

# ATIVIDADE FITORREMEIADORA DA ESPÉCIE *Melissa officinalis* EM SOLO CONTAMINADO POR CHUMBO

Caroline Machado da COSTA<sup>(1)</sup>; Edson Valente CHAVES<sup>(2)</sup>

(1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Av. Sete de Setembro, 1975, Centro, Manaus, Amazonas, email: gatinha\_machado@hotmail.com

(2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Av. Sete de Setembro, 1975, Centro, Manaus, Amazonas, email: edson\_valente@yahoo.com.br

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de avaliar limites de contaminação por chumbo pela espécie *Melissa officinalis* que normalmente é utilizada na medicina popular. O experimento foi realizado na casa de vegetação da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), utilizando mudas da espécie e solo natural. No solo, antes do plantio, foi determinado o pH, a granulometria, matéria orgânica e alumínio trocável. 3kg do solo amostrado foi acondicionado e vasos de polietileno de 5 kg e posterior plantio da espécie. Após dois meses de aclimatização da espécie foram adicionados doses de chumbo (Pb) de 0 (controle), 3, 6, 9, 12 e 15 mg L<sup>-1</sup>. Durante dois meses foi acompanhado o desenvolvimento da planta. Depois de dois meses de plantio as mudas foram coletadas, separadas em raiz e parte aérea. Foram secadas e digeridas com mistura de ácidos concentrados HNO<sub>3</sub> e HClO<sub>4</sub> (4:1) e as concentrações de Pb medidas por FAAS. A espécie *Melissa officinalis* apresentou tolerância até a dosagem de 6 mg L<sup>-1</sup> de contaminação por Pb, acima dessa concentração a planta apresenta níveis de toxidez apresentando clorose e necrose. A *Melissa officinalis* foi classificada como fitoextratora para Pb e quando utilizada nesta situação na medicina popular constitui um risco para a saúde pública.

**Palavras-chave:** *Melissa officinalis*, Fitorremediação, Chumbo.

## 1. INTRODUÇÃO

A recuperação de áreas contaminadas, pelas atividades humanas, pode ser feita através de vários métodos, tais como escavação, incineração, extração com solvente, oxidoredução e outros que são bastante dispendiosos. Alguns processos deslocam a matéria contaminada para local distante, causando riscos de contaminação secundária e aumentando ainda mais os custos com tratamento. Por isso, em anos recentes passou-se a dar preferência por métodos in situ que perturbem menos o ambiente e sejam mais econômicos. Dentro deste contexto, a biotecnologia oferece a fitorremediação como alternativa capaz de empregar sistemas vegetais fotossintetizantes e sua microbiota com o fim de desintoxicar ambientes degradados ou poluídos (CUNNINGHAM et al., 1996).

A fitorremediação consiste na utilização de plantas que sejam capazes de remover, transferir ou destruir elementos nocivos de solos e águas contaminadas. As plantas que possuem essa capacidade de retirar os metais pesados do solo absorvem esses elementos e os acumulam em galhos e folhas. Elas secretam em suas raízes uma substância que as tornam os metais pesados solúveis em água e assim elas os absorvem pelas raízes e depois os acumulam em suas partes aéreas (CHAVES e SANTANA, 2008).

As substâncias alvos da fitorremediação incluem metais (Pb, Zn, Cu, Ni, Hg, Se), compostos inorgânicos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), elementos químicos radioativos (U, Cs, Sr), hidrocarbonetos derivados de petróleo (BTEX), pesticidas e herbicidas (atrazina, bentazona, compostos clorados e nitroaromáticos), explosivos (TNT, DNT), solventes clorados (TCE, PCE) e resíduos orgânicos industriais (PCPs, PAHs), entre outros. A concentração do poluente e a presença de toxinas devem estar dentro dos limites de tolerância da planta usada para não comprometer o tratamento. Riscos como a possibilidade dos vegetais entrarem na cadeia alimentar, devem ser considerados quando empregar esta tecnologia (CUNNINGHAM et al., 1996).

Um vegetal é um ser vivo e está sujeito às influências do ambiente que podem afetar de diferentes formas seu metabolismo. É indiscutível a importância do solo transferindo água, sais minerais, nutrientes e, sob determinadas condições, elementos não benéficos como metais pesados. Estima-se que 80% da população

dos países em desenvolvimento, onde a pobreza é a principal responsável pela falta de condições mínimas de higiene e saúde (água potável, medicamentos e instalações sanitárias), é completamente dependente da medicina caseira (BRAZ-FILHO, 1994). Essas pessoas são as principais vítimas potenciais do uso incorreto de plantas medicinais. Este trabalho teve como objetivo avaliar limites de contaminação por chumbo pela espécie *Melissa officinalis* que normalmente é utilizada na medicina popular.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Em termos de poluição ambiental, os metais podem ser classificados de acordo com três critérios: a) não crítico; b) tóxico, mas muito solúvel ou raro e c) muito tóxico e relativamente acessível (Tabela 1).

**Tabela 1** – Classificação de alguns elementos de acordo com a toxicidade na fauna e flora.

| Toxidade     | Elementos  |
|--------------|--|
| Não crítico  | Na, K, Mg, Ca, H, O, N, C, P, Fe, S, Cl, Br, F, Li, Rb, Sr, Si         |
| Tóxico       | Ti, Hf, Zr, W, Nb, Ta, Re, Ga, La, Os, Rh, Ir, Ru, Ba, Al              |
| Muito tóxico | Be, Co, Ni, Zn, Cu, Sn, As, Se, Te, Pd, Ag, Cd, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi |

Fontes: Forster e Wittmann (1983) e Oliver, (1997).

A toxicidade dos metais é uma questão de dose ou de tempo de exposição, da sua forma físico-química e da via de administração e/ou absorção. O seu caráter tóxico depende da interação com o organismo vegetal, normalmente ocorrendo em três etapas: i) estágio de entrada e absorção; ii) estágio no organismo, onde ocorrem transporte, a distribuição, acumulação, biotransformação e efeito ocorrem; e iii) estágio de saída do organismo. Em cada um desses estágios, encontram-se elementos em diferentes formas químicas e físicas, cujas características anatômicas e propriedades fisiológicas dos órgãos ou sistema são apropriadas para as diversas interações observadas nos organismos (DINARDI et al., 2003).

Segundo Warman e Copper (2000), particularmente no solo, os metais podem estar na forma solúvel, fixada pelos minerais, precipitada com outros componentes, na biomassa e complexada com alguns componentes da matéria orgânica. A atividade de um dado metal na solução do solo é determinada pelo seu equilíbrio com as partículas de argila, hidróxido de ferro, alumínio, manganês e quelantes solúveis.

Entre os metais que apresentam atividades na solução do solo encontra-se o chumbo (Pb). Kabata-Pendias e Pendias (2000), afirmaram que as características geoquímicas do Pb se assemelham ao metais alcalinos terrosos. Este fato explica a habilidade deste metal substituir isomorficamente K, Ba, Sr e Ca em minerais e deslocá-los em sítios de sorção. Por isso, o Pb é considerado um dos metais pesados com menor mobilidade, sendo acumulado naturalmente nos horizontes superficiais (FRANCHINI et al., 1999).

## FITORREMEDIAÇÃO

A técnica da fitorremediação tem como objetivo a descontaminação de solo e água, utilizando as plantas como agente de descontaminação. Após extrair o contaminante do solo, a planta armazena-o em sua estrutura para tratamento subsequente, quando necessário, ou mesmo metaboliza-o, podendo, em alguns casos, transformá-lo em produtos menos tóxicos ou mesmo inócuos. Pode ser empregada em solos contaminados por substâncias inorgânicas e/ou orgânicas, com resultados promissores obtidos para metais pesados (PIRES et al., 2001).

A fitorremediação pode ser utilizada sozinha ou associada a outras técnicas, e é ideal para níveis baixos e médios de contaminação. Possui elevada relação custo-benefício quando comparada com outras técnicas, como exemplo aeração do solo ou escavação, pode ser aplicada em grandes áreas e tem boa aceitação pública. Estudos realizados na Suécia relatam que a espécie *Salix vitaminalis*, cultivada em áreas, a 500 m de uma fábrica de bateria, reduziu a concentração de Pb no solo em mais de 60%, após três anos de plantio (MAGNUS, 1994).

Investimentos em pesquisa e desenvolvimento de tecnologia estenderam o potencial da comunidade vegetal para uma gama de poluentes, introduzidos que variam desde nutrientes até metais pesados e compostos químicos orgânicos de origem antropogênica. Estes estudos demonstraram que, além de potencializar a

biodegradação no solo, espécies de plantas aquáticas, herbáceas, arbustivas e arbóreas são capazes de remover, biocumular e também destoxificar as mais diferentes classes de compostos químicos (SCHNOOR et al, 1995; MORENO, 2001). O processo de absorção de metais pesados por plantas depende de vários fatores, como: concentração do metal no solo (solos com maiores concentrações de metal favorecem a acumulação destes nas plantas), solubilidade em água (compostos mais solúveis em água são mais facilmente remediados) e da espécie cultivada (algumas espécies são seletivas a determinados metais).

A concentração e o acúmulo de metais nos tecidos das plantas dependem da sua disponibilidade na solução do solo. As espécies tolerantes, geralmente acumulam maiores concentrações de metais pesados nas raízes em relação à parte aérea. Desta forma, procuram-se espécies que apresentem esta característica; ou seja, que possam reter quantidades elevadas de metais pesados em suas raízes e que evitem a translocação o metal para a parte aérea. Evitando assim, que o metal interfira em seus processos metabólicos (BAKER, 1987 e GUSSARSSON et al., 1991).

Há espécies que apresentam diversos mecanismos que reduzem a disponibilidade na rizosfera, a retenção dos metais na parede celular ou na superfície da raiz e a imobilização do metal no citoplasma, diminuindo a atividade tóxica do metal na planta (MAGNUS, 1994).

No Brasil constatou-se a presença altos níveis de chumbo em algas marinhas coletadas no litoral do Rio de Janeiro e sugeriu-se tratar de uma bioacumulação que interfere nos mecanismos de defesa das algas contra os herbívoros, já que os metais pesados são quelados pelos taninos e estes deixam então de conferir sabor amargo às algas, facilitando a herbívora (SANTOS et al, 1994). Grill et al, (1987) citado por Harbone (1992) observou que de uma maneira genérica plantas tolerantes a metais pesados possuem constantemente peptídeos ligados a estes metais e sugeriu que os mesmo poderiam ser induzidos pela adição destes metais ao meio de cultivo. O autor os chamou de fitoquelatinas.

### 3. METODOLOGIA

O experimento foi realizado em casa de vegetação da UFAM, utilizando mudas de *Melissa officinalis* e amostras de solos não contaminados, ambos coletados na fazenda da UFAM. Na amostra de solo foi realizada a determinação de pH, areia, silte, argila, matéria orgânica (M.O) e alumínio trocável ( $H^+$  e  $Al^{3+}$ ) seguindo o método sugerido pela EMBRAPA (1999). O solo utilizado foi acondicionado em vasos de polietileno de 5 kg, contendo, aproximadamente, 3 kg de solo, onde foram feito o plantio da espécie *Melissa officinalis* por um período de dois meses para sua aclimatização. Após dois meses de plantio da espécie, foram adicionados doses de solução de Pb [ $Pb(NO_3)_2$ ] com as seguintes concentrações: 0 (controle); 3; 5; 9; 12 e 15 mg  $L^{-1}$ . Durante esse tempo foi feita uma avaliação periódica do desenvolvimento das plantas (altura, sobrevivência e sintomas de toxidez). Depois de dois meses as mudas foram coletadas e separadas em raiz e parte aérea (caule e folhas), lavada com água deionizada, armazenadas e identificadas em sacos de papel de 1 kg. As amostras foram secas ao ar, em estufa com circulação e renovação de ar a uma temperatura de 65 °C por 48 horas e moídas em moinho Tipo Willye. Cerca de 0,50 g das partes da plantas foram digeridas com a mistura de ácidos concentrados  $HNO_3$  e  $HClO_4$  (4:1) em microdigestor a 200 °C por duas horas ou até completo clareamento do extrato, e a concentração de Pb foram medida por FAAS em espectrômetro de absorção atômica (GBC, modelo AAS 932 PLUS) pelo método direto e chama de ar/acetileno (MALAVOLTA, 1997). Todas as análises foram feitas em triplicatas.

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela X mostraram que o solo utilizado no experimento, possui característica argilosa e sendo levemente ácido. Características encontradas em Latossolos Amarelos estudados no Amazonas, que não passaram por influência antrópicas (VALLE, 1998; CHAVES, 2008). O solo controle, por possuir valor de pH de 4,9 e um valor de MO em torno de 9,4 mg  $L^{-1}$ , tem tendência de formar complexos orgânicos, o que torna o Pb mais biodisponível para as plantas (USEPA, 2005 e CHAVES e SANTANA, 2008).

**Tabela 2** – Parâmetros físico-químicos e químicos do solo controle.

| Parâmetros   | Solo Controle         |
|--|-----------------------|
| pH em água   | 4,9 <sub>(0,3)</sub>  |
| Areia (%)  | 12,0 <sub>(0,9)</sub> |
| Silte (%)  | 11,0 <sub>(0,7)</sub> |
| Argila (%)   | 77,0 <sub>(3,0)</sub> |
| MO (g kg <sup>-1</sup> )                                       | 9,4 <sub>(0,7)</sub>  |
| (H <sup>+</sup> e Al <sup>3+</sup> ) (C mol dm <sup>-3</sup> ) | 17,1 <sub>(0,8)</sub> |

( ) desvio padrão em triplicata

A avaliação da espécie durante os dois meses de contaminação por Pb, mostrou que a planta se desenvolveu muito bem com as dosagem de 3 e 6 mg L<sup>-1</sup>, não apresentando níveis (Figura 1a). Entretanto com as dosagens de 9 mg L<sup>-1</sup> em diante a planta apresentou folhas com clorose e necrose, sendo as esses níveis de contaminação prejudicial a espécie estudada (Figura 1b).

Segundo Utriainen et al. (1997), as plantas que crescem em aéreas contaminadas necessitam de mecanismos de tolerância em suas raízes para sobreviverem e crescerem. Em geral, existem dois tipos de tolerância: aquela que previne a absorção em excesso de íons de metal (exclusão) e a habilidade de conviver com altas concentrações dos metais nos tecidos (tolerância). Um dos fatores responsável pela toxidez das espécies em aéreas contaminadas é a contaminação por metais pesados, que dependendo de suas concentrações, afeta o crescimento das plantas (MAGNUS, 1994).



(a)



(b)

Figura 1 – Espécie *Melisa officinalis* após dois meses com dosagem de Pb. (a) aparência da planta com dosagem de até 6 mg L<sup>-1</sup> e (b) acima de 9 6 mg L<sup>-1</sup>.

Os valores da concentração de Pb pela espécie *Melissa officinalis* no cultivo, após fitorremediação, permitiu observar o potencial de acumulação do metal pela planta (Tabela 3). A espécie foi capaz de absorver Pb na raiz e na parte aérea para todos os valores de concentração adicionados do experimento, sendo esses valores maiores na raiz. É possível observar que esses valores foram crescentes até a dose de 9 mg L<sup>-1</sup> de Pb adicionado (não na mesma proporção) e tornando-se constante a partir desse valor. Segundo estudos

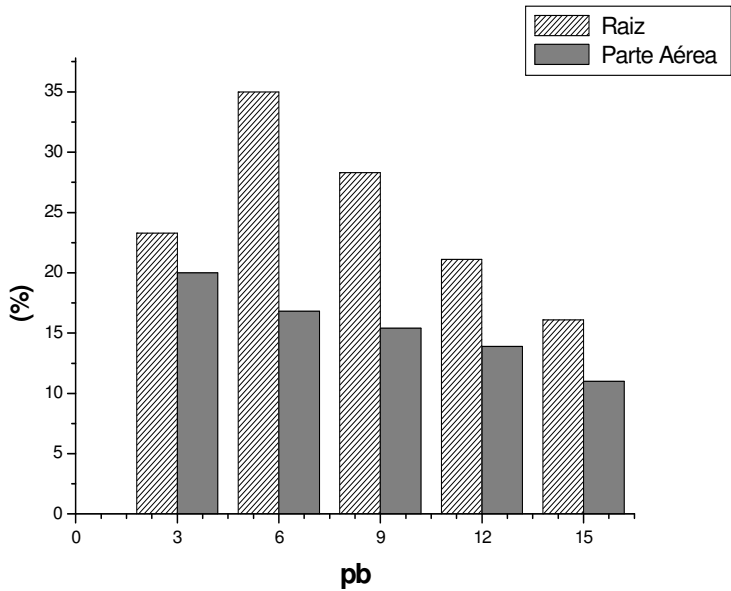
realizados por Freire (2005), a espécie *Melissa officinalis* apresentou uma concentração entre 1,4 a 1,8 mg L<sup>-1</sup> de Pb encontrado em suas folhas.

**Tabela 3**– Concentração (mg/L) de Pb adicionado e presente, após fitorremediação pela espécie *Melissa officinalis*.

| Pb adicionado (mg/L) | Pb presente na <i>Melissa officinalis</i> após fitorremediação (mg/L) |                        |
|----------------------|---|------------------------|
|                      | Raiz  | Parte Aérea            |
| 0                    | ND  | ND                     |
| 3                    | 0,70 <sub>(0,10)</sub>  | 0,60 <sub>(0,12)</sub> |
| 6                    | 2,10 <sub>(0,9)</sub>   | 1,01 <sub>(0,10)</sub> |
| 9                    | 2,55 <sub>(0,20)</sub>  | 1,39 <sub>(0,08)</sub> |
| 12                   | 2,53 <sub>(0,31)</sub>  | 1,67 <sub>(0,12)</sub> |
| 15                   | 2,41 <sub>(0,35)</sub>  | 1,65 <sub>(0,14)</sub> |

( ) desvio padrão em triplicata

A taxa de absorção de Pb pela espécie *Melissa officinalis* utilizada no cultivo permitiu observar o potencial de acumulação do metal pela parte aérea e raiz da planta (Figura 2). No geral, a planta foi capaz de acumular o metal tanto na raiz como na parte aérea, sendo maior na raiz. Entretanto a taxa de absorção comprova que a planta não absorve na mesma proporção da dosagem de contaminação por Pb pela planta.



**Figura 2.** Taxa de absorção em % de Pb pelas espécie *Melissa officinalis*.

O processo de obtenção do Pb pelos vegetais envolvem captação do metal do solo pela raiz e o transporte até a folha. De acordo com Bettiol e Camargo (2000), a solubilização pelos exsudatos de raízes é o principal mecanismo de absorção deste metal pela planta. A entrada de Pb absorvido pela raiz, estocado nas paredes celulares com translocação limitada para a parte aérea (GARBISU e ALKORTA, 2001). Das espécies

arbóreas, por serem pouco estudadas, as que melhores responderam em solos contaminados com Pb, foram: *camaldulensis*, *E. maculata*, *E. torelliana*, *A. mangium* e *P. caribaea*. *Myrsine umbellata*, *Cedrella fissilis*, *Tabebuia impetiginosa* e *Copaifera langsdorffii*, *Senna multijuga*, *Schizolobium amazonicum* e *Caesalpinia echinata* (MARQUES et al., 2000; ACCIOLY, 2001; CHAVES e SANTANA, 2008).

De acordo com Dinardi et al. (2003), plantas que envolve a absorção dos contaminantes pelas raízes, os quais são nelas armazenados ou são transportados e acumulados nas partes aéreas são classificadas como fitoextratora. Podemos assim classificar espécie *Melissa officinalis* como fitoextratora de Pb.

Por se tratar de uma espécie que é utilizada na medicina popular e por possuir predisposição em acumular Pb, a *Melissa officinalis*, constitui um fator de alto risco para a saúde de quem as utiliza. Nos países industrializados há uma preocupação maior em estudar o ambiente onde se desenvolvem e com a melhor maneira de cultivá-las (FREIRE, 2005).

## CONCLUSÃO

A espécie *Melissa officinalis* apresentou tolerância até a dosagem de 6 mg L<sup>-1</sup> de contaminação por Pb, acima dessa concentração a planta apresenta níveis de toxidez apresentando clorose e necrose. A *Melissa officinalis* foi classificada como fitoextratora para Pb e quando utilizada nesta situação na medicina popular constitui um risco para a saúde pública.

## AGRADECIMENTOS

A FAPEAM pela concessão de auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, A.M.A.. **Amenizantes e estratégias para o estabelecimento de vegetação em solos contaminados por metais pesados**. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2001. 185p.
- BAKER, A.J.M. Metal tolerance. **The New Phytologist**, Londres, 106:93-111, 1987.
- BETTIOL, W. CAMARGO O.A. (Eds.) 2000. Impacto ambiental uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna: **EMBRAPA**, p. 249-259.
- BRAZ-FILHO, R. Química de Produtos Naturais, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. A Peregrinação de um Pacatubano. **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 405-45, 1994.
- CHAVES, E.V., SANTANA, G.P. **Comportamento dos metais pesados Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn em solos contaminados do aterro sanitário e Pólo Industrial de Manaus**. Submetido a Revista Acta Amazônica. 2008.
- CUNNINGHAM, S.D., ANDERSON, T.A.; SCHWAB, A.P.; HSU, F.C.. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advance in Agronomy**, New York 56:55-114, 1996
- DINARDI, A.L., et al. **Fitorremediação**. 3º fórum de estudos contábeis. Faculdade integrada Claretiana, Rio Claro, São Paulo, 2003.
- FÖRSTNER, U.; WITTMANN, G.T.W. **Metal Pollution in the Aquatic Environment**. Berlin, Springer-Verlag, 1983. 486p.
- FRANCHINI, J C.; MYAZAWA, M.; PAVAN, M A.; MALAVOLTA, E. Dinâmica de íons em solo ácido lixiviado com extratos de resíduos de adubos verdes e soluções puras de ácidos orgânicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 12, p 2267-2276, dezembro, 1999.
- FREIRE. M. F. I. metais pesados e plantas medicinais. **revista científica eletrônica de agronomia** - 2005.
- GARBISU, C., ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresource Technology** 77:229 – 236. 2001.
- GRILL, E., WINNACKER, E. L., ZENK, M. H. Proc. **Natn. Acad. Sci. U.S.A** . v. 84 , p. 439-43, 1987.
- Gussarsson, M. Cadmium-induced alterations in nutrient composition and growth of *Betula pendula* seedlings: the significance of the fine roots as a primary target for cadmium toxicity. **Journal of Plant Nutrition, Madison**, 17(12):2151-2163. 1994.

HARBONE, J. B. & DEY, P. M. **Plant Biochemistry**. Academic Press, London , 1997.

KABATA-PENDIAS, A. e PENDIAS, H. **Trace elements in soil and plants**. 4a ed., Boca Raton, CRC Press, 2000. 331p

MAGNUS, F.B. **Toxic substances in the environment**. New York: John Wiley & Sons Inc. 1994.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos**. São Paulo: Produquímica, 1997. 153 p.

MARQUES, T.C.L.L.S.M., MOREIRA, A.M.S., SIQUEIRA, J.O.. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35:121-132. 2000

MORENO, F. N.; CORSEUIL, H. X. Fitorremediação de aquíferos contaminados por gasolina. **Eng. Sanitária Amb.**, 6:1-7, 2001.

OLIVER, M. A. **Soils and human health: a review**. European J. Soil Sci., v. **48**, p. **573-592**, 1997

PIRES, F. R. et al. **Uso da fitorremediação na descontaminação do solo**. In: ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS, 23, 2001, Viçosa, MG. Resumos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 104p.

SANTOS , P. L., GOOUVEA, R.. C. S., KELECOM, A. **A bioacumulação de chumbo-210 em algas marinhas bentônicas independe da presença de florotaninos**. XVI Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares - II Jornada de Iniciação Científica em Biodiversidade - Anais, UFF, 1994.

SCHNOOR, J.L.; LICHT, L.A.; MCCUTCHEON, S.C.; WOLFE, L.N.; & D CARREIRA, L.H. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. Environ., **Sci. and Technol.**, v. 29, n. 7, p. 318-323, 1995.

USEPA.. Why Do Wellhead Protection? Issues and Answers in Protecting Public Drinking Water Supply Systems. **Office of Water**, EPA 813-K-95-001. 2005

UTRIAINEN, M.A; KARENLAMPI, L.V.; KARENLAMPI, S.O.; SCHAT, H. Differential tolerance to copper and zinc of micropropagated birches tested in hydroponics. **The New Phytologist**, Oxford 137:543-549. 1997.

WARMAN, P.R.; COPPER J.M. Fertilization of a mixed forage crop with fresh and composted chicken manure and NPK fertilizer: effects on soil and tissue Ca, Mg, S, B, Cu, Fe Mn and Zn. **Can J. Soil Sci.**, v.80, p. 345-352, 2000.