

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA

Mirian Barbieri

**BIOATIVIDADE DO SOLO SOB PLANTIO DIRETO COM
SUCESSÃO E ROTAÇÃO DE CULTURAS**

**Santa Maria, RS.
2017**

Mirian Barbieri

**BIOATIVIDADE DO SOLO SOB PLANTIO DIRETO COM SUCESSÃO E
ROTAÇÃO DE CULTURAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, linha de pesquisa: Interação Organismo-Ambiente da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Zaida Inês Antonioli

**Santa Maria, RS, Brasil
2017**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Barbieri, Mirian
Bioatividade do solo sob plantio direto com sucessão
e rotação de culturas / Mirian Barbieri.- 2017.
61 p.; 30 cm

Orientadora: Zaida Inês Antonioli
Coorientadora: Caroline Borges Bevilacqua
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2017

1. Atividade enzimática 2. Diversidade genética 3.
Escarificação 4. Microrganismos 5. RAPD I. Antonioli,
Zaida Inês II. Borges Bevilacqua, Caroline III. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Mirian Barbieri. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.


E-mail: mirian.barbieri1993@hotmail.com

Mirian Barbieri


BIOATIVIDADE DO SOLO SOB PLANTIO DIRETO COM SUCESSÃO E ROTAÇÃO DE CULTURAS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, linha de pesquisa: Interação Organismo-Ambiente da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

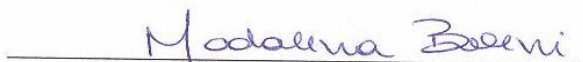
Aprovado em 06 de março de 2017:



Zaida Inês Antonioli, Prof.^a Dr.^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Marcelo Aloísio Sulzbacher, Dr. (UFSM)



Madalena Boeni, Dr.^a. (FEPAGRO)

Aos meus amados pais Neri e Marilaine, pelo exemplo de vida, amor, carinho e pelos ensinamentos.

À minha tia Vanilda Inês Somavilla Rubin in memoriam.

Eu dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito à minha numerosa e sólida **família**, por serem meu alicerce e ambiente de refúgio. Agradeço pelos momentos de felicidade que vocês me proporcionam.

Aos meus **pais** Neri Barbieri e Marilaine Somavilla Barbieri, que sempre me apoiam e incentivam em todas as minhas decisões.

Ao meu **irmão** Guilherme Barbieri, pela amizade, confiança e companheirismo. Que sejamos sempre o suporte um do outro!

À minha **orientadora**, Dra. Zaida Inês Antonioli, pelo seu papel exemplar de educadora! Obrigada pelos ensinamentos e confiança!

Ao professor Dr. Rodrigo Josemar Seminoti Jacques pela orientação, incentivo, confiança e amizade.

À minha **co-orientadora** Dra. Caroline Borges Bevilacqua. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, companheirismo e amizade! Uma importante parte deste trabalho só foi executada graças ao teu conhecimento e determinação. Agradeço imensamente!

À Dra. Madalena Boeni e ao Ms. Dinis Deuschle da FEPAGRO, pela ajuda na condução do experimento, excelente convívio e auxílio sempre que necessário.

Às **professoras** Dra. Josiane Pacheco Menezes e a Dra. Rosamari Piaia! Obrigada pelo convívio harmonioso e pela amizade durante todo esse tempo. Obrigada por tudo!

Aos **colegas** do Laboratório de Biologia do Solo e Microbiologia do Ambiente Joice Freiberg, Valdemir Bittencourt, Willian Santos, Daiane Dalla Nora, Caroline Rabuscke, Anderson Moro, Guilherme Padilha, Nariane de Andrade, Ricardo Balardin, Reyllis Unfer, Máisa Wohlenberg, Mariana Dossin, Caroline Bevilacqua, Ângela Neufeld, Fernanda Cantoni, Daiana Baldoni, Marcelo Sulzbacher e Natíelo Santana, obrigada pela amizade, pelos momentos alegres compartilhados e por toda a ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos **professores** do Departamento de Biologia e do Departamento de Solo pelos ensinamentos e contribuição tanto na minha formação pessoal quanto profissional.

Aos **amigos (as)** Isadora Cervo, Isabele Cervo, Érika Londero, Luana Lenz, Leidiana da Rocha, Julie Matie Noda, Lariana Löffler, Aline Freitas, Jonas Machado, David Magano, Michelle Antunes, Mirian Valente, Guilherme Dietrich, Vanilda Inês

Ulianapela convivência e por estarem sempre perto durante os momentos bons e também durante os momentos tristes e de estresse!

*Aos **amigos (as)** mais distantes, Ildernandes Vieira (CE), AllissonSanzovo (PR), Priscila Romanin (PR), Maiara Amaral (SP), Larissa Almeida (MT), Carolinne Rosa de Carvalho (MG), Carolina Mendes (RJ). Galera do aloj! Obrigada por serem estes grandes amigos e excelentes profissionais! Saudade enorme de cada um de vocês! O que o ICB-USP uniu, ninguém separa!*

*À **Universidade Federal de Santa Maria** e ao **Programa de Pós-graduação em Agrobiologia** por proporcionar a realização deste curso e por incentivar meu aprendizado.*

*À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos durante todo o período de realização deste curso de Mestrado.*

*E por fim, agradeço principalmente à **Deus**, por me dar todos esses motivos pelos quais agradeço.*

Muito obrigada por tudo!

*“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver. Apesar de todos os desafios,
incompreensões e períodos de crise.
Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir “meu” castelo...”*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

BIOATIVIDADE DO SOLO SOB PLANTIO DIRETO COM SUCESSÃO E ROTAÇÃO DE CULTURAS

AUTORA: Mirian Barbieri

ORIENTADORA: Zaida Inês Antonioli

A adoção de práticas conservacionistas pode afetar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, resultando em alteração na composição e a atividade da comunidade microbiana. O objetivo deste trabalho foi obter informações sobre a qualidade, diversidade e atividade biológica do solo, quando submetido aos sistemas de plantio direto escarificado e plantio direto não escarificado, com sucessão e rotação de culturas. O experimento é conduzido na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa de Sementes, em Júlio de Castilhos, RS, em um Nitossolo Vermelho. Os tratamentos foram constituídos de dois tipos de manejo do solo: (1) plantio direto com compactação natural e (2) plantio direto escarificado, e de uma sucessão de culturas (soja/trigo) e duas rotações, rotação I (soja-nabo + trigo/soja-aveia + ervilhaca/soja) e rotação II (soja-aveia + ervilhaca + nabo/milho-crotaláriajuncea-trigo/soja). Foram realizadas análises referentes ao carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, atividade enzimática do solo (urease, fosfatase ácida e Hidrólise do Diacetato de Fluoresceína), taxa de respiração basal e na análise da diversidade genética por meio da técnica de RAPD. O carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana do solo foram superiores em todos os tratamentos sob plantio direto com compactação natural em ambos os períodos de coleta. O mesmo padrão pode ser observado para a atividade da enzima urease, que apresentou valores superiores em solo com compactação natural. Todas as enzimas apresentaram um incremento na sua atividade no período do verão, o que demonstra que são influenciadas pela temperatura e umidade do solo. Para a taxa de respiração basal, no período do inverno foram obtidos valores superiores quando comparado ao período do verão. Além disso, no inverno a maior taxa de liberação de CO₂ acumulada, foi observada no plantio direto com compactação natural, sendo que o contrário foi observado para o período do verão, onde a maior taxa foi obtida em solo escarificado. A técnica de RAPD mostrou-se eficiente na detecção da variabilidade genética entre os tratamentos, agrupando-os em quatro grupos e ainda, gerou um perfil de marcadores genéticos que podem ser utilizados em posteriores trabalhos para avaliar a diversidade genética em solos agrícolas. Com base nesses resultados pode-se concluir que o plantio direto não escarificado associado às boas práticas de conservação do solo, como a permanente cobertura por meio de resíduos vegetais, contribui para um aumento nos valores de biomassa microbiana, taxa de respiração e atividade enzimática do solo. Além disso a técnica de RAPD associada a outros bioindicadores tornam-se importantes ferramentas para o monitoramento e avaliação da qualidade, atividade e diversidade biológica do solo.

Palavras-chave: atividade enzimática, diversidade genética, escarificação, microrganismos, RAPD.

ABSTRACT

SOIL BIOACTIVITY IN NO-TILLAGE SYSTEM WITH SUCCESSION AND CROP ROTATION

AUTHOR: Mirian Barbieri
ADVISOR: Zaida Inês Antonioli

The adoption of conservation practices can affect the physical, chemical and biological properties of the soil, resulting changes in the composition and activity of the microbial community. The aims of this research was to obtain information about the soil quality, diversity and biological activity, submitted to two types of soil management (scarified (PDE) and no-scarified tillage (PDNE)) and three types of cover management (Succession: soybean-wheat, Rotation I: Soybean-turnip+wheat/soybean-oats+vetch and Rotation II: soybean-oats+vetch+turnip/corn-crotalaria juncea-wheat/soybeans). Analyzes of carbon and nitrogen from microbial biomass, soil enzymatic activity (urease, acid phosphatase and FDA), basal respiration rate and genetic diversity analysis were performed using the RAPD technique. Carbon and nitrogen from soil microbial biomass were higher in all treatments under no-scarified no-tillage in both collection periods. The same pattern can be observed for urease enzyme activity, which presented higher values in no-scarified no-tillage soil. All enzymes showed an increase in their activity in the summer period, which shows that they are influenced by temperature and soil moisture. For the basal respiration rate, in the winter period higher values were obtained when compared to the summer period. In addition, in the winter, the highest rate of accumulated CO₂ release was observed in no-scarified no-tillage, and the opposite was observed for the summer period, where the highest rate was obtained in scarified tillage. The RAPD technique was efficient in detecting the genetic variability among the treatments, grouping them into four groups and generated a profile of genetic markers that can be used in later works to evaluate the genetic diversity in agricultural soils. Based on these results, we concluded that no-scarified no-tillage associated with good soil conservation practices, such as permanent coverage through plant residues, contribute to an increase in the values of microbial biomass, respiration rate and enzymatic activity of the soil. RAPD technique associated with other bioindicators become important tools for the monitoring and evaluation of soil quality, activity and biological diversity.

Keywords: enzymatic activity, genetic diversity, scarification, microorganisms, RAPD.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

Ag ₂ SO ₄	Sulfato de prata
ANOVA	Análise de Varincia
ARDRA	Análise de restrio de DNAríbssomal amplificado
BaCl ₂	Cloreto de brio
BMS	Biomassa microbiana do solo
C	Carbono
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CBM	Carbono da biomassa microbiana do solo
C/N	Relao carbono/nitrogênio
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
FDA	Hidrólise do Diacetato de Fluoresceína
FEPAGRO	Fundao Estadual de Pesquisa Agropecuária
HCl	cido clorídrico
K ₂ SO ₄	Sulfato de potássio
KCl	Cloreto de potássio
MOS	Matéria Orgânica do Solo
N	Nitrogênio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBM	Nitrogênio da biomassa microbiana do solo
NH ₄	Amnio
PCA	Análise dos componentes principais
PCR	Reao em cadeia da polimerase
PNP	Para nitrofenil fosfato
qCO ₂	Quociente metabólico
RAPD	DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente
RISA	Análise de espaçador intergênico ribossmico
SSCP	Polimorfismo de conformao de cadeia simples
THAM	Tris hidroximetilaminometano
T-RFLP	Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrio
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Representação esquemática da execução do trabalho realizado com diferentes sistemas de uso e manejo do solo 17

ARTIGO

Figura 1: Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal durante os anos de 2015 e 2016 para o município de Júlio de Castilhos, RS 44

Figura 2: Relação genética entre os tratamentos utilizados determinada através da Análise dos Componentes Principais (PCA), para o período do verão (fevereiro/2016) e inverno (setembro/2016)..... 53

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1: Caracterização dos atributos químicos do solo na camada de 0-10 cm, antes do cultivo da soja (safra 2015/16)	36
Tabela 2: Códigos e sequências dos <i>primers</i> de RAPD utilizados neste estudo	42
Tabela 3: Biomassa microbiana entre os diferentes tratamentos nas diferentes épocas de amostragem do solo	43
Tabela 4: Atividade enzimática do solo entre os diferentes tratamentos nas diferentes épocas de amostragem	45
Tabela 5: Respiração basal (C-CO ₂) dos microrganismos entre os diferentes tratamentos nas diferentes épocas de amostragem do solo	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 SISTEMAS DE MANEJO DE CULTURAS	18
2.2 BIOTA DO SOLO	19
2.2.1 Biomassa microbiana	20
2.2.2 Atividade biológica do solo	21
2.2.2.1 <i>Atividade enzimática</i>	21
2.2.2.2 <i>Taxa de respiração microbiana</i>	23
2.2.3 Diversidade genética do solo	24
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
4ARTIGO	31
RESUMO	31
SUMMARY	32
4.1 INTRODUÇÃO	33
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.2.1 Caracterização da área experimental	34
4.2.2 Solo para análise microbiológica	35
4.2.3 Biomassa microbiana	37
4.2.3.1 <i>Carbono da biomassa microbiana</i>	37
4.2.4Atividade enzimática do solo	38
4.2.4.1 <i>Urease</i>	38
4.2.4.2 <i>Fosfatase ácida</i>	38
4.2.4.3 <i>Hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)</i>	39
4.2.5Atividade microbiana do solo	40
4.2.5.1 <i>Taxa de respiração basal</i>	40
4.2.6 Análise estatística	41
4.2.7Análise molecular	41
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.3.1 Biomassa microbiana	42
4.3.1.1 <i>Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana</i>	42
4.3.2 Atividade enzimática do solo	45
4.3.2.1 <i>Urease</i>	45
4.3.2.2 <i>Fosfatase ácida</i>	46
4.3.2.3 <i>Hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)</i>	48
4.3.3 Atividade microbiana do solo	49
4.3.3.1 <i>Taxa de respiração basal</i>	49
4.3.4 Diversidade genética	52
4.4 CONCLUSÕES	55
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

1. INTRODUÇÃO GERAL

Até meados dos anos 1980, o grande problema das lavouras produtoras do Sul do Brasil era a erosão hídrica, decorrente do preparo convencional do solo. O revolvimento intenso e a incorporação ou queima de resíduos vegetais da cultura anterior deixavam o solo exposto à ação erosiva das chuvas, acarretando grandes perdas de solo, água, insumos agrícola e sementes (OLIVEIRA et al., 2012).

A adoção, em larga escala, do sistema plantio direto, a partir dessa época, minimizou o problema. Contudo, nos últimos anos, denota-se que falhas na implementação desse sistema, têm promovido retrocessos na conservação do solo em grande parte das lavouras. Alguns princípios básicos do sistema plantio direto, como rotação de culturas e manutenção do solo constantemente coberto, não têm sido respeitados. Como consequência de um conjunto de práticas inadequadas ao manejo, é notório o retorno gradativo da erosão hídrica em lavouras anuais produtoras de grãos no Rio Grande do Sul, associada a alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, o que compromete a estabilidade do sistema produtivo.

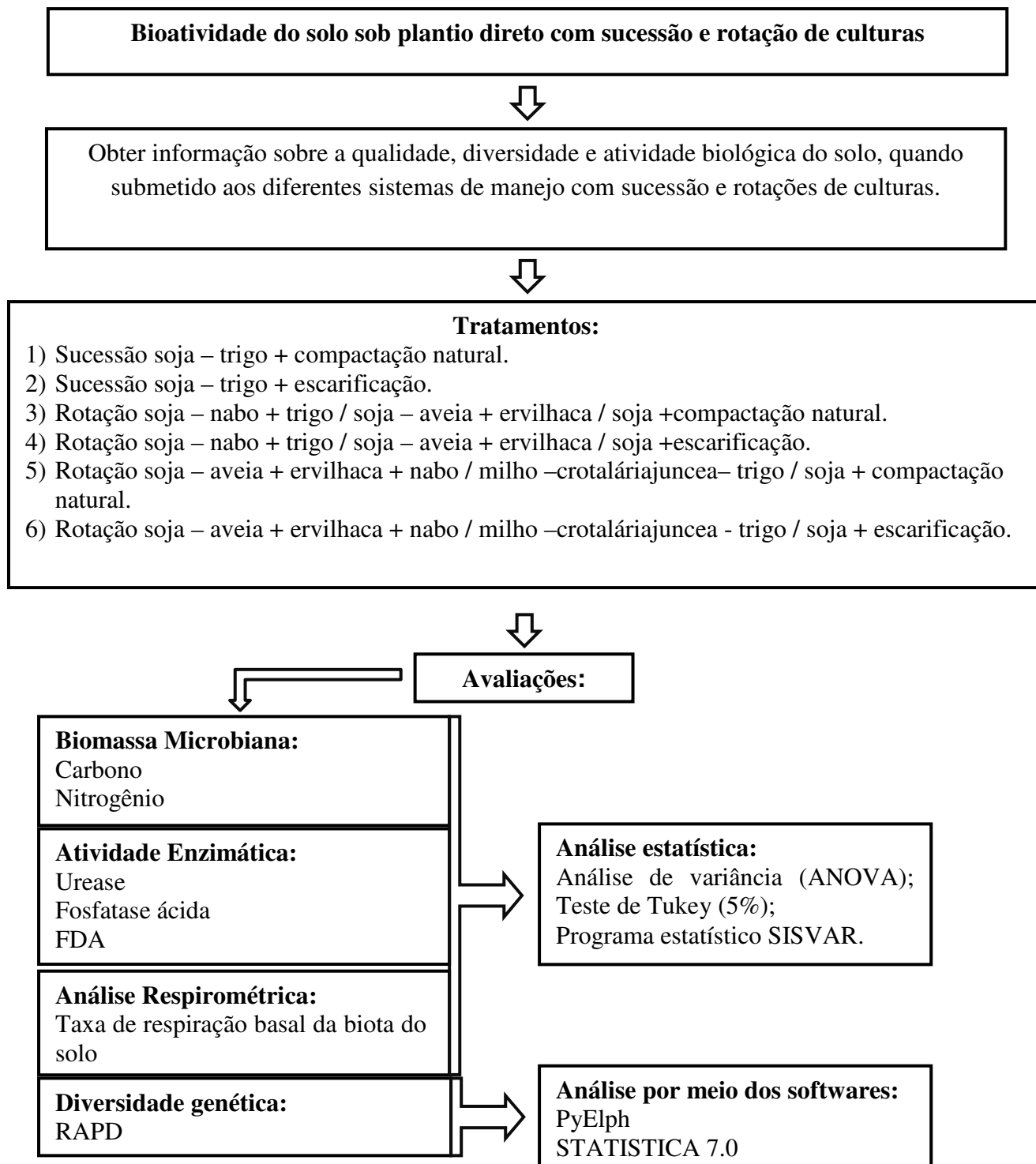
Em trabalho realizado por Dadalto et al. (2015), comparando o sistema plantio direto e preparo convencional, as parcelas sob plantio direto apresentaram incremento nos valores de carbono da biomassa microbiana, enquanto o preparo convencional apresentou maiores valores de quociente metabólico (qCO_2). Os dados obtidos evidenciam que o plantio direto foi o sistema que apresentou menor interferência na atividade microbiológica do solo, concluindo que esse sistema proporciona maior biomassa microbiana e menor perda relativa de carbono via respiração, sendo possível determinar, assim, maior acúmulo de carbono no solo em longo prazo. O mesmo observa-se em trabalho realizado por Mendes et al. (2003) cujo objetivo era avaliar a distribuição da biomassa microbiana e da atividade enzimática do solo sob três diferentes sistemas de manejo, vegetação nativa, sistema plantio direto e preparo convencional. Concluiu-se que os sistemas de manejo (plantio direto e convencional) influenciaram o perfil de distribuição das propriedades biológicas do solo e o sistema plantio direto apresentou um incremento da atividade enzimática. Nesse sentido, fica evidente a importância da adoção de práticas sustentáveis que tem por objetivo a melhoria e a manutenção das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo.

Diante disso, para entender esse problema, é necessário a adoção e o desenvolvimento de sistemas agrícolas produtivos baseados em culturas com elevado aporte de material orgânico no solo, associado ao sistema plantio direto, permitindo

geração de renda e manutenção constante da cobertura do solo, tanto por plantas vivas como por resíduos vegetais (EMBRAPA, 2009).

Assim, a hipótese a ser testada é de que o sistema plantio direto associado com a prática de rotação de culturas, possibilita a melhoria da qualidade, diversidade e atividade biológica do solo. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi obter informação sobre a qualidade, diversidade e atividade biológica do solo, nos diferentes sistemas de manejo, através da atividade das enzimas urease, fosfatase ácida e hidrólise do diacetato de fluoresceína, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, taxa de respiração basal dos microrganismos e análise da diversidade genética por meio da técnica de RAPD (Figura 1). E como objetivos específicos, relacionar variáveis do solo sensíveis à adoção de sistemas de manejo do solo, a fim de compor índices de qualidade do solo, identificar sistemas sustentáveis de manejo, baseados em efeitos sobre a qualidade do solo, monitorar e avaliar a qualidade do solo nos diferentes sistemas de manejo do solo, caracterizar a diversidade genética por meio de técnicas moleculares e formar recursos humanos qualificados ao desenvolvimento e identificação de sistemas de manejo voltados para a preservação ambiental.

Figura 1. Representação esquemática da execução do trabalho realizado com diferentes sistemas de uso e manejo do solo.



Fonte: Elaborada pela autora.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SISTEMAS DE MANEJO DE CULTURAS

Os sistemas de manejo de culturas são necessários para sustentar a produtividade a fim de conservar e melhorar a qualidade do solo (AZIZ; MAHMOOD; ISLAM, 2013). Mudanças nos sistemas ou nas práticas de manejo das culturas, muitas vezes resultam em alterações das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, que por sua vez, refletem em sua qualidade funcional (CELIK et al., 2011; DING et al., 2011; WOLFARTH et al., 2011).

A agricultura conservacionista com base no sistema plantio direto e na rotação de culturas (HOBBS et al., 2008), adotada em mais de 100 milhões de hectares no mundo (DERPSCH et al., 2010), torna-se uma tendência atual a fim de aumentar a produtividade do sistema, melhorando a qualidade dos solos agrícolas (DANG et al., 2015), a gestão da água, disponibilidade de matéria orgânica (JEMAI et al., 2013) e o controle da erosão (PEREIRA, 2014). Grande parte do sucesso desse sistema reside no fato de que a palha, deixada por culturas de cobertura sobre a superfície do solo, somada aos resíduos das culturas comerciais, cria um ambiente extremamente favorável ao crescimento vegetal e contribui para a estabilidade da produção (ALVARENGA et al., 2001) e para a recuperação ou manutenção da sua estrutura (VEZZANI; MIELNICZUK, 2009; SPERA et al., 2010).

A adoção de práticas conservacionistas e o uso de plantas de cobertura normalmente têm efeito positivo na estrutura e no fluxo de água e ar no solo (CUNHA et al., 2011). O preparo convencional tem resultado, em geral, na degradação do solo, em virtude de reduzir o teor de matéria orgânica e a estabilidade de agregados, resultando na diminuição da capacidade produtiva do solo.

O uso inadequado dos sistemas de manejo propicia o surgimento de erosão e esgotamento da matéria orgânica do solo, que resultam em perdas de nutrientes e produtividade (RAMOS et al., 2011). Todas as propriedades internas e inter-relacionadas do solo, bem como a estrutura da fauna edáfica e da comunidade microbiana são significativamente influenciadas pelo preparo do solo (THOMAS et al., 2007).

Neste contexto, as práticas de manejo do solo ou das culturas interferem na estrutura e, também, na atividade da comunidade microbiana do solo. Considerando que a agricultura conservacionista, depende consideravelmente da ciclagem dos nutrientes

da matéria orgânica e também, que a microbiota do solo desempenha um papel especial nesse processo, é possível inferir que a criação de condições favoráveis à comunidade microbiana e a sua atividade, é de fundamental importância para entender melhor esses processos e ampliar o conhecimento sobre a biota do solo (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

2.2 BIOTA DO SOLO

O solo caracteriza-se como um habitat para um grande número de seres macro e microscópicos, o qual contém uma enorme diversidade de organismos que garantem o seu biofuncionamento e sustentação (MANHÃES; FRANCELINO, 2013). Esses seres compõem a biota do solo, a qual é considerada também, o marcador biológico para classificação de ecossistemas perturbados (VENTER et al., 2016).

Os microrganismos do solo são reconhecidos por sua habilidade em promover transformações bioquímicas dos nutrientes e por sua importância em prover os elementos nutritivos de interesse às plantas, principalmente nitrogênio, fósforo e potássio (PAUL; CLARK, 1989). Esses nutrientes constituem a parte viva e mais ativa da matéria orgânica, atuando como indicadores capazes de refletir mudanças nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Todavia, sabendo-se que os microrganismos fazem parte do solo de maneira indissociável, sendo responsáveis por desempenhar importantes papéis nos processos ecológicos, tais como decomposição da matéria orgânica, mineralização e transformação de nutrientes, além de inúmeras outras reações bioquímicas, como também, o intemperismo de rochas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A biota do solo é representada por cinco grandes grupos: bactérias, actinomicetos, fungos, algas e protozoários (MOREIRA; CARES, 2009). Apesar de constituírem somente 1 a 4% do carbono total e ocuparem menos de 5% do espaço poroso do solo, a diversidade e a quantidade dos microrganismos é abundante. Entretanto, como o solo é normalmente um ambiente estressante, limitado por nutrientes, apenas 15% a 30% das bactérias e 10% dos fungos encontra-se em estado ativo (ANDREOLLA; FERNANDES, 2007). Esses microrganismos têm sido cada vez mais associados à qualidade ambiental, tanto por seu papel fundamental na manutenção dos ecossistemas como por sua sensibilidade a variações dos muitos fatores que incidem sobre o ambiente.

As perturbações ambientais podem ser detectadas quando acontecem alterações na comunidade da fauna do solo (SOUZA, 2008), tanto com relação à diversidade

quanto à densidade, geradas por alguma intervenção na cobertura vegetal ou no manejo do solo. A diminuição da diversidade e a alteração da estrutura da população de determinados grupos da fauna edáfica podem indicar um processo de degradação do solo e, conseqüentemente, a perda de sua sustentabilidade, a médio e longo prazo. Este fato, aliado à crescente preocupação com a devastação de ecossistemas naturais, estimula o surgimento de estudos da comunidade microbiana como bioindicadora da qualidade do solo (AQUINO et al., 2005).

Diante do exposto, a maioria das práticas inadequadas de manejo do solo têm efeitos negativos sobre a diversidade e abundância dos organismos edáficos (LAVELLE; SPAIN, 2001). Ainda segundo Lavellee Spain (2001), dependendo de quais sejam as alterações causadas nas comunidades edáficas pelas práticas de manejo adotadas, estas podem refletir na redução da qualidade do solo, quando resultarem em menor diversidade, quantidade e atividade dos organismos edáficos. Entretanto, se as práticas de manejo do solo resultarem em alterações positivas nas comunidades edáficas, isto pode possibilitar a melhoria da qualidade do solo.

Sendo assim, indicadores microbiológicos de qualidade podem ser utilizados no monitoramento e avaliação das condições dos solos (KASCHUK et al., 2010; GE et al., 2013). Entre os principais indicadores microbiológicos normalmente utilizados para a avaliação da qualidade do solo pode-se destacar a determinação da biomassa microbiana, a atividade enzimática do solo e a taxa de respiração microbiana (ARAÚJO et al., 2012; KHEYRODIN et al., 2012; BALOTA et al., 2014).

2.2.1 Biomassa microbiana

A biomassa microbiana do solo (BMS) é um indicador sensível às mudanças no ecossistema, pois representa o destino inicial do carbono em transformação no solo, sendo influenciada pelos fatores que interferem na atividade e na densidade da fauna edáfica, além de representar a principal fonte das enzimas do solo, responsável quase pela totalidade de sua atividade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No que se refere aos atributos biológicos, a BMS fornece informações importantes sobre a dinâmica de um reservatório lábil da matéria orgânica do solo, ou seja, pode avaliar o tamanho da fração mais ativa e dinâmica da matéria orgânica (SILVA, 2008).

A BMS é um dos componentes que controlam funções chaves no solo, como a decomposição e o acúmulo de MOS, ou transformações envolvendo os nutrientes minerais. Representa, ainda, uma reserva considerável de nutrientes, os quais são continuamente assimilados durante os ciclos de crescimento dos diferentes organismos

que compõem o ecossistema. Assim, os solos que mantêm um alto conteúdo de biomassa microbiana são capazes não somente de armazenar, mas também de ciclar mais nutrientes no sistema (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

Os nutrientes armazenados na BMS podem atingir valores equivalentes entre 100 e 600 kg de nitrogênio, 50 a 300 kg de fósforo, 70 kg de potássio e 11 kg de cálcio por hectare (ha) (PEREZ et al., 2005). Como a biomassa dos microrganismos é reciclada cerca de 10 vezes mais rapidamente que a fração orgânica morta do solo, tem-se que a quantidade de nutrientes presentes nas células dos microrganismos é muito significativa perante a ciclagem de nutrientes em todo o ecossistema. Em condições ideais, a microbiota do solo permite que os nutrientes sejam, gradualmente, liberados para a nutrição das plantas, sem perdas por lixiviação. Segundo Hungria et al. (1997), a diminuição da microbiota do solo prejudica a fixação temporária dos nutrientes, onde podemos citar o carbono, nitrogênio e fósforo, dentre outros, incrementando suas perdas e resultando no empobrecimento do solo.

Deste modo, a quantidade e composição da BMS podem ser influenciadas por diversos fatores, como por exemplo, o sistema de cultivo, a rotação de culturas e a textura dos solos (VENZKE FILHO et al., 2008). Os valores mais elevados dos teores de carbono microbiano implicam maior imobilização temporária de nutrientes e, conseqüentemente, em menores perdas de nutrientes no sistema solo-planta (MERCANTE et al., 2008).

A BMS é, portanto, relevante indicadora da qualidade do solo, uma vez que, além de responder prontamente às variações de manejo e cultivo do solo, possibilita estudar, por meio de sua quantificação, o potencial de imobilização do carbono e nitrogênio e os seus conseqüentes efeitos no sistema solo (MARCHI, 2010).

Assim, o parâmetro da BMS e sua atividade tem sido considerada mais sensível às mudanças iniciais no conteúdo total da MOS, podendo ser utilizada para indicar o nível de degradação ou alterações na qualidade do solo, em função do uso e práticas de manejo utilizadas (TRANNIN et al., 2007).

2.2.2 Atividade biológica do solo

2.2.2.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática no solo fornece informações úteis sobre os mecanismos de sensibilidade microbiana ao carbono e nitrogênio. As enzimas podem ser divididas em enzimas hidrolíticas que são responsáveis pela aquisição de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) para suportar o metabolismo primário, e enzimas oxidativas, que

degradam compostos recalcitrantes, como a lignina para a aquisição de nutrientes (TIEMANN; BILLINGS, 2011).

Estes grupos de enzimas podem responder de forma diferente para a adição de C e N e para as diferentes práticas de manejo do solo (CUSACK et al., 2011; GRANDY et al., 2013). Cusack et al. (2011) verificaram que a adição de N aumentou a atividade de algumas enzimas hidrolíticas, mas diminuiu a atividade das enzimas oxidativas em duas florestas tropicais. Wang et al. (2015) relataram que as crescentes aplicações de nitrogênio aumentaram a atividade da N-acetil-glicosaminidase, mas diminuiu a atividade β -glicosidase em uma pastagem na China. Sendo assim, as enzimas do solo são mediadoras diretas no catabolismo biológico do solo orgânico e dos componentes minerais (NIELSEN; WINDING, 2002), por isso têm sido sugeridas como potenciais indicadores da qualidade do solo.

Em trabalho realizado por Silveira (2007), foram utilizadas a atividade enzimática de β -glicosidase, urease e fosfatase ácida como indicador das alterações do solo. Nesse trabalho, foi observado que a atividade enzimática foi influenciada pela quantidade de carbono orgânico no solo proveniente do plantio direto ou por deposição da mata nativa. A autora conclui que o carbono orgânico além de ser aproveitado como fonte de energia pelos microrganismos, protege as enzimas do ataque de enzimas proteolíticas, permanecendo de forma constante no solo (SILVEIRA, 2007). Em trabalho semelhante, Matsuoka (2006), concluiu que as enzimas β -glucosidase, fosfatase ácida, urease e amidase são sensíveis à mudança do manejo da cultura podendo indicar alterações no solo. Dessa forma, estudos sobre a atividade das enzimas são bons indicativos de qualidade e sustentabilidade do solo cultivado (EVANGELISTA et al., 2012).

A escolha das enzimas que serão analisadas para avaliar a qualidade do solo baseia-se na sua sensibilidade ao manejo do solo, na decomposição da matéria orgânica e na capacidade de funcionamento da análise (SILVEIRA, 2007). As enzimas mais utilizadas para avaliar a qualidade do solo são as hidrolases, as quais são diretamente relacionadas aos ciclos dos principais elementos do solo.

A enzima fosfatase é fundamental na mineralização do fósforo, sendo também responsável pelo ciclo deste elemento no solo. Elas estão amplamente distribuídas no solo e são amplamente estudadas devido ao fato de hidrolisarem o fósforo orgânico em fósforo inorgânico, tornando-o assim disponível para as plantas. De acordo com Tabatabai (1994), as fosfatases podem ser classificadas de acordo com seu pH ótimo de

ação, podendo ser classificadas como fosfatase ácida (pH 6,5) ou fosfatase alcalina (pH 11).

As ureases participam do ciclo do nitrogênio, contribuindo com a liberação de nitrogênio orgânico. Estas são enzimas que catalisam a reação de hidrólise da ureia a duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono. Apresentam ampla distribuição em plantas, fungos e bactérias, mas não são sintetizadas por animais (DICK et al., 1996).

Além das enzimas responsáveis pelas reações de hidrólise, os microrganismos liberam para o solo lipases, proteases e esterases. Essas enzimas não são específicas e estão envolvidas na degradação de resíduos orgânicos (SILVEIRA, 2007). Associada a isso, a hidrólise do Diacetato de Fluoresceína (FDA) é amplamente aceita como um método enzimático capaz de medir todas as atividades microbianas, seja de populações cultiváveis ou não cultiváveis, em uma grande variedade de amostras ambientais, visto que enzimas extracelulares como esterases, lipases e proteases, que são abundantes no solo e estão envolvidas na decomposição de muitos tipos de tecidos, possuem a capacidade de catalisar a hidrólise de FDA (RIBEIRO et al., 2015). Além disso, o método costuma correlacionar-se bem com algumas das mais precisas medições de biomassa e incorporação de carbono. A habilidade de hidrolisar FDA mostra-se muito difundida, especialmente entre os maiores decompositores, bactérias e fungos (ADAM; DUNCAN, 2001; GREEN et al., 2006).

De forma geral, as atividades das enzimas do solo, urease, fosfatase, lipase, esterase e protease, tornam-se reduzidas em solos manejados quando comparadas com solos sob campos nativos (CARAVACA et al., 2002). Dessa forma, a determinação da atividade enzimática do solo tem mostrado possuir sensibilidade para indicar modificações promovidas por sistemas de manejo do solo em curtos espaços de tempo (ROLDÁN et al., 2005).

2.2.2.2 Taxa de respiração microbiana

A taxa de respiração microbiana e/ou respiração basal, é a soma total de todas as funções metabólicas nas quais o CO₂ é produzido, descrevendo o nível da atividade microbiana, permitindo assim, inferências sobre o teor e a decomposição MOS (LOPES et al., 2010; MOURA et al., 2015).

A respiração microbiana é a oxidação biológica da matéria orgânica a CO₂ pelos microrganismos aeróbios e ocupa uma posição chave no ciclo do carbono nos ecossistemas terrestres. A avaliação da respiração do solo é a técnica mais frequente

para quantificar a atividade microbiana, sendo positivamente relacionada com o conteúdo de MOS e com a BMS (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

As bactérias e os fungos são os principais responsáveis pela maior liberação de CO₂ via degradação da MOS (PEIXOTO, 2010). Assim como em outros processos metabólicos, essa degradação é dependente do estado fisiológico da célula microbiana e é influenciada por diversos fatores do solo, como: umidade, temperatura, estrutura, disponibilidade de nutrientes, textura, relação C/N, presença de resíduos orgânicos, entre outros (TANG et al., 2006; SILVA et al., 2010).

A respiração microbiana pode ser avaliada em campo, sob condições naturais, ou em laboratório. Nas condições de laboratório, a respiração tem sido usada em estudos sob influência de vários atributos físicos do solo, como temperatura e umidade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A mensuração da taxa de respiração microbiana em laboratório pode ser realizada através da quantificação do O₂ consumido ou do CO₂ liberado do solo. A mais utilizada é pela quantificação do CO₂ liberado, podendo ser avaliada através de titulação (quando capturado por NaOH ou KOH), cromatografia gasosa, ¹⁴C ou por espectroscopia de infravermelho (SILVEIRA, 2007).

A combinação das medidas da BMS e respiração do solo fornecem a quantidade de CO₂ evoluída por unidade de biomassa, denominada quociente metabólico ou respiratório (qCO₂). O qCO₂ indica a eficiência da biomassa microbiana em utilizar o carbono disponível para biossíntese, sendo também um sensível indicador para estimar a atividade biológica e a qualidade do substrato (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

Assim, a fertilidade natural do solo depende significativamente da ciclagem de MOS que é mediada pela taxa de respiração microbiana. O declínio na atividade microbiana terá alto impacto na fertilidade natural do solo, com grandes efeitos nos ecossistemas naturais e implementados (BROOKES, 1995).

2.2.3 Diversidade genética do solo

Os microrganismos do solo representam a forma de vida mais abundante e diversificada do planeta (WHITMAN et al., 1998). Coletivamente chamados de microbiota do solo, são representados por cinco grandes grupos: bactérias, actinobactérias, microfungos, algas e protozoários, sendo, entretanto, a diversidade tão vasta quanto desconhecida (ANDREOLA; FERNANDES, 2007).

A microbiota do solo tem papel essencial na ciclagem de nutrientes, formação do húmus, degradação de substâncias xenobiotas, formação e manutenção da estabilidade

de agregados e fluxo de gases, dentre outras funções (CARMO et al., 2005). Assim, processos que interfiram na diversidade genética e, ou, funcional da microbiota dos solos podem contribuir para a alteração de sua qualidade (LAMBAI et al., 2005).

O estudo da diversidade genética dos solos pode ajudar na identificação de alterações ambientais causadas por fatores bióticos e abióticos e por práticas antropogênicas (TAMILSELVI et al., 2015), incluindo a aplicação de fertilizantes, pesticidas e outras práticas agrônômicas, como o revolvimento do solo, além de fornecer informações essenciais para avaliar a qualidade e a sustentabilidade do solo (YANG; ZHANG, 2014; TAUTGES et al., 2016).

O estudo da diversidade genética da comunidade microbiana do solo pode ser realizado utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Esses marcadores são os mais utilizados quando não existe nenhum conhecimento genético prévio dos microrganismos a serem estudados. Eles se baseiam na amplificação aleatória de fragmentos de DNA através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando *primers* de sequência aleatória (WILLIAMS et al., 1990).

Neste sentido, considerando que poucos estudos sobre a diversidade genética do solo são realizados, e que propriedades edafoclimáticas influenciam no comportamento dos seres no planeta, este trabalho procura explicar a relação ecológica de microrganismos nas diferentes condições de uso e manejo do solo no Sul do Brasil. Assim será possível avaliar o efeito de diferentes manejos e cultivos adotados, sobre a atividade microbiológica do solo neste ambiente.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVARENGA, R. C. et al. Plantas de cobertura de solo para sistema plantio direto. **Informe agropecuário**, v.22, p.25-36, 2001.

ANDREOLA, F.; FERNANDES, S. A. P. Microbiota do Solo na Agricultura Orgânica e no Manejo das Culturas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do Solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, p.21-39, 2007.

AQUINO, A. M. et al. A biota do solo e processos relevantes num novo contexto da agricultura. In: WADT, P. G. S. (editor técnico). Manejo do solo e recomendação de adubação para o Estado do Acre. Rio Branco: EMBRAPA Acre, 2005. 635p

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v.23, p.66-75, 2007.

ARAÚJO, E. A. et al. Qualidade do solo: conceitos, indicadores e avaliação. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.5, p.187-206, 2012.

AZIZ, I.; MAHMOOD, T.; ISLAM, K. R. Effect of long term no-till and conventional tillage practices on soil quality. **Soil and Tillage Research**, v.131, p.28-35, 2013.

BALOTA, E. L. et al. Soil microbial properties after long-term swine slurry application to conventional and no-tillage systems in Brazil. **Science of the Total Environment**, v.490, p.397-404, 2014.

BROOKES, P. C. The use of microbial parameters in soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, v.19, p.269-279, 1995.

CARAVACA, F.; MASCIANDARO, G.; CECCANTI, B.B. Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semiarid mediterranean environment. **Soil and Tillage Research**, v.68, p.23-30, 2002.

CARMO, J. B. et al. Disponibilidade de nitrogênio e fluxos de N₂O a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.735-746, 2005.

CELIK, I. et al. Impacts of different tillage practices on some soil microbiological properties and crop yield under semi-arid Mediterranean conditions. **International Journal of Plant Production**, v.5, p.237-254, 2011.

CUNHA, E. Q. et al. Sistemas de preparo do solo e culturas de cobertura na produção orgânica de feijão e milho. II - atributos biológicos do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.603-611, 2011.

CUSACK, D. F. et al. Changes in microbial community characteristics and soil organic matter with nitrogen additions in two tropical forests. **Ecology**, v.92, p.621-632, 2011.

DADALTO, J. P. et al. Sistema de preparo do solo e sua influência na atividade microbiana. **Journal of the Brazilian Association of Agriculture Engineering**, v.35, p.506-513, 2015.

DANG, Y. P. et al. Strategic tillage in no-till farming systems in Australia's northern grains-growing regions: II. Implications for agronomy, soil and environment. **Soil and Tillage Research**, v.152, p.115-123, 2015.

DERPSCH, R. et al. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v.3, p.1-25, 2010.

DICK, R. P.; BREACKWELL, D. P.; TURCO, R. F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. **Methods for assessing soil quality**, v.49, p.247-271, 1996.

DING, X. et al. Effects of tillage and crop rotation on soil microbial residues in a rainfed agroecosystem of northeast China. **SoilandTillageResearch**, v.114, p.43–49, 2011.

EMBRAPA. Cultivo do milho. Embrapa Milho e Sorgo Sistema de produção, n. 2: Embrapa Milho e Sorgo, set. 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/index.htm>. Acesso em: 28 de agosto de 2016.

EVANGELISTA, C. R. et al. Atividade enzimática do solo sob sistema de produção orgânica e convencional na cultura da cana-de-açúcar em Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, p.1251-1262, 2012.

GE, T. et al. Microbial biomass, activity, and, community structure, in horticultural soils under conventional and organic management strategies. **European Journal of Soil Biology**, v.58, p.122-128, 2013.

GRANDY, A. S. et al. Soil respiration and litter decomposition responses to N fertilization rate in no-till corn systems. **Agriculture Ecosystems Environmental**, v.179, p.35–40, 2013.

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

HOBBS, P. R.; SAYRE, K.; GUPTA, R. The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.363, p.543–555, 2008.

HUNGRIA, M. et al. Importância do sistema de semeadura na população microbiana do solo. Comunicado Técnico/Embrapa-Soja, Londrina, Paraná, n.56, p.1-9, 1997.

JEMAI, I. et al. Impact of three and seven years of no-tillage on the soil water storage, in the plant root zone, under a dry subhumid Tunisian climate. **Soil & Tillage Research**, v.126, p.26-33, 2013.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indicators for improving sustainability. **Soil Biology & Biochemistry**, v.42, p.1–13, 2010.

KHEYRODIN, H.; GHAZVINIAN, K.; TAHERIAN, M. Tillage and manure effect on soil microbial biomass and respiration, and on enzyme activities. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.14652-14659, 2012.

LAMBAIS, M. R. et al. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. Tópicos em ciência do solo. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v.4. p.43-84, 2005.

LAVELLE, P.; SPAIN, A. V. Soilecology. Dordrecht: Kluwer, 2001. 654 p.

LOPES, M. M. et al. Changes in soil microbial biomass and activity in different Brazilian pastures. **Spanish Journal of Agriculture Research**, v.8, p.1253-1259, 2010.

MANHÃES, C. M. C.; FRANCELINO, F. M. A. Biota do solo e suas relações com o sistema radicular. **Revista Nucleus**, v.10, p.127-138, 2013.

MARCHI, B. Disposição de efluentes de suínos em solo: estudo de caso. 2010. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

MATSUOKA, M. Atributos biológicos de solos cultivados com videira na região da Serra Gaúcha. 2006. 171p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

MENDES, I. C. et al. Propriedades biológicas em agregados de um latossolo vermelho-escuro sob plantio convencional e direto no cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.435-443, 2003.

MERCANTE, F. M. et al. Biomassa microbiana em um Argissolo Vermelho, em diferentes coberturas vegetais, em área cultivada com mandioca. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.30, p.479-485, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E. Biodiversidade do solo. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.13-14, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras: UFLA, 729p., 2006.

MOURA, J. A. et al. Respiração basal e relação de estratificação em solo cultivado com citros e tratado com resíduos orgânicos no estado de Sergipe. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, p.731-746, 2015.

NIELSEN, M. N.; WINDING, A. Microorganisms as indicators of soil health. **National Environmental Research Institute**, n.388, 84p., 2002.

OLIVEIRA, J. G. R. et al. Erosão no plantio direto: Perda de solo, água e nutrientes. **Boletim geografia**, v.30, p.91-98, 2012.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. Soil microbiology and biochemistry. **New York: Academic Press**, 273 p., 1989.

PEIXOTO, F. G. T. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos do estado de São Paulo sob vegetação nativa e cultivados. 2010. 83p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2010.

PEREIRA, C. S. S.; SOBRINHO, T. A. Programs of water erosion control in rural context: a brief overview Brazilian. **Revista Ambiência Guarapuava**, v.10, p.851-867, 2014.

PEREZ, K. S. S.; RAMOS, M. L. G.; MCMANUS, C. Nitrogênio da biomassa microbiana em solo cultivado com soja, sob diferentes sistemas de manejo, nos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.137-144, 2005.

RAMOS, M. E. et al. Soil responses to different management practices in rainfed orchards in semiarid environments. **SoilandTillageResearch**, v.112, p.85–91, 2011.

RIBEIRO, T. S.; CUNHA, P. Ö.; SILVA, L. A. P. Avaliação do Potencial de Biorremediação de Solos Contaminados: Método de Hidrólise de Diacetato de Fluoresceína (FDA) como Indicador de Atividade Microbiana. **Revista Aquila**, n.13, p.105-120, 2015.

ROLDÁN, A. et al. Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. **AppliedSoilEcology**, v.30, p.11-20, 2005.

SILVA, L. G. Uso e monitoramento de indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade dos solos de cerrado sob diferentes agroecossistemas. 137 p. 2008. Dissertação (Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária) – Universidade de Brasília, 2008.

SILVA, R. R. et al. Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica campos das Vertentes – MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1585-1592, 2010.

SILVEIRA, A. O. Atividades enzimáticas como indicadores biológicos da qualidade de solos agrícolas do Rio Grande do Sul. 2007. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. **Instituto agrônomo**, 312 p., 2007.

SOUZA, R. C. et al. Estrutura da comunidade da fauna edáfica em fragmentos florestais na Restinga da Marambaia, RJ. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, p.49-57, 2008.

SPERA, S. T. et al. Atributos físicos de um Hapludox em função de sistemas de produção integração lavoura-pecuária (ILP), sob plantio direto. **Acta ScientiarumAgronomy**, v.32, p.37-44, 2010.

TABATABAI, M. A. SoilEnzymes. IN: Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties. **Soil Science Society of America**, p.775–833, 1994.

TAMILSELVI, S. M. et al. Effect of long-term nutrient managements on biological and biochemical properties of semi-arid tropical Alfisol during maize crop development stages. **Ecology Indicator**, v.48, p.76–87, 2015.

TANG, X. et al. Soil atmospheric exchange of CO₂, CH₄, and N₂O efflux in three subtropical forest ecosystems in southern China. **Global Change Biology**, v.12, p.546–560, 2006.

TAUTGES, N. E. et al. Soil microbial diversity and activity linked to crop yield and quality in a dryland organic wheat production system. **Applied Soil Ecology**, v.108, p.258-268, 2016.

THOMAS, G. A. et al. No-tillage and conservation farming practices in grain growing areas of Queensland – a review of 40 years of development. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.47, p.887-898, 2007.

TIEMANN, L. K.; BILLINGS, S. A. Indirect effects of nitrogen amendments on organic substrate quality increase enzymatic activity driving decomposition in a Mesic Grassland. **Ecosystems**, v.14, p.234-247, 2011.

TRANNIN, I. C. B.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de biossólido industrial e cultivo de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.1, p.1173-1184, 2007.

VENTER, Z. S., JACOBS, K., HAWKINS, H. J. The impact of crop rotation on soil microbial diversity: A meta-analysis. **Pedobiologia**, v.59, p.215-223, 2016.

VENZKE FILHO, S. P. et al. Biomassa microbiana do solo em sistema de plantio direto na região de Campos Gerais- Tibagi, PR. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.599-610, 2008.

VEZZANI, F. M.; MIELNICZUK, J. Uma visão sobre qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.743-755, 2009.

WANG, R. Z. et al. Responses of enzymatic activities within soil aggregates to 9-year nitrogen and water addition in a semi-arid grassland. **Soil Biology and Biochemistry**, v.81, p.159–167, 2015.

WHITMAN, W. B., COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A**, v.95, p.6578- 6583, 1998.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

WOLFARTH, F. et al. Earthworms promote the reduction of Fusarium biomass and deoxynivalenol content in wheat straw under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.43, p.1858–1865, 2011.

YANG, D.; ZHANG, M. Effects of land-use conversion from paddy field to orchard farm on soil microbial genetic diversity and community structure. **European Journal of Soil Biology**, v.65, p.30-39, 2014.

4 ARTIGO

Bioatividade do solosob plantio direto com sucessão e rotação de culturas¹

Soil bioactivity in no-tillage system with succession and crop rotation

Mirian Barbieri¹, Mariana Ferneda Dossin², Daiane Dalla Nora³, Willian B. dos Santos⁴, Caroline B. Bevilacqua⁵, Nariane de Andrade⁶, Dinis Deuschle⁷; Rodrigo J. S. Jacques⁸ e Zaida Inês Antonioli⁹

¹ Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Solos, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Mestre em Agrobiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Solos, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Acadêmica do curso de Agronomia, UFSM. Aluna de iniciação científica voluntária.

⁴ Acadêmico do curso de Agronomia, UFSM. Bolsista PIBIT/CNPq.

⁵ Doutora em Ciências, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Defesa Fitossanitária, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁶ Acadêmica do curso de Agronomia, UFSM. Bolsista PET-SESu.

⁷ Mestre em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Solos, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁸ Professor no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Solos, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Bolsista de Produtividade do CNPq.

⁹ Professora no Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia e no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Solos, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Bolsista de Produtividade do CNPq.

RESUMO

A adoção de práticas conservacionistas alteram as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, influenciando a composição da comunidade microbiana. O trabalho objetivou obter informação sobre a qualidade, diversidade e atividade biológica do solo, quando submetido a dois tipos de manejo do solo (plantio direto escarificado (PDE) e não escarificado (PDNE)) e três tipos de manejo de cobertura (Sucessão: soja-trigo, Rotação I: soja-nabo+trigo/soja-aveia+ervilhaca/ e Rotação II: soja-aveia+ervilhaca+nabo/milho-crotaláriaajuncea-trigo/soja). Foram analisadas a biomassa microbiana, atividade enzimática, taxa de respiração basal e diversidade genética do solo, nos períodos do verão (fevereiro/2016) e inverno (setembro/2016). O carbono

¹ Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista de Ciências Agrárias.

enitrogênio da biomassa microbiana foram superiores nos tratamentos sob PDNE. Todas as enzimas apresentaram incremento na atividade no período do verão. Para a respiração basal dos microrganismos, a menor taxa de CO₂ acumulada foi no período do verão em solo sob PDNE. Detectou-se variabilidade genética através da técnica de RAPD, reunindo os tratamentos em quatro grupos. Pode-se concluir que o sistema PDNE associado à rotação de culturas contribui para aumentar a biomassa microbiana e atividade enzimática no solo. Além disso, a técnica de RAPD associada a outros bioindicadores tornam-se importantes ferramentas para o monitoramento da qualidade do solo.

Palavras-chave: atividade enzimática, diversidade genética, escarificação, microrganismos, RAPD.

SUMMARY

The adoption of conservation practices affect the physical, chemical and biological properties of the soil, altering the composition of the microbial community. The objective of this research was to obtain information about the soil quality, diversity and biological activity, of the soil when submitted to two types of soil management (scarified (PDE) and no-scarified tillage (PDNE)) and three types of cover management (Succession: soybean-wheat, Rotation I: Soybean-turnip+wheat/soybean-oats+vetch and Rotation II: soybean-oats+vetch+turnip/corn-crotalaria juncea-wheat/soybeans). The microbial biomass, enzymatic activity, basal respiration rate and soil genetic diversity were analyzed during the summer (february/2016) and winter (september/2016) periods. The carbon and nitrogen of the microbial biomass were higher in treatments under PDNE. All enzymes showed an increase in the activity during the summer period. For the basal respiration of the microorganisms, the smallest accumulated CO₂ rate was in the summer period under PDNE. The RAPD technique proved to be efficient in the detection of genetic variability, combining treatments in four groups. We concluded that

PDNE associated with crop rotation contributes to increase the levels of microbial biomass and soil enzymatic activity. In addition, the RAPD technique associated with other bioindicators become important tools for the monitoring and evaluation of soil quality.

Keywords:Enzymatic activity, genetical diversity, scarification, microorganisms, RAPD.

4.1 INTRODUÇÃO

Até meados dos anos 1980, o grande problema das lavouras produtoras do Sul do Brasil era a erosão hídrica, decorrente do preparo convencional do solo. O revolvimento intenso e a incorporação ou queima de resíduos vegetais da cultura anterior deixavam o solo exposto à ação erosiva das chuvas, acarretando grandes perdas de solo, água, insumos agrícola e sementes (OLIVEIRA et al., 2012).

A adoção, em larga escala, do sistema plantio direto, a partir dessa época, minimizou o problema. Contudo, nos últimos anos, denota-se que falhas na implementação desse sistema, têm promovido retrocessos na conservação do solo em grande parte das lavouras. Alguns princípios básicos do sistema plantio direto, como rotação de culturas e manutenção do solo constantemente coberto, não têm sido utilizados. Como consequência de um conjunto de práticas inadequadas ao manejo, é notório o retorno gradativo da erosão hídrica em lavouras anuais produtoras de grãos no Rio Grande do Sul, associada a alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, o que compromete a estabilidade do sistema produtivo.

Tais alterações provocadas pelas práticas de manejo puderam ser observadas em trabalho realizado por Dadalto et al. (2015), que ao comparar o sistema plantio direto e preparo convencional, as parcelas sob plantio direto apresentaram incremento nos valores de carbono da biomassa microbiana, enquanto o preparo convencional

apresentou maiores valores de quociente metabólico (qCO_2). Os dados obtidos evidenciam que o plantio direto foi o sistema que apresentou menor interferência na atividade microbiológica do solo, concluindo que esse sistema proporciona maior biomassa microbiana e menor perda relativa de carbono via respiração, sendo possível determinar, assim, maior acúmulo de carbono no solo em longo prazo. O mesmo observa-se em trabalho realizado por Mendes et al. (2003) cujo objetivo era avaliar a distribuição da biomassa microbiana e da atividade enzimática do solo sob vegetação nativa, sistema de plantio direto e preparo convencional. Concluiu-se que os sistemas de manejo (plantio direto e convencional) influenciaram o perfil de distribuição das propriedades biológicas do solo e a atividade enzimática mostrou um incremento no sistema plantio direto. Nesse sentido, fica evidente a importância da adoção de práticas sustentáveis que tem por objetivo a melhoria e a manutenção das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo.

Diante disso, para entender esse problema, é necessário a adoção e o desenvolvimento de sistemas agrícolas produtivos baseados em culturas com elevado aporte de material orgânico ao solo, permitindo manutenção constante da cobertura do solo, tanto por plantas vivas como por resíduos vegetais agrícolas (EMBRAPA, 2013). Assim, o objetivo do presente estudo foi obter informação sobre a qualidade, diversidade e atividade biológica do solo, nos diferentes sistemas de manejo do solo, através da atividade das enzimas urease, fosfatase ácida e hidrólise do diacetato de fluoresceína, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, taxa de respiração basal dos microrganismos e análise da diversidade genética por meio da técnica de RAPD.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Caracterização da área experimental

O experimento vem sendo conduzido desde 2013 na área experimental pertencente à Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), no município de Júlio de Castilhos, na região central do Estado do Rio Grande do Sul, situado o 29°13'39" de latitude sul e a 53°40'38" de longitude oeste (LONDERO, 2015). O solo é classificado como um Nitossolo Vermelho (EMBRAPA, 2013). Anteriormente à instalação do experimento, a área vinha sendo há 20 anos cultivada sob semeadura direta com soja no verão e trigo, aveia e avevém no inverno. A escarificação do solo foi realizada em outubro de 2013, anteriormente à instalação do experimento, utilizando-se de escarificador de sete hastes, atuando até 30 cm de profundidade. O cultivo das culturas comerciais e de cobertura de solo que constituem o manejo de cobertura foi conduzido de forma mecanizada, sob semeadura direta, de acordo com as recomendações técnicas para cada cultura.

O delineamento experimental é composto de blocos ao acaso com três repetições e parcelas de 3,5 × 22 m, totalizando uma área de 77 m² por parcela. Os tratamentos consistem de 1 sucessão e 2 rotações de culturas associadas ao sistema plantio direto/escarificado e não escarificado, totalizando 6 tratamentos: T1) Sucessão soja-trigo + compactação natural; T2) Sucessão soja-trigo + escarificação; T3) Rotação soja-nabo + trigo/soja-aveia + ervilhaca/soja + compactação natural; T4) Rotação soja-nabo + trigo/soja-aveia + ervilhaca/soja + escarificação; T5) Rotação soja-aveia + ervilhaca + nabo/milho-crotalária/juncea-trigo/soja + compactação natural; T6) Rotação soja-aveia + ervilhaca + nabo/milho-crotalária/juncea-trigo/soja + escarificação.

4.2.2 Solo para análise microbiológica

O solo foi coletado na camada de 0-10 cm de profundidade, com auxílio de trado calador, onde foram excluídos os resíduos vegetais da superfície. Foram coletadas 8 subamostras em “zigue-zague” na parcela para a formação das amostras compostas de cada

unidade experimental. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e colocadas em caixas de isopor com gelo para a preservação do material biológico (SULEIMAN et al., 2013). As amostragens foram realizadas em duas épocas do ano, verão (fevereiro/2016) e no inverno (setembro/2016). Na sequência, o material foi transportado até o Laboratório de Biologia do Solo e Microbiologia do Ambiente Professor Marcos Rubens Fries da Universidade Federal de Santa Maria, onde foram peneiradas (2 mm), homogeneizadas e refrigeradas a 4°C, com umidade de campo, até o momento da realização das análises. Retirou-se 5 gramas de solo de cada uma das amostras para a determinação do teor de umidade, realizada através de secagem em estufa a 105°C por um período de 24 horas. A umidade do solo foi determinada pela diferença de peso do solo antes e depois da secagem. Também foi realizada a caracterização química do solo antes do plantio da soja na safra 2015/16, pelo Laboratório de Análises Químicas da FEPAGRO, em Porto Alegre, RS (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização dos atributos químicos do solo na camada de 0-10 cm, antes do cultivo da soja (safra 2015/16).

Atributos	T1 ⁽¹⁾	T2	T3	T4	T5	T6
Argila (%)	48,3a*	50,1a	46,3a	48,8a	50,3a	49,3a
Matéria Orgânica (%)	2,7a	2,5a	2,9a	3a	2,9a	2,7a
pH (H ₂ O)	5,2a	5,3a	5,4a	4,8a	5,1a	4,9a
Ca trocável (cmoldm ⁻³)	4,9a	4,8a	6,7a	4,4a	5a	4,2a
Mg trocável (cmol dm ⁻³)	1,6a	1,5a	1,8a	1,7a	1,8a	1,5a
Al trocável (cmoldm ⁻³)	0,3a	0,2a	0,2a	0,2a	0,4a	0,4a
P disponível (mg dm ⁻³)	27,7a	22a	16a	17,2a	23,3a	18a
K trocável (mg dm ⁻³)	211,6a	237,5a	202a	248,5a	203,6a	227,5a
Capacidade de troca de cátions a pH 7,0	12,5a	11,8a	14a	12,3a	13,6a	12,5a
Saturação por bases (%)	58,9a	61,5a	64,6a	57,5a	56a	52,6a

*Letras iguais na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. ⁽¹⁾ T1: Sucessão soja-trigo + compactação natural; T2: Sucessão soja-trigo + escarificação; T3: Rotação soja-nabo + trigo/soja-aveia + ervilhaca/soja + compactação natural; T4: Rotação soja-nabo + trigo/soja-aveia + ervilhaca/soja + escarificação; T5: Rotação soja-aveia + ervilhaca + nabo/milho-crotaláriajuncea-trigo/soja + compactação natural e T6: Rotação soja-aveia + ervilhaca + nabo/milho-crotaláriajuncea-trigo/soja + escarificação.

4.2.3 Biomassa microbiana

4.2.3.1 Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana

Para a determinação do carbono e do nitrogênio da biomassa microbiana do solo foi utilizada a metodologia de fumigação-extração proposta por Vance et al. (1987), este método é baseado em duas etapas. A primeira etapa, fumigação, tem o objetivo de promover o rompimento da parede celular liberando o conteúdo intracelular e a segunda etapa, a extração, tem o objetivo quantificar a biomassa microbiana. Para isso, o solo, ainda úmido, foi homogeneizado em peneira de malha 2 mm, onde também foram retirados os resíduos vegetais. Após esse preparo foram pesadas subamostras desse solo onde metade seguiu para fumigação.

O processo de fumigação consiste em incubar as amostras em estufa a vácuo (TE-395, Tecnal) sob atmosfera de clorofórmio, retirando-se o ar do interior do dessecador com auxílio de uma bomba de vácuo (TE-0581, Tecnal), repetindo esta operação até a percepção do borbulhamento do clorofórmio. Após 24 horas de fumigação, as amostras fumigadas e não fumigadas seguiram para o processo de extração, onde foram transferidas para frascos de vidro do tipo “snap-cap”, com capacidade para 100 mL, contendo solução de K_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado para 6,5–6,8. Posteriormente, os frascos foram agitados por 30 minutos em agitador horizontal, após passaram por um período de decantação e foram filtrados em papel filtro qualitativo. Os extratos filtrados foram utilizados para determinação do carbono em analisador elementar (TOC-L/TN, Shimadzu).

Os cálculos de C e N da biomassa microbiana seguiram da seguinte forma: $C \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = (C_f - C_n)/K_c$, onde C_f = Carbono do solo fumigado, C_n = Carbono do solo não fumigado e K_c = fator de correção (0,41) e $N \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = (N_f - N_n)/K_n$, onde o fator de correção $K_n = 0,54$.

4.2.4 Atividade enzimática do solo

4.2.4.1 Urease

A atividade da enzima urease foi determinada conforme (Dick et al., 1996). Foram pesados 5g de solo em tubos tipo *Falcon* e adicionados 9mL da solução de Tris hidroximetilaminometano (THAM) 0,05M e 1 mL da solução de ureia 0,2M e após mantidas em incubadora BOD (MA415, Marconi) a 37°C por duas horas, com exceção dos controles. Para o preparo das amostras controles, a solução de ureia 0,2M foi adicionada após o período de incubação das amostras com a solução de Tris hidroximetilaminometano (THAM) 0,05M. Após o período de incubação a 37°C, retiraram-se as amostras e foi adicionado 30 mL de solução refrigerada de KCl-Ag₂SO₄, posteriormente, o volume foi ajustado para 50 mL com adição de KCl-Ag₂SO₄ e os frascos foram invertidos manualmente 10 vezes, a fim de homogeneizar o conteúdo. A determinação do N-NH₄⁺ na suspensão de solo foi realizada de acordo com metodologia descrita por Tedesco et al. (1995), onde uma alíquota de 20 mL da solução foi transferida para um tubo de digestão de 100 mL, e seguiu para destilação a vapor desta solução com 0,2 g de MgO por 5 minutos. A atividade da enzima urease foi expressa em microgramas de N-NH₄⁺ liberados por hora por grama de solo seco.

4.2.4.2 Fosfatase ácida

A atividade da enzima fosfatase ácida foi determinada conforme (Dick et al., 1996), com adaptações propostas por Verchot e Borelli (2005). Amostras de 1g de solo foram pesadas em tubos tipo *Falcon*, em seguida, foram adicionados 4mL de solução MUB pH 6,5 (Tris hidroximetilaminometano + ácido malêico + ácido cítrico + ácido bórico – dissolvido em 488 mL de solução de NaOH 1 mol L⁻¹) em todos os tubos e 1 mL de solução de PNP 0,5 M L⁻¹ (p-nitrofenil fosfato dissódico), com exceção dos

controles. Após, as amostras foram mantidas em incubadora a 37°C por uma hora, também foram preparadas as amostras controle (solo sem adição da solução de PNP).

Passado o período de incubação, foi adicionado 4mL de solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹, 1 mL de CaCl₂ 0,5 mol L⁻¹, parando a atividade da enzima fosfatase e 1 mL de PNP 0,5M (somente nos controles). Após isso as amostras foram filtradas em papel filtro (Whatmann^o 4). A intensidade da coloração amarela do extrato foi determinada em espectrofotômetro (UV-M51 UV-VISÍVEL, BEL Engineering) a 410 nm e a quantidade de *p*-nitrofenol formada na amostra foi determinada com base em uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de *p*-nitrofenol (0, 10, 20, 30, 40, 50 mg de *p*-nitrofenol mL⁻¹). A atividade da enzima fosfatase foi expressa em microgramas de *p*-nitrofenol liberados por hora por grama de solo seco.

4.2.4.3 Hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)

A determinação da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) foi realizada de acordo com Green et al. (2006). O método tem como princípio a permanência da fluoresceína na célula causando fluorescência intracelular que pode ser quantificada por espectrofotometria. Para isso, 1g de solo foi incubado com 20 mL de solução tampão de fosfato de sódio 60 mM e 0,1 mL de solução de FDA 4,8 mM a 25°C em *shakers* sob agitação de 100rpm durante 2 horas, neste momento também foram preparadas as amostras controle (solo sem adição da solução de FDA 4,8 mM). Após, foi adicionado em cada amostra 20 mL de acetona com o objetivo de cessar a reação enzimática e 0,1 mL da solução de FDA nas amostras controle. As amostras permaneceram paradas para que as partículas sólidas pudessem decantar, posteriormente foram filtradas em papel filtro (Whatman n^o 4).

A intensidade da coloração do extrato foi medida em espectrofotômetro a 490 nm, e a concentração de fluoresceína foi calculada a partir da equação da reta obtida

através de uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de fluoresceína (10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 200, 250 e 300 μg de fluoresceína), sendo a atividade enzimática expressa em microgramas de fluoresceína liberados por hora por grama de solo seco.

4.2.5 Atividade microbiana do solo

4.2.5.1 Taxa de respiração basal

A taxa respiração basal foi estimada através da quantidade de CO_2 liberado do solo durante um período de 21 dias de incubação, utilizando metodologia proposta por Stotzky (1965).

As unidades experimentais foram constituídas de recipientes de vidro de aproximadamente 1L, ficando hermeticamente fechados. Foram utilizadas amostras de 100g de solo, mantidas em incubadora com temperatura de 26°C e com umidade corrigida para o peso do solo seco. Também foram utilizados três recipientes sem solo como controle.

O CO_2 liberado foi capturado por 20 mL de uma solução de NaOH 0,5 M, adicionada em copos plásticos junto ao solo no recipiente de 1L. Após 7 dias de incubação, o NaOH 0,5 M foi quantificado por titulação com solução de HCl 0,5 mol L^{-1} , sendo adicionado imediatamente antes 1 mL de BaCl_2 1M, para impedir que o Na_2CO_3 formado através do processo de respiração fosse desdobrado em NaOH + CO_2 . Posteriormente, acrescentaram-se três gotas de indicador ácido/base fenolftaleína 1%.

Novos copos plásticos com 20 mL de solução de NaOH 0,5 M foram colocados nos frascos de vidro para subseqüentes períodos de incubação. Foram realizadas três titulações, sendo aos 7, 14 e 21 dias após a incubação.

A diferença entre o volume de ácido necessário para neutralizar o NaOH 0,5 M nos recipientes testemunhas e nos tratamentos, equivale à quantidade de CO₂ produzida pelos microrganismos do solo.

4.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F, se aplicou às médias, o teste de *Tukey* ao nível de 5% de significância, com o auxílio do programa estatístico *SISVAR* (FERREIRA, 2000).

4.2.7 Análise molecular

O solo utilizado para análise molecular foi coletado na camada de 0-10 cm de profundidade, onde foram excluídos os resíduos vegetais da superfície.

As amostragens foram realizadas em “zigue-zague” na parcela com trado calador, sendo sempre esterilizado com álcool 70% entre um tratamento e outro. O solo foi acondicionado em tubos tipo *Falcon* de 15 mL e colocado em caixas de isopor com gelo para a preservação do material biológico. Após, foi transportado até o Laboratório de Biologia do Solo e Microbiologia do Ambiente da UFSM, onde foi mantido à -20°C até o momento da realização da análise molecular.

Para a extração do DNA genômico total, 250 mg de solo foram processados usando o Kit *Power Soil*® (MOBIO, Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® e os resultados foram baseados no grau de pureza entre 1,8 a 2,2 sob comprimento de onda 260/280 nm.

Foram testados 11 *primers* (Tabela 2) e as reações de amplificação foram preparadas em volume final de 10 µL contendo 10x Taq buffer, 25 mM dNTPs, 25

pmol *primers*, 2mM MgCl₂, 1U/μl Taq DNA polimerase, 10 ng DNA e água ultrapura (HARRY et al., 2001; GAO et al., 2010b).

Essas reações foram realizadas com uma etapa inicial de desnaturação de 2 minutos à 94°C, seguida por 45 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, anelamento a 36°C durante 1 minuto e alongamento a 72°C durante 1,5 minutos, com extensão final a 72°C durante 5 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,2%.

Tabela 2: Códigos e sequências dos *primers* de RAPD utilizados neste estudo (GAO et al., 2010b; HARRY et al., 2001).

Código	Sequência (5' - 3')	Amplificação
C06	GAACGGACTC	Não
C20	ACTTCGCCAC	Não
D04	TCTGGTGAGG	Não
D10	GGTCTACACC	Não
D16	AGGGCGTAAG	Não
D18	GAGAGCCAAC	Não
PS1	TAGGCGGCGG	Não
PS2	CTGCTGGGAC	Sim
PS3	GAGGCCCGTT	Não
PS4	GTCGCCGTCA	Sim
PS5	CTCCCCAGAC	Sim

A análise dos resultados foi realizada através da presença (“1”) e ausência (“0”) de bandas utilizando o software PyElph (PAVEL e VASILE, 2012) e a análise dos componentes principais (PCA) foi realizada através do software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Biomassa microbiana

4.3.1.1 Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana

Durante o período do inverno (setembro/2016), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para o carbono da biomassa microbiana (CBM). Já para a coleta realizada no verão (fevereiro/2016), o tratamento 5 (T5), que corresponde ao sistema de rotação II associada ao plantio direto não escarificado, apresentou um incremento no CBM quando comparado com os demais tratamentos, apresentando valor de 102,84 mg kg⁻¹ solo seco. Os menores valores foram observados para os tratamentos 1 e 2 (T1 e T2), sendo 87,98 e 83,99 mg kg⁻¹ solo seco, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Biomassa microbiana entre os diferentes tratamentos nas diferentes épocas de amostragem do solo.

	Sucessão		Rotação I		Rotação II	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
CBM (mg kg⁻¹ solo seco)						
PD não escarificado	87,98Ab	144,23Aα	94,07Aab	148,70Aα	102,84Aa	155,48Aα
PD escarificado	83,99Aa	130,35Aα	92,43Aa	146,73Aα	92,97Ba	153,15Aα
NBM (mg kg⁻¹ solo seco)						
PD não escarificado	12,40Ab	12,77Aα	12,76Aab	14,77Aα	14,51Aa	14,21Aα
PD escarificado	11,10Aa	12,05Aα	12,48Aa	13,85Aα	12,62Aa	13,21Aα

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, minúscula na linha (verão) e letras gregas na linha (inverno), não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. PD: Plantio direto; CBM: Carbono da Biomassa Microbiana; NBM: Nitrogênio da Biomassa Microbiana; Sucessão: Soja-trigo; Rotação I: Soja-nabo + trigo/soja-aveia + ervilhaca/soja; Rotação II: Soja-aveia + ervilhaca + nabo/milho-crotaláriajuncea-trigo/soja.

Ao estudar a comunidade microbiana em solos com elevado aporte de cobertura vegetal e ausência de revolvimento para a cultura da soja Alves et al. (2011) encontraram valores relativamente maiores de CBM, para a região centro-oeste do Brasil, tendo em vista o acúmulo de material orgânico, que fornece maior fonte de nutrientes para o desenvolvimento da comunidade microbiana. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Eekeret al. (2008), que observaram valores de biomassa microbiana mais elevados em solos sob plantio direto, em relação ao sistema que

empregava a escarificação do solo. O aumento da biomassa microbiana do solo está correlacionado com a adoção do plantio direto e com o aumento da adição de resíduos culturais na superfície do solo (LISBOA et al., 2012a).

Semelhantemente ao CBM, o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM), não apresentou diferença estatística para as análises realizadas no período do inverno. Entretanto, para as coletas realizadas no verão, o maior valor observado para a variável NBM também, foi no tratamento 5 (T5), apresentando valor de $14,51 \text{ mg kg}^{-1}$ solo seco, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos onde também foi empregado o plantio direto não escarificado (Tabela 3). O plantio direto escarificado não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos em ambos os períodos de coleta. Os menores valores foram observados para os tratamentos 1 e 2 (T1 e T2), sendo $12,40$ e $11,10 \text{ mg kg}^{-1}$ solo seco, respectivamente (Tabela 3). Os dados do presente estudo corroboram com Silveira et al. (2006) e Lourente et al. (2010) que observaram um incremento da biomassa microbiana do solo em períodos chuvosos (Figura 1).

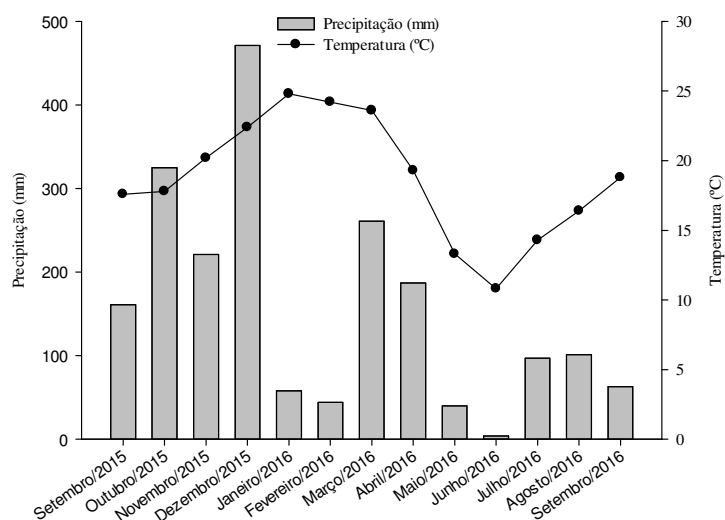


Figura 1: Precipitação pluviométrica e temperatura média mensal durante os anos de 2015 e 2016 para o município de Júlio de Castilhos, RS. (Fonte: IRGA – Instituto Rio Grandense do Arroz).

Sendo assim, os altos níveis de biomassa microbiana encontrados podem ser atribuídos à disponibilidade de nutrientes, carbono orgânico e resíduos de plantas no

solo, além de maiores teores de umidade do solo e temperatura, que influenciam positivamente o crescimento e desenvolvimento de microrganismos no solo (LOURENTE et al., 2010).

4.3.2 Atividade enzimática do solo

4.3.2.1 Urease

Na tabela 4 estão apresentados os valores da atividade das enzimas urease, fosfatase ácida e FDA no solo, sendo possível observar diferença estatística somente para as enzimas fosfatase ácida e FDA.

A atividade da enzima urease não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos avaliados. Entretanto, é importante ressaltar que nos tratamentos sob plantio direto não escarificado foram observados os maiores valores de atividade enzimática, em ambos os períodos de coleta independente da sucessão ou rotação de cultura empregada (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade enzimática do solo entre os sistemas de cultivo plantio direto escarificado e não escarificado em duas épocas de amostragem.

	Sucessão		Rotação I		Rotação II	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
UREASE ($\mu\text{g de N-NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ solo seco)						
PD não escarificado	58,26Aa	48,09A α	64,78Aa	43,63A α	61,24Aa	49,13A α
PD escarificado	51,20Aa	42,14A α	63,89Aa	37,30A α	53,02Aa	43,52A α
FOSFATASE ÁCIDA ($\mu\text{g de p-nitrofenol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ solo seco)						
PD não escarificado	431,42Ab	319,07A β	791,20Aa	444,04A α	795,73Aa	526,45A α
PD escarificado	439,24Ab	217,26A β	768,11Aa	417,38A α	941,03Aa	487,75A α
FDA ($\mu\text{g de F h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ solo seco)						
PD não escarificado	62,93Aa	35,06A β	57,80Aa	38,96B β	69,56Aa	46,46A α
PD escarificado	60,03Aa	27,13A β	63,50Aa	48,56A α	69,46Aa	44,30A α

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, minúscula na linha (verão) e letras gregas na linha (inverno), não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. PD: Plantio direto; FDA: Hidrólise do Diacetato de Fluoresceína; Sucessão: Soja-trigo; Rotação I: Soja-nabo + trigo/soja-aveia + ervilhaca/soja; Rotação II: Soja-aveia + ervilhaca + nabo/milho-crotalária juncea-trigo/soja.

Ao avaliar os tratos culturais utilizados, pode-se observar que os sistemas não promoveram alterações evidentes na atividade da enzima urease nas diferentes épocas amostradas. Estes resultados assemelham-se aos que foram obtidos por Conti et al. (1998), no qual a atividade da urease não diferiu entre as rotações utilizadas, na região do Pampa da Argentina. Os resultados obtidos neste trabalho com relação à atividade enzimática estão de acordo com outros estudos realizados, os quais demonstram que ao comparar os sistemas de plantio direto e preparo convencional, a atividade da enzima urease também esteve superior no sistema plantio direto não escarificado (LANNA et al., 2010; LISBOA et al., 2012a).

No Rio Grande do Sul, Silveira (2007), observou que aqueles sistemas sob plantio direto não escarificado apresentaram maiores valores de atividade da enzima urease quando comparados ao plantio direto escarificado. Seguindo a mesma tendência, uma maior atividade de urease em sistemas de plantio direto também pode ser observada por Roldán et al. (2005). Estes autores obtiveram valores de atividade enzimática duas vezes maior nas áreas de plantio direto não escarificado em relação às áreas de preparo convencional do solo.

4.3.2.2 Fosfatase ácida

Houve uma grande variação entre as épocas de coleta com relação à atividade da fosfatase ácida (cerca de 118,2% para o verão e 142,5% para o período do inverno), sendo as amostras coletadas no período do verão as que apresentaram maior atividade. Não foi possível observar variação na atividade da enzima para o tipo de manejo de solo utilizado, entretanto com relação às comparações entre os sistemas de culturas foi observada diferença somente na sucessão (soja-trigo) quando comparada com as rotações I e II, o que indica que houve influência das culturas utilizadas (Tabela 4).

Na coleta realizada no período do verão, os valores para a atividade da fosfatase ácida variaram de 431,42 μg de p-nitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo seco, em área de plantio direto não escarificado, a 941,03 μg de p-nitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo seco, para o plantio direto escarificado.

Nas amostras coletadas no inverno, observou-se uma variação menor na atividade enzimática, os valores variaram de 217,26 a 526,45 μg de p-nitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo seco. A maior atividade desta enzima foi observada no tratamento 5 (T5), sob sistema de plantio direto não escarificado, e a menor atividade no tratamento 2 (T2), em solo escarificado. Estes valores estão dentro de uma faixa normalmente encontrada em diversos estudos em sistemas de cultivo, variando de 23 a 2100 μg de p-nitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo seco, tendo média de aproximadamente 617 mg de p-nitrofenol kg^{-1} solo h^{-1} , para análises realizadas em solo com umidade de campo (CONTE et al., 2002; MENDES et al., 2003; MANKOLO et al., 2012).

A maior atividade da fosfatase ácida em sistemas de plantio direto sem escarificação também foi observada por Lisboa et al. (2012a), onde a atividade da fosfatase ácida foi significativamente superior em áreas sob plantio direto sem escarificação que em solo escarificado, com valores variando de 302,6 à 61,5 μg de p-nitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo seco, respectivamente. Esse resultado é similar ao obtido por Roldán et al. (2007), em que a maior atividade da enzima está relacionada às atividades dos fungos micorrízicos arbusculares. No presente trabalho, também podem ser observados valores superiores para a atividade da fosfatase ácida nos tratamentos 2 e 6 (T2 e T6), ambos sob solo escarificado, coletados no período do verão. Estes resultados podem ser explicados devido ao fato de que a atividade microbiana tende a diminuir em períodos com temperaturas mais amenas, e aumentar quando as temperaturas são mais elevadas (SILVEIRA, 2007).

4.3.2.3 Hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)

Semelhante ao observado na atividade das outras enzimas analisadas, a hidrólise de FDA apresentou atividade enzimática superior na coleta realizada no verão em comparação à realizada no inverno. Além disso, os resultados obtidos foram superiores para todos os tratamentos sob plantio direto não escarificado, quando comparado ao solo escarificado, porém essa diferença não foi significativa (Tabela 4). Estes resultados corroboram com os encontrados por Correa et al. (2009), onde também obtiveram valores para a hidrólise de FDA superiores em solo com compactação natural após cultivo com milho. Ainda segundo Silva et al. (2004), a atividade microbiológica está diretamente relacionada com o acúmulo de matéria orgânica na superfície do solo, o que pode ser obtido através de práticas conservacionistas como o plantio direto.

Os valores da hidrólise de FDA variaram de 57,80 a 69,56 μg de fluoresceína $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo seco, na amostragem realizada no verão, e de 27,13 a 48,56 μg de fluoresceína $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo seco, na amostragem realizada no inverno. A menor atividade no período do verão foi observada no tratamento 4 (T4), que corresponde ao sistema de rotação I associado ao plantio direto escarificado e a maior atividade no tratamento 5 (T5), sistema de rotação II em solo sob plantio direto sem escarificação.

De acordo com José et al. (2013), a atividade microbiana é influenciada pelos sistemas de manejo, o que demonstra uma redução dos valores quando em condições de manejo convencional, o que pode ser causado pelo fato de não haver adição de material orgânico como fonte de nutrientes para os microrganismos. Além disso, o tipo de manejo e o tipo de cultura podem resultar em alterações na composição física, química e na microbiota do solo (MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2002). Essas alterações nas propriedades físico-químicas interferem nas funções do solo, pois podem, por exemplo, afetar a disponibilidade de nutrientes e/ou interferir na atividade enzimática (MAIA et al., 2010).

Para as coletas realizadas no período do inverno, pode-se observar diferença estatística significativa para o manejo de solo utilizado. A rotação I quando associada ao plantio direto escarificado, apresentou resultado cerca de 24,64% maior em comparação com o plantio direto não escarificado na mesma rotação. Além disso, houve diferença significativa para as culturas utilizadas em solo sob plantio direto não escarificado. Nota-se que a rotação II proporcionou um incremento de 19,25% na hidrólise de FDA, quando comparada com a rotação I, demonstrando que os sistemas de cultivo têm grande influência na atividade enzimática dos solos agrícolas (ZATORRE et al., 2011).

4.3.3 Atividade microbiana do solo

4.3.3.1 Taxa de respiração basal

Os valores obtidos para a taxa de respiração basal (C-CO₂) não apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos nos dois períodos de amostragem. Contudo, os maiores valores de C-CO₂ foram observados no período do verão, nos tratamentos submetidos ao plantio direto escarificado (T2, T4 e T6) sendo, 196,82, 247,79 e 260,16mg C-CO₂ kg⁻¹ solo seco, respectivamente. Já para as amostragens realizadas no período do inverno, os maiores valores obtidos foram nos tratamentos com solo sob plantio direto sem escarificação (T1, T3 e T5), com valores de 350,86, 348,38 e 319,81mg C-CO₂ kg⁻¹ solo seco, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5: Respiração basal (C-CO₂) dos microrganismos entre sistemas de cultivo plantio direto escarificado e não escarificado em duas épocas de amostragem.

	Sucessão		Rotação I		Rotação II	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
	C-CO₂ (mg C-CO₂ kg⁻¹ solo seco)					
PD não escarificado	170,74Aa	350,86Aa	238,76Aa	348,38Aa	256,09Aa	319,81Aa
PD escarificado	196,82Aa	310,44Aa	247,79Aa	332,68Aa	260,16Aa	319,79Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, minúscula na linha (verão) e letras gregas na linha (inverno), não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. PD: Plantio direto; C-CO₂:

respiração basal; Sucessão: Soja-trigo; Rotação I: Soja-nabo + trigo/soja-aveia + ervilhaca/soja; Rotação II: Soja-aveia + ervilhaca + nabo/milho-crotaláriajuncea-trigo/soja.

Dentre os atributos biológicos sensíveis às alterações nos sistemas de manejo do solo e culturas, a biomassa microbiana, recebe um papel de destaque, representando a parte viva da matéria orgânica, respondendo intensamente às flutuações de umidade, temperatura, manejo e qualidade dos resíduos, podendo ser uma potencial fonte de C-CO₂ à atmosfera (SINGH e SIDHU, 2014). Um dos principais fatores que determina se o solo pode atuar como fonte ou dreno de C-CO₂ é a escolha do sistema de manejo. Sistemas de manejo que aumentem a adição de resíduos vegetais e a retenção de carbono no solo se constituem em alternativas importantes, para aumentar a capacidade de dreno do C-CO₂ atmosférico e mitigação dos problemas relacionados ao aquecimento global (AMADO et al., 2001; BAYER et al., 2006).

Os resíduos vegetais que são mantidos em superfície (sistema plantio direto) resultam em menores taxas de decomposição quando comparados aos resíduos que são incorporados ao solo (preparo convencional), onde a decomposição é promovida devido às alterações nas condições microclimáticas do solo, principalmente relacionadas ao contato (PARTON et al., 1996). Além disso, os sistemas em que os resíduos são mantidos em superfície apresentam, ainda, vantagens relacionadas à melhoria na qualidade do solo, como a lenta e gradual adição de carbono no sistema, menor amplitude térmica, manutenção da umidade, favorecendo no acúmulo de matéria orgânica do solo (BAYER e MIELNICZUK, 2008).

Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que houve maiores emissões de C-CO₂ em solo sob plantio direto escarificado no período do verão. Isto pode ser explicado, devido ao fato de que na escarificação, o contato solo/resíduo é aumentado devido ao revolvimento do solo (LUPWAYI et al., 2004; GIACOMINI et al., 2007). O revolvimento do solo, prática utilizada no sistema convencional de plantio, promove o

rompimento dos agregados, fazendo com que ocorra a liberação do CO₂ preso nos espaços porosos (REICOSKY, 1997). Além disso, a combinação de temperaturas elevadas no período do verão somadas a não cobertura do solo, podem também influenciar a atividade microbiana, ocasionando uma maior difusividade de C-CO₂ para a atmosfera, e aumento da amplitude térmica. Esses fatores, observados em conjunto, influenciam a microbiota a degradar a matéria orgânica do solo, aumentando o fluxo de C-CO₂ desse sistema (LISBOA et al., 2012b).

Já os menores valores de C-CO₂ observados no plantio direto não escarificado, estão estreitamente relacionados à lenta e gradual ciclagem dos resíduos culturais, promovidas pelo não revolvimento do solo, liberando compostos orgânicos que estimulam a formação e a estabilidade de agregados (ELLIOT, 1986; REICOSKY et al., 1995; ASSIS e LANÇAS, 2010). Como consequência, a MOS fica menos exposta aos processos microbianos, reduzindo a taxa de mineralização e resultando em um menor fluxo de CO₂ para a atmosfera refletindo em uma biomassa microbiana mais eficiente, ou seja, com menor perda de C pela respiração e com uma fração significativa de C sendo incorporada ao tecido microbiano (COSTA; SILVA; RIBEIRO, 2013). Este fato pode ser evidenciado nos resultados da biomassa microbiana do solo (tabela 3), em que os valores mais elevados de C foram obtidos nos tratamentos sob plantio direto não escarificado em ambos os períodos de coleta, o que demonstra maior perda de C em solo sob escarificação.

Quanto ao efeito da qualidade de resíduos, devido às diferentes rotações de culturas utilizadas no experimento, pode-se observar que a relação C/N destes parece ter influenciado na atividade microbiana do solo, bem como nas emissões de C-CO₂ à atmosfera. Os resíduos culturais são compostos basicamente dos mesmos componentes, porém em diferentes proporções (HADAS et al., 2004). De acordo com as proporções de componentes químicos encontrados os resíduos são classificados em resíduos de alta

qualidade e resíduos de baixa qualidade. Resíduos com alta quantidade de lignina e polifenóis tendem a apresentar grande resistência à decomposição ao longo do tempo quando comparados com resíduos com altas quantidades de fração solúvel (TIAN et al., 1993).

Neste contexto, os maiores valores observados de respiração basal nas rotações I, II e na sucessão soja-trigo, no período de inverno, são explicadas pela tendência de maiores emissões de C-CO₂ do solo sob sucessão de leguminosas, como a soja, as quais apresentam uma alta qualidade de resíduo, resultando em altas taxas de decomposição, devido a facilidade de degradação pelos microrganismos. Já no período de verão foi observado sempre um decréscimo nos valores de C-CO₂, nas três rotações de culturas utilizadas, que pode ser explicado pela menor qualidade dos resíduos encontrados no solo nesse período, visto que os cultivos antecedentes eram compostos de resíduos de alta relação C/N, como os resíduos de gramíneas ou consórcios. Dessa forma, pode-se observar uma menor decomposição desses resíduos, devido a sua maior recalcitrância química.

4.3.4 Diversidade genética

Através da técnica de RAPD foi possível verificar a variabilidade genética entre os tratamentos adotados no presente estudo. Dos 11 *primers* de RAPD testados, três foram selecionados (PS2, PS4 e PS5) por serem mais informativos e produzirem bandas mais nítidas. Foram obtidas 56 bandas, sendo seis polimórficas e 50 monomórficas nos diferentes tratamentos.

Os marcadores utilizados não apresentaram diferença entre os períodos de coleta, proporcionando amplificação com os mesmos *primers* e apresentando o mesmo padrão de bandas já obtido. Neste sentido, os resultados foram apresentados apenas uma vez (Figura 2).

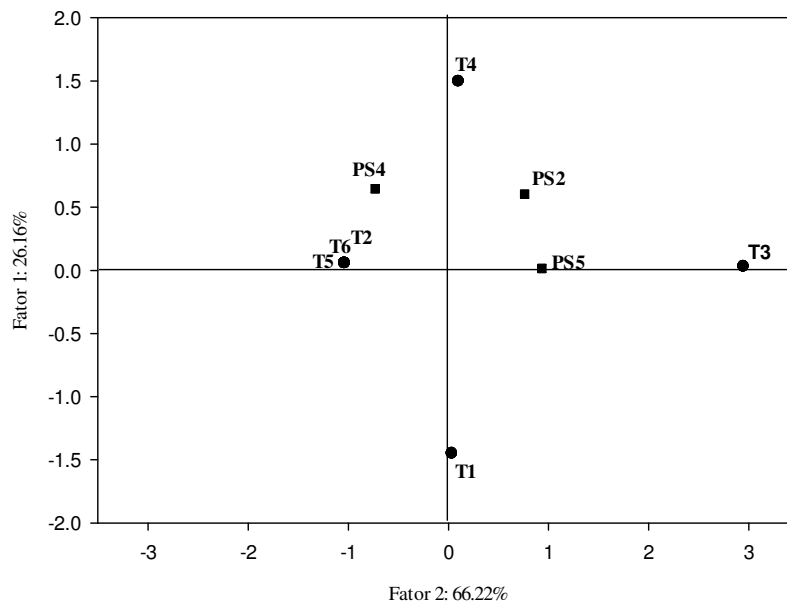


Figura 2: Relação genética entre os tratamentos utilizados determinada através da Análise dos Componentes Principais (PCA), para o período do verão (fevereiro/2016) e inverno (setembro/2016). Onde PS2, PS4 e PS5 = *Primerse* T1: Sucessão soja-trigo + compactação natural; T2: Sucessão soja-trigo + escarificação; T3: Rotação soja-nabo + trigo/soja-aveia + ervilhaca/soja + compactação natural; T4: Rotação soja-nabo + trigo/soja-aveia + ervilhaca/soja + escarificação; T5: Rotação soja-aveia + ervilhaca + nabo/milho-crotaláriajuncea-trigo/soja + compactação natural e T6: Rotação soja-aveia + ervilhaca + nabo/milho-crotaláriajuncea-trigo/soja + escarificação.

Os resultados obtidos através da análise dos componentes principais (PCA) indicam variabilidade genética presente entre os tratamentos (Figura 2), o que separou-os em 4 grupos. Os tratamentos 2, 5 e 6 (T2, T5 e T6) não apresentaram variabilidade genética entre eles, sendo, portanto, agrupados como semelhantes. Os demais tratamentos não apresentaram similaridade, podendo ser observada divergência genética entre eles.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Gao et al. (2010), que afirmam que as técnicas em conjunto tornam-se importantes métodos para a análise da diversidade microbiana. Isto pode ser observado nas outras análises realizadas no presente estudo, como a BMSe atividade enzimática. Nota-se que sempre os menores valores foram observados nos tratamentos submetidos a tratamentos culturais mais simples (Sucessão soja-trigo), que é o caso do tratamento 1 (T1). Com o resultado da análise de

RAPD, pode-se verificar que este tratamento não possui amplificação com nenhum dos *primers* e também foi o tratamento que apresentou menor valor para a atividade da enzima fosfatase ácida (431,42 μg de p-nitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo seco) o que leva a concluir que este tratamento possui menor diversidade microbiana, ou até mesmo, menor número de microrganismos, quando comparado com os demais tratamentos.

De acordo com Silva et al. (2015), a técnica de RAPD também demonstrou ser satisfatória para a análise de variabilidade e similaridade entre os isolados, revelando um perfil genético bem diversificado. Além disso, foi possível gerar um perfil de marcadores genéticos que podem ser utilizados para monitorar a presença de microrganismos em ambientes contaminados. O mesmo pode ser observado em outros trabalhos que utilizaram a técnica de RAPD para a análise da variabilidade genética (SILVA et al., 2010; PIRES et al., 2015).

Gao et al. (2010), ao empregar os mesmos *primers* (PS1, PS2, PS3, PS4 e PS5) utilizados neste estudo para avaliar a estrutura da comunidade microbiana em amostras de solo, concluíram que a técnica de RAPD e outros bioindicadores utilizados para avaliar a comunidade microbiana como a taxa de respiração basal e atividade enzimática, em conjunto, tornam-se importantes métodos para a avaliação da qualidade do solo.

Além disso, outros *primers* podem ser utilizados para análise tanto da diversidade quanto da similaridade microbiana do solo, o que pode ser observado em outros trabalhos realizados empregando a técnica de RAPD (DHIEF et al., 2011; MARTINS et al., 2014; PARVIN et al., 2016). Do mesmo modo, além da técnica de RAPD, outros métodos podem ser utilizados para a análise da diversidade genética em amostras de solo, como a técnica de DGGE, ARDRA, T-RFLP, RISA, e SSCP, as quais permitem obter um perfil da comunidade microbiana (BRESOLIN et al., 2010).

Diante dos resultados obtidos, o uso da diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo vem avançando muito. Isso porque tem se tornado consenso que a diversidade microbiana possui importantes vantagens como indicador de qualidade do solo, além da importância como nicho ambiental para outros organismos do solo (ABURJAILE et al., 2011).

4.4 CONCLUSÕES

O sistema plantio direto não escarificado proporcionou um incremento no conteúdo de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, na ordem sucessão < rotação I < Rotação II.

Todas as enzimas avaliadas (urease, fosfatase ácida e FDA) apresentaram incremento na atividade enzimática no período do verão, o que demonstra que essas enzimas possuem suas atividades influenciadas pela temperatura.

A taxa de respiração basal do solo foi um bom indicador para demonstrar as alterações na atividade da microbiota nos diferentes sistemas de manejo avaliados.

A técnica de RAPD mostrou-se eficiente na detecção da variabilidade genética entre os tratamentos e gerou um perfil de marcadores genéticos que podem ser utilizados em posteriores trabalhos para avaliar a diversidade genética em solos agrícolas.

O plantio direto não escarificado associado à rotação de culturas contribui para um aumento nos valores de biomassa microbiana, atividade enzimática e estoque de C no solo. Estes bioindicadores associados com a técnica de RAPD tornam-se importantes ferramentas para o monitoramento e avaliação da qualidade, atividade e diversidade biológica do solo no Sul do Brasil.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURJAILE, S.B.; SILVA, M.P.; BATISTA, E.A.F.S.; BARBOSA, L.P.J.L.; BARBOSA, F.H.F. (2011) - Pesquisa e caracterização da diversidade microbológica do solo, na região de São José Do Buriti – MG, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa (cerrado) por plantações de eucalipto. *Ciência Equatorial*, vol. 1, p. 69-81.

ALVES, T.S.; CAMPOS, L.L.; NETO, N.E.; MATSUOKA, M.; LOUREIRO, M.F. (2011) - Biomassa e atividade microbiana de solo sob vegetação nativa e diferentes sistemas de manejo. *Acta Scientiarum. Agronomy*, vol. 33, p. 341-347.

AMADO, T.J.C.; BAYER, C.; ELTZ, F.L.F.; BRUM, A.C.R. (2001) - Potencial de culturas de cobertura em acumular carbono e nitrogênio no solo no plantio direto e a melhoria da qualidade ambiental. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 25, p. 189-197.

ASSIS, R.L.; LANÇAS, K.P. (2010) - Agregação de um nitossolo vermelho distroférico sob sistemas de plantio direto, preparo convencional e mata nativa. *Revista Engenharia Agrícola*, vol.30, p.58-66.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L. MIELCICZUK, J.; PAVINATO, A.; DIECKOW, J. (2006) - Carbon sequestration in two Brazilian Cerrado soils under no-till. *Soil Tillage Research*, vol. 86, p. 237-245.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J. (2008) - Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. (Eds.) *Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2ª Ed. Porto Alegre: Metrópole, 654p.

BRESOLIN, J.D.; BUSTAMANTE, M.M.C.; KRÜGER, R.H.; SILVA, M.R.S.S.; PEREZ, K.S. (2010) - Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 40, p. 391-403.

CONTE, E.; ANGHINONI, I.; RHEINHEIMER, D.S. (2002) - Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida após aplicação de fosfato em solo no sistema plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 26, p. 925-930.

CONTI, M.E.; PALMA, R.M.; ARRIGO, N.M.; ZOURARAKIS, D.P.; CAPPELLETTI, C.A. (1998) - Long-term rotation effect of soybean with no-till maize on soil N availability indices and microbial activity in the Argentine Pampa. *Soil and Tillage Research*, vol. 49, p. 267-270.

CORREA, M.L.P.; GALVÃO, J.C.C.; FONTANETTI, A.; MIRANDA G.V.M.; SANTOS, M.M. (2009) - Atividade Microbiana Enzimática (FDA) como Indicador Microbiológico da Qualidade de Solos em Sistemas de Plantio Direto de Milho Orgânico e Convencional. *Revista Brasileira de Agroecologia*, vol. 4, p. 1450-1454.

COSTA, E.M.; SILVA, H.F.; RIBEIRO, P.R.A. (2013) - Matéria orgânica do solo e seu papel na manutenção e produtividade dos sistemas agrícolas. *Enciclopédia Biosfera*, vol. 9, p. 1842-1860.

DADALTO, J.P.; FERNANDES, H.C.; TEIXEIRA, M.M.; CECON, P.R.; MATOS, A.T. (2015) - Sistema de preparo do solo e sua influência na atividade microbiana. *Journal of the Brazilian Association of Agriculture Engineering*, vol. 35, p. 506-513.

DHIEF, A.; GUASMI, F.; TRIKI, T.; MOHAMED, N.; ASCHI-SMITI, S. (2011) - Natural genetic variation in *Calligonum* tunisian genus analyzed by RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, p. 9766-9778.

DICK, R.P.; BREACKWELL, D.P.; TURCO, R.F. (1996) - Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: Doran, J.W.; Jones, A.J. eds. *Methods for assessing soil quality*. Madison: SSSA, p.247-241.

EEKEREN, N.V.; BOMMELÉ, L.; BLOEM, J.; SCHOUTEN, T.; RUTGERS, M.; GOEDE, R.; REHEUL, D.; BRUSSAARD, L. (2008) - Soil biological quality after 36 years of ley-arable cropping, permanent grassland and permanent arable cropping. *Applied Soil Ecology*, vol. 40, p. 432-446.

ELLIOT, E.T. (1986) - Aggregate structure and carbon, nitrogen and phosphorus in natives and cultivated soils. *Soil Science Society of America Journal*, vol. 50, p. 627-633.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (2013) - Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2.ed. Brasília: Embrapa. 306 p.

FERREIRA DF (2000) - Sistemas de análise estatística para dados balanceados. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 145p.

GAO, Y.; MAO, L.; MIAO, C.Y.; ZHOU, P.; CAO, J.J.; ZHI, Y.E.; SHJ, W.J. (2010) - Spatial characteristics of soil enzyme activities and microbial community structure under different land uses in Chongming Island, China: Geostatistical modelling and PCR-RAPD method. *Science of the Total Environment*, vol. 408, p. 3251-3260.

GIACOMINI, S.J.; RECOUS, S.; MARY, B.; AITA, C. (2007) - Simulating the effects of N availability, straw particle size and location in soil on C and N mineralization. *Plant Soil*, vol. 301, p. 289-301.

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

HADAS, A.; KAUTSKY, L.; GOEK, M.; KARA, E.E. (2004) - Rates of decomposition of plants residues and available nitrogen in soil, related to residue composition through simulation of carbon and nitrogen turnover. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 36, p. 255-266.

HARRY, M.; JUSSEAUME N.; GAMBIER, B.; GARNIER-SILLAM, E. (2001) – Use of RAPD markers for the study of microbial community similarity from termite mounds and tropical soils. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 33, p. 471-427.

JOSÉ, J.B.S.; RIEFF, G.G.; SÁ, E.L.S. (2013) - Edaphic mesofauna and microbial activity in different soil management systems in the culture of tobacco. *Current Agricultural Science and Technology*, vol. 19, p. 56-66.

LANNA, A.C.; SILVEIRA, P.M.; SILVA, M.B.; FERRARESI, T.M.; KLIEMANN, H.J. (2010) - Atividade de urease no solo com feijoeiro influenciada pela cobertura vegetal e sistemas de plantio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 34, p. 1933-1939.

LISBOA, B.B.; VARGAS, L.K.; ABICHEQUER, A.D.; CAMARGO, F.A.O.; SELBACH, P.A. (2012a) - Biomassa microbiana, atividade e diversidade metabólica em um Argissolosob diferentes manejos. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, vol. 18, p. 175-192.

LISBOA, B.B.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, A.O.; MARTINS, A.F.; SELBACH, P.A. (2012b) - Indicadores Microbianos de Qualidade do Solo em Diferentes Sistemas de Manejo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 36, p. 45-55.

LONDERO, A. L. (2015) - Perdas de água e sedimento de bacias pareadas de ordem zero sob plantio direto com e sem terraço. 156 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

LOURENTE, E.R.P.; MERCANTE, F.M.; MARCHETTI, M.E.; SOUZA, L.C.F.; SOUZA, C.M.A.; GONÇALVES, M.C.; SILVA, M.A.G. (2010) - Rotação de culturas e relações com atributos químicos e microbiológicos do solo e produtividade do milho. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 31, p. 829-842.

LUPWAYI, N.Z.; CLAYTON, G.W.; O'DONOVAN, J.T., HARKER, K.N., TURKINGTON, T.K., RICE, W.A. (2004) - Decomposition of crops residues under conventional and zero tillage. *Canadian Journal of Soil Science*, vol. 84, p. 403-410.

MAIA, S.M.F.; OGLE, S.M.; CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P. (2010) - Changes in soil organic carbon storage under different agricultural management systems in the Southwest Amazon Region of Brazil. *Soil & Tillage Research*, vol. 106, p. 177-188.

MANKOLO, R.; REDDY, C.; SENWO, Z.; NYAKATANA, E.; SAJJALA, S. (2012) - Soil Biochemical Changes Induced by Poultry Litter Application and Conservation Tillage under Cotton Production Systems. *Agronomy*, vol. 2, p. 187-198.

MARTINS, E.C.A.; PELUZIO, J.M.; COIMBRA, R.R.; SILVEIRA, M.A.; OLIVEIRA, J.D.D.; JUNIOR, W.P.O. (2014) - Genetic diversity in sweet potato in Tocantins. *Bioscience Journal*, vol. 30, p. 429-435.

MATSUOKA, M.; MENDES, I.C.; LOUREIRO, M.F. (2002) - Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos de Cerrado e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 24p.

MENDES, I.C.; SOUZA, L.V.; RESCK, D.V.S.; GOMES, A.C. (2003) - Propriedades biológicas em agregados de um latossolo vermelho-escuro sob plantio convencional e direto no cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 27, p. 435-443.

OLIVEIRA, J.G.R.; RALISCH, R.; GUIMARÃES, M.F.; BARBOSA, G.M.C.; FILHO, J.T. (2012) - Erosão no plantio direto: Perda de solo, água e nutrientes. *Boletim Geografia*, vol. 30, p. 91-98.

PARTON, W.J.; OJIMA, D.S.; SCHIMEL, D.S. (1996) - Models to evaluate soil organic matter storage and dynamics. In: CARTER, M.R.; STEWART, B.A. (Eds.) Structure and Organic Matter Storage in Soils, Lewis Publ., CRC Press, Boca Raton, FL, p. 421-448.

PARVIN, N.; BILKISS, M.; NAHAR, J.; SIDDIQUA, M.K.; MEAH, M.B. (2016) - RAPD analysis of *Sclerotium rolfsii* isolates causing collar rot of eggplant and tomato. International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology, vol. 6, p. 47-57.

PAVEL, A.B.; VASILE, C.I. (2012) - PyElph-A software tool for gel analysis and phylogenetics. BMC Bioinformatics, vol. 13, p. 1-6.

PIRES, M.V.V.; FALEIRO, F.G.; SILVA, J.C.S.; MELO, J.T.; PEIXOTO, J.R. (2015) - Morphological characteristics and genetic variability of araticum using rapd and microsatellites markers. Revista Brasileira de Fruticultura, vol. 37, p. 149-158.

REICOSKY, D.C. (1997) - Tillage-induced CO₂ emissions from soil. Nutrient Cycling in Agroecosystems, vol. 49, p. 273-285.

REICOSKY, D.C.; KEMPER, W.D.; LANGDALE, G.W.; DOUGLAS JR., C. L.; RASMUSSEN, P.E. (1995) - Soil organic matter changes resulting from tillage and biomass production. Journal of Soil and Water Conservation, vol. 50, p. 253-261.

ROLDÁN, A.; SALINAS-GARCIA, J.R.; ALGUACIL, M.M.; DÍAZ, E.; CARAVACA, F. (2005) - Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions. Geoderma, vol. 129, p. 178-185.

SILVA, A.S.; SILVA-MANN, R.; CARVALHO, S.V.A. (2010) - Diversidade genética e seleção por marcadores moleculares RAPD em populações de alface. Scientia Plena, vol. 6, p. 1-9.

SILVA, M.; SIQUEIRA, E.R.; COSTA, J.L.S. (2004) - Hidrólise de diacetato de fluoresceína como bioindicador da atividade microbológica de um solo submetido a reflorestamento. Revista Ciência Rural, vol. 34, p. 1493-1496.

SILVA, R.G.; PINHATI, F.R.; SILVA, J.T. (2015) - Análise da variabilidade genética por RAPD de linhagens isoladas de solo e lodo impactados com efluente industrial. Revista da Biologia, vol. 14, p. 1-5.

SILVEIRA, A.O. (2007) - Atividades enzimáticas como indicadores biológicos da qualidade de solos agrícolas do Rio Grande do Sul. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.

SILVEIRA, R.B.; MELLONI, R.; MELLONI, E.G.P. (2006) - Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, em Itajubá/MG. Cerne, vol. 12, p. 48-55.

SINGH, Y.; SIDHU, H.S. (2014) - Management of Cereal Crop Residues of Sustainable Rice-Wheat Production System in the Indo – Gangetic Plains of India. Proceedings of the Indian National Science Academy, vol. 80, p. 95 – 114.

STOTZKY, G. (1965) - Microbial respiration. In: BLACK, C.A., ed. Methods of soil analysis. American Society of Agronomy, vol. 2, p. 1550-1570.

SULEIMAN, A.K.A.; LUPATINI, M.; BOLDO, J.T.; PEREIRA, M.G.; ROESCH, L.F.W. (2013) - Shifts in soil bacterial community after eight years of land-use change. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 36, p. 137-144.

TEDESCO, M.J., GIANELLO, C., BISSANI, C.A, BOHNEN, H., VOLKWEISS, S.J. (1995) - Análises de solo, planta e outros materiais. 2ed. (Boletim técnico, 5), Porto Alegre: UFRGS.

TIAN, G.; KANG, B.T.; BRUSSARD, B.L. (1993) - Mulching effect of plant residues with chemically contrasting compositions on maize growth and nutrients accumulation. *Plant and Soil*, vol.153, p.179-187.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. (1987) - An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 19, p.703-707.

VERCHOT, L.V. & BORELLI, T. (2005) - Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in degraded tropical soils. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 37, p.625-633.

ZATORRE, N.P.; ALMEIDA, R.F.; FRANCHINI, J.C.; CHAER, G.M.; BODDEY, R.M.; JANTALIA, C.P. (2011) - Influência dos sistemas agrícolas na atividade enzimática do solo. *Embrapa Agrobiologia*, 60p.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema plantio direto não escarificado em ambos os períodos de coleta (verão e inverno), independente da rotação de cultura empregada favorece o conteúdo de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana. Sendo que, quanto mais complexa a rotação de cultura adotada, maior o valor de carbono da biomassa microbiana obtido.

O solo manejado em sistema sob plantio direto proporciona maior atividade da enzima urease em ambos os períodos de coletas. Todas as enzimas avaliadas (urease, fosfatase ácida e FDA) apresentam incremento na atividade enzimática no período do verão, o que demonstra que essas enzimas possuem suas atividades influenciadas pela temperatura.

A taxa de respiração basal do solo foi indicador adequado para demonstrar as alterações na atividade da microbiota nos diferentes sistemas de manejo avaliados. Sendo possível observar aumento nos estoques de carbono em solos sob plantio direto quando comparado ao plantio convencional (maiores emissões).

A técnica de RAPD mostrou-se eficiente na detecção da variabilidade genética entre os tratamentos e gerou um perfil de marcadores genéticos que podem ser utilizados em posteriores trabalhos para avaliar a diversidade genética em solos agrícolas.

O plantio direto não escarificado associado à rotação de culturas e manutenção do solo constantemente coberto contribui para um aumento nos valores de biomassa microbiana, atividade enzimática e estoque de C no solo. Estes bioindicadores associados com a técnica de RAPD tornam-se importantes ferramentas para o monitoramento e avaliação da qualidade, atividade e diversidade biológica do solo.