade, já foram estudadas e implementadas algumas soluções para ultrapassar alguns dos problemas associados à degradação de solos após atividade mineira. Entre elas, destaca-se a revegetação do solo que permite diminuir a taxa de erosão e aumentar a

capacidade de retenção de água, a plantação de árvores de crescimento rápido ou fixadoras de nitrogénio, assim como a aplicação de corretivos ao solo (Rolda, 2005).

2.3. Utilização dos aditivos (cinzas e lamas biológicas) para reabilitação de solos degradados

Uma das técnicas estudadas pelo LNW para reabilitação de solos degradados das minas foi a valorização por aplicação nos solos mineiros, de cinzas geradas durante os processos de combustão de biomassa florestal residual, especificamente as cinzas volantes, provenientes dos sistemas de despoeiramento dos gases de combustão, de agora em diante designadas simplesmente por cinzas.

As cinzas de biomassa florestal são consideradas um resíduo inorgânico, com uma elevada alcalinidade, ricas em cálcio, potássio e magnésio. Apesar de serem pobres em azoto e conterem baixas concentrações de fósforo (Gómez-Rey et al., 2012), estes resíduos podem representar um elevado valor acrescentado enquanto fonte de nutrientes para solos degradados, contribuindo para a recuperação de solos ácidos e promoção do crescimento das plantas (Nayak et al., 2014). A sua aplicação pode ainda atuar como corretivo do pH do solo, tornando-o menos adverso para o desenvolvimento da vegetação e de microrganismos.

Em Portugal, são produzidas mais de 150 mil toneladas de cinzas de biomassa florestal por ano que são maioritariamente redirecionadas para aterros, o que torna este material bastante acessível (LIFE No_Waste, 2019), com a vantagem de proceder à sua valorização como corretivo de solo, diminuindo os quantitativos encaminhados para aterro

Se por um lado as cinzas de biomassa florestal podem ser utilizadas para aumentar a disponibilidade e o balanço de nutrientes que são captados pela vegetação/árvores, por outro existem vários impactes ambientais resultantes da aplicação direta deste corretivo, que têm vindo a ser identificados (Gómez-Rey et al., 2012). Muitos estão associados a elementos potencialmente tóxicos presentes nas cinzas, tais como o B, Se, Mo, As, Cd e Ni, que poderão induzir toxicidade quando em concentrações elevadas (Nayak et al., 2014). Dependendo dos solos, a sua aplicação pode ainda aumentar a solubilidade do

carbono orgânico e a libertação de CO₂, bem como promover a nitrificação e lixiviação de azoto, pondo em risco as massas de água (Gómez-Rey et al., 2012). Além disso, as cinzas de biomassa florestal sem tratamento prévio são difíceis de aplicar no solo, podendo representar riscos de saúde para os operadores, devido às partículas finas facilmente transportadas pelo ar. Considerando ainda que são altamente reativas (o que pode aumentar de forma muito imediata o pH e a salinidade no solo) e que representam consequências adversas para a vegetação, tem vindo a ser recomendada a granulação/carbonatação e estabilização de cinzas de biomassa como operações prévias para aumentar o valor das cinzas de biomassa, diminuindo os seus riscos associados (Silva et al., 2019).

Por forma a contornar o aumento da lixiviação do N do solo, e tendo em conta que cinzas de combustão de biomassa são pobres neste nutriente, tem sido proposto a utilização de um fertilizante rico em N por forma a contrabalançar a imobilização do N e a colmatar a sua pouca abundância (Gómez-Rey et al., 2012).

Assim, juntamente com as cinzas, o projecto-piloto LNW utilizou lamas provenientes do tratamento biológico de efluentes industriais como segundo aditivo a aplicar aos solos degradados, funcionando este como uma fonte adicional de nutrientes, visando a recuperação de funções do solo, melhoria da capacidade de retenção de água e diminuição do nível de erosão do solo. Para além disso, as lamas obtidas após o tratamento biológico são ricas em azoto e fósforo (Reis, 2013), permitindo assim complementar as cinzas de queima de biomassa florestal.

Tal como acontece com as cinzas, é imperativo que haja um tratamento prévio das lamas industriais que vão ser aplicadas ao solo. No projeto LNW, utilizaram-se lamas biológicas em duas formas: tal e qual e compostadas. A compostagem (realizada em compostor de 300 L com estilha como agente de porosidade e com arejamento por convexão natural) permitiu estabilizar microbiologicamente a matéria orgânica presente na lama biológica. Desta forma foi possível verificar a influência que o processo de estabilização teve nos resultados.

Por forma a verificar se as medidas aplicadas estão de fato a melhorar a qualidade do solo degradado, é importante avaliar indicadores físicos, químicos e microbiológicos de forma periódica, pois estes permitem verificar não só a qualidade, mas também a sustentabilidade do ecossistema durante e após a aplicação de medidas de recuperação.

Os parâmetros bioquímicos, como a respiração basal e a biomassa microbiana contabilizada na forma de carbono, são de elevada importância, uma vez que representam a fração de matéria orgânica do solo que é mais sensível a práticas de gestão e a poluição, sendo considerado um indicador de qualidade do solo (Nayak et al., 2014). A sua avaliação, juntamente com os parâmetros químicos, concentração de carbono e de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Na), será alvo de estudo da presente dissertação.

3. Metodologia

Ao longo deste capítulo é apresentada mais detalhadamente a área experimental, assim como os aditivos utilizados e o efeito imediato verificado nos valores de pH nos solos. É também descrita a recolha e processamento de amostras, assim como dos métodos analíticos selecionados para determinação das variáveis.

3.1. Desenho experimental

Em maio de 2018, o projeto LIFE No_Waste deu início a um projeto-piloto experimental, que consistiu na construção de 12 talhões localizados em Minas de São Domingos, distrito de Beja, na faixa piritosa Ibérica, com 100 m² cada um. Este projeto consistiu na construção de talhões impermeabilizados com geomembrana (Figura 1) onde foram testados tratamentos a solos degradados provenientes de três minas desativadas (Aljustrel, Lousal e São Domingos) (LIFE No_Waste, 2019).



*Figura 1: Talhões experimentais desenvolvidos pelo projeto LIFE_No Waste, em minas de São Domingos, Maio de 2018
Fonte: (LIFE No_Waste, 2019).*

O esquema da Figura 2 representa a disposição espacial dos diferentes tratamentos. O tratamento 0 é o controlo, sendo o solo dos talhões A0, L0 e SD0 igual aquele que se encontra em cada uma das áreas mineiras estudadas sem qualquer aditivo. Aos talhões A1, L1 e SD1 foram adicionadas cinzas obtidas da queima de biomassa florestal residual que foram pré-tratadas por granulação e estabilização, correspondendo estes ao tratamento 1. O tratamento 2 corresponde aos talhões A2, L2 e SD2, onde foram incorporados grânulos da cinza de biomassa e as lamas biológicas desidratadas, previamente estabilizadas por compostagem com casca de eucalipto como agente de porosidade. Finalmente, para

tratamento 3, correspondente aos talhões A3, L3 e SD3, foi aplicada uma mistura de lamas e cinzas, ambas não estabilizadas. A taxa de aplicação de cada aditivo em cada tratamento foi de cerca de 5% (peso seco), relativamente ao solo com um horizonte de 200 mm.

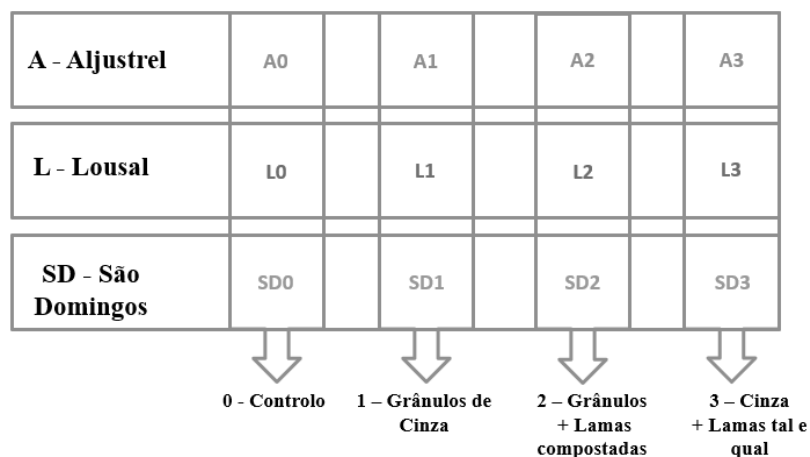


Figura 2: Esquema do projeto-piloto LIFE_No Waste

Desde maio de 2018 que a experiência piloto tem sido alvo de monitorização regular com a avaliação de diversos parâmetros físico-químicos, dos quais de destaca, para efeitos de desenvolvimento do presente estudo, o parâmetro pH. A aplicação dos aditivos no solo refletiu-se, de forma mais imediata, num aumento dos valores do pH dos solos (Tabela 1) que, tal como foi mencionado no capítulo 2, é uma medida fundamental para reabilitação da sua qualidade. Em março de 2019 os talhões foram semeados com uma mistura comercial de sementes, incluindo gramíneas, leguminosas e plantas autóctones, com o intuito de se observar a efetividade dos aditivos/combinções de aditivos na recuperação da fertilidade do solo.

Tabela 1: Valores de pH medidos nas amostras recolhidas em outubro (Fonte: resultados do projeto LNW)

Tratamento	0	1	2	3
A	4,32	6,42	7,16	7,33
L	3,84	7,27	7,11	7,51
SD	3,54	7,05	7,12	7,55

3.2. Recolha e processamento de amostras

As amostras de solo analisadas no âmbito desta dissertação resultaram da recolha e mistura de várias porções de solo recolhidas de diferentes localizações dentro de cada talhão, perfazendo um total de 12 amostras compostas com cerca de 5 kg cada (uma por talhão). As campanhas de amostragem foram realizadas em três momentos distintos:

- **31 de outubro de 2018:** esta primeira campanha permitiu caracterizar os tratamentos 5 meses após a sua aplicação, e após exposição a condições climáticas características da época de verão (temperaturas mais elevadas, menor humidade do ar e solo). No entanto, nos dias imediatamente antes da campanha de amostragem, ocorreram chuvas intensas que fizeram inundar parcialmente os talhões do ensaio;
- **15 de janeiro de 2019:** no momento desta campanha de amostragem, os talhões experimentais encontravam-se saturados devido às chuvas intensas que ocorreram em dezembro e janeiro;
- **3 de março de 2019:** esta campanha de amostragem pretendeu caracterizar os talhões no final do inverno e imediatamente antes de se realizar a sua sementeira (nova fase da experiência).

O processamento das amostras incluiu secagem ao ar, até aproximadamente 50% da capacidade de retenção de água (*Water Holding Capacity*, WHC). Após as amostras terem atingido esta humidade, parte das mesmas foi preservada em sacos fechados a 4 °C, e outra parte sendo deixada a secar completamente ao ar, para as análises que necessitaram de solo seco.

3.3. Métodos analíticos

Foram analisadas diversas variáveis para cada amostra em cada uma das três campanhas de amostragem. Na Tabela 2 resumem-se as variáveis quantificadas, assim como o método analítico utilizado.

Tabela 2: Variáveis determinadas e respetivo método analítico/protocolo utilizado

Variável	Método/Equipamento	Referência
Fração de humidade (W) e perda por ignição (LOI)	ISO 11465 - Método gravimétrico	International Standard Organization (2002);
Capacidade de retenção de água (WHC)	ISO 14240-2:1997 (E) – Determinação da biomassa microbiana do solo	International Standard Organization (2002);
Respiração basal do solo (RB)	ISO 16072 – Métodos laboratoriais para determinação da respiração microbiana do solo; Equipamento Oxitop;	International Standard Organization (2002); Wirtz (1999)
Biomassa C-microbiana (BMC)	ISO 14240-2:1997 (E) - Determinação da biomassa microbiana do solo, método de fumigação e análise de carbono orgânico (Analytik Jena Multi N/C3100 ou oxidação pelo dicromato seguida de espectrofotometria de visível)	International Standard Organization (1997);
Biomassa N-microbiana (BMN)	ISO 14240-2:1997 (E) - Determinação da biomassa microbiana do solo; Método de Kjeldhal - Digestor FOSS, Unidade de destilação VELP;	International Standard Organization (1997); N-Kj FOSS Application Note 300 (2009)
Carbono solúvel em água fria (WSC) e carbono solúvel em água quente (HWC)	Extração aquosa e análise de carbono orgânico (Analytik Jena Multi N/C3100);	Ghani, Dexter, & Perrott (2003)
	Método de Kjeldhal - Digestor FOSS, Unidade de destilação VELP;	N-Kj FOSS Application Note 300 (2009)
Macronutrientes (N, P, K, Mg, Na e Ca)	Extração de Melich III, seguida de espectrofotometria de visível (P) e espectrofotometria de emissão (Na e K) e absorção (Ca e Mg) atómica;	4500-P E. Método do ácido ascórbico, APHA (2005); Protocolo de extração de Mehlich III, Carter & Gregorich (2008).

Para a quantificação da respiração basal do solo (RB) foi utilizado um equipamento de medição e registo temporal de pressão em vaso fechado (Oxítóp) (Figura 3). Este sistema permite quantificar a depleção de pressão devido ao consumo de oxigénio pelos microrganismos do solo, levando à formação de CO₂. Este gás é posteriormente absorvido por uma solução de hidróxido de potássio (1,5 mol.L⁻¹) (agente de absorção), gerando-se uma depressão dentro dos frascos exclusivamente associada ao consumo de oxigénio. Essa depressão é alvo de medição manométrica (OxiTop-C measuring sensors WTW, Weilheim, FRG), registo e armazenamento de dados, automaticamente em intervalos de tempo regulares. Os registos são posteriormente descarregados através do OxiTop OC110 controller (WTW, Weilheim, FRG).



Figura 3: Determinação da respiração basal dos solos - sistema Oxítóp

Antes de se analisar esta variável, foi necessário determinar o volume ocupado pelo solo e de gás livre e ajustar cada amostra a cerca de 50% da sua capacidade de retenção de água (WHC) de acordo com o método indicado na Tabela 2. Após adicionar o solo e o agente de absorção aos frascos, estes foram selados e incubados a 24 °C até se ter verificado uma estabilização da curva respirométrica (entre 3 e 8 dias). Através da curva obtida, foi possível calcular a taxa de respiração, correspondente ao declive do intervalo onde a curva apresenta um comportamento aproximadamente linear.

Relativamente à determinação da biomassa C e N-microbiana, foi utilizado o método de fumigação-extração com posterior quantificação dos teores de carbono e azoto nos extratos (International Standard Organization, 1997). O solo é composto por microrganismos e matéria orgânica, sendo necessário segregar a fração que corresponde apenas à biomassa microbiana. Para fazer essa distinção, previamente à extração, as amostras foram fumigadas com clorofórmio durante 24 h, promovendo assim a lise celular dos microrganismos e libertando a biomassa C/N para o meio. Paralelamente foram analisadas amostras não fumigadas, sendo que a diferença entre elas permitiu quantificar a fração de biomassa microbiana.

No passo de fumigação foram realizadas duas réplicas de cada amostra que foram fumigadas num exsicador, no qual foi colocado um copo com clorofórmio e alguns grânulos de papel de alumínio para controlo de ebulição (Figura 4). Foi aplicada pressão negativa com uma bomba de vácuo e, após o clorofórmio borbulhar durante cerca de 2 min, a torneira de vácuo foi fechada, e as amostras deixadas a incubar durante 24 h em ambiente escuro e à temperatura ambiente.

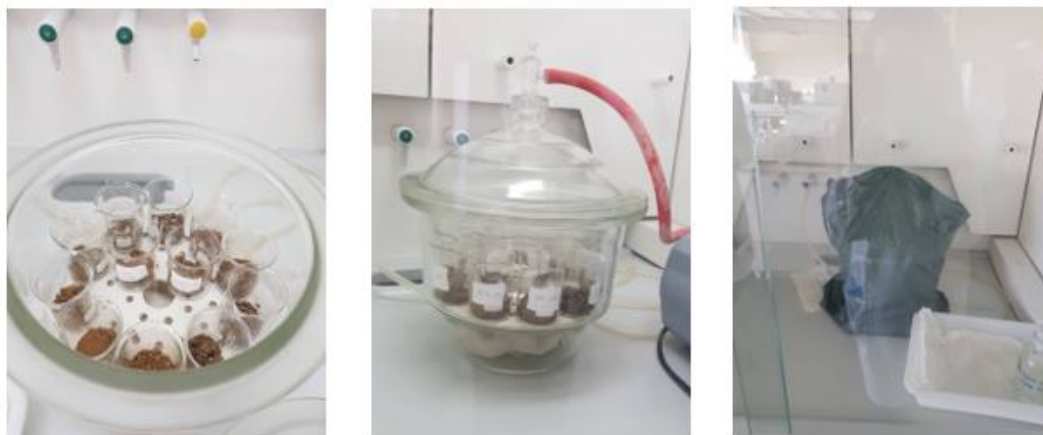


Figura 4: Fumigação das amostras com clorofórmio

No passo de extração todas as réplicas (fumigadas e não-fumigadas) foram transferidas para balões Erlenmeyer. A extração foi feita com sulfato de potássio ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), a uma razão de extração solo:extratante de 1:4, através de agitação em agitador horizontal a 280 rotações por minuto (rpm), durante 30 min. Posteriormente os extratos foram filtrados para frascos de vidro e conservados a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua análise. Na primeira campanha, a análise da concentração de BCM foi realizada num analisador de carbono orgânico (Analytik Jena

Multi N/C3100, Figura 5). Os extratos foram diluídos por forma a estarem compreendidos numa das duas retas de calibração do equipamento ($0,5$ e 5 mg C.L^{-1} e $10-50 \text{ mg C.L}^{-1}$). A acidificação da solução a analisar com HCl (2 N) garantiu que todo o carbono inorgânico foi removido previamente às análises. O tempo de análise para cada amostra foi de cerca de 15 min. Por dificuldades operacionais relacionadas com o funcionamento do analisador de carbono orgânico, para as restantes 2 campanhas, foi utilizado o método de quantificação por oxidação por dicromato de potássio, sendo as leituras posteriormente feitas por espectrofotometria de visível a 600 nm (International Standard Organization, 1997).



Figura 5: Equipamento utilizado para determinação de HWC, WSC e Biomassa C-microbiana.

Para análise da concentração de BNM e macronutriente N foi aplicado o método de Kjeldahl tendo-se seguido as normas técnicas dos equipamentos de digestão FOSS e de destilação VELP (Figura 6). Este método foi composto por duas etapas:

- Digestão: a matéria orgânica foi destruída por ácido sulfúrico (0,01 N) na presença de um catalizador (Kjeltab: $3.5 \text{ g K}_2\text{SO}_4 + 0.4 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e pela ação do calor, sendo o azoto convertido no ião amónio, tendo sido adaptados os níveis de temperatura utilizados na digestão do extrato: 60 min a $150 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min a $250 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min a $370 \text{ }^\circ\text{C}$ e 60 min a $420 \text{ }^\circ\text{C}$ (no caso do N macronutriente a rampa de aquecimento foi uma só, até $420 \text{ }^\circ\text{C}$, por 60 min);
- Destilação: as amostras digeridas foram diluídas e alcalinizadas com a adição de hidróxido de sódio, convertendo o NH_4^+ em NH_3 . O azoto amoniacal foi separado

por destilação a vapor, sendo o amoníaco extraído da solução alcalina e capturado em ácido bórico, para posterior titulação (com ácido sulfúrico 0,0048 N) e quantificação do N na amostra.



Figura 6: Unidade de digestão FOSS (esquerda), unidade scrubber (centro) e unidade de destilação VELP (direita)

No que diz respeito às variáveis físico-químicas, para além da capacidade de retenção de água, determinou-se o teor de humidade (W), a perda por ignição (LOI) e a capacidade de retenção de água (WHC) de acordo com os protocolos referidos na Tabela 2.

A determinação das frações de carbono foi feita por solubilização em água quente e água fria – carbono solúvel em água quente (HWC) e carbono solúvel em água fria (WSC). Este método foi utilizado para quantificar o carbono orgânico facilmente disponível. A sua determinação foi feita segundo o procedimento apresentado na Figura 7, sendo que a única adaptação foi a alteração da taxa de agitação de 30 para 280 rpm.

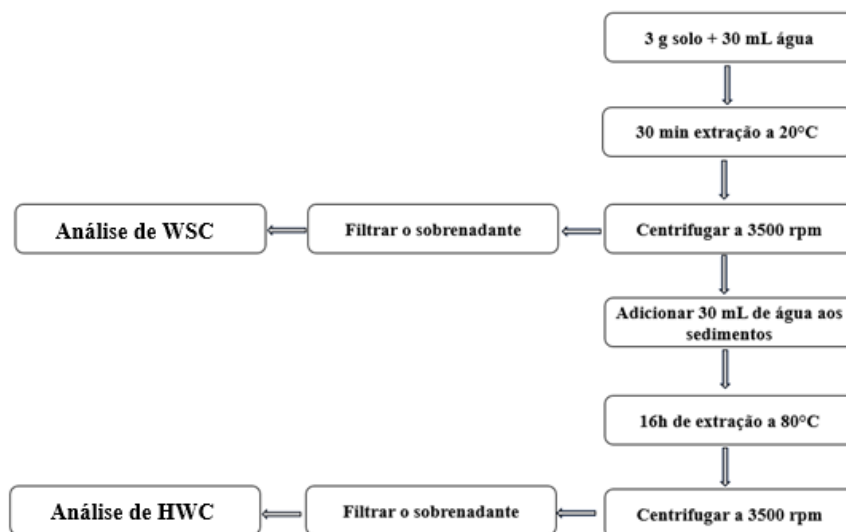


Figura 7: Passos metodológicos para determinação de HWC e WSC (Fonte: Ghani, Dexter, & Perrott (2003))

Na Figura 8 ilustra-se a extração e filtração das amostras para determinação de WSC, assim como o banho de água a 80 °C onde os extratos foram colocados durante 16 h para extração de HWC. A quantificação do carbono solubilizado nestas amostras foi realizada no mesmo analizador de carbono orgânico utilizado para determinação da BCM (Figura 5).



Figura 8: Equipamento para extração de WSC e HWC: Agitador horizontal (esquerda); filtração da fração líquida das amostras (centro); banho quente (direita)

Para determinação dos macronutrientes P, K, Na, Ca e Mg realizaram-se extrações de Mehlich III (Carter & Gregorich, 2008) sendo o fósforo quantificado através do método do ácido ascórbico (APHA, 2005), o potássio e o sódio por espectrofotometria de emissão atômica e o cálcio e o magnésio por espectrofotometria de absorção atômica.

Relativamente ao azoto, este nutriente foi quantificado pelo método Kjeldahl. Para isso, foi adicionada uma pequena quantidade de solo seco aos tubos de Kjeldahl, bem como um Kjeltab e ácido sulfúrico. Foram ainda testados padrões de ácido glutâmico (0,2 g) e brancos de glucose (1 g), em todos os casos com um Kjeltab e ácido sulfúrico. A digestão foi realizada a 420 °C. Uma vez que as amostras continham pouco azoto, a titulação foi feita com ácido sulfúrico diluído (0,0048 N) (FOSS Application Note 300, 2009).

Foi ainda calculado o quociente metabólico (qCO_2), que é a razão entre a respiração basal e a BMC do solo, expresso em $\mu g CO_2.g^{-1} ss$. A sua determinação permitiu comparar a eficiência com que os microrganismos utilizam o substrato disponível no solo nos diferentes tratamentos (Evangelista Da Silva et al., 2007).

3.4. Tratamento de resultados

Para realizar o tratamento estatístico dos resultados obtidos ao longo desta dissertação foi utilizado o *software* SPSS, nomeadamente para realização de análise de variância (ANOVA). Previamente foram realizados testes à normalidade de todos os resultados, garantindo pelo menos uma das seguintes condições: teste de Shapiro-Wilk não significativo ou valores de curtose e assimetria entre -1,5 e 1,5.

No caso em que os dados não se encontraram normalmente distribuídos, procedeu-se à sua transformação utilizando funções como a raiz quadrada ou o logaritmo decimal. Na maior parte dos casos, os dados foram agrupados por solos (Aljustrel, Lousal e São Domingos), permitindo estudar o comportamento individual de cada solo através de ANOVA dois fatores de efeitos fixos (tempo ou campanha de amostragem e tratamento). Sempre que a interação entre fatores foi significativa, utilizaram-se modelos estatísticos de um fator utilizando o primeiro fator sobre cada nível do segundo fator e vice-versa. Nas variáveis com apenas uma réplica, tal como a respiração basal, foram utilizados modelos

estatísticos contendo apenas o fator tempo. Sempre que se pretendeu comparar os desempenhos de cada um dos solos os dados foram desagrupados e utilizou-se o solo como fator. Os resultados dos modelos estatísticos são apresentados em tabelas que contêm os fatores considerados para cada variável, o número de graus de liberdade, as estatísticas de teste F e o valor p de cada teste.

Relativamente aos resultados apresentados em gráficos, são ainda incluídas barras de erro que representam o desvio padrão calculado entre as réplicas da mesma amostra.

4. Resultados e discussão

Apresentam-se de seguida os resultados obtidos, de forma a procurar responder aos objetivos da dissertação.

4.1. Respiração basal (RB)

Tal como referido no Capítulo 2, a humidade do solo afeta a atividade microbiana, sendo um fator limitante para o crescimento de plantas e microrganismos. Além de ter efeitos a nível celular e de funcionamento metabólico, a água retida no solo é essencial para a difusão de enzimas e substratos extracelulares no solo. A respiração do solo tende a diminuir de forma linear com a redução do conteúdo de água no solo. Por outro lado, a solos com elevado nível de humidade estão associados baixos níveis de arejamento, o que implica, também, uma baixa taxa de respiração (Phillips & Nickerson, 2015). Assim, antes de se proceder aos testes para quantificação da respiração basal, as amostras foram ajustadas a cerca de 50% da capacidade de retenção de água (WHC). Na Tabela 3 encontram-se os valores de WHC obtidos nas campanhas de outubro e de março. Para os testes de janeiro, assumiu-se que a WHC era a mesma que a determinada em outubro.

Tabela 3: Capacidade de retenção de água para os diferentes solos e tratamentos

Solo/tratamento	WHC (g H ₂ O.100 g ⁻¹ ss)	
	Outubro	Março
A0	31	34
A1	32	37
A2	46	49
A3	50	45
L0	40	37
L1	33	38
L2	40	50
L3	60	62
SD0	39	45
SD1	44	43
SD2	42	51
SD3	50	57

Verificou-se que a aplicação dos tratamentos 2 (adição de cinzas granuladas e lamas compostadas) e 3 (adição de cinzas e lamas não estabilizadas) no solo aumentou a capacidade de retenção de água. Considerando o tratamento 3, a WHC aumentou cerca de 61% em Aljustrel, 50% em Lousal e 28% em São Domingos (na campanha de outubro).

Segundo a literatura, a relação entre a humidade e respiração do solo gera alguma controvérsia. Apesar de estar associada uma diminuição gradual da respiração à medida que a sua humidade diminui, a humidificação de solo seco pode levar a picos de respiração e ao aumento da mineralização do N, atingindo por vezes valores superiores aos registados em solo constantemente húmido (Phillips & Nickerson, 2015). Além disso, estes picos de respiração podem afetar também a absorção anual de carbono pelos ecossistemas. Quanto maior for a duração e intensidade da seca/alagamento do solo, maior será o pico de respiração verificado (Phillips & Nickerson, 2015). Assim, os solos em estudo foram incubados a 20 °C, 24 h antes de se proceder ao teste de respiração, por forma a minimizar possível ocorrência destes picos de respiração.

Recorrendo ao registo do sistema Oxitop foi possível obter curvas temporais de respiração para cada de solo/tratamento, expressas em $\mu\text{g CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{ ss}$, a partir das quais se calculou a taxa de respiração. Na Figura 9 estão representados alguns exemplos das curvas obtidas para a segunda campanha. A Figura 10 ilustra as taxas de respiração calculadas para todos os tratamentos e campanhas de amostragem.

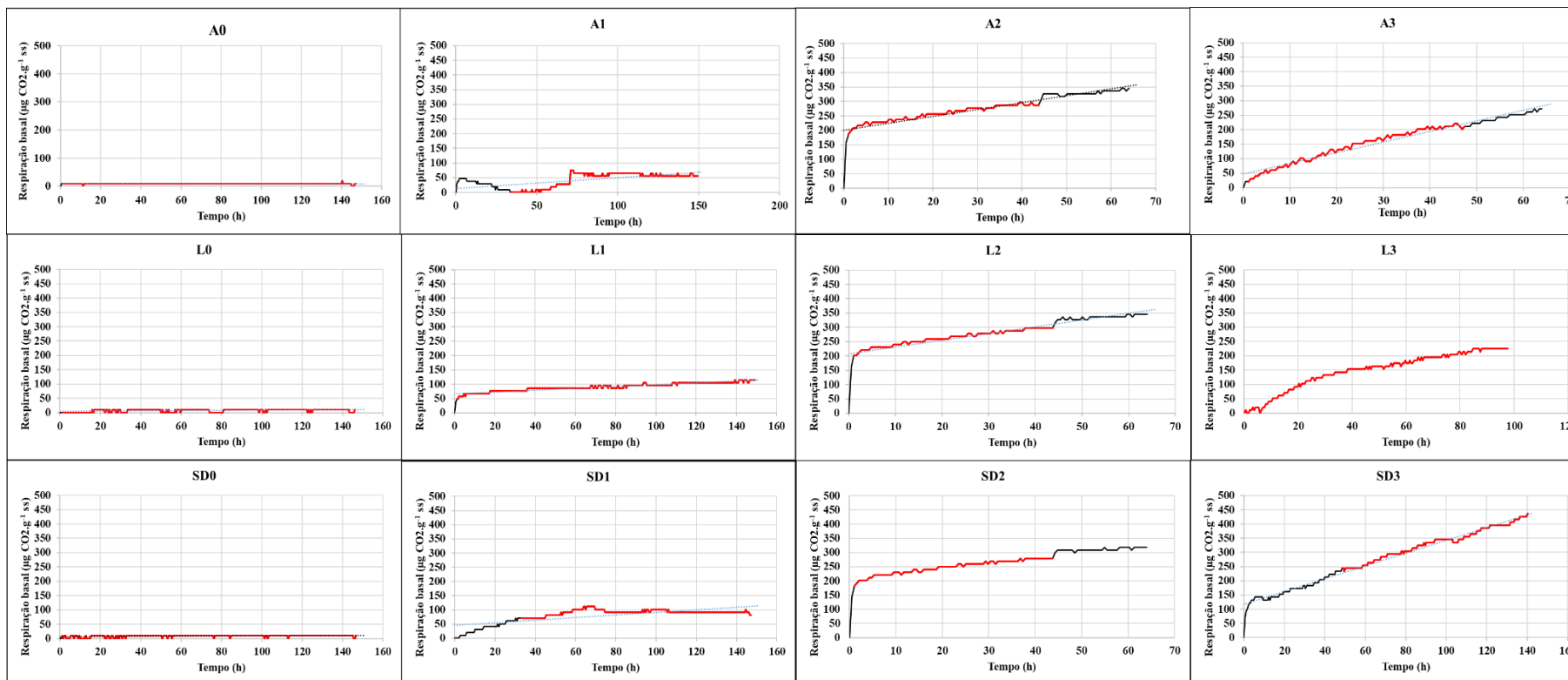


Figura 9: Curvas de respiração (expressas em $\mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ss}$) na segunda campanha de amostragem.

A respiração do solo (RB) é um indicador da atividade dos microrganismos presentes no solo, pressupondo-se que uma maior quantidade de CO₂ libertada é expressão de uma maior quantidade de microrganismos presentes no solo. Na Figura 10 verifica-se que a respiração foi muito baixa (entre 0 e 0,49 μg CO₂.g⁻¹.h⁻¹) nos solos que não foram aditivados (tratamento 0), aumentando nos restantes tratamentos (tratamento 1: 0,16-1,10 μg CO₂.g⁻¹.h⁻¹, tratamento 2: 0,97-2,20 μg CO₂.g⁻¹.h⁻¹ e tratamento 3: 0,96-3,16 μg CO₂.g⁻¹.h⁻¹). De uma forma geral, verifica-se uma diminuição ao longo do tempo da taxa de respiração no caso dos talhões de controlo e aditivados com os grânulos de cinza (tratamentos 0 e 1), e um aumento nos solos aditivados com cinzas e lamas, quer sejam estabilizadas (tratamento 2) ou não (tratamento 3). Este aumento ao longo do tempo poderá ser devido à eficácia dos aditivos de base orgânica (lamas) que perdurou e se consolidou ao longo dos meses, induzindo uma taxa de respiração mais elevada.

A variação da respiração consoante o tratamento aplicado vai ao encontro da observação de Joerfensen et al. (1992): a RB está correlacionada não só com a biomassa BCM, mas também com o conteúdo de C e N nos solos, tal como apresentado adiante nas secções 4.3 e 4.4.

Relativamente ao azoto, os resultados obtidos demonstraram uma diminuição da RB nos solos com baixo conteúdo de N (solos não aditivados/aditivados apenas com cinzas) e um aumento da RB em solos cujo conteúdo em N é superior (nos solos aos quais se adicionou, para além de cinzas, lamas biológicas como fonte de matéria orgânica). Apesar de o produto da respiração quantificado neste trabalho ter sido apenas CO₂, e não compostos azotados, os resultados mostram que a provisão de macronutrientes através da adição de corretivos orgânicos foi essencial para estimular a atividade microbiana dos solos.

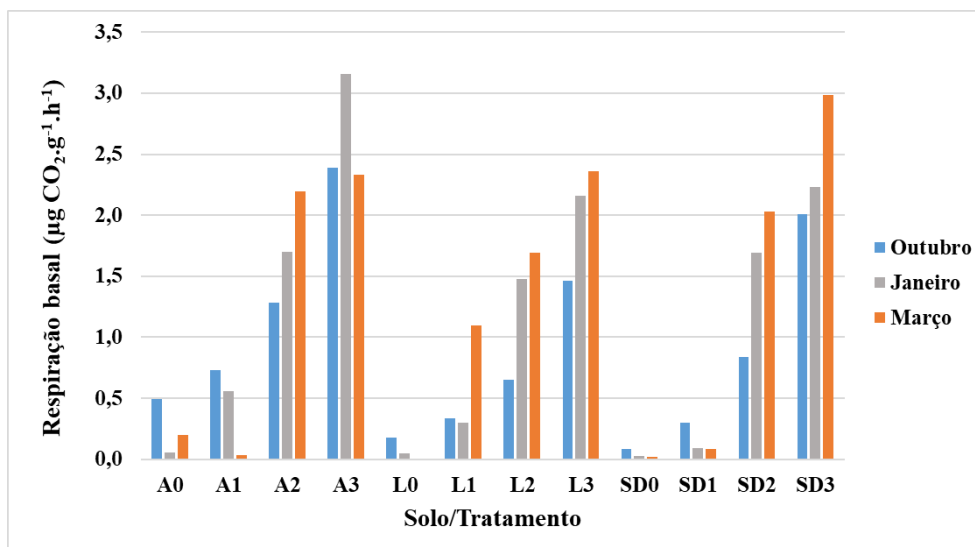


Figura 10: Taxa de RB do solo nas três campanhas de amostragem

Estas conclusões foram corroboradas com os dados obtidos nos modelos estatísticos de efeitos simples aplicados a esta variável. No caso da RB, foi feita apenas uma réplica de cada amostra de solo, ficando a análise estatística restrita ao tratamento aplicado que, por sua vez, teve um efeito significativo na respiração basal de todos os solos ($F \geq 11,37$ e $p \leq 0,05$). Contrariamente, a respiração não foi significativamente diferente nos três solos estudados ($F = 0,269$ e $p = 0,766$), relativamente a cada um dos tratamentos aplicados.

4.2. Biomassa C-microbiana (BCM) e biomassa N-microbiana (BNM)

A biomassa microbiana do solo tem sido usada como indicador da eficiência de reabilitação de solos. Além de ter um papel importante na transformação bioquímica dos compostos orgânicos, funciona também como um reservatório de nutrientes como o N e o P. Desta forma, a biomassa microbiana é um indicador das mudanças que ocorrem no solo à medida que o material orgânico vai sendo incorporado, e a sua monitorização torna perceptível a sensibilidade dos microrganismos às alterações no sistema (Longo et al., 2010).

Para a determinação da biomassa C- e N-microbiana, foram utilizados os extratos obtidos com e sem fumigação com clorofórmio, sendo a Figura 11 resultante do cálculo da

diferença entre concentrações das amostras fumigadas e não fumigadas. Para as amostras da primeira campanha, a determinação da BCM foi feita recorrendo a um equipamento analisador de carbono orgânico total. Devido a constrangimentos técnicos neste equipamento, foi necessário escolher e adaptar um método alternativo para quantificar esta variável. Assim, em todas as campanhas de amostragem, as fumigações e filtrações foram feitas da mesma forma, alterando-se apenas o método da quantificação de carbono nos extratos. Para as amostras recolhidas em janeiro e março, utilizou-se um método de quantificação por oxidação por dicromato de potássio de acordo com a mesma norma, sendo as leituras posteriormente feitas por espectrofotometria de visível a 600 nm.

Na Figura 11 verifica-se que existiu um padrão temporal na BCM. No caso dos solos não aditivados e nos solos com a aplicação de grânulos de cinzas (tratamentos 0 e 1) verificou-se que o valor máximo obtido para a BCM diminuiu gradualmente deste outubro até março: de 111,6 para 38,2 $\mu\text{g C.g}^{-1}$ ss (tratamento 0) e de 139,4 para 29,8 $\mu\text{g C.g}^{-1}$ ss (tratamento1). O mesmo não aconteceu nos tratamentos 2 e 3, onde se verificou que de outubro para janeiro houve uma diminuição dos valores máximos de BCM (de 868,7 para 309,5 $\mu\text{g C.g}^{-1}$ ss), voltando estes a aumentar de janeiro para março (de 309,5 para 519 $\mu\text{g C.g}^{-1}$ ss) (tratamento 3). Este resultado é coerente com o aumento notável da taxa de RB observado nestes tratamentos na amostragem de março (Figura 10), indiciando maior quantidade de microrganismos e/ou maior atividade.

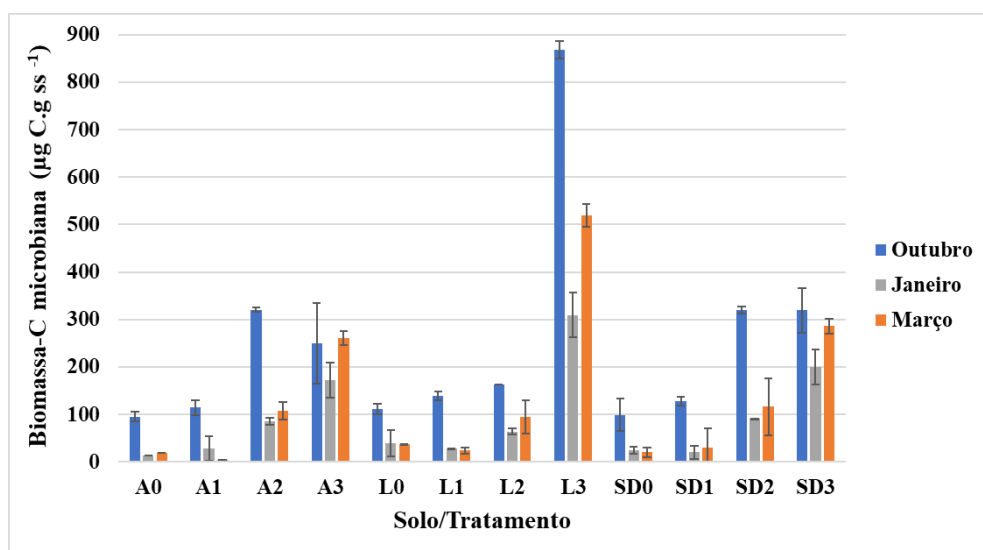


Figura 11: Concentração de BCM nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março

O padrão sazonal verificado nesta variável pode ainda estar associado às diferenças de temperatura registadas nas diferentes alturas de amostragem. Segundo registos do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, a temperatura média do solo em Beja a 5 cm de profundidade foi de 15,7, 7,4 e 12,8 °C em outubro, janeiro e março, respetivamente (IPMA, 2019). Esta variação de temperaturas é coincidente com o padrão sazonal da BCM, o que pode indicar que temperaturas mais elevadas poderão ter favorecido um aumento da BCM presente no solo.

Foram aplicados modelos estatísticos de dois fatores para a BCM, cujos valores se encontram apresentados na Tabela 4. No caso do solo de São Domingos, a interação entre o tempo e o tratamento não foi significativa para os valores de BCM obtidos (apesar dos fatores o serem quando analisados individualmente) o que indica que o tempo e o tratamento afetaram igualmente a BCM.

A interação entre os fatores para os solos de Aljustrel e Lousal foi significativa ($p=0,019$ e $p=0,004$ respetivamente), sendo necessário aplicar modelos estatísticos de efeitos simples individualmente para cada fator. Atendendo a estes modelos, e considerando o tratamento, verificou-se que este foi significativo para as concentrações de BCM em todas as campanhas de amostragem, tanto em Aljustrel ($F \geq 18,01$ e $p \leq 0,009$) como em Lousal ($F \geq 35,34$ e $p \leq 0,002$). Por sua vez, o tempo apenas foi significativo no tratamento 1 e 2 em Aljustrel ($F \geq 27,01$ e $p \leq 0,012$) e no tratamento 1 e 3 no Lousal ($F \geq 99,47$ e $p \leq 0,002$).

Tabela 4: Análise de variância da concentração de BCM (raiz quadrada de BCM) (* - significativo ($p \leq 0,05$); gl: graus de liberdade)

	Solo	A	L	SD
	gl	F	F	F
Tempo	3	69,76*	314,9*	41,33*
Tratamento	2	45,88*	83,04*	24,97*
Tempo × Tratamento	6	4,04*	6,28*	1,67

Após a determinação da BCM, foi possível calcular o quociente metabólico (qCO_2 , razão entre a respiração e a BMC). Este quociente é um indicador de *stress* dos microrganismos,

permitindo aferir a eficiência microbiana na utilização de substrato (Evangelista Da Silva et al., 2007). Na Figura 12 é apresentada a evolução temporal deste parâmetro, para os diferentes solos e tratamento.

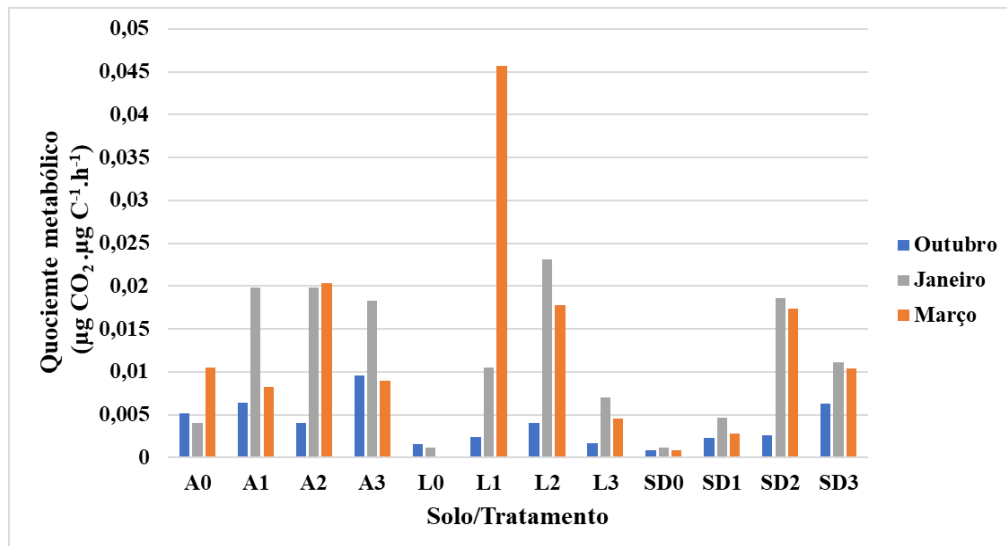


Figura 12: Quociente metabólico para os diferentes solos e campanhas

Observou-se que o solo de Lousal ao qual foi aplicado o tratamento de cinzas granuladas (L1) apresentou um qCO_2 muito mais elevado do que os restantes solos/tratamentos. Também se observou que a taxa de respiração foi mais elevada para o solo/tratamento L1 ($1,1 \mu g CO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$, Figura 10) do que para os solos de Aljustrel e São Domingos com o mesmo tratamento ($0,03$ e $0,08 \mu g CO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$, respetivamente), o que justifica o pico de qCO_2 observado. Tal como discutido por Fernandes et al (2005), estes valores elevados de qCO_2 podem indicar que o solo L1 apresenta um nível de *stress* mais elevado.

De uma forma geral, a análise dos valores de qCO_2 permitiu verificar uma redução deste quociente entre o tratamento 2 e o tratamento 3. Verificou-se ainda que houve um aumento entre outubro e janeiro, mas que os valores diminuíram novamente na campanha de março. Esta variação resulta do aumento mais acentuado dos valores da BCM do que os dos valores de RB. Segundo a literatura, quanto maior é carência de substrato para os microrganismos no solo, maior é a energia que estes terão de despende para conseguir assegurar o seu desenvolvimento (Mazurana et al., 2013). Desta forma, um valor de qCO_2 mais baixo indica que a biomassa microbiana é mais eficiente e, por sua vez, que existe maior quantidade de carbono que é eficientemente incorporado pelos microrganismos

(Mazurana et al., 2013). Considerando o solo do Lousal e São Domingos, verifica-se de forma clara a diminuição que ocorreu com a incorporação de lamas, demonstrando assim a eficácia da aplicação de aditivos (nomeadamente de base orgânica, tal como lamas biológicas) em solos degradados para preservar a eficiência de utilização dos *stocks* de carbono por parte das comunidades microbianas. Valores mais altos de qCO_2 e de respiração também estão associados a períodos mais regulares de chuva (Silva et al., 2018), como foi o caso do mês de janeiro em que se observaram quocientes metabólicos geralmente mais elevados. Na Tabela 5 encontram-se resumidos valores de RB, BCM e qCO_2 obtidos neste estudo e comparados com a literatura.

Tabela 5: Resumo Valores de RB, BCM e qCO_2 teóricos e obtidos neste estudo; Controlo: solos sem aditivos; Tratamento 1: cinzas granuladas; Tratamento 2: cinzas granuladas e lamas compostadas; Tratamento 3: Cinzas e lamas tal e qual;

Referência	RB ($\mu g CO_2.g^{-1}ss$)	BCM ($\mu g C.g^{-1}ss$)	qCO_2 ($\mu g CO_2.g C^{-1}.h^{-1}$)
Este estudo (Controlo)	0-0,2	14-112	0-0,01
Este estudo (Tratamento 1)	0,03-1,1	4-139	0,002-0,05
Este estudo (Tratamento 2)	1,7-2,9	64-321	0,002-0,02
Este estudo (Tratamento 3)	2,2-3,0	173-869	0,002-0,01
Beck et al. (1997) (solo sem vegetação)	0,06	70	0,0010
Beck et al. (1997) (solos florestais com cinzas)	3,72	1397	0,003
Gómez-Rey et al. (2012) (solo sem tratamento)	-	-	0,006
Gómez-Rey et al. (2012) (<i>pellets</i> de cinza)	-	-	0,001
Gómez-Rey et al. (2012) (<i>pellets</i> de cinza e fertilizante N)	-	-	0,003
Gómez-Rey et al. (2012) (cinzas tal e qual e fertilizante N)	-	-	0.003
Silva et al. (2018) (área reabilitada revegetada)	48,76	321,7	0,1516

com erva)

Anderson & Domsch (2010) (solo agrícola)	1,83	147	0,0124
--	------	-----	--------

Beck et al. (1996) reportou valores do quociente metabólico observados em solos florestais aditivados com cinzas de cerca de $0,003 \mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g C}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, sendo este valor da mesma ordem de grandeza dos solos aditivados com grânulos de cinzas no presente estudo ($0,002-0,05 \mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{C} \cdot \text{h}^{-1}$). Da mesma forma, solos aos quais não foram aplicados tratamentos ($q\text{CO}_2=0,006 \mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{C} \cdot \text{h}^{-1}$) e solos aditivados com cinzas e fertilizante rico em azoto ($q\text{CO}_2=0,003 \mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{C} \cdot \text{h}^{-1}$) também apresentam valores semelhantes aos obtidos para o correspondente tratamento 0 ($0-0,01 \mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g C}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e tratamento 3 ($0,002-0,01 \mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{C} \cdot \text{h}^{-1}$), atestando assim a coerência dos resultados apresentados. Por outro lado, e de acordo com Silva et al. (2018), solos que foram reabilitados e posteriormente revegetados com gramíneas apresentaram valores de biomassa e respiração muito mais elevados o que resultou num quociente metabólico mais elevado. Esta diferença pode estar associada ao facto de o solo ter sido previamente reabilitado, através da plantação de árvores e leguminosas, o que contribuiu para a recuperação da estabilidade do solo. Finalmente, Anderson & Domsch (2010) obtiveram um quociente metabólico num solo agrícola de $0,0124 \mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{C} \cdot \text{h}^{-1}$, valor que se assemelha aos obtidos para os solos aditivados com cinzas granuladas e lamas compostadas neste estudo (tratamento 1 e 2), o que indica que o solo está a responder positivamente aos corretivos aplicados.

De acordo com modelos estatísticos de um fator, verificou-se que nem o $q\text{CO}_2$ (raiz quadrada do quociente, $F=1,378$ e $p=0,266$) nem a BCM ($F=0,799$ e $p=0,454$) variaram de forma significativa nos três solos estudados. Como tal, não foram as características particulares de cada solo que influenciaram a sua resposta bioquímica, mas sim os tratamentos aplicados.

Relativamente à BNM, a sua determinação apenas foi feita na campanha de outubro, pois os valores obtidos foram inconsistentes com o que seria expectável. Considerando que os valores obtidos de BNM foram muito baixos (inferiores a $25 \mu\text{g N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ss}$), estes podem ter estado próximos do limite de quantificação do método analítico, o que pode ter contribuído para a falta de representatividade dos resultados obtidos. Em condições normais, seria de

esperar obter uma relação C/N de biomassa relativamente constante (Weil & Brady, 2007), indicativa da composição celular. Na Figura 13, além dos valores individualizados de biomassa C e N-microbiana, representou-se também os valores obtidos para esta razão, sendo possível verificar que estes apresentaram alguma dispersão.

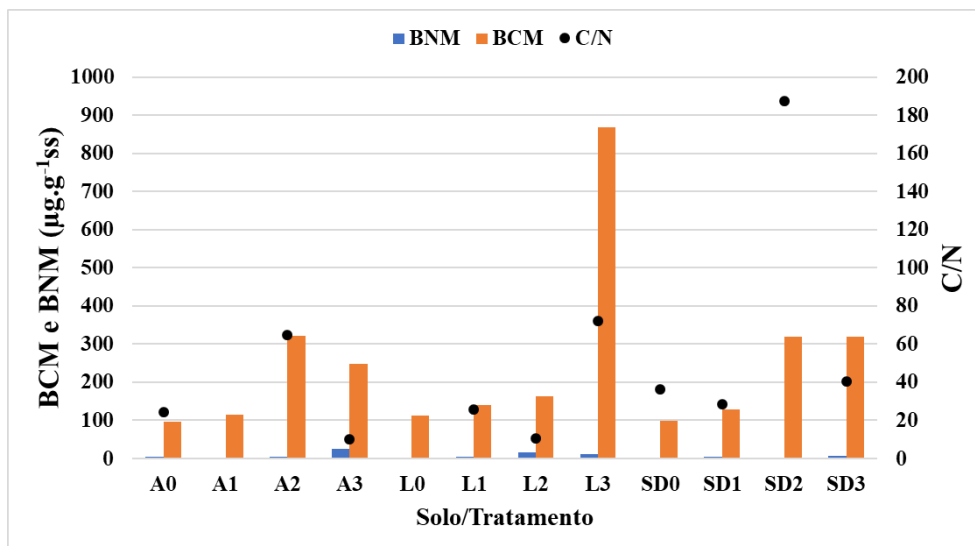


Figura 13: BCM, BNM e correspondente razão mássica

4.3. Carbono solúvel em água fria (WSC) e carbono solúvel em água quente (HWC)

Estas variáveis permitiram quantificar o carbono orgânico facilmente disponível. De uma forma geral, este método permite extrair em primeiro lugar carbono facilmente solúvel (associado, por exemplo, a resíduos de animais ou plantas) e posteriormente componentes lábeis de carbono (Ghani et al., 2003). Esta extração permite quantificar uma importante fração do carbono orgânico total do solo (Melém Junior et al., 2008).

Verificou-se que o HWC aumentou com a aplicação de aditivos, comparativamente aos talhões de controlo (Figura 14), tendo sido a aplicação combinada de lamas e cinzas tal e qual o tratamento mais eficaz no aumento do conteúdo de carbono (entre 280% a 1850%). As concentrações obtidas vão ao encontro do que seria esperado, uma vez que as cinzas não contêm carbono, sendo este proveniente da adição do composto aos solos. Em termos de coerência com os restantes solos, a concentração obtida para o solo/tratamento SD3, na campanha de janeiro, deveria ter sido superior à do tratamento 2 (tendo em conta o

comportamento nos talhões A3 e L3). No entanto, a concentração de carbono medida neste caso resultou de apenas uma réplica, não sendo possível assegurar a sua representatividade.

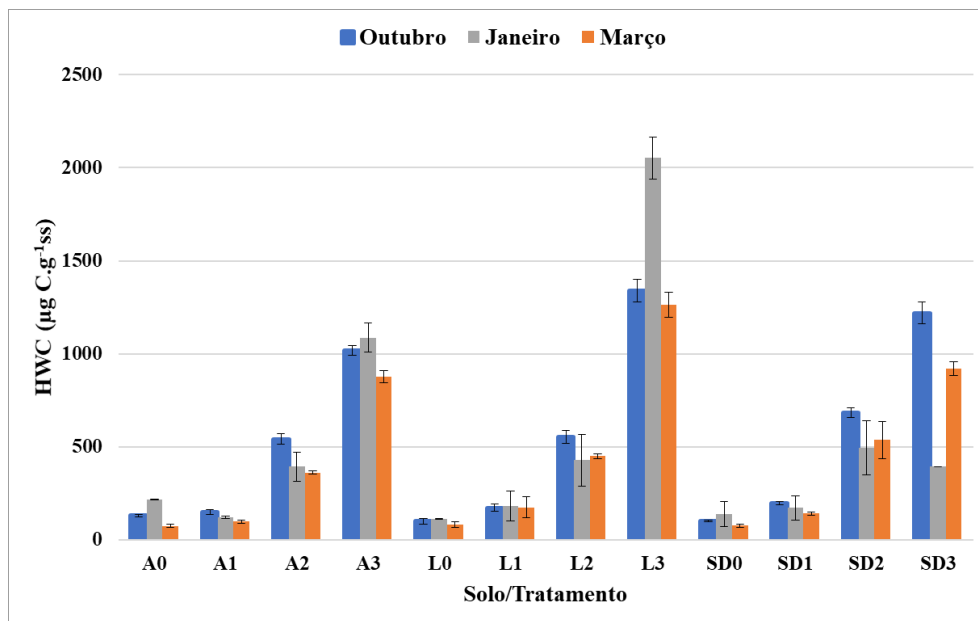


Figura 14: Evolução temporal dos valores obtidos de carbono solúvel em água quente

Relativamente ao WSC, verificou-se um aumento nos solos aditivados (Figura 15). De uma forma geral, a aplicação de cinzas foi o tratamento que apresentou teores de WSC mais baixos (entre 8 e 41%), e a aplicação de lamas e cinzas tal e qual o que aumentou de forma mais notória os teores de WSC (entre 280 e 665%).

Verificou-se que o aumento de C é coincidente com o aumento da taxa de respiração, apesar de não se verificar uma relação linear forte entre as variáveis (Figura 17).

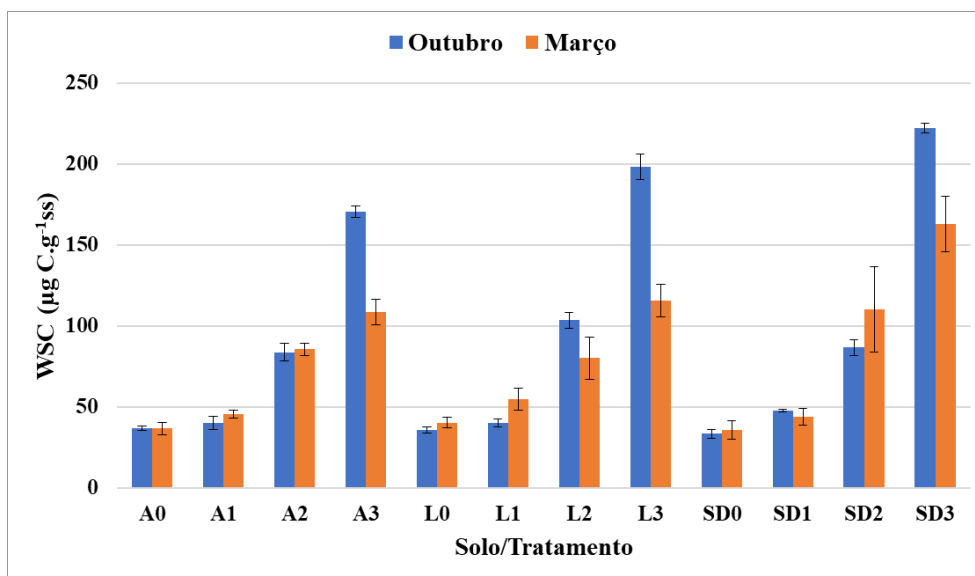


Figura 15: Evolução temporal dos valores obtidos de carbono solúvel em água fria

Tendo em conta que o modelo estatístico de dois fatores aplicado a WSC e HWC que demonstrou que a interação entre o tempo e o tratamento foi significativa (Tabela 6), foram aplicados modelos estatísticos de efeitos simples para as duas variáveis. O tratamento foi significativo tanto no WSC ($F \geq 28,52$ e $p \leq 0,05$) como no HWC ($F \geq 12,75$ e $p \leq 0,05$) em todos os solos e em todas as campanhas de amostragem. Por sua vez, o tempo apenas foi significativo nos três solos quando aditivados com lamas e composto (tratamento 3), sendo ainda significativo no solo/tratamento L1 e L2 ($F \geq 7,576$ e $p \leq 0,05$)

Tabela 6: Análise de variância da concentração de WSC e HWC ($\ln(WSC)$ e $\ln(HWC)$) (* - significativo ($p \leq 0,05$); gl: graus de liberdade)

	Variável	WSC			HWC		
		Solo	A	L	SD	A	L
	gl	F	F	F	F	F	F
Tratamento	3	399,9*	165,026*	175,6*	1155*	254,6*	182,0*
Tempo	1	3,410	2,036	0,055	85,665*	0,027	4,649*
Tratamento × tempo	3	20,24*	173,0*	6,348*	20,383*	1,213	2,148

O HWC está correlacionado com a BCM e a evolução da RB, o que indica que uma parte do carbono a solúvel em água quente deve estar facilmente disponível para ser utilizado pelos microrganismos (Ghani et al., 2003). Este estudo permitiu verificar - através do *plot* de todos os valores obtidos para estas duas variáveis - que existe uma relação aproximadamente linear entre o carbono solúvel em água quente e a biomassa C-microbiana, sendo mais notória para valores de BCM até cerca de 300 $\mu\text{g C.g}^{-1}\text{ss}$ (Figura 16). Concentrações superiores de BCM conduziram a uma maior dispersão do teor de carbono solúvel em água quente. Por sua vez, verificou-se que a respiração também aumenta de forma aproximadamente linear com o conteúdo de carbono solúvel em água quente no solo (Figura 17). Finalmente, verificou-se que nem as concentrações de WSC ($F=0,251$ e $p=0,778$) nem as de HWC ($F=0,296$ e $p=0,744$) foram influenciadas pelo tipo de solo.

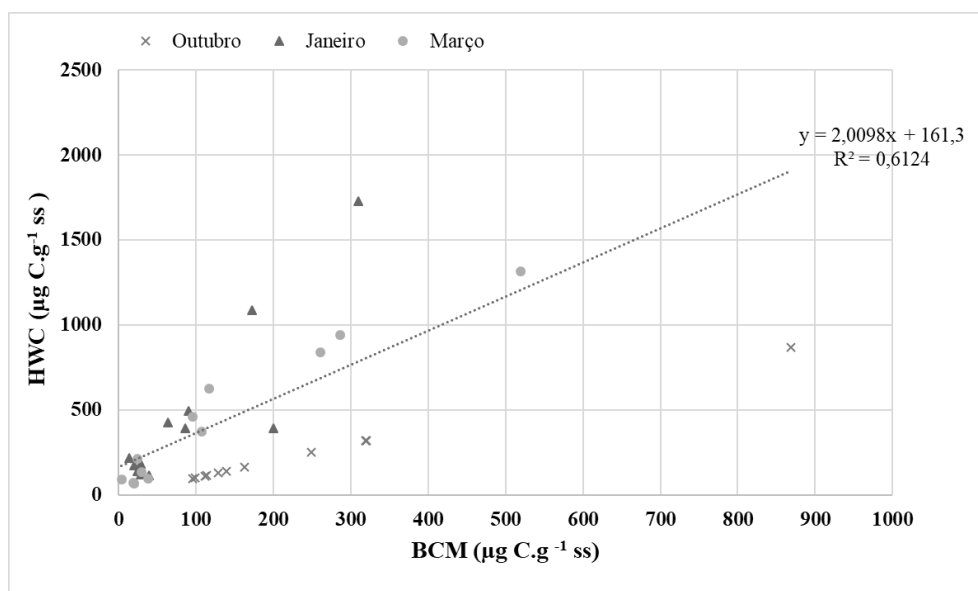


Figura 16: Relação entre carbono solúvel em água quente e a BCM, para todos as amostragens, solos e tratamentos

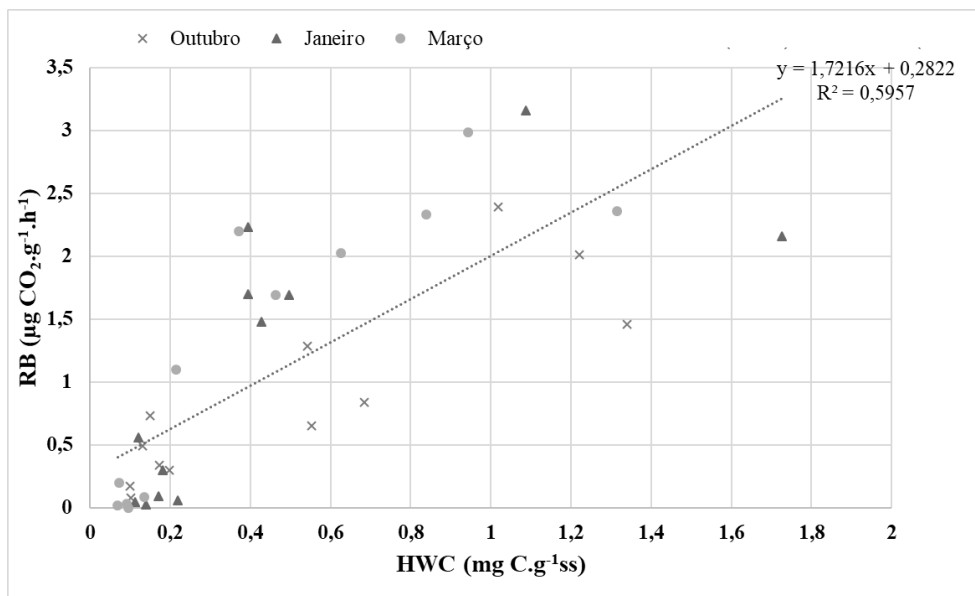


Figura 17: Relação entre RB e carbono solúvel em água quente, para todas as amostragens, solos e tratamentos

4.4. Macronutrientes disponíveis

Relativamente aos macronutrientes nas amostras dos solos testados, foram analisados o azoto, o fósforo, o cálcio, o potássio, o magnésio e o sódio nas campanhas de outubro e de março, cujos valores são apresentados seguidamente. Na Figura 18 estão representados os valores obtidos sobre a concentração de azoto. Verificou-se que o seu conteúdo nos solos é semelhante entre o controlo e o tratamento 1, com concentrações na gama 0,50 - 0,76 mg N.g⁻¹ ss, valor que aumenta substancialmente quando se combinam os dois aditivos (cinzas e lamas), passando a concentrações para a gama 1,55 - 2,80 mg N.g⁻¹ ss.

Tendo em conta o referido no ponto anterior, e considerando os dados obtidos para o macronutriente N, foi possível determinar a relação C/N. no solo (Figura 19).

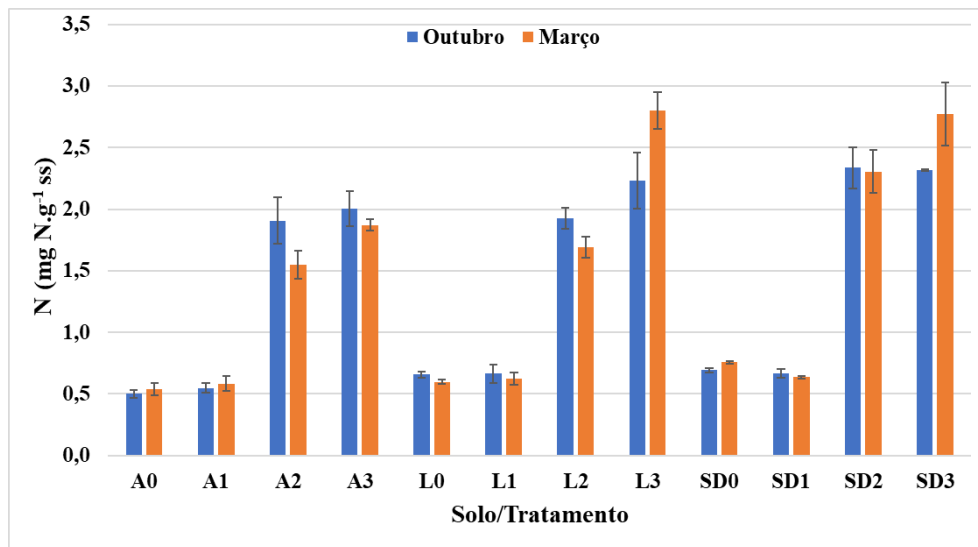


Figura 18: Concentração de azoto nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março

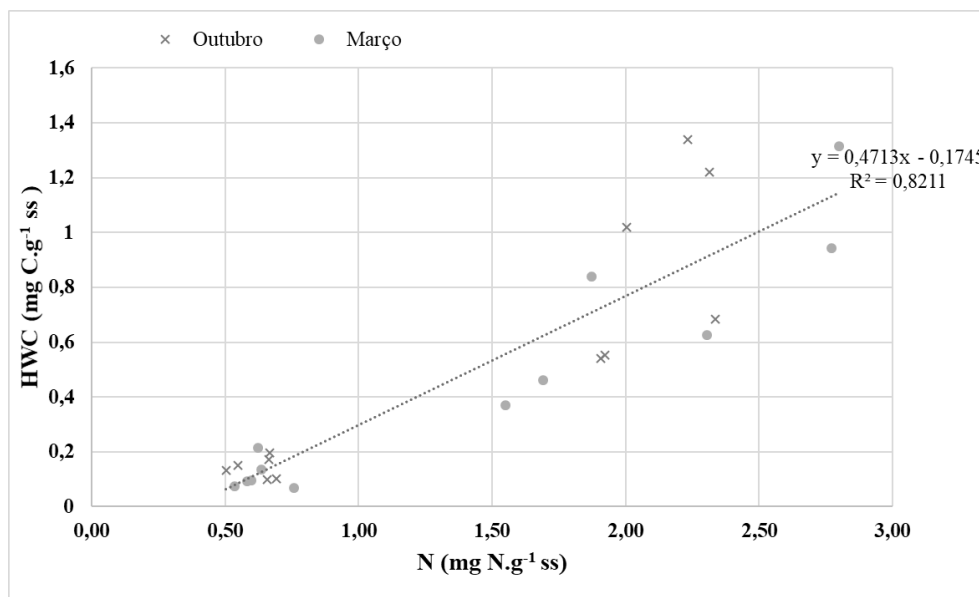


Figura 19: Relação entre HWC e macronutriente N, para todas as amostragens, solos e tratamentos

Uma razão C/N alta é indicativa de uma competição intensa entre os microrganismos pelo azoto disponível no solo. Por outro lado, esta razão permite ainda tirar conclusões sobre a taxa com que o azoto é disponibilizado para as plantas (Weil & Brady, 2007). De acordo com Haug (1993), a relação C/N do material adicionado ao solo tem uma grande influência na disponibilidade do N no solo, apresentando uma razão de 20:1 (Haug, 1993). O declive

obtido pela relação apresentada na Figura 19, estima a razão C/N no solo de 0,47, indicando que o N não será limitante do crescimento microbiológico.

Os resultados obtidos através da aplicação do modelo estatístico de dois fatores para o azoto encontram-se na Tabela 7. Tanto o tempo ($F \geq 2,48$ e $p \leq 0,05$) como o tratamento ($F \geq 136,1$ e $p \leq 0,05$) tiveram um efeito significativo nas concentrações de azoto nos solos. Como a interação foi significativa no modelo de dois fatores, os modelos de efeitos simples mostraram que o tratamento influenciou de forma significativa a concentração de N em ambas as campanhas de amostragem e nos três solos ($F \geq 54,16$ e $p \leq 0,05$). No entanto, não houve diferenças expressivas entre tratamentos 0 e 1, concluindo-se que a adição exclusiva de cinza em nada contribuiu para aumentar o conteúdo de azoto do solo tratado. Por sua vez, a adição das lamas biológicas, estabilizadas ou não (tratamentos 2 e 3), permitiu aumentar significativamente o conteúdo de azoto no solo, uma vez que as lamas biológicas são ricas em azoto, contrariamente às cinzas. Relativamente ao tempo, este fator apenas foi significativo no conteúdo de azoto nos solos de Aljustrel e Lousal aditivados com as cinzas granuladas e as lamas estabilizadas, e nos solos do Lousal e São Domingos aditivados com cinzas e lamas (quer em grânulos/estabilizadas quer na sua forma tal e qual), tal como ilustrado na Figura 18. De uma forma geral, e tal como observado com a BCM, a respiração basal aumenta com o aumento do conteúdo de azoto no solo, de $0,50 \text{ mg N.g}^{-1} \text{ ss}$ para $2,80 \text{ mg N.g}^{-1} \text{ ss}$.

Considerando os declives obtidos nos gráficos de dispersão do C e do N ($m=1,7216$ e $m=0,9643$), é possível aferir que para o mesmo conteúdo de carbono e azoto, a respiração passa para mais do dobro (Figura 17 e Figura 20). Por outras palavras, o conteúdo em C tem um contributo mais notório para a RB do solo do que o conteúdo em N.

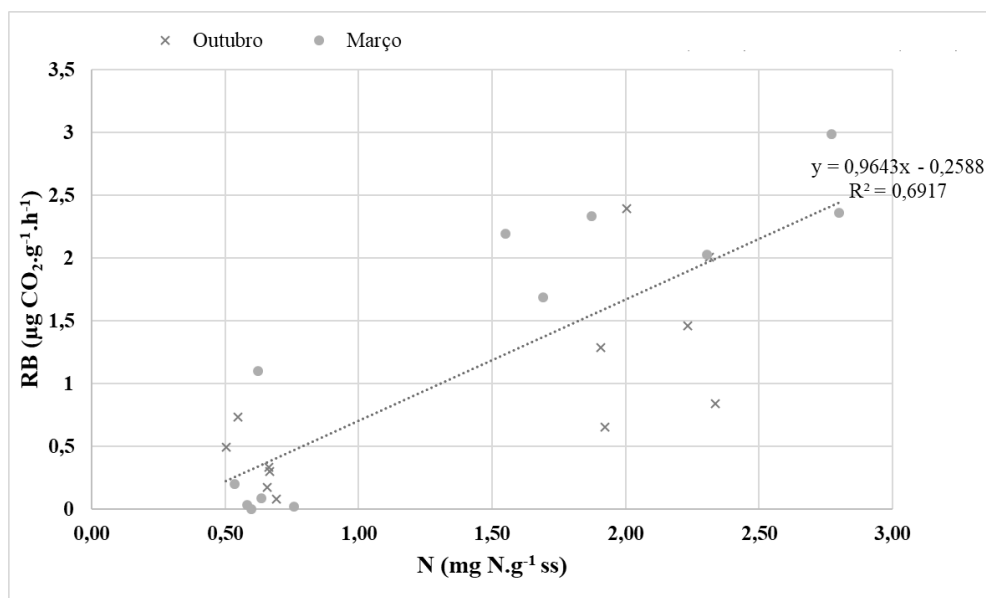


Figura 20: Relação entre RB e nutriente N, para todas as amostragens, solos e tratamentos

Tabela 7: Análise de variância da concentração de N (* - significativo ($p \leq 0,05$); gl: graus de liberdade)

	Solo	A	L	SD
	gl	F	F	F
Tempo	2	6,70*	2,48*	5,00*
Tratamento	3	340,8*	136,1*	387,4*
Tempo × tratamento	2	5,17*	5,185*	5,08*

Relativamente ao fósforo (Figura 21), verificou-se que os solos aos quais foi aplicado o tratamento 3 apresentaram uma concentração superior, em resultado do elevado teor de fósforo nas lamas biológicas, tanto na sua forma precipitada como incorporada nos seus compostos orgânicos (Reis, 2013). A concentração de fósforo no tratamento contendo lamas compostadas foi notoriamente mais baixa. Apesar de o tratamento 2 também conter lamas, estas foram previamente estabilizadas, processo que ocorreu nas instalações industriais. Antes de serem transportadas para o local experimental, ocorrerem vários períodos de pluviosidade que podem eventualmente ter diminuído a concentração de fósforo nas lamas por lixiviação.

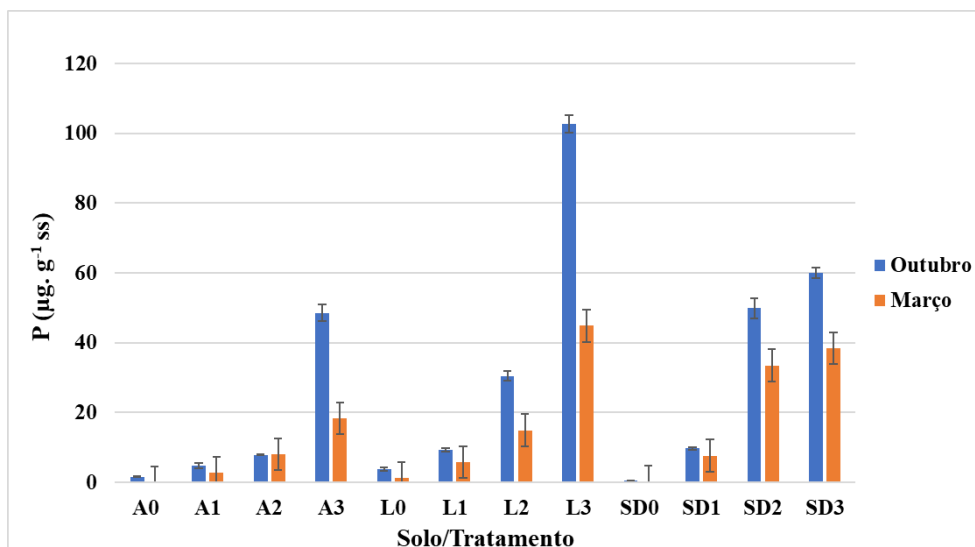


Figura 21: Concentração de fósforo para os diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março

Os modelos estatísticos aplicados à concentração de fósforo (Tabela 8) mostram que a interação entre os dois fatores é significativa no caso de Aljustrel e Lousal, não sendo no entanto significativa para os solos de São Domingos ($p=0,528$). Por outro lado, o modelo estatístico de efeitos simples mostrou que o tratamento foi significativo para as concentrações de fósforo nas duas campanhas de amostragem e em todos os solos ($F \geq 72,01$ e $p \leq 0,05$). O tempo, por sua vez, também foi significativo para todos tratamentos e solos, à exceção do tratamento 2 aplicado no solo de Aljustrel ($F=0,246$ e $p=0,646$), onde não se observaram diferenças notórias entre as concentrações de fósforo em outubro ($8,11 \mu\text{g P.g}^{-1} \text{ ss}$) e março ($7,87 \mu\text{g P.g}^{-1} \text{ ss}$).

Tabela 8: Análise de variância da concentração de P (raiz quadrada de P) (* - significativo ($p \leq 0,05$); gl: graus de liberdade)

	Solo	A	L	SD
	gl	F	F	F
Tempo	1	52,87*	130,1*	8,491*
Tratamento	3	150,1*	545,6*	125,0*
Tempo × tratamento	3	16,75*	15,65*	0,769

As concentrações de cálcio e o magnésio, determinadas por absorção atômica, encontram-se resumidas na Figura 22 e na Figura 23, respetivamente. De uma forma geral, verificou-se que estas concentrações aumentaram do tratamento 1 para o 3. No caso do cálcio, verificou-se um aumento considerável nas concentrações do tratamento L0 e SD0 para os restantes, uma vez que tanto as cinzas como as lamas são aditivos ricos em cálcio. Contrariamente, nos solos de Aljustrel o aumento de teor de cálcio em relação ao controlo não foi tão notório. Tal razão poderá ser parcialmente explicada pelo facto de o solo de Aljustrel apresentar inerentemente um conteúdo de cálcio superior aos demais.

Relativamente à concentração de magnésio, verificou-se que o tratamento 3 é o que parece aportar maior quantidade. De forma semelhante ao cálcio, verificaram-se concentrações elevadas de magnésio no talhão de controlo do solo de Aljustrel. Uma das justificações para esta observação poderá ser o fato de a amostra recolhida não ter sido representativa, ou terem ocorrido eventuais erros analíticos. No entanto, registaram-se concentrações sistematicamente elevadas nas duas campanhas de amostragem, o que exclui a possibilidade de ocorrência de erro analítico.

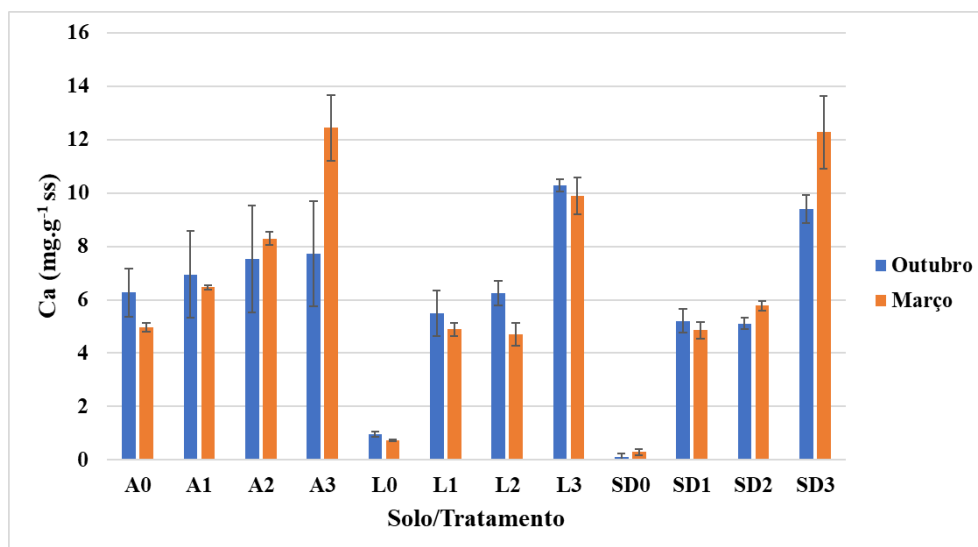


Figura 22: Concentração de cálcio nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março

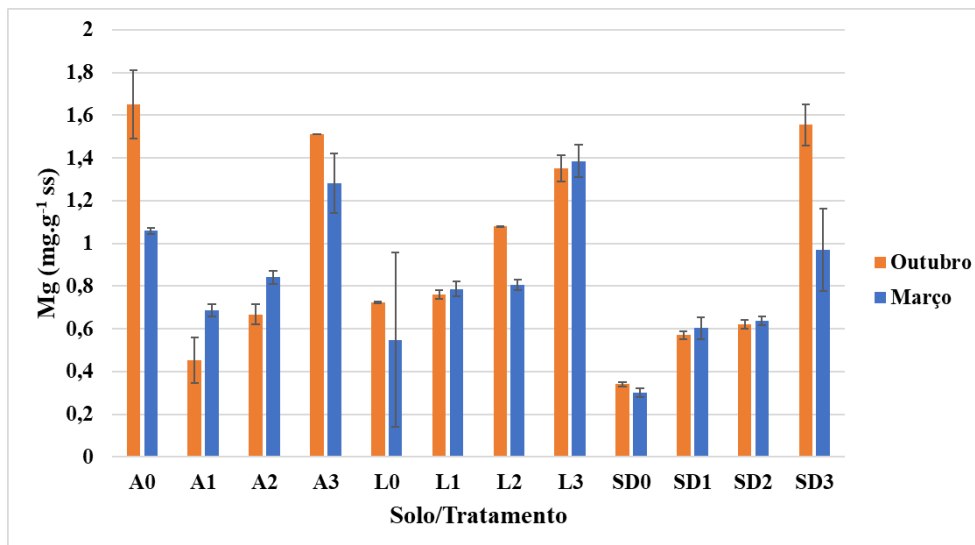


Figura 23: Concentração de magnésio nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março

Os parâmetros obtidos nos modelos estatísticos de dois fatores para as concentrações de Ca e Mg encontram-se resumidos na Tabela 9. Para o caso do cálcio, a interação entre o tempo e o tratamento foi significativa nos solos de Aljustrel ($F=6,359$ e $p \leq 0,05$) e São Domingos ($F=9,310$ e $p \leq 0,05$). Atendendo ao tempo individualmente em modelos estatísticos de um fator, este apenas é significativo no tratamento 2 para o solo de SD ($F=16,57$ e $p \leq 0,05$) e no tratamento 3 dos dois solos ($F \geq 11,55$ e $p \leq 0,05$). Considerando o tratamento, este foi significativo em todas as campanhas ($F \geq 63,23$ e $p \leq 0,05$), à exceção da de outubro para o solo de Aljustrel, atendendo às diferenças pouco expressivas da concentração de cálcio combinadas com os elevados desvios-padrão dos resultados analíticos.

Verificou-se que, no caso do magnésio, a interação entre o tempo e o tratamento foi significativa para os solos de Aljustrel e São Domingos. O modelo estatístico de efeitos simples mostra que o tempo foi significativo nos talhões de controlo e com tratamento de cinzas granuladas ($F \geq 11,69$ e $p \leq 0,05$) nos solos de Aljustrel, e no talhão de controlo dos solos de São Domingos ($F=12,52$ e $p \leq 0,05$). Por sua vez, o tratamento foi significativo em todas as campanhas ($F \geq 30,69$ e $p \leq 0,05$).

Tabela 9: Análise de variância da concentração de cálcio e do magnésio (Mg ao quadrado) (* - significativo ($p \leq 0,05$); gl: graus de liberdade)

Macronutriente	Cálcio				Magnésio		
	Solo	A	L	SD	A	L	SD
	gl	F	F	F	F	F	F
Tratamento	3	12,89*	396,7*	354,0*	10,24*	24,70*	69,01*
Tempo	1	2,716	13,55*	13,76*	0,210	1,010	2,856
Tratamento × tempo	3	6,359*	2,401	9,310*	4,986*	1,048	3,266*

Para as concentrações de macronutrientes determinadas através de espectrofotometria de emissão (Na e K), verificou-se que o sódio aumentou de forma gradual com o aumento do tratamento 1 para o 3, e diminuiu ao longo do tempo (Figura 24). Na campanha de outubro registaram-se valores na gama 463-1180 $\mu\text{g Na.g}^{-1}$ ss, enquanto que na campanha de março os valores situaram-se no intervalo 309-953 $\mu\text{g Na.g}^{-1}$ ss. Relativamente ao potássio (Figura 25), a sua concentração aumentou de forma gradual nos talhões de Aljustrel, mas nos solos do Lousal e de São Domingos o tratamento 1 apresentou valores semelhantes ao tratamento 2, voltando a concentração a aumentar no tratamento 3.

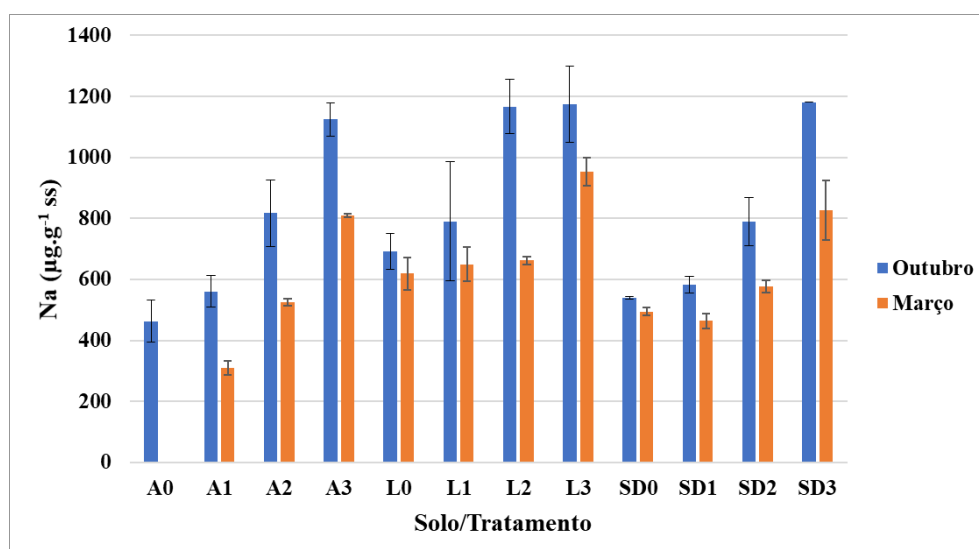


Figura 24: Concentração do sódio nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março

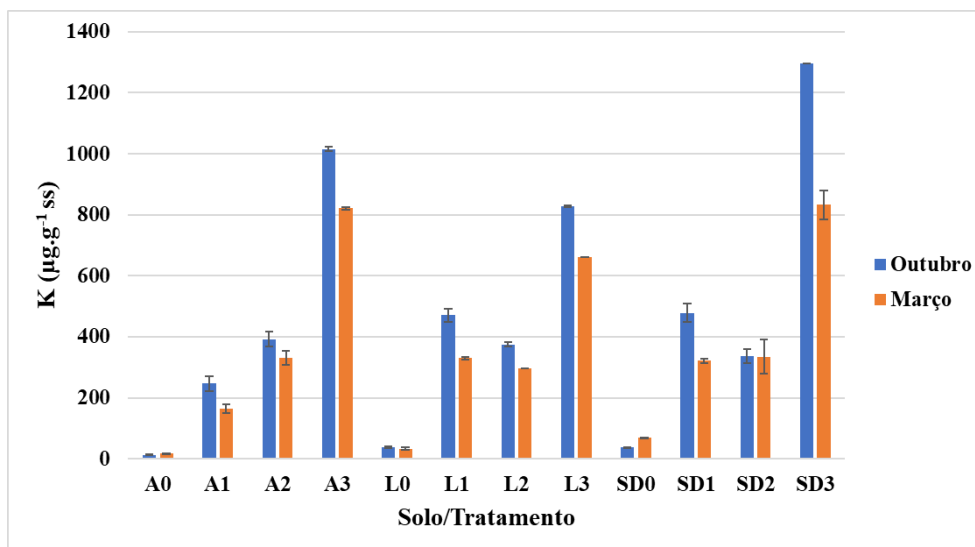


Figura 25: Concentração do potássio nos diferentes tratamentos, para as campanhas de outubro e março

Os parâmetros do modelo estatístico de dois fatores realizado para o sódio e o potássio (Tabela 10) demonstraram que a interação entre o tempo e o tratamento não foi significativa em nenhum dos solos para a concentrações destes nutrientes no solo.

Tabela 10: Análise de variância da concentração do sódio (*sem(Na)*) e do potássio (*sem(K)*) (* - significativo ($p \leq 0,05$); gl: graus de liberdade)

	Macronutriente		Sódio			Potássio		
	Solo	A	L	SD	A	L	SD	
	gl	F	F	F	F	F	F	
Tratamento	3	0,642	1,357	0,538	0,111	1,961	0,349	
Tempo	1	0,042	0,034	0,267	0,148	0,412	0,457	
Tratamento × tempo	3	0,581	0,780	0,468	2,895	1,300	1,096	

Verificou-se uma maior expressão na diminuição temporal das concentrações de K e Na, uma vez que são nutrientes facilmente solúveis. A disponibilidade dos restantes nutrientes também diminuiu ao longo do tempo, mas de forma menos notória, uma vez que se encontram principalmente nas formas carbonatadas ou ligados a compostos com baixa solubilidade, nomeadamente no caso do fósforo (Gómez-Rey et al., 2012). Não obstante, os tratamentos aplicados aumentaram indiscutivelmente as concentrações dos

macronutrientes disponíveis no solo. De uma forma geral, uma maior quantidade de nutrientes no solo permite o desenvolvimento dos microrganismos, o que, por sua vez, aumenta a competição por substrato.

Finalmente, comparando as concentrações globais de nutrientes determinadas nos três diferentes solos, verificou-se que o tipo de solo apenas foi significativo nas concentrações de cálcio ($F=3,422$ e $p=0,038$) no caso de Aljustrel, não o sendo para nenhum dos outros macronutrientes ($F \geq 0,778$ e $p \geq 0,062$).

5. Conclusões

Esta dissertação permitiu avaliar a resposta bioquímica de solos degradados provenientes de três áreas mineiras distintas - Aljustrel, Lousal e São Domingos – após a aplicação de dois corretivos visando a sua reabilitação: cinzas resultantes da queima de biomassa florestal (forma granulada e tal e qual) e lamas biológicas industriais (compostadas e tal e qual).

A aplicação destes corretivos permitiu aumentar a taxa de respiração basal dos solos em mais de 200% no caso de aplicação exclusiva de cinzas granuladas ($0,07 \mu\text{g CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), em mais de 3000% na adição de cinzas granuladas e lamas compostadas ($1,43 \mu\text{g CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), e em mais de 4500 % na adição combinada de cinzas e lamas não estabilizadas ($2,11 \mu\text{g CO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), relativamente ao controlo. A biomassa C microbiana também aumentou em mais de 20% no caso de aplicação exclusiva de cinzas granuladas ($45 \mu\text{g C}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ss}$), em mais de 140% na adição de cinzas granuladas e lamas compostadas ($57 \mu\text{g C}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ss}$), e em mais de 1250% na adição combinada de cinzas e lamas não estabilizadas ($242 \mu\text{g C}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ss}$), relativamente ao controlo. Em termos gerais, a sazonalidade entre outubro de 2018 e março de 2019 teve influência nestas duas variáveis.

Relativamente ao conteúdo dos macronutrientes biodisponíveis no solo (P, N, K, Na, Ca e Mg), verificou-se que, de uma forma geral, as suas concentrações aumentaram relativamente ao controlo, sendo que o tratamento com cinzas e lamas não estabilizadas apresentou as concentrações mais elevadas destes macronutrientes (mais de 20% relativamente ao controlo). A diminuição da disponibilidade de nutrientes no solo foi proporcional ao aumento da taxa de respiração e ao aumento de BCM no solo. A aplicação de cinzas granuladas sem qualquer aditivo de base orgânica não permitiu fornecer azoto suficiente ao solo.

Não se verificaram diferenças significativas no comportamento bioquímico e na concentração de nutrientes e carbono entre os três solos estudados. De uma forma geral, a aplicação de cinzas e lamas não estabilizadas foi o tratamento que permitiu um aumento mais visível em todas as variáveis quantificadas neste trabalho e, por conseguinte, este parece ter sido o tratamento mais eficaz na reabilitação dos solos estudados, refletido por um quociente metabólico mais baixo (maior eficiência microbiana) e um rendimento

metabólico superior (biomassa microbiana é mais eficiente na incorporação do carbono). Embora o efeito da lixiviação de nutrientes não tenha sido estudado nesta dissertação, a aplicação de cinzas sem pré-tratamento (por exemplo, granulação e estabilização) poderá induzir a uma perda dos seus componentes nutricionais por lixiviação. Como tal, é recomendável a estabilização das cinzas antes de aplicação ao solo, permitindo fazer perdurar, ao longo do tempo, o seu efeito benéfico na reabilitação de solos degradados.

6. Sugestões para trabalhos futuros

Pretende-se que este trabalho contribua de forma positiva para o projeto LIFE_No Waste, uma vez que acrescenta a vertente bioquímica na avaliação da reabilitação dos solos degradados de áreas mineiras. Foram quantificadas variáveis que não estavam inicialmente previstas no âmbito deste projeto, e que assim permitirão uma abordagem mais extensiva na avaliação do processo de recuperação dos solos degradados. Contudo, surgiram algumas dificuldades ao longo do trabalho experimental para as quais se sugerem adaptações e melhorias, tal como se ilustra seguidamente.

O método de determinação da biomassa C microbiana teve de ser adaptado, uma vez que a elevada concentração do extratante (sulfato de potássio) causou danos ao equipamento de quantificação de carbono orgânico. Para contornar este problema, utilizou-se um método de quantificação baseado na oxidação da amostra com dicromato de potássio e posterior quantificação por espectrofotometria que, apesar de ter sido previamente validado com o método anterior, poderá ter levado a eventuais inconsistências entre medições por métodos distintos.

A determinação da biomassa N microbiana é um parâmetro relevante, uma vez que permitiria determinar a razão C/N da biomassa. Esta razão é importante para os modelos de reabilitação dos solos, tendo em conta que estes devem ter por base um aumento da matéria orgânica que tenha uma relação C/N do solo semelhante à da biomassa, indicativa de uma recuperação da vida do solo (Longo et al., 2010). Os valores obtidos na primeira campanha para este parâmetro foram muito baixos e irregulares, pelo que o método analítico adotado (N-Kjeldahl) poderá não ser o mais indicado para solos contendo gamas de BNM semelhantes ou inferiores às que existem nos solos estudados. Assim, sugere-se a investigação de outros métodos mais adequados/sensíveis à determinação da BNM do solo, tais como a fumigação-incubação (Vargas & Scholles, 1998).

Para complementar este estudo, e tendo em conta a literatura de suporte desta dissertação, a determinação da atividade enzimática poderá também contribuir para avaliar a atividade microbiológica durante a recuperação dos solos degradados.

7. Referências bibliográfica

- Anderson, T. H., & Domsch, K. H. (2010). *Soil microbial biomass: The eco-physiological approach*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2039–2043. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.06.026>
- APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and waste water*, 21st edn. American Public Health Association, Washington, DC.
- Beck, T., Kandeler, E., & Nuss, E. (1997). *An inter-laboratory comparison of ten different ways of measuring soil microbial biomass C*. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(7), 1023–1032. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071797000308>
- Carter, M. R., & Gregorich, E. G. (2008). *Soil sampling and methods of analysis*. Canadian Society of Soil Science. Disponível em: <https://www.crcpress.com/Soil-Sampling-and-Methods-of-Analysis/Carter-Gregorich/p/book/9780849335860>
- COM – Comissão das Comunidades Europeia (2006). *Thematic Strategy for Soil Protection*. Disponível em: <http://terrestrial.eionet.eu.int/CLC2000/docs/publications/corinescreen.pdf>
- Curiel Yuste, J., Baldocchi, D. D., Gershenson, A., Goldstein, A., Misson, L., & Wong, S. (2007). *Microbial soil respiration and its dependency on carbon inputs, soil temperature and moisture*. *Global Change Biology*, 13(9), 2018–2035. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2486.2007.01415.x>
- EDM. (2018). *Recuperação ambiental da mina de são domingos avança para a 2ª fase*. Disponível em: <https://edm.pt/noticias/recuperacao-ambiental-da-mina-de-s-domingos-avanca-para-a-2a-fase/>
- Evangelista Da Silva, E., Sabadin De Azevedo, P. H., & De-Polli, H. (2007). *Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂)*. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/627577/1/cot099.pdf>
- Buscot, F., & Varma, A. (2005). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. (A. Varma & F. Buscot, Eds.) (3rd ed.). Springer. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/b137872.pdf>
- FOSS Application Note 300. (2009). *The determination of nitrogen according to Kjeldahl using Block Digestion and Steam Vestillation*
- Ghani, A., Dexter, M., & Perrott, K. W. (2003). *Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilisation, grazing and cultivation*, 35, 1231–1243. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003807170300186X>
- Gómez-Rey, M. X., Madeira, M., & Coutinho, J. (2012). *Wood ash effects on nutrient dynamics and soil properties under Mediterranean climate*. *Annals of Forest Science*, 69(5), 569–579. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13595-011->

0175-y

Haug, R. T. (1993). *The practical handbook of compost engineering*. (Lewis Publishers, Ed.) (2nd ed.). USA.

Ingram, L. J., Schuman, G. E., Stahl, P. D., & Spackman, L. K. (2003). *Short-Term Microbial Respiration As an Indicator of Soil Quality for Reclaimed Coal Mine Soils of Northeastern Wyoming*. *Proceedings America Society of Mining and Reclamation*, 462–473 Disponível em:

https://www.researchgate.net/profile/Lachlan_Ingram/publication/237574077_SHORT-TERM_MICROBIAL_RESPIRATION_AS_AN_INDICATOR_OF_SOIL_QUALITY_FOR_RECLAIMED_COAL_MINE_SOILS_OF_NORTHEASTERN_WYOMING1/links/57504f2b08ae4eed2740bfd0.pdf

International Standard Organization. (1997). ISO 14240-2: Soil quality - *Determination of soil microbial biomass*. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/32096.html>

International Standard Organization. (2002). ISO 16072: Soil quality - *Laboratory methods for determination of microbial soil respiration*. Disponível em:

<https://www.iso.org/standard/32096.html>

Johnston, C. A., Groffman, P., Breshears, D. D., Cardon, Z. G., Currie, W., Emanuel, W., Wielopolski, L. (2004). *Carbon cycling in soil*. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(10), 522–528. Disponível em:

[https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/1540-9295\(2004\)002%5B0522:CCIS%5D2.0.CO%3B2](https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/1540-9295(2004)002%5B0522:CCIS%5D2.0.CO%3B2)

LIFE No_Waste. (2019). Disponível em: <http://lifenowaste.pt/s/>

Longo, R. M., Ribeiro, A. Í., & Melo, W. J. De. (2010). *Recuperação de solos degradados na exploração mineral de cassiterita : biomassa microbiana e atividade da desidrogenase*, 132–138. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87052011000100019&script=sci_abstract&tlng=pt

Loureiro, S. P. M. (2004). *Avaliação da Ecotoxicidade de Solos: Estudo do Caso da Mina de Jales*. Doutorado em Biologia, Universidade de Aveiro, 185. Disponível em: <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/950/1/2009001068.pdf>

Mazurana, M., Fink, J. R., Camargo, E., Schmitt, C., Andrezza, R., & Camargo, F. A. de O. (2013). *Carbon stocks and microbial activity in a consolidated no tillage system in Southern Brazil*. SCAP. Disponível em:

<http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v36n3/v36n3a02.pdf>

Melém Junior, N. J., Carneiro, C. E. A., Brito, O. ., Franchini, J. ., Guedes, M. ., Brito, R. M., & Cunha, F. S. (2008). *Proporção carbono lábil/carbono total do solo após aplicação de resíduos orgânicos*. Disponível

em:<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/64477/1/AP-2008-proporcao-carbono-residuos-organicos.pdf>

Nayak, A. K., Kumar, A., Raja, R., Rao, K. S., Mohanty, S., Shahid, M., ... Bhattacharyya, P. (2014). *Fly ash addition affects microbial biomass and carbon mineralization in agricultural soils*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92(2), 160–164. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00128-013-1182-5>

Phillips, C. L., & Nickerson, N. (2015). *Soil Respiration. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095489094422>

Reis, A. M. C. dos. (2013). *Estabilização de misturas de resíduos para aplicação florestal*. Mestrado em Engenharia do Ambiente, Universidade de Aveiro, 122. Disponível em: <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/11385/1/7725.pdf>

Rolda, A. (2005). *Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions*, 30, 3–10. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139305000417>

Silva, A. O., Monique, A., Fernanda, A., Guimarães, A. A., Valentim, J., Maria, F., & Moreira, D. S. (2018). *Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies*. *Ecological Indicators*, 93 (December 2017), 142–151. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.073>

Silva, F. C., Cruz, N. C., Tarelho, L. A. C., & Rodrigues, S. M. (2019). *Use of biomass ash-based materials as soil fertilisers: Critical review of the existing regulatory framework*. *Journal of Cleaner Production*, 214, 112–124. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.12.268>

IPMA. (2019). Instituto Português do Mar e da Atmosfera. Disponível em: <http://www.ipma.pt/pt/index.html>

Vargas, L. K., & Scholles, D. (1998). *Nitrogénio da biomassa microbiana, em solo sob diferentes sistemas de manejo, estimado por métodos de fumigação*. 411 *Revista Brasileira da Ciência do Solo*, 22, 411–417. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v22n3/06.pdf>

Vezzani, F. M., & Mielniczuk, J. (2009). *Uma visão sobre qualidade do solo*. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 33(4), 743–755. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832009000400001

Brady, Nyle, C., Weil, & Raymond, R. (1996). *Nature and Properties of Soils*. (Global edition, Ed.), *Journal of Range Management* (5th ed., Vol. 136). Pearson.

Wirtz, H. P. A. (1999). *Measurement of the respiration activity of soils using the Oxitop Control measuring system*.