

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA

PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS COMO INDICADORES DE QUALIDADE
DO SOLO EM SISTEMAS DE MANEJO

BRUNO BRITO LISBOA
ENGENHEIRO AGRÔNOMO (UFRGS)

Dissertação apresentada como um
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Março de 2009

À minha esposa Ane e meu filho Guilherme
pelo incentivo e compreensão nos
momentos de dificuldade.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Pedro Alberto Selbach pela orientação tranqüila e dedicada.

Ao colega da FEPAGRO, Luciano Kayser Vargas pelas constantes sugestões, troca de idéias e pela camaradagem.

À colega Andressa de Oliveira Silveira pelos fundamentais ensinamentos em enzimologia do solo.

À minha família pelo apoio e pela valorização de meu esforço.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Solos pelo auxílio e amizade.

Aos colegas e estagiários do Laboratório de Fitopatologia e Ecologia Microbiana da FEPAGRO pela colaboração e amizade.

À FEPAGRO por oportunizar minha qualificação como pesquisador.

Ao PRONEX/CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS COMO INDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO EM SISTEMAS DE MANEJO¹

Autor: Bruno Brito Lisboa

Orientador: Prof. Pedro Alberto Selbach

RESUMO

A atividade agrícola, mediante sistemas de manejo de solo, pode alterar a capacidade produtiva do solo. Este fato leva à necessidade da utilização de mecanismos para avaliar o impacto gerado por uma determinada prática. Porém, diferentemente de ar e água, ainda não existem indicadores definitivos de qualidade para o solo. Este trabalho analisou diferentes parâmetros microbiológicos para avaliar a qualidade do solo submetido a diferentes sistemas de preparo e de culturas, em relação a um sistema referência. Os parâmetros analisados foram a atividade das enzimas β -glucosidase, urease, fosfatase ácida e arilsulfatase, juntamente com determinação da atividade respiratória, biomassa e diversidade funcional da microbiota do solo. Os sistemas de manejo avaliados foram os preparos de solo direto (PD) e convencional (PC) e os sistemas de culturas rotação, sucessão e pousio. Além destes sistemas, foi avaliado também o campo nativo (CN), este considerado como condição original do solo para a realização de comparações entre os diferentes manejos. Os resultados das análises de atividade enzimática, bem como as determinações da biomassa e respiração microbiana, indicaram que o PC gerou valores inferiores aos demais sistemas, enquanto o CN e o PD tenderam a apresentar resultados semelhantes, indicando a capacidade do PD em manter a qualidade original do solo. Por outro lado, os sistemas de culturas avaliados não apresentaram diferenças nestas avaliações. A determinação da diversidade funcional diferenciou os sistemas, indicando que os sistemas que favorecem o acúmulo de carbono foram mais semelhantes ao sistema referencial.

¹ Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. (77p.), março, 2009.

MICROBIOLOGICAL PARAMETERS AS SOIL QUALITY INDICATORS IN MANAGEMENT SYSTEMS²

Author: Bruno Brito Lisboa

Adviser: Prof. Pedro Alberto Selbach

ABSTRACT

Agricultural activity, through different soil management practices, may cause impacts in soil productive capacity. This leads to the necessity of impact evaluation derived from a given soil management practice. However, in contrast to air and water, there are no definitive established indicators to soil quality. In this research, different microbiological parameters were evaluated in order to access soil quality as affected by tillage practices and crop systems, in comparison to a natural reference system. The evaluated parameters were the activities of β -glucosidase, urease, acid phosphatase and arylsulphatase, along with the determination of soil microbial respiratory activity, microbial biomass and microbial functional diversity. The evaluated managements were conventional tillage (CT) and no-tillage (NT) and, as crop systems, crop rotation, crop succession and fallow. Besides those systems, natural pasture (NP) was also evaluated, being considered as the original soil condition that was compared to the other management systems. The results of the analyses of enzymatic activities, as well as the determinations of microbial biomass and respiratory activity, indicated that CT presented values inferior to the other systems, while NP and NT trended to show similar results, indicating that NT may keep original soil quality. On other hand, as a rule, crop systems did not differ. The determination of microbial functional diversity distinguished the treatments, indicating that systems that favored carbon accumulation were more similar to the natural reference system.

² Master of Science dissertation in Soil Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (77 p.), March, 2009.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Qualidade do solo.....	3
2.2 Indicadores Bioquímicos.....	7
2.2.1 Biomassa microbiana.....	7
2.2.2 Atividade respiratória.....	9
2.2.3 Atividade enzimática.....	10
2.2.4 Diversidade funcional.....	14
2.2.5. Sistemas de Preparo do solo e de Culturas.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Localização e caracterização da área experimental.....	19
3.2 Tratamentos e amostragens.....	20
3.3 Preparo da amostras.....	21
3.4 Avaliações.....	22
3.4.1 Biomassa Microbiana.....	22
3.4.2 Atividade respiratória.....	23
3.4.3 Atividade enzimática.....	23
3.4.3.1 Atividade de β -glucosidase.....	24
3.4.3.2 Atividade da fosfatase ácida.....	25
3.4.3.3 Atividade da arilsulfatase.....	25
3.4.3.4 Atividade da urease.....	25
3.4.4 Diversidade funcional.....	27
3.4.5 Índice integralizador dos indicadores.....	28

3.5 Análises estatísticas.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Biomassa Microbiana.....	30
4.2 Atividade respiratória.....	34
4.3 Atividade enzimática.....	39
4.3.1 Atividade de β -glucosidase.....	39
4.3.2 Atividade da fosfatase ácida.....	42
4.3.3 Atividade da arilsulfatase.....	47
4.3.4 Atividade da urease.....	51
4.4 Índice integralizador dos parâmetros.....	55
4.5 Diversidade funcional.....	57
5. CONCLUSÕES.....	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
7. APÊNDICES.....	72

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
01. Sistemas de culturas empregados durante quatro ciclos de cultivo	20
02. Médias dos grupos avaliados nos contrastes ortogonais para valores de biomassa microbiana do solo (mgC g de solo ⁻¹) (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	31
03. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da biomassa microbiana do solo (PD = plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	31
04. Médias dos grupos avaliados nos contrastes ortogonais para valores de atividade respiratória da microbiana do solo (mgC g de solo ⁻¹) (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc. = sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	35
05. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da atividade respiratória da microbiota do solo (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	36
06. Médias dos grupos avaliados nos contrastes ortogonais para valores de atividade da enzima β -glucosidase (mg pNF kg solo ⁻¹ h ⁻¹) (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	40
07. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da atividade da enzima β -glucosidase (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	40
08. Médias dos grupos avaliados nos contrastes ortogonais para valores de atividade da enzima fosfatase ácida (mg pNF kg solo ⁻¹ h ⁻¹) (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	43
09. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da atividade da enzima fosfatase ácida (PD= plantio direto,	

PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	43
10. Médias dos grupos avaliados nos contrastes ortogonais para valores de atividade da enzima arilsulfatase ($\text{mg pNF kg solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	47
11. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da atividade da enzima arilsulfatase (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	48
12. Médias dos grupos avaliados nos contrastes ortogonais para valores de atividade da enzima urease ($\text{mg N-NH}_4 \text{ kg solo}^{-1} \text{ 2h}^{-1}$) (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	52
13. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da atividade da enzima urease (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	53
14. Índice integralizador dos parâmetros microbiológicos nos sistemas de manejo nas quatro épocas de amostragem (PD= plantio direto, CV= preparo convencional e CN= campo nativo).....	56
15. Índice de diversidade de Shannon para diversidade funcional da comunidade microbiana do solo em diferentes sistemas de manejo ((PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).....	58

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

01. Componente principal relacionando os manejos com padrão de utilização de fontes de carbono (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo)..... 59

1. INTRODUÇÃO

Atualmente existe o consenso de que a produção e a produtividade dos agroecossistemas devem ser sustentáveis no tempo. E dentro deste contexto, o manejo dos solos agrícolas é uma parte fundamental para o alcance deste objetivo. Em função disto, várias estratégias têm sido desenvolvidas para a conservação da capacidade produtiva dos solos, como o emprego de preparos conservacionistas, como o Plantio Direto, bem como o emprego de sistemas de culturas baseados na diversidade de espécies cultivadas, como por exemplo, a rotação de culturas.

Em solos de regiões tropicais e subtropicais, o principal impacto da atividade agrícola nos solos é a perda do conteúdo de carbono orgânico nos mesmos. Este fato afeta diretamente a capacidade produtiva dos solos, através de problemas como aumento de densidade, diminuição da capacidade de troca de cátions, redução da capacidade de retenção de água e da disponibilidade de nutrientes, entre outros. Sob este ponto de vista, o comportamento da matéria orgânica do solo sob um determinado sistema de manejo, poderia ser utilizado como uma ferramenta para determinar a qualidade dos solos. Porém, o período de tempo para que os efeitos negativos de um determinado manejo sejam percebidos através da observação da redução dos teores de carbono orgânico do solo, somente tornam-se perceptíveis anos após do emprego da prática. Sendo assim, a matéria orgânica do solo deixa de ser um parâmetro de qualidade do solo para tornar-se o problema a ser resolvido.

A busca por indicadores definitivos de qualidade do solo é uma tarefa difícil, diferentemente da água e do ar, para os quais já existem há muito

tempo. Este fato se dá devido à existência de uma grande diversidade de solos, os quais variam naturalmente quanto a características físicas, químicas e biológicas. Esta diversidade dificulta a determinação de parâmetros simples para a realização de comparações.

É consenso na literatura que parâmetros biológicos e bioquímicos são capazes de refletir os impactos resultantes da utilização de práticas agrícolas em agroecossistemas, tendo em vista que a microbiota do solo desempenha papéis-chave em diversos processos no solo, principalmente na dinâmica da matéria orgânica do solo. Estes indicadores, além de possuírem sensibilidade às perturbações, também respondem de forma rápida, o que, em termos de avaliação de sistemas de manejo do solo, é uma importante vantagem.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar parâmetros bioquímicos como potenciais indicadores de qualidade de solo submetido a diferentes preparos de solo e sistemas de culturas, comparando-os com um sistema natural utilizado como referencial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Qualidade do solo

A atividade agrícola é a principal causa da degradação dos solos no mundo (Dick, 1992), sendo que este recurso fundamental, não possui ainda indicadores definitivos de qualidade (Bezdicek, 1996). A conceituação para qualidade do solo surgiu em meados da década de 90 com propostas como da Sociedade Americana de Ciência do Solo, através de seu comitê *Ad Hoc* de qualidade do solo, que a definiu como “a capacidade de uma determinada classe de solo, dentro de um ambiente natural ou manejado, em manter a produtividade, sustentar a qualidade do ar e da água e promover a saúde do seres humanos, animais e plantas” (Janvier et al., 2007). De forma semelhante, para Doran (1997), qualidade do solo, dentro de um agroecossistema, abrange atributos físicos, químicos, biológicos e também produtivos, podendo ser definida como a manutenção da capacidade de produção biológica do solo, sustentando a qualidade ambiental e promovendo a saúde vegetal e animal.

Este caráter múltiplo do conceito de qualidade do solo aumenta a complexidade de sua determinação, pois todos estes aspectos devem ser levados em conta, podendo ser avaliados por vários indicadores. Segundo Zilli et al. (2003), um indicador de qualidade do solo deve ter as seguintes características:

- Ser capaz de responder, de forma rápida e acurada, a um distúrbio no solo.
- Refletir os aspectos do funcionamento do ecossistema.
- Possuir processo de avaliação.

- Ser economicamente viável.

A matéria orgânica (MO) constitui-se em um importante indicador da condição do solo. Ela interage nos aspectos físicos, biológicos e químicos do solo, principalmente no que se refere a fatores como estabilidade de agregados e estrutura, infiltração e retenção de água, resistência à erosão, disponibilidade de nutrientes para os vegetais, atividade microbiana, capacidade de troca de cátions (CTC), lixiviação de nutrientes e liberação de CO₂ e outros gases para a atmosfera (Mielniczuk, 1999; Reeves, 1997). Além disso, a MO é altamente responsiva ao manejo do solo, principalmente a sistemas de preparo de solo. Neste caso, a perda do carbono orgânico do solo é acentuada com o emprego de sistemas que utilizam elevado grau de revolvimento do solo, por atuarem diretamente sobre fatores como aeração, ruptura de agregados e fracionamento e incorporação de resíduos ao solo, o que, por consequência, aumenta a atividade microbiana sobre a MO (Bayer & Mielniczuk, 1997).

Por outro lado, a resposta da MO em função de práticas de manejo poderá ser identificada somente depois de anos após o emprego periódico das mesmas, de maneira que, se a perturbação for pontual, dificilmente a MO poderá ser utilizada como um indicador dos impactos promovidos (Powlson & Brookes, 1987). Provavelmente, quando alterações na MO são diagnosticadas, ela deixaria de ser um indicador para se tornar o problema a ser resolvido. Desta forma, é necessário obter-se indicadores que possuam a mesma rede de inter-relações da MO, mas com uma maior velocidade de resposta às perturbações impostas aos solos pelos sistemas agrícolas.

Dentre os indicadores de qualidade de solo alternativos à MO, os microbiológicos merecem especial atenção. Segundo Dick et al. (1996), o componente microbiológico do solo é o centro de inúmeros processos e funções, como a decomposição de resíduos, ciclagem de nutrientes, síntese de substâncias húmicas, agregação e degradação de compostos xenobióticos. De acordo com Friedel et al. (1996), a disponibilidade de nutrientes e a produtividade dos agroecossistemas dependem diretamente do tamanho e da atividade da biomassa microbiana do solo.

Carter (1986) observou que a análise do carbono e do nitrogênio da biomassa microbiana do solo para indicar as modificações promovidas por operações de preparo de solo foi mais sensível do que avaliações de carbono e nitrogênio total. De forma semelhante, Vargas (2003), comparando os sistemas de preparo direto e convencional, verificou que a determinação da biomassa microbiana foi mais eficiente para avaliar os efeitos provocados pelos dois sistemas do que o carbono orgânico do solo.

Segundo Angers et al. (1993), indicadores microbiológicos constituem-se em importantes ferramentas para a determinação da qualidade do solo, tendo em vista que os microrganismos desempenham papéis-chave em atributos como a ciclagem de nutrientes e na agregação do solo, além de outros, como a supressão de patógenos (Van Elsas et al., 2002). Conforme Avidano (2005), a análise da resposta de microrganismos a diferentes práticas culturais é fundamental, pois estes respondem rapidamente a mudanças ambientais, constituindo-se em bons bioindicadores de qualidade do solo. Os parâmetros bioquímicos, como atividade de enzimas, possuem elevado potencial para a avaliação da qualidade do solo em sistemas agrícolas,

também por apresentar alta sensibilidade, permitindo avaliações logo após a ocorrência das perturbações no solo (Gil-Sotres et al., 2005).

Estes parâmetros de qualidade de solo são susceptíveis a variações de acordo com as práticas de manejo adotadas, indicando que o sistema pode estar evoluindo para um aumento ou redução da qualidade do solo. Sistemas de preparo e de culturas determinam modificações nas condições originais do solo, através de sua mobilização, repercutindo sobre a agregação, diferenciação no aporte de material orgânico, em termos quantitativos e qualitativos, determinados pelas espécies empregadas bem como a disposição do material no perfil do solo. Todo este conjunto de alterações tem reflexos sobre a microbiota do solo e, portanto, sobre a atividade dos microrganismos e, conseqüentemente, na qualidade do solo como um todo (Vargas & Scholles, 2000).

Segundo Acton & Padbury (1993), deve haver um número mínimo de parâmetros de qualidade do solo para a formação de um índice geral, de maneira que, quando inter-relacionados, forneçam um valor numérico que indique a capacidade de um solo desenvolver uma ou mais funções. Usualmente, o referencial para a estimação da qualidade de solos, através do uso destes parâmetros, é o emprego de um solo sob vegetação nativa ou clímax, o qual representa a condição original do solo, permitindo eliminar variações regionais, além de não tornar necessária a criação do conceito do “solo ideal” (Gil-Sotres et al, 2005).

2.2. Indicadores Bioquímicos

2.2.1 Biomassa Microbiana

A biomassa microbiana do solo (BM) é conceituada como o componente vivo da matéria orgânica do solo, excetuando-se animais e raízes de plantas, sendo entendida como a percussora de frações mais estáveis da mesma (Parton et al., 1987). Ela atua em processos de transformação e imobilização de nutrientes no solo, através da mineralização da matéria orgânica e na produção de mais biomassa microbiana. Segundo Carter (1986), a biomassa do solo é mais afetada pelo sistema de manejo do que o carbono total, o que torna esta determinação microbiológica mais eficiente para indicar as modificações causadas no solo. Conforme Carter (1991), o aumento da BM em relação à porcentagem de MO do solo indica de forma antecipada a elevação do acúmulo de carbono orgânico do solo, demonstrando ser este parâmetro intimamente ligado à MO.

A determinação da biomassa microbiana é uma avaliação clássica na microbiologia do solo, sendo que a primeira metodologia foi sugerida por Jenkinson (1966) e apresentada em sua forma mais reconhecida por Jenkinson & Powlson (1976). O princípio da análise é baseado na fumigação do solo com o objetivo de eliminar a microbiota da amostra, para que esta sirva como substrato no qual os microrganismos do solo, quando reinoculados, a utilizem como fonte de carbono, juntamente com a MO do solo potencialmente degradável, emitindo CO₂ no processo respiratório. A amostra fumigada é comparada com a não fumigada, de maneira que a diferença entre as duas é proporcional ao carbono da comunidade microbiana do solo.

Este método baseia-se nos pressupostos de que a fumigação elimina a biomassa sem afetar a matéria orgânica do solo, de que a quantidade de microrganismos mortos na amostra não fumigada é irrelevante em relação à amostra fumigada e de que a fração do carbono mineralizado da biomassa morta em um período de tempo possui a mesma resposta para solos distintos (Jenkinson & Ladd, 1981). Segundo Polwson (1994), esta metodologia foi pioneira na abordagem holística da microbiologia do solo, diferentemente do que era feito até 1976. Até então, isolava-se um organismo do solo e buscava-se conhecer por qual processo bioquímico ele era responsável. A determinação da biomassa do solo para um determinado propósito, avalia a comunidade microbiana como um todo, constituindo-se num parâmetro integrativo de qualidade do solo.

Esta análise mostrou-se eficiente para evidenciar diferenças entre diversos usos do solo, em trabalho de Rangel & Silva (2007), que, utilizando o sistema pastagem nativa como referencial, demonstraram que os sistemas que utilizavam maior intensidade de movimentação de solo, obtiveram os menores valores de BM. De forma semelhante, Vargas & Scholles (2000), avaliando os preparos de solo plantio direto, convencional e reduzido, observaram que os maiores valores de BM estavam ligados aos maiores teores de carbono do solo. Na mesma direção, Roldán et al. (2003), avaliando sistemas de preparo de solo juntamente com diferentes níveis de cobertura do solo com resíduos vegetais, observaram que a BM foi superior nos tratamentos que não revolviam o solo, e, dentro destes, aquele que permitiu a cobertura de 100% do solo foi o que obteve o maior valor. Além das questões de revolvimento do solo e

cobertura morta, a quantidade de resíduo aplicado ao solo é determinante para o aumento da BM, como é demonstrado em trabalho de Albiach et al. (2000).

Estes resultados demonstram o potencial da avaliação da BM como indicadora da qualidade do solo, tendo em vista a sensibilidade para determinar o impacto de diferentes sistemas de manejo do solo, bem como a alta correlação com o carbono orgânico do solo.

2.2.2 Atividade respiratória

A atividade respiratória da microbiota do solo, analisada pela emissão de CO₂, representa a oxidação da matéria orgânica pelos microrganismos de metabolismo aeróbio. A determinação da emissão de dióxido de carbono segue o mesmo princípio da análise da biomassa, através da captura deste gás em solução de NaOH, com posterior titulação (Atlas & Bartha, 1998). Esta análise é um importante complemento para a determinação da BM, tendo em vista que ela informa o quanto está ativa a comunidade microbiana do solo para uma determinada biomassa. O método tem sido utilizado há muito tempo para estudar a atividade microbiana no solo (Lundegaardh, 1927), pois, além de apresentar bons resultados, é de execução simples e de baixo custo.

A emissão de CO₂ pela microbiota do solo é um método sensível para identificar modificações na comunidade microbiana do solo promovidas por sistemas de manejo. Em trabalho de Franzluebbbers et al. (1998), foi observado que o campo nativo proporcionou uma maior evolução de CO₂ em relação ao plantio direto, sendo que este sistema apresentou atividade respiratória superior ao preparo convencional do solo. Segundo os autores,

estes resultados devem-se ao comportamento diferenciado de cada sistema em relação à ciclagem do carbono do solo, sendo que os manejos que favorecem um balanço positivo de MO no solo, como plantio direto e campo nativo, tendem a apresentar uma atividade microbiana mais elevada do que a observada no preparo convencional, o qual tem como característica a perda de carbono no tempo.

Em trabalho que avaliou parâmetros microbiológicos do solo, entre eles a atividade respiratória, envolvendo culturas perenes e anuais, Matsuoka et al. (2003) concluíram que a evolução do CO₂ emitido pela microbiota do solo é um indicador sensível para a avaliação da qualidade do solo. De forma semelhante, Trannin et al. (2007), trabalhando com adição de diferentes doses de biossólidos de origem industrial na cultura do milho, verificaram que esta técnica foi capaz de distinguir os diferentes tratamentos.

2.2.3 Atividade Enzimática

A decomposição de compostos orgânicos pela microbiota é mediada pela atividade de enzimas dos grupos das hidrolases e oxidoreduases, as quais catalisam reações de catabolismo de uma diversidade de compostos orgânicos complexos, que envolvem a maioria dos ciclos dos nutrientes (Paul & Clark, 1998). As enzimas ligam-se ao substrato, de forma específica e tridimensional, diminuindo a energia de ativação, tornando possível a reação ou então regulando a velocidade da mesma (Moreira & Siqueira, 2006).

A origem das enzimas com atividade no solo está ligada à comunidade microbiana, mas também podem ser oriundas de vegetais e animais, (Tabatabai, 1994). Estas substâncias são classificadas, em relação ao

local onde exercem sua atividade, como intra ou extracelulares. As enzimas intracelulares catalisam reações constitutivas no interior da célula microbiana, enquanto as extracelulares são programadas para atuarem fora da célula degradando substratos maiores e mais complexos, que não podem ser transportados para seu interior (Moreira & Siqueira, 2006). Estas moléculas permitem com que a comunidade microbiana do solo tenha acesso a nutrientes presentes na MO do solo.

As enzimas extracelulares do solo estabilizam-se adsorvidas nas superfícies externas e internas de argilominerais e podem estar complexadas em colóides com a matéria orgânica do solo. A argila e os ácidos húmicos são importantes para a estabilização das enzimas, em termos de resistência a estresses térmicos no solo (Lähdesmäki and Piispanen, 1992).

Em relação à avaliação da qualidade do solo, as determinações da atividade enzimática podem indicar a capacidade do solo em degradar ou transformar substratos, gerando dados indiretamente ligados à diversidade funcional (Dick et al, 1996). A atividade de enzimas no solo pode fornecer informações quanto a mudanças tanto como qualitativas na MO do solo, de forma que o aumento da atividade enzimática normalmente está ligado com a estabilização do carbono no solo (Bending et al.,2002).

Devido à sua baixa concentração no solo, as determinações são mensuradas em termos de atividade e não de quantidade. Sendo assim, a atividade é avaliada pela adição de uma concentração conhecida de um substrato que possui afinidade com uma determinada enzima, com a posterior quantificação do produto, em função de um período de incubação.

A atividade das enzimas está fortemente associada com a atividade microbiana do solo, e, portanto, influenciada por variações do ambiente, como temperatura, umidade e manejo. Segundo Mijangos et al. (2006), a atividade enzimática do solo, a qual controla a ciclagem dos nutrientes através dos processos de mineralização da MO, constitui-se num importante indicador de diversidade microbiológica do solo. Estes autores, trabalhando com avaliação da atividade das enzimas desidrogenase, β -glucosidase, arilsulfatase e fosfatase ácida, observaram que em sistema de preparo de solo em que não havia revolvimento, os valores da atividade destas enzimas foram superiores ao preparo com revolvimento de solo.

Bandick & Dick (1999), estudando a influência de práticas de manejo de solo sobre a atividade enzimática do solo, tendo como referencial uma área com cobertura permanente de pastagem, concluíram que os sistemas com intervenção antrópica apresentaram valores inferiores de atividade das enzimas testadas em relação ao referencial. Entretanto, nas áreas cultivadas, os sistemas que envolveram a utilização de plantas de cobertura do solo e adição de resíduos orgânicos, em comparação com os locais que não receberam aporte de MO, obtiveram valores superiores de atividade das enzimas.

Estes resultados demonstram o potencial das avaliações da atividade enzimática no solo como indicadores do impacto induzido por sistemas de manejo. Segundo Roldán et al. (2003), as atividades das enzimas do solo são um bom indicador da fertilidade, desde que elas estejam relacionadas com ciclos de nutrientes de importância às culturas agrícolas. Sendo assim, é necessário determinar as enzimas a serem analisadas, tendo em vista que uma

série delas (hidrolases) está ligada ao ciclo de elementos de grande importância no solo, como o nitrogênio, carbono, fósforo e enxofre.

Recentemente, estas enzimas hidrolíticas têm sido largamente utilizadas em estudos de avaliação da qualidade do solo, pela alta sensibilidade a perturbações no solo, custo relativamente baixo das análises e pela rapidez e simplicidade com que são executadas (Bandick & Dick, 1999; Dick et al., 1994; Kandeler & Eder, 1993; Matsuoka et al., 2003).

As enzimas do grupo das glucosidases são largamente encontradas na natureza, sendo importantes no ciclo do C, uma vez que os produtos obtidos pela ação destas enzimas são importantes fontes de energia para os microrganismos do solo (Dick et al, 1996). A enzima β -glucosidase catalisa a hidrólise de vários β -glucosídeos, sendo que sua determinação é muito utilizada para a avaliação da qualidade do solo, tendo em vista que esta enzima é muito sensível a práticas de manejo do solo (Gil-Sotres, 2005).

Por sua vez, a fosfatase ácida é responsável pela liberação do ânion PO_4 no processo de mineralização de ésteres e anidridos de ácido fosfórico, sendo, portanto, fundamentais no ciclo do fósforo no solo. Segundo Tabatabai (1994), a enzima fosfatase ácida também é produzida por vegetais, porém com maior participação da microbiota do solo, ao contrário da enzima fosfatase alcalina, sintetizada apenas por microrganismos. Contudo, a utilização da fosfatase alcalina é mais adequada para solos de pH elevado.

De forma semelhante, as enzimas do grupo da sulfatase desempenham o papel de liberar o SO_4^{2-} de ésteres de sulfato orgânicos, sendo que a enzima arilsulfatase é a que mais possui resultados de pesquisas (Deng & Tabatabai, 1997).

A urease é a enzima que catalisa a reação de hidrólise da uréia a CO_2 e NH_3^+ . A análise da atividade desta enzima no solo tem a capacidade de discriminar o efeito da adição de resíduos vegetais, esterco e fertilizantes químicos no solo (Dick et al., 1996). Porém, segundo Gill-Sotres (2005), o emprego apenas da atividade desta enzima para mensurar a qualidade do solo teria validade limitada, tendo em vista que o comportamento da mesma está fortemente ligado à prática de adubações minerais e orgânicas.

De forma geral, as atividades de enzimas do solo, como a β -glucosidase, urease e fosfatase, tornam-se reduzidas em sistemas cultivados em relação a referenciais como o campo nativo (Caravaca et al., 2002), de maneira que a determinação da atividade enzimática do solo tem mostrado possuir sensibilidade para indicar modificações promovidas por sistemas de manejo do solo em espaços de tempo relativamente curtos (Roldán et al, 2005).

2.2.4 Diversidade funcional

Diversidade funcional do solo é definida como a capacidade de uma comunidade microbiana em utilizar uma determinada gama de compostos orgânicos como fonte de carbono para a obtenção de energia e biomassa (Zak et al., 1994). Diferentemente da atividade enzimática, por exemplo, que indica o status do metabolismo microbiano *in situ*, a determinação da diversidade metabólica do solo reflete o potencial da porção culturável da microbiota do solo a responder a determinados substratos. Segundo Wardle & Giller (1996), a estrutura e funcionalidade da microbiota refletem as interações entre fatores bióticos (microrganismos) e abióticos (ambiente) do solo.

Até a década de 90, o método para a determinação da diversidade funcional do solo era baseado no isolamento de culturas bacterianas, e então estes organismos eram testados quanto à sua capacidade de degradar diferentes substratos, o que tinha o inconveniente de testar poucos organismos culturáveis do solo, não se constituindo em um bom indicador da comunidade microbiana (Bradley & Degens, 1998a; O'Donnell & Göres, 1999; Torsvik, et al., 1990). Um avanço para a avaliação da diversidade funcional do solo foi obtido com o surgimento das microplacas *BIOLOG* (Biolog inc.), nas quais se empregam diretamente diluições de amostras de solo, que após período de incubação, são avaliadas colorimetricamente através da reação de oxidação do substrato e a consequente redução do sal de tetrazólio, o que define a utilização ou não dos substratos contidos em cada poço da placa (Harch et al., 1997). Este método foi o primeiro a ser empregado para comparar a atividade de comunidades microbianas heterotróficas em diferentes habitats, como solo, água e rizosfera (Garland & Millsa, 1991).

As placas *BIOLOG-ECO* foram desenvolvidas especificamente para estudos de ecologia microbiana, em função da grande diversidade de fontes de carbono (Preston-Mafham et al., 2002), sendo que nove destas são substâncias que compõem exudatos vegetais (Campbell et al., 1997), ao contrário das microplacas *BIOLOG-GN* que tem como finalidade identificar espécies de isolados microbianos (Stefanowicz, 2006).

Conforme Garland (1996), o comportamento funcional da microbiota do solo é influenciado pela atividade rizosférica, a qual vai determinar a quantidade e composição dos exudatos disponibilizados para os microrganismos. A atividade da rizosfera é dependente da diversidade de

espécies vegetais introduzidas, bem como do manejo de solo em relação a sistemas de preparo.

A diversidade funcional pode ser determinada em termos de riqueza de substrato, e também pelo índice de diversidade de Shannon, como em trabalho de Li et al. (2007), que, a partir dos resultados da análise de placas *BIOLOG* com 96 fontes de carbono, identificaram alterações na diversidade funcional de solo cultivado com diferentes espécies agrícolas.

Não necessariamente a diversidade funcional está ligada à diversidade genética, tendo em vista que um determinado microrganismo do solo pode desempenhar mais de uma função, isto é, ocupar um nicho que antes de uma perturbação no solo era ocupado por outro. Esta capacidade é chamada de redundância, a qual está ligada à característica de resiliência, que é definida como o potencial de uma comunidade microbiana do solo em recuperar sua funcionalidade após a ocorrência de uma perturbação (Bradley & Degens, 1998b).

2.2.5. Sistemas de Preparo do solo e de Culturas

O tipo de manejo do solo aplicado em relação ao sistema de preparo para a realização da semeadura e de sua cobertura possui fundamental interferência nas propriedades físicas, químicas e biológicas (Carter, 1986), tendo em vista as variações promovidas na temperatura e umidade do solo, qualidade e disposição do resíduo vegetal aportado e atividade rizosférica (Cattelan & Vidor, 1990).

O preparo do solo é uma operação crítica nos sistemas de produção agrícola, principalmente no que se refere à produção de grãos, em função da

abrangência desta atividade, bem como o elevado grau de intensidade com que é praticada. O preparo convencional do solo é caracterizado pelo elevado revolvimento do solo promovido pela realização das operações de aração e gradagem do solo, que tem como objetivo a formação da chamada “cama de semeadura” através da pulverização do solo. Este sistema leva à incorporação total dos restos de culturas no solo de maneira homogênea no perfil do solo na camada arável. Outra consequência deste preparo é a manutenção do solo descoberto até que a cultura implantada desenvolva-se.

Já o sistema de preparo plantio direto identifica-se pela baixa intensidade de revolvimento do solo, não havendo a incorporação de restos culturais, o que leva à formação de cobertura vegetal morta em função da deposição da palha da cultura anterior sobre o solo. Este sistema, em comparação ao anterior, em função da menor perturbação do solo, favorece a formação de agregados, reduz as perdas de solo por erosão hídrica e também diminui a amplitude térmica do solo.

Enquanto o preparo convencional possui um padrão que leva a um balanço negativo no fluxo de carbono no solo, o sistema plantio direto, por permitir um aporte maior de carbono em função da necessidade de cobrir o solo e também por permitir uma taxa menor de decomposição da MO em função da maior proteção física no interior de agregados, leva ao aumento do conteúdo de carbono do solo com o passar do tempo (Alvarez, 1995; Bayer & Mielniczuk, 1997).

Além do preparo do solo, o emprego de sistema de culturas constitui-se numa importante estratégia para evitar as consequências negativas da agricultura baseada em monocultivos. A diversificação de espécies em grandes

áreas de produção de grãos dificilmente é alcançada, fato que leva a sucessão de culturas. Porém, é possível contar com a diversificação de espécies no tempo. Ou seja, é possível implantar uma espécie diferente após o término do ciclo da anterior. Este tipo de manejo leva ao que é conhecido como rotação de culturas, o qual tem como foco principal a utilização de espécies de importância econômica e alimentar, cultivadas de forma escalonada.

Segundo Moore et al. (2000), os sistemas de culturas que utilizam rotação de culturas tendem a possuir teores maiores de MO, maior estabilidade estrutural e maior biomassa e atividade microbiana, em comparação com sucessões de culturas. De forma semelhante, Adeboye et al. (2006) observaram que a maior diversidade de qualidade dos restos culturais promovida pelo emprego da rotação de culturas teve influência positiva no incremento da MO e da biomassa microbiana, indicando uma tendência de aumento da qualidade do solo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e caracterização da área experimental

O experimento do qual foram retiradas as amostras para a realização deste trabalho caracteriza-se por ser de longa duração, tendo sido instalado no ano de 2000, em área de campo nativo, sem histórico de cultivos anteriores, sobre solo classificado como um Argissolo Vermelho distrófico típico (Embrapa, 2006). A área está localizada na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, no município de Eldorado do Sul (RS), na região fisiográfica da Depressão Central (30° 05' 25" S, 51° 40' 33" O). O clima regional é classificado como sub-tropical de verão úmido quente do tipo fundamental Cfa, conforme a classificação de Köeppen. A região, segundo a classificação ecoclimática de Maluf & Caiaffo (2001), pertence também à Depressão Central.

Os tratamentos foram dispostos em parcelas principais de 750 m² (30 x 25 m) caracterizadas pelos sistemas de culturas, e subparcelas de 375 m² (25 x 15m) para sistema de preparo de solo plantio direto (PD) e 187,5 m² (25 x 7,5m) para os sistemas de preparo convencional (PC) e reduzido.

Os sistemas de culturas utilizados foram rotação (soja – trigo – milho – aveia+ervilhaca), sucessão (soja - aveia + ervilhaca - milho) e pousio no inverno (soja – pousio - milho). O manejo de fertilidade do solo foi realizado conforme a recomendação oficial para o Estado do RS e SC (Comissão, 2004).

Havia também o campo nativo (CN) como sistema de referência, representando a condição original do solo, com a finalidade de realizar comparações entre os sistemas. Neste tratamento foi realizada simulação de pastejo através de operações de sega e coleta do resíduo vegetal

semestralmente, além de não haver nenhuma forma de reposição de nutrientes através de adubações.

As operações de preparo do solo foram realizadas antes das culturas de verão. No sistema convencional, o preparo do solo consiste nas operações de aração e duas gradagens, com a conseqüente incorporação dos resíduos vegetais no solo, enquanto o plantio direto é realizado com a semeadura ocorrendo sobre os restos de cultura anteriores, sem revolvimento de solo.

3.2. Tratamentos e Amostragem

Neste trabalho foram avaliados os sistemas de cultura rotação (rot), sucessão (suc) e pousio (pou), nos sistemas de preparo do solo PC e PD. As parcelas foram divididas em três pontos de amostragem. Cada amostra era constituída por 15 subamostras coletadas de forma completamente casualizada, coletadas com trado calador, na profundidade de 7 cm.

As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas, transportadas do campo para o laboratório e mantidas a 4°C por no máximo três dias até o processo das análises.

A coleta das amostras foi realizada em quatro épocas: 26 de junho de 2006, 21 de novembro de 2006, 21 de junho de 2007 e 18 de março de 2008. As culturas implantadas em cada época e para cada sistema de cultura foram estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sistemas de culturas empregados durante quatro ciclos de cultivo

Sistema de Culturas				
Coleta	Data	Rotação	Sucessão	Pousio
1	26/06/06	Trigo	Aveia+Vica	Espontâneas
2	21/11/06	Milho	Milho	Milho
3	21/06/07	Aveia+ Vica	Aveia+Vica	Espontâneas
4	18/03/08	Soja	Soja	Soja

3.3 Preparo da amostras

O processamento das amostras consistiu na tamisagem do solo em peneira com malha de 2 mm, procedimento idêntico para todas as análises realizadas neste trabalho. Subamostras de 10 g foram retiradas para a determinação da umidade gravimétrica do solo. Para a determinação da biomassa microbiana, atividade respiratória e diversidade metabólica, as amostras foram utilizadas imediatamente após o processamento, enquanto que para as análises de atividade enzimática do solo, as amostras foram secas ao ar e assim mantidas por no máximo dois meses até o momento das análises (Dick et al., 1996).

3.4 Avaliações

3.4.1 Biomassa microbiana

Para a determinação da BM foi empregado o princípio da fumigação e incubação (Jenkinson & Powlson, 1976). Foram utilizados frascos de vedação hermética com volume de 1,5 L, nos quais eram adicionadas subamostras de 50 g e 49 g (base úmida) de solo para as amostras não fumigadas e fumigadas, respectivamente. A fumigação das amostras foi realizada com a adição de 250 µL de clorofórmio (CHCl₃) PA, e mantendo-se os frascos fechados por período de 12 horas. Após, os frascos foram abertos em capela de exaustão por pelo menos quatro horas para a eliminação do clorofórmio. O procedimento para a reinoculação das amostras fumigadas consistiu na adição de 1,0 g de solo não fumigado em cada frasco.

Em cada frasco de amostras, foi adicionado um copo plástico de 50 mL contendo 8 mL de NaOH com molaridade padronizada de 1 mol L⁻¹. A incubação das amostras foi realizada em incubadora tipo BOD a 23° C no

escuro, por um período de 10 dias, com a umidade ajustada para 70% da capacidade de campo. Foram estabelecidas 3 provas em branco, as quais eram formadas por frascos de incubação sem solo, contendo apenas o copo plástico com 8 mL de NaOH.

Após este período, os copos contendo o NaOH foram retirados, sendo acrescidos de 3 mL de BaCl₂ (10%) e 3 gotas do indicador fenolftaleína (solução alcoólica a 2%). A titulação foi realizada com HCl com molaridade padronizada a 1 mol L⁻¹.

O C liberado na forma de CO₂ (mg Kg⁻¹) pelos tratamentos fumigado e não fumigado foi calculado com o auxílio da seguinte expressão:

$$C-CO_2 = \frac{(mL \text{ branco} - mL \text{ amostra}) \times 6 \times 1000 \times M \text{ HCl} \times FC}{\text{Massa de solo seco (g)}}$$

onde 6 é o equivalente-grama do C, 1000 é um fator de correção de mg g⁻¹ para mg kg⁻¹ e FC é um fator de correção da molaridade, calculado por M HCl/N NaOH.

A determinação da BM foi realizada através da expressão descrita em trabalho de Horwath et al. (1996):

$$BM = 1,73F - 0,56 NF$$

Onde BM é o carbono da biomassa microbiana e F e NF são os valores, em mg Kg⁻¹ de C-CO₂, das amostras fumigadas e não fumigadas, respectivamente.

3.4.2 Atividade respiratória

Para a avaliação da atividade microbiana através da produção de C-CO₂, foi realizado procedimento semelhante à determinação da BM, sem a utilização de um tratamento fumigado. O C-CO₂ produzido foi avaliado a cada 10 dias até 30 dias de incubação. Após, foi analisado aos 45 e 60 dias. O C-CO₂ total produzido em 60 dias de incubação foi calculado pela soma de CO₂ liberado entre cada período de incubação. Para a determinação do C-CO₂ liberado, também foi seguido o procedimento do item anterior.

3.4.3 Atividade enzimática

Para a avaliação da atividade enzimática do solo utilizaram-se metodologias propostas por Dick et al. (1996) para as enzimas β-glucosidase (ciclo do carbono), fosfatase ácida (ciclo do fósforo), arilsulfatase (ciclo do enxofre) e urease (ciclo do nitrogênio). Empregou-se, no entanto, adaptação proposta por Verchot & Borelli (2005), que não usaram tolueno para inibir a atividade microbiana no processo de análise, tendo em vista que naquele trabalho não foram identificadas diferenças consistentes entre amostras nas quais o inibidor microbiano foi utilizado e aquelas em que não houve adição do mesmo.

A determinação da atividade das enzimas β-glucosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase é baseada na ação destas sobre seus substratos específicos, formando como produto o p-nitrofenol, o qual é extraído por filtragem e quantificado por análise colorimétrica. A avaliação da atividade da urease é baseada na liberação do amônio (NH₄⁺) através da ação da enzima sobre o substrato uréia durante período de incubação. A quantificação do

amônio liberado foi realizada pelo método da destilação e titulação, conforme Tedesco et al. (1995).

3.4.3.1 Atividade de β -glucosidase

O substrato utilizado para a determinação da atividade desta enzima é o p -nitrofenil- β -D-glicosídeo (PNG 0,05 M) (Apêndice 1). Para cada amostra utilizou-se 1 g de solo, colocado em erlenmeyer de 50 mL, com 4 mL do tampão MUB pH 6,0 (Apêndice 2) e 1 mL de solução PNG, incubando-se a 37°C. Após 1 hora, com a finalidade de evitar a dispersão de argilas e de interromper a atividade da enzima, adicionou-se 1 mL de CaCl_2 0,5 mol L⁻¹ e 4 mL do tampão de Tris-Hydroxymetyl-Amino-Metano 0,1 mol L⁻¹ (THAM pH 12) (Apêndice 3). Em seguida filtrou-se a suspensão de solo em um papel filtro Whatman nº 2. A prova em branco foi produzida seguindo os passos anteriores com uma duplicata, porém com o acréscimo da solução de PNG após a incubação. A leitura se deu em espectrofotômetro a 410 nm e o conteúdo de p -nitrofenol foi determinado através de uma curva de calibração obtida com padrões de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 μg de p -nitrofenol. Esta curva foi obtida com a pipetagem de 1,0 mL da solução padrão de nitrofenol (Apêndice 4) em 100mL de água. Em seguida foram pipetadas alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL e ajustado para 5,0 mL. Após, foram adicionados 1,0 mL de CaCl_2 0,5M e 4,0 mL de tampão THAM 0,1M pH 12. E, por fim, procedeu-se a filtragem em papel Whatman nº 2. A atividade desta enzima é expressa em μg de p -nitrofenol produzido por hora por grama de solo ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ solo}$).

3.4.3.2 Atividade da fosfatase ácida

O substrato para a determinação da atividade da enzima fosfatase ácida foi o p -nitrofenil fosfato (PNF 0,05 M) (Apêndice 5). Foi pesado 1,0 g de solo em erlenmeyer de 50 mL e adicionado 4 mL de MUB pH 6,5 (Apêndice 6) e 1 mL da solução de PNF e em seguida incubou-se por 1 hora sob temperatura de 37°C. Após este período, procedeu-se de forma idêntica à análise da enzima β -glucosidase. A atividade desta enzima é expressa na mesma unidade da β -glucosidase.

3.4.3.3 Atividade da arilsulfatase

O substrato para a determinação da atividade da enzima arilsulfatase é o p -nitrofenil-sulfato (PNS 0,05 M) (Apêndice 7). Para cada amostra utilizou-se 1,0 g de solo, colocada em erlenmeyer de 50 mL, 4 mL do tampão de acetato (Apêndice 8), 1 mL de solução PNS, incubando-se por 1 hora sob temperatura de 37°C. Após este período, procedeu-se de forma idêntica à análise da enzima β -glucosidase. A atividade desta enzima é expressa na mesma unidade da β -glucosidase.

3.4.3.4 Atividade da urease

A uréia foi utilizada como substrato para a análise da atividade desta enzima, em solução em água 0,2 mol L⁻¹. Para esta análise, 5,0 g de solo foram colocadas em tubo de centrífuga (50 mL), sendo adicionados 9 mL de tampão THAM (Apêndice 9) e, em seguida, a solução de uréia. As amostras foram incubadas a temperatura de 37°C por duas horas. Após este período,

foram adicionados 35 mL de solução de KCl-Ag₂SO₄ (Apêndice 10), a 4°C. Em seguida, o volume foi ajustado para 50 mL, com a adição da mesma solução.

Para determinar o NH₄⁺ foi empregada metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Uma alíquota de 20 mL da suspensão foi transferida para um frasco de destilação de 100 mL, juntamente com 0,2 g de MgO calcinado. No condensador do destilador, foi posicionado um erlenmeyer de 50 mL contendo 5,0 mL de indicador ácido bórico. A destilação foi encerrada depois de recolhido cerca de 35 a 40 mL de destilado.

A titulação foi realizada com H₂SO₄ padronizado com molaridade em cerca de 0,0025 mol L⁻¹. O mesmo procedimento foi adotado para a obtenção de três provas em branco, utilizando 20 mL da solução de KCl-Ag₂SO₄.

A concentração de amônio foi obtida a partir da seguinte expressão:

$$\text{NH}_4 \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{mL H}^+_{\text{am}} - \text{mL H}^+_{\text{br}}) \times 70 \times 2,5}{5 \text{ g}}$$

onde: H⁺_{am} e H⁺_{br} são as quantidades de ácido gasto na titulação da amostra e do branco, respectivamente.

Controles foram realizados em cada série de análises para determinar o N-NH₄ não derivado da uréia através da atividade da urease. Para realizar os controles, foram seguidos os procedimentos descritos para análise de urease, mas fazendo-se a adição de 1,0 mL da solução de uréia após a incubação e a adição de 35 mL da solução KCl-Ag₂SO₄. A atividade da enzima urease foi expressa em mg N-NH₄ kg⁻¹ solo 2h⁻¹.

3.4.4 Diversidade funcional

Para a determinação da diversidade funcional, foram utilizadas microplacas *ECOpate* (Biolog inc.), utilizando-se protocolo segundo Li et al. (2007). Cada placa possuía 31 fontes de carbono além do branco (água), em triplicata, perfazendo total de 96 poços.

As amostras de solo, no máximo após 24h da realização da coleta, foram tamisadas em peneira com malha de 2 mm. Para cada amostra foi realizada uma diluição em série, utilizando-se 10g de solo em 90mL de solução estéril 0,05M K₂HPO₄ (pH 7,0). Alíquotas de 600 µL da diluição 10⁻³ foram pipetadas para os poços das microplacas com auxílio de micropipeta multicanal, sendo em seguida incubadas a 25° C por 72h.

Após o período de incubação, as placas foram analisadas em leitor de microplacas com absorvância de 590 nm. A capacidade de utilizar uma fonte de carbono foi determinada conforme trabalho de Ibekwe & Kennedy, (1998), empregando-se a equação:

$$We = \frac{(Wa - W0)}{W0} * 100$$

onde:

We = Índice de desenvolvimento da cor

Wa = Absorvância de cada cavidade

W0 = Absorvância do branco

A condição para que a reação tenha sido positiva, e portanto, o substrato tenha sido metabolizado, é que We tenha sido superior a 100. Com o resultado, foi montada uma matriz binária (reagentes e não reagentes) e

aplicada análise multivariada através da determinação do componente principal.

O índice de diversidade de Shannon foi determinado para cada tratamento, segundo trabalho de Derry et al. (1998), através da expressão:

$$H = C/N(N \ln N - \sum ni \ln ni)$$

onde:

H = índice de Shannon

C = 2,3

ni = Densidade óptica de um poço da placa *Biolog*

N= Somatório das densidades ópticas da placa *Biolog*

3.4.5 Índice integralizador dos indicadores

Neste trabalho foi utilizada a expressão matemática proposta em trabalho de Garcia-Ruiz et al. (2008) para gerar um índice que englobou todos os indicadores utilizados, permitindo uma visão integralizada dos resultados obtidos nas diferentes análises.

A expressão utilizada para tal foi a seguinte:

$$IG = \sqrt[6]{BM \times AR \times EG \times EU \times EF \times EA}$$

onde:

IG = Índice global

BM = Biomassa microbiana

AR = Atividade respiratória

EG = Atividade da enzima β -glucosidase

EU = Atividade da enzima urease

EF = Atividade da enzima fosfatase ácida

EA = Atividade da enzima arilsulfatase

3.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos nas diferentes avaliações foram analisados segundo um delineamento totalmente casualizado, com o emprego de três repetições. Os dados nas avaliações de atividade respiratória, biomassa microbiana e atividade enzimática foram avaliados em teste de contrastes ortogonais ao nível de significância de 5%.

Nas análises da diversidade funcional do solo, o teste para a comparação das médias do índice de diversidade de Shannon foi o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A matriz binária gerada nas leituras colorimétricas das placas *Biolog* foram submetidas à análise multivariada através da determinação do componente principal, empregado-se para tal o programa computacional PaST versão 1.32 (Hammer et al. 2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biomassa Microbiana

Na comparação realizada no contraste PC X CN/PD (Tabelas 2 e 3), observa-se que em todas as épocas ocorreram diferenças significativas, sendo que os maiores valores de biomassa foram obtidos no grupo CN/PD. Da mesma forma, na comparação entre o PC e PD, em todas as amostragens foram determinadas diferenças entre os dois sistemas de manejo. Porém, na segunda época de avaliação, observa-se através das médias, que a biomassa da comunidade microbiana do solo foi superior no PC, provavelmente em função de alguma variação pontual, tendo em vista que nos outros três momentos de avaliação, os valores deste parâmetro foram superiores no PD. Estes resultados assemelham-se com os obtidos por Eekeren et al. (2008), que observaram valores mais elevados de biomassa em tratamento com PD, em relação a sistema de cultura de milho que empregava sempre a operação de aração. Conforme Roldán et al. (2003), o aumento da BM do solo está correlacionado com a adoção do PD e com o aumento da adição de resíduos culturais na superfície do solo. O trabalho de Balota et al. (1997) corrobora estes resultados, na comparação entre PD e PC em sucessões entre trigo/milho e trigo/soja, em que o sistema com menor revolvimento de solo apresentou maior biomassa microbiana. Os autores concluem neste trabalho que a BM comportou-se como uma indicadora eficiente das alterações microbianas ocorridas no solo em função do manejo aplicado.

Tabela 2. Médias dos grupos avaliados nos contraste ortogonais para valores de biomassa microbiana do solo (mgC g de solo⁻¹). (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Grupos	Épocas			
	1	2	3	4
CN	463,9	260,2	476,7	238,3
PD	454,4	322,3	378,9	195,0
PC	374,5	379,1	239,4	129,9
CN/PD	737,7	591,1	582,9	303,3
PD rot	408,7	315,4	302,7	168,0
PD pou	504,1	223,0	462,0	231,0
PD suc	450,5	428,6	371,9	185,9
PD pou/suc	477,3	325,8	416,9	208,5
PC rot	414,2	434,9	220,0	106,6
PC suc	388,5	364,3	264,8	130,4
PC pou	320,7	338,0	233,6	152,8
PC pou/suc	354,6	351,1	249,2	141,6

Tabela 3. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da biomassa microbiana do solo. (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Contrastes	Épocas			
	1	2	3	4
PC X CN/PD	*	*	*	*
PD X PC	*	*	*	*
CN X PD	ns	ns	ns	ns
PD rot X PD pou/suce	*	ns	ns	ns
PDpou X PDsuc	ns	*	ns	ns
PCrot X PCsuc/pou	ns	ns	ns	ns
PCpou X PCsuc	ns	ns	ns	ns

* Diferença significativa a 5%

* ns: diferença não significativa

Na comparação realizada no contraste PD X CN, verificou-se que não houve diferenças significativas nas quatro épocas de avaliação, indicando

que, segundo este parâmetro, o PD tende a conservar as características originais do solo, apresentando impacto tão baixo quanto o sistema CN. Diferentemente deste resultado, Brempong et al. (2008) observaram em estudo avaliando diferentes sistemas de cultivos envolvendo milho, pastagem de gramíneas e floresta nativa, que o último diferenciava-se dos sistemas com interferência humana. Neste caso as diferenças obtidas podem dever-se ao fato de que a condição referência tratava-se de floresta, provavelmente com condições superiores de aporte de carbono ao solo. Entretanto, Mijangos et al. (2006) observaram que os valores de biomassa microbiana do solo no PC foram baixos em relação ao PD e ao CN, enquanto estes dois sistemas não apresentaram diferenças entre eles, semelhantemente aos resultados do presente trabalho.

Sabe-se que as variações nas quantidades de biomassa microbiana e de sua atividade possuem relação com as variações do carbono orgânico no solo (Alvarez, 1995), indicando que os sistemas que contribuem para o aumento da MO do solo, como o PD e o CN, são os que obtêm os maiores valores nestes parâmetros. De forma inversa, o PC dispõe os resíduos culturais em contato mais íntimo com o solo, além de romper agregados de solo, expondo frações protegidas da MO, favorecendo sua decomposição, além de manter o solo descoberto, favorecendo também as perdas de C por erosão (Lee et al., 1993).

Na avaliação da biomassa nos sistemas de culturas, foi observado que não houve diferenças consistentes entre os diferentes manejos, o que diverge dos resultados obtidos por Carter (1986), que observou que nos sistemas que utilizavam rotação de culturas ao invés do pousio na produção de

trigo, houve o estímulo na produção de biomassa microbiana. Entretanto, Vargas & Scholles (2000) não identificaram diferenças marcantes na BM entre os sistemas de culturas, mesmo entre aqueles que utilizavam ou não leguminosas. Da mesma forma, Eekeren et al. (2008) não observaram diferenças na biomassa quando avaliaram o efeito da rotação entre milho e pastagem cultivada, com emprego de revolvimento de solo em relação ao sistema de monocultivo de milho com PC.

Catellan & Vidor (1990), avaliando o efeito de diferentes sistemas de coberturas vegetais e fatores ambientais, observaram que a biomassa foi acentuadamente influenciada pela precipitação, sendo favorecida pela maior disponibilidade hídrica. Os autores identificaram que as coberturas vegetais que possibilitavam a maior retenção de água foram as que mais estimularam o desenvolvimento da BM, e dentre estas, o CN foi o que mais se sobressaiu.

Angers et al. (1992), avaliando sistemas de preparo do solo e de culturas no cultivo da cevada, concluíram que nos manejos que propiciavam pouca movimentação de solo e utilizando rotação de culturas, a BM era estimulada, principalmente na camada de 0 a 7,5 cm de profundidade. Segundo Robinson et al. (1996), os efeitos positivos que podem ser obtidos pela utilização da rotação de culturas estão ligados à possibilidade de haver maior aporte de carbono ao sistema, bem como fornecer diferentes tipos de resíduos vegetais ao solo. Porém, o que vai determinar estes efeitos, em última instância, será a escolha das espécies utilizadas na rotação, de maneira que o resultado não necessariamente será superior aos obtidos na sucessão de culturas, por exemplo.

Os resultados do presente trabalho, em relação à BM como indicadora das modificações promovidas por preparos de solo, confirmam os de Powlson et al. (1987), que compararam sistemas de cultivo de cevada e concluíram que a avaliação da biomassa da microbiota do solo foi um indicador eficiente para determinar estes efeitos. Naquele trabalho, os autores concluem que a biomassa microbiana fornece informações sobre o impacto do manejo antes que modificações do carbono total do solo possam ser percebidas. Além disso, o aumento da BM resulta numa maior formação de agregados no solo, o que está relacionado com o aumento da proteção da MO do solo (Carter, 1991). Por outro lado, Kandeler et al. (1999), em experimento de longa duração (8 anos), observaram que a determinação da biomassa microbiana foi eficiente para identificar modificações do solo submetido a diferentes sistemas de preparo, porém as modificações apenas foram consistentes após o terceiro ano de cultivo. Os dados coletados no presente trabalho iniciaram-se a partir do sexto ano de implantação do experimento, podendo este já ser considerado como um trabalho de longa duração, corroborando os estudos citados.

Os resultados do presente trabalho, demonstram que, nas condições deste experimento, a BM é um eficiente indicador para modificações na qualidade do solo impostas por sistemas de preparo, corroborando trabalho realizado por Roldán et al. (2007), que também observaram resultados satisfatórios no emprego da BM para distinguir efeitos do preparo convencional e plantio direto nas culturas de milho e feijão.

4.2 Atividade respiratória

O comportamento da atividade respiratória foi similar ao obtido na avaliação da BM. Através da análise de emissão de CO₂ foi possível identificar

diferenças entre os sistemas de preparo do solo (Tabelas 4 e 5). O contraste PC x CN/PD representa a comparação do sistema que envolve intensa movimentação de solo em relação aos que promovem baixo ou nenhum revolvimento. Neste caso, as taxas respiratórias foram superiores nas quatro épocas no grupo CN/PD, indicando que estes manejos com características mais conservacionistas favoreceram mais a atividade microbiana no solo. Segundo Bradford & Peterson (2000), sistemas agrícolas que não utilizam a movimentação de solo tendem a apresentar maior atividade microbiana, tendo em vista o aporte gradual de carbono, menores amplitudes térmicas em função da cobertura do solo e a manutenção da umidade na camada superficial.

Tabela 4. Médias dos grupos avaliados nos contrastes ortogonais para valores de atividade respiratória da microbiota do solo (mg C g de solo⁻¹). (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Grupos	Épocas			
	1	2	3	4
CN	401,6	426,6	489,1	555,7
PD	488,2	401,2	311,1	507,7
PC	309,4	387,6	288,8	298,7
CN/PD	466,6	407,5	355,6	519,7
PD rot	520,6	408,7	270,8	531,8
PD pou	482,8	313,4	327,2	504,5
PD suc	461,2	481,5	335,3	486,7
PD pou/suc	472,0	397,5	331,2	495,6
PC rot	289,2	407,3	223,6	273,7
PC suc	291,5	390,2	319,2	291,6
PC pou	347,5	365,4	323,8	330,7
PC pou/suc	319,5	377,8	321,5	311,2

Tabela 5. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da atividade respiratória da microbiota do solo. (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Contrastes	Épocas			
	1	2	3	4
PC X CN/PD	*	*	*	*
PD X PC	*	*	ns	*
CN X PD	ns	ns	*	ns
PD rot X PD pou/suce	ns	ns	*	ns
PDpou X PDsuc	ns	ns	ns	ns
PCrot X PCsuc/pou	ns	ns	*	ns
PCpou X PCsuc	ns	ns	ns	ns

* Diferença significativa a 5%

* ns: diferença não significativa

Quando o sistema referência não é considerado e a comparação é realizada apenas entre PD e PC, foi verificada, exceto na terceira época, uma atividade microbiana superior no PD, corroborando o resultado do contraste anterior, onde o sistema que segundo Alvarez et al. (1995) gera um balanço positivo de carbono no solo, proporcionou um estímulo superior à atividade microbiológica. Estes resultados assemelham-se aos trabalhos de Ballota et al. (1997); Meriles et al. (2008); e Sall et al. (2006), que, avaliando sistemas de culturas com diferentes preparos de solo, constataram que a atividade respiratória foi superior no manejo que não envolvia movimentação de solo. Da mesma forma, Vargas & Scholles (2000), observaram que a atividade microbiana do solo foi favorecida pelo emprego do PD. Nesse trabalho, os autores concluem que a maior disponibilidade de carbono nas camadas superficiais do solo, proporcionada pelos sistemas conservacionistas de preparo, favorece a atividade dos microrganismos. A

razão deste fato é que a determinação da atividade microbiana através da emissão de CO₂ é uma leitura indireta do carbono prontamente mineralizável do solo, o que, portanto, indica que quanto mais positivo for o balanço do carbono no sistema, maior será o potencial de atividade microbiana no solo.

Na comparação entre o PD e o sistema referência CN, observa-se que apenas na terceira época ocorreu diferença significativa na atividade respiratória, sendo superior no campo nativo. Neste caso, há o indicativo da proximidade dos dois sistemas na resposta da atividade microbiana pela emissão de CO₂, demonstrando, por este parâmetro, que o PD tem a capacidade de manter a atividade microbiana do solo no padrão da condição original do solo. Semelhantemente, em trabalho realizado por Constantini et al. (1996), os autores observaram que a atividade microbiana em PD cultivado com milho em sucessão foi semelhante à obtida em uma pastagem nativa preservada por 20 anos na Argentina. Por outro lado, Mijangos et al. (2006), em pesquisa que avaliou diferentes preparos de solo e fertilização orgânica do solo, observaram que a atividade respiratória do solo foi superior em PD em relação ao PC, porém, o maior valor de emissão de CO₂ foi obtido no campo nativo, superando inclusive o PD aportado com adubação orgânica, indicando que naquele caso, o manejo conservacionista não acompanhou a evolução obtida no sistema referencial.

Em relação aos contrastes que envolveram sistemas de culturas, de maneira geral, não foi percebido o impacto no solo em termos de atividade respiratória (Tabela 4.). Resultados semelhantes foram obtidos por Meriles et al. (2008) e Vargas & Scholles (2000), que também não identificaram de forma clara, através da emissão de CO₂, modificações mais consistentes entre

sistemas de culturas. Da mesma forma, Balota et al. (1998), avaliando parâmetros microbiológicos entre os sistemas trigo/soja e trigo/milho em PC e PD, observaram poucas diferenças entre as sucessões, nos dois tipos de preparo de solo.

Mesmo na segunda época de amostragem, na qual havia diferença entre as coberturas vegetais nos três sistemas de culturas, isto é, trigo na rotação, aveia + ervilhaca na sucessão e espontâneas no pousio, não foram observadas diferenças significativas na atividade respiratória entre os tratamentos. Este resultado contrasta com o obtido por Catelan & Vidor (1990), que identificaram maior emissão de CO₂ no tratamento cultivado no sistema de cobertura aveia + ervilhaca / milho + caupi em relação à aveia / milho. Os autores relacionam este dado com a maior atividade rizosférica proporcionada pelo emprego de leguminosas tanto no período de verão quanto no de inverno. De forma semelhante, Chander et al. (1997), em estudo que avaliou diferentes sistemas de rotação de culturas em termos de parâmetros biológicos e bioquímicos, observaram que o fator principal que estimulou a atividade respiratória da microbiota do solo foi o emprego da adubação verde com a leguminosa herbácea *Sesbania aculeata*, diferentemente dos outros sistemas que utilizavam apenas culturas comerciais.

Os resultados destes autores indicam uma elevada variação no que se refere à atividade microbiana em diferentes sistemas de culturas, fato percebido também nos outros parâmetros avaliados no presente trabalho. Por outro lado, a atividade respiratória demonstrou ser um indicador bastante sensível para discriminar diferentes sistemas de preparo de solo, possuindo potencial para, juntamente com outros parâmetros, avaliar a qualidade do solo.

4.3. Atividade enzimática

4.3.1 Atividade da enzima β -glucosidase

Pela análise efetuada constata-se que foi possível distinguir os sistemas de preparo do solo (Tabelas 6 e 7). No contraste que compara o preparo convencional com o grupo que não emprega o revolvimento do solo, observaram-se diferenças significativas nas quatro épocas de amostragem, sendo que as maiores taxas de atividade desta enzima foram obtidas no grupo CN/PD.

O contraste PD X PC, apresentou diferenças significativas em todas as épocas, sendo que a maior atividade foi obtida no PD. Roldán et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes na comparação de preparos com e sem movimentação de solo em relação à atividade desta enzima. Naquele trabalho os autores avaliaram diferentes sistemas de produção de sorgo no México, observando que a atividade da β -glucosidase foi praticamente 100% superior em PD do que em PC, na profundidade de 0 a 5 cm. Em avaliações em maiores profundidades, os autores observaram que a atividade da enzima em PD diminuía, enquanto em PC se manteve uniforme. De forma semelhante, Van Den Bossche et al. (2008) verificaram que a atividade desta enzima era cerca de 100% superior nos sistema PD e preparo reduzido em relação ao PC. Neste estudo, os autores associam este resultado a maior capacidade dos sistemas conservacionistas em aumentar o conteúdo de carbono do solo, principalmente nas camadas superficiais, conclusão corroborada por Melero et al. (2008).

Tabela 6. Médias dos grupos avaliados nos contraste ortogonais para valores de atividade da enzima β -glucosidase ($\text{mg } \rho\text{NF kg solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$). (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Grupos	Épocas			
	1	2	3	4
CN	107,0	73,2	80,9	119,4
PD	172,3	107,0	92,4	119,1
PC	76,8	63,5	61,5	50,9
CN/PD	156,0	98,6	89,5	119,2
PD rot	142,6	99,9	95,7	118,6
PD pou	216,4	106,1	87,7	133,5
PD suc	158,0	115,0	93,7	105,2
PD pou/suc	187,2	110,6	90,7	119,4
PC rot	84,6	65,8	56,4	42,8
PC suc	50,4	59,0	70,8	61,1
PC pou	95,2	65,8	57,2	48,8
PC pou/suc	72,8	62,4	64,0	54,9

Tabela 7. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da atividade da enzima β -glucosidase. (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Contrastes	Épocas			
	1	2	3	4
PC X CN/PD	*	*	*	*
PD X PC	*	*	*	*
CN X PD	*	*	ns	ns
PD rot X PD pou/suce	ns	ns	ns	ns
PDpou X PDsuc	ns	ns	ns	ns
PCrot X PCsuc/pou	ns	ns	ns	ns
PCpou X PCsuc	ns	ns	ns	ns

* Diferença significativa a 5%

* ns: diferença não significativa

Por outro lado, Roldán et al. (2003) não encontraram diferenças na atividade da enzima entre PD e PC em sistemas de cultivo de milho, quando o resíduo vegetal em PD era removido. Quando a palha era mantida cobrindo 66% do solo, a atividade da enzima era mais de 100% superior ao PC, indicando que a atividade da β -glucosidase está relacionada com o aumento da adição de resíduos vegetais e, portanto, a ciclagem de carbono no solo. Estes resultados demonstram a importância da produção de massa vegetal e de sua manutenção em cobertura no PD, além do não revolvimento do solo, explicando qualitativamente os problemas que atualmente ocorrem com o PD no RS (Reinert et al., 2008).

Na comparação entre PD e CN, nas duas primeiras amostragens, a atividade da β -glucosidase foi superior no PD, enquanto nas duas seguintes não foram identificadas diferenças significativas. Estes resultados foram muito semelhantes aos observados na avaliação da atividade respiratória do solo, que indiretamente indica a quantidade de carbono prontamente mineralizável. Este comportamento semelhante entre estes dois parâmetros pode ser explicado pelo fato de a atividade da enzima β -glucosidase estar ligada à liberação de açúcares de baixo peso molecular a partir da decomposição da MO do solo, os quais são importantes fontes de energia, fundamentais para a microbiota do solo, sendo, assim, indiretamente importantes no processo respiratório (Bandick & Dick, 1999).

Os resultados obtidos mostram uma tendência de o PD possuir maior atividade da enzima β -glucosidase em relação ao sistema referência CN. De forma diferente, Bandick & Dick (1999) observaram que os sistemas de pastagem permanente obtiveram taxas de atividade desta enzima sempre

superiores aos sistemas cultivados. Os autores sugerem que o fato de que a pastagem não utiliza revolvimento de solo e o de que a atividade rizosférica é permanente neste sistema tenham contribuído para este resultado. Em nosso trabalho, os sistemas PC e PD recebiam fertilizantes de acordo com a recomendação oficial (Comissão..., 2004.) a cada implantação de culturas (duas vezes ao ano), enquanto o CN, além de não receber adubo, ainda era submetido ao corte e remoção da vegetação (duas vezes ao ano), de maneira a simular o pastoreio.

Em relação aos sistemas de culturas, em nenhum dos contrastes testados houve diferença significativa, corroborando os resultados dos parâmetros anteriores. Roldán et al. (2003) observaram que a atividade da enzima β -glucosidase decrescia com o emprego de leguminosas no sistema. Este resultado não foi observado no presente trabalho, tendo em vista que apenas na segunda amostragem não havia a presença de leguminosas (cultivo de milho), e observando-se as médias, não é possível observar um efeito claro do aumento da atividade da enzima no cultivo do milho. Talvez esta questão não dependa somente do emprego ou não de leguminosas, pois em trabalho que avaliou o efeito de sistemas de rotação de culturas, Miller & Dick, (1995) observaram que nos sistemas que utilizavam trevo vermelho, a atividade da β -glucosidase foi superior à de onde não havia a sua utilização.

4.3.2 Atividade da enzima fosfatase ácida

Os resultados obtidos nas análises da atividade da enzima fosfatase ácida, apresentados nas tabelas 8 e 9, demonstraram elevada sensibilidade deste parâmetro para a diferenciação dos sistemas de preparo do solo.

Tabela 8. Médias dos grupos avaliados nos contraste ortogonais para valores de atividade da enzima fosfatase ácida (mg pNF kg solo⁻¹ h⁻¹). (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Grupos	Épocas			
	1	2	3	4
CN	80,9	119,9	432,3	82,2
PD	92,4	109,6	302,6	88,5
PC	61,5	92,3	231,8	63,5
CN/PD	76,9	109,0	267,2	76,0
PD rot	95,7	113,7	333,4	91,7
PD pou	87,7	111,7	271,9	79,5
PD suc	93,7	103,4	302,6	94,5
PD pou/suc	90,7	107,6	287,3	87,0
PC rot	56,4	103,2	224,5	58,0
PC suc	70,8	112,6	268,3	75,3
PC pou	57,2	109,4	202,5	63,9
PC pou/suc	64,0	111,0	235,4	66,2

Tabela 9. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da atividade da enzima fosfatase ácida. (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Contrastes	Épocas			
	1	2	3	4
PC X CN/PD	*	*	*	*
PD X PC	*	*	*	*
CN X PD	*	*	*	*
PD rot X PD pou/suce	ns	ns	ns	ns
PDpou X PDsuc	ns	ns	ns	ns
PCrot X PCsuc/pou	*	ns	ns	ns
PCpou X PCsuc	ns	ns	ns	ns

* Diferença significativa a 5%

* ns: diferença não significativa

Na comparação realizada entre os sistemas sem movimentação de solo com o preparo convencional, foi observado que a atividade da enzima foi significativamente superior nas quatro avaliações em CN/PD. De forma semelhante, o PD gerou a maior atividade da enzima em relação ao PC, resultado também obtido por Roldán et al. (2007, 2005a) que compararam estes preparos nas culturas de milho e feijão, observando atividade da fosfatase ácida sempre superior no sistema conservacionista. Naquele trabalho, a maior atividade da enzima é relacionada, além do fato de que o PD tende a aumentar o estoque de carbono no solo, também à maior atividade de micorrizas arbusculares, as quais são favorecidas por esse sistema de preparo, tendo em vista que não há o revolvimento do solo e a conseqüente quebra da rede de hifas das plantas micorrizadas. Ainda segundo os autores, a maior atividade dessa enzima obtida em PD pode reduzir a deficiência de P para as culturas em ambientes com menores teores deste nutriente, em função de uma ciclagem mais rápida do P orgânico para formas minerais. Mina et al. (2008) também observaram atividade superior da enzima em solo sob PD em relação a PC, porém as diferenças não foram tão marcantes quanto às obtidas no presente trabalho, o que talvez possa ser explicado pela diferença de profundidade de amostragem empregada nos dois trabalhos, a qual neste trabalho foi de 0-7 cm, enquanto na pesquisa citada foi de 0-15 cm. A atividade microbiana em PD tende a ser maior na superfície, em virtude da deposição de resíduo vegetal para a cobertura do solo, enquanto em PC o material é distribuído uniformemente no perfil (Dick, 1984). Isto indica que a profundidade de amostragem tem influência nos resultados neste tipo de determinação, o que, juntamente com a grande diversidade de protocolos para a análise de

atividade de enzimas encontrados na literatura, torna ainda mais complexa a padronização de parâmetros com potencial para a determinação de índices confiáveis de qualidade do solo.

Na comparação entre o PD e o sistema de referência (CN), foram observadas diferenças significativas em todas as épocas de amostragens. Na primeira e quarta avaliação, o PD obteve as maiores taxas de atividade da enzima, enquanto na segunda e terceira época, os maiores valores foram observados no CN. Este resultado mostra um equilíbrio entre os dois sistemas de preparo do solo, diferentemente do que foi observado em trabalho de Roldán et al. (2005b), envolvendo a cultura do sorgo com diferentes sistemas em experimento de três anos de duração. No trabalho, que partiu de áreas já degradadas no México, os autores observaram que a atividade da enzima fosfatase ácida no CN foi mais de 100% superior em relação ao PD.

Segundo Bandick & Dick (1999), a adubação mineral fosfatada pode interferir na determinação da atividade desta enzima. A maior disponibilidade de P mineral para os vegetais e microrganismos faz com se torne menos necessária a mineralização de formas orgânicas de fósforo e conseqüentemente a produção da enzima fosfatase pela comunidade microbiana se torna menor, o que vai repercutir sobre a atividade da mesma no solo. O PD recebeu adubação conforme a recomendação oficial (Comissão..., 2004), enquanto não era aportada nenhuma fonte de fósforo no CN, fato que não foi observado no presente trabalho, tendo em vista o equilíbrio entre PD e CN nas quatro amostragens.

Em estudo de Deng & Tabatabai (1997), foi observado que a atividade da enzima fosfatase ácida foi superior nos sistemas com baixo

revolvimento de solo em comparação com aqueles que empregavam algum tipo de preparo. Porém, os autores observam que, quando no sistema PD o resíduo vegetal era retirado da cobertura do solo, o efeito produzido era a redução da atividade da fosfatase ácida, tornando-a semelhante às encontradas no PC. Estes resultados demonstram o papel fundamental de uma cobertura de solo adequada no PD, para que este sistema possa ter a capacidade de manter a qualidade do solo. Ainda segundo os autores, as diferenças entre os sistemas de preparo de solo em relação à atividade das enzimas do grupo das fosfatases estão relacionadas ao balanço de carbono do solo, o que influencia diretamente a biomassa microbiana tanto na quantidade quanto na sua diversidade.

Em relação às comparações entre os sistemas de culturas, a análise da atividade da enzima fosfatase ácida foi a menos sensível para determinar diferenças, sendo que esta foi observada somente em um caso, na primeira amostragem no contraste PCpou X PCsuc, o que indica que não houve um efeito proporcionado pelas culturas utilizadas.

O emprego de diferentes sistemas de culturas apresenta resultados controversos na literatura. Izquierdo et al. (2003), em um experimento com duração de oito anos, avaliou diferentes parâmetros bioquímicos de qualidade do solo, dentre eles a atividade da enzima fosfatase ácida, comparando sistemas como pastagem com gramíneas tropicais, forrageiras herbáceas e rotação de culturas (mandioca/feijão/tomate/espinafre). Os autores observaram que a rotação foi a que gerou os menores valores para a atividade da fosfatase, ocorrendo o mesmo para os outros indicadores. De forma diversa, Deng & Tabatabai (1997) verificaram que a atividade da fosfatase ácida foi afetada pela

profundidade da amostragem de solo bem como pelo tipo de preparo de solo, porém não pelo tipo de cultura agrícola. Estes resultados indicam uma inconsistência nos efeitos produzidos por sistemas de culturas, os quais, provavelmente, são de menor magnitude do que os gerados por sistemas de preparo de solo.

4.3.3 Atividade da enzima arilsulfatase

A avaliação da atividade da enzima arilsulfatase foi a que mais apresentou diferenças entre os tratamentos, como mostra a Tabela 11. Entre os sistemas de preparo do solo, em todas as épocas de amostragens foram determinadas diferenças estatísticas (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Médias dos grupos avaliados nos contraste ortogonais para valores de atividade da enzima arilsulfatase ($\text{mg } \rho\text{NF kg solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$). (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Grupos	Épocas			
	1	2	3	4
CN	440,3	58,3	154,8	217,7
PD	228,6	74,2	116,8	113,3
PC	90,8	14,5	63,6	65,4
CN/PD	159,7	44,4	90,2	89,3
PD rot	185,1	78,5	132,5	105,8
PD pou	291,4	79,9	97,7	118,4
PD suc	209,2	64,3	120,3	115,5
PD pou/suc	250,3	72,1	109,0	117,0
PC rot	137,5	27,3	46,2	58,4
PC suc	79,1	10,9	75,3	75,3
PC pou	55,8	5,4	69,3	85,8
PC pou/suc	67,5	8,1	72,3	68,9

Tabela 11. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da atividade da enzima arilsulfatase. (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Contrastes	Épocas			
	1	2	3	4
PC X CN/PD	*	*	*	*
PD X PC	*	*	*	*
CN X PD	*	*	*	*
PD rot X PD pou/suce	*	ns	ns	ns
PDpou X PDsuc	*	ns	ns	ns
PCrot X PCsuc/pou	*	*	ns	ns
PCpou X PCsuc	ns	ns	ns	*

* Diferença significativa a 5%

* ns: diferença não significativa

Na comparação do contraste PC x CN/PD, o grupo que representa os tratamentos em que não há movimentação de solo obteve sempre as maiores taxas de atividade da enzima. Da mesma forma, no contraste PC x PD, nas quatro épocas houve diferenças significantes favoráveis ao preparo PD, com elevadas diferenças entre as médias. Este resultado corrobora aos obtidos por Melero et al. (2008) em estudo que comparou PC e PD em sistemas de produção de grãos na Espanha. Neste trabalho, os autores observaram que a atividade da enzima arilsulfatase no sistema PD foi superior à obtida no PC, e relacionam este fato ao aumento do estoque do carbono no solo com menor revolvimento.

Quando o PD foi comparado com o sistema referencial em relação à atividade da arilsulfatase, observaram-se diferenças significativas nas quatro avaliações. Com exceção da segunda época, o CN obteve os maiores valores para a atividade da enzima. Este resultado é semelhante ao obtido por Haynes

(1999), no qual foi observada maior atividade da enzima arilsulfatase no CN em relação aos sistemas com e sem revolvimento de solo. Segundo o autor, este fato é explicado em função de que o solo sob pastagem, diferentemente do PD e PC, possui um aporte constante de MO durante o ano, constituído por material vegetal senescente tanto na parte aérea quanto radicular, além da exudação de compostos orgânicos pelas diferentes espécies vegetais de forma ininterrupta. Naquele trabalho, foi observada uma alta correlação entre a atividade da arilsulfatase com o estoque de carbono no solo.

A atividade da arilsulfatase foi o parâmetro bioquímico que, de forma isolada, foi o mais sensível aos sistemas de preparo do solo. Segundo Bandick & Dick (1999), esta enzima cumpre um importante papel ecológico em disponibilizar SO_4^{2-} , a partir da decomposição da MO, para os vegetais. Porém além disso, ela atua como um indicador indireto para a presença de fungos no solo. Dentro da biomassa microbiana, somente os fungos possuem ésteres de sulfatos, os quais são substratos para a atividade desta enzima. Conforme Calderón et al. (2000) os sistemas de preparo que utilizam menor revolvimento do solo são aqueles que mais favorecem ao aumento da população de fungos. É provável que, além das características que desfavorecem o acúmulo de MO no solo no PC, que as operações de aração e gradagem tenham influenciado de maneira negativa a população de fungos e, conseqüentemente, a atividade da arilsulfatase. De forma inversa, o PD e o CN, favorecendo a manutenção do carbono no solo e o incremento da biomassa fúngica, possibilitariam os altos valores de atividade para esta enzima.

A elevada sensibilidade deste parâmetro observada no presente trabalho contrasta com resultados obtidos por Lagomarsino et al. (2008), os

quais, avaliando os efeitos de manejo orgânico e convencional do solo sobre indicadores microbiológicos, não determinaram diferenças na atividade da arilsulfatase. De forma semelhante, Mijangos et al. (2006) também não obtiveram resposta da atividade desta enzima para adubação orgânica. Porém, esses autores observaram que a atividade da arilsulfatase foi superior no PD em relação ao PC em amostras coletadas apenas 30 dias após a realização dos preparos de solo, corroborando os resultados do presente trabalho.

Em trabalho para avaliar as relações entre adubação com sulfato de amônio e a imobilização de enxofre no solo rizosférico nas culturas de nabo e cevada, tendo campo nativo como referência, Vong et al. (2004) observaram que a atividade da enzima arilsulfatase foi superior no sistema referencial, em relação às culturas, ocorrendo o mesmo com a imobilização do enxofre. Nessa pesquisa também foi identificado que o CN possuía maior teor de formas lábeis de carbono, fato este que, segundo os autores, correlaciona-se com a biomassa microbiana. Sendo assim, a imobilização mais intensa de enxofre, em função da maior BM no CN, diminuiu a disponibilidade do nutriente na solução do solo, estimulando a produção da enzima arilsulfatase pela microbiota estimulada pelo nitrogênio e enxofre da adubação. Estes resultados confirmam os obtidos no presente trabalho, referentes à capacidade de sistemas como o PD e o CN, que favorecem o acúmulo de MO do solo, em estimular a microbiota do solo e, em conseqüência, a atividade de enzimas como a arilsulfatase.

Em relação aos sistemas de culturas, a atividade da enzima arilsulfatase apresentou diferenças mais evidentes na primeira amostragem. No contraste PD rot x PD pou/suc a atividade da enzima no sistema com rotação

de culturas foi inferior à do grupo que envolvia pousio e sucessão de culturas. Enquanto no mesmo contraste, porém em PC, a atividade da arilsulfatase foi 100% superior na rotação de culturas, resultado também obtido na segunda época de amostragem.

O contraste PDpou X PDSuc apresentou maior atividade da enzima para o sistema pousio na primeira amostragem. No entanto, nas coletas seguintes não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Já no PC, este contraste apresentou diferença significativa na última amostragem, com atividade mais elevada também no tratamento com pousio.

4.3.4 Atividade da enzima urease

Na análise da atividade da enzima urease no contraste PC x CN/PD foram observadas diferenças significativas nas quatro épocas de avaliação (Tabela 13), sendo que a atividade da enzima sempre foi superior no grupo CN/PD (Tabela 12). Foi observado o mesmo comportamento quando o sistema referencial não foi levado em conta, isto é, quando a comparação foi realizada apenas entre os sistemas PC e PD. Em todas as amostragens, a atividade da urease foi superior no PD. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Vand Den Bosshe et al. (2008), em trabalho que avaliou os impactos gerados por diferentes sistemas de preparo em diferentes solos. Neste trabalho os autores observaram que a atividade da urease foi superior sempre entre 50 a 100% no PD em relação a PC, nos três locais estudados. Esse resultado, naquele estudo, foi atribuído aos teores superiores de C em PD, o que estimularia a atividade microbiana do solo. De forma semelhante, Roldán et al. (2003) observaram que a atividade da urease foi superior no PD em relação ao PC. Além disso, os autores avaliaram o efeito da cobertura do solo sobre esta

enzima no PD, verificando que quando 66% do solo era coberto por resíduos vegetais, a atividade da urease foi cerca de 100% superior em relação àquela obtida no solo sem cobertura. Este resultado, segundo os autores, aliado à avaliação dos teores de carbono orgânico dos solos estudados, indica que a atividade da urease está ligada à MO do solo, e portanto, aos sistemas de manejo que favorecem o seu acúmulo, como o PD e CN.

Tabela 12. Médias dos grupos avaliados nos contraste ortogonais para valores de atividade da enzima urease ($\text{mg N-NH}_4 \text{ kg solo}^{-1} \text{ 2h}^{-1}$). (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Grupos	Épocas			
	1	2	3	4
CN	85,4	64,7	76,7	78,8
PD	134,4	86,5	65,0	77,6
PC	35,0	65,0	49,6	55,6
CN/PD	122,2	81,1	67,9	78,7
PD rot	145,0	85,4	89,1	53,8
PD pou	140,6	84,0	53,1	70,4
PD suc	117,7	90,2	52,9	58,7
PD pou/suc	82,9	73,7	52,2	71,8
PC rot	25,3	63,3	51,3	53,8
PC suc	42,1	65,3	46,6	58,7
PC pou	37,6	66,3	51,1	54,2
PC pou/suc	39,9	65,8	48,8	56,4

Tabela 13. Contrastes ortogonais para sistemas de preparo e de culturas, em função da atividade da enzima urease. (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Contrastes	Épocas			
	1	2	3	4
PC X CN/PD	*	*	*	*
PD X PC	*	*	*	*
CN X PD	*	*	*	ns
PD rot X PD pou/suce	ns	ns	ns	ns
PDpou X PDsuc	ns	ns	ns	ns
PCrot X PCsuc/pou	ns	ns	ns	ns
PCpou X PCsuc	ns	ns	ns	ns

* Diferença significativa a 5%

* ns: diferença não significativa

Quando a comparação foi realizada entre o CN e o PD, foi observado que nas duas primeiras épocas de amostragens, a atividade da urease foi superior no PD, porém, na terceira época de avaliação, o resultado inverteu-se, ocorrendo maior atividade enzimática no sistema referência, enquanto na última determinação, não foi observada diferença significativa entre os dois sistemas. Este resultado demonstra, de forma geral, que o preparo PD assemelha-se com o CN, indicando que os dois sistemas possuem comportamentos semelhantes no ciclo do N, no tocante ao processo de mineralização deste nutriente no solo. Estes resultados são corroborados por trabalho de Roldan et al. (2005b), no qual compararam-se sistemas de preparo de solo com um sistema natural. Os autores observaram que a atividade da enzima urease na profundidade de 0 a 5 cm no CN foi superior ao PC, porém não diferiu significativamente do PD.

Em relação aos sistemas de culturas, em nenhuma das avaliações foi percebida alguma diferença significativa entre os tratamentos em nenhuma das épocas. De forma semelhante, Conti et al. (1998), avaliando o efeito da

rotação milho-soja em relação à sucessão milho-milho em PD na Argentina, constataram que a atividade da urease nestes dois casos não diferiu. Izquierdo et al. (2003) observou que o emprego de rotação de culturas (mandioca/feijão/tomate/espinafre) proporcionou a redução da atividade da urease em relação às áreas de monoculturas com pastagem composta por gramínea tropical e forrageira herbácea.

Dick (1984) avaliou o efeito de sistemas de culturas sobre indicadores bioquímicos de qualidade do solo. Neste trabalho, o autor utilizou os sistemas milho-milho, milho-soja e milho-aveia-alfafa, em dois solos diferentes. Foi observado que na rotação que empregava a alfafa, todos os indicadores, inclusive a atividade da enzima urease, foram superiores independentemente do solo avaliado. Porém, nos outros dois sistemas, a atividade da urease variou de acordo como tipo de solo, de maneira que em um tipo a atividade da enzima na sucessão com milho foi maior, enquanto em outro, a rotação que incluía soja foi superior. De forma semelhante, Klose & Tabatabai (2000) avaliaram a atividade da urease em sistemas de culturas em duas localidades, observaram numa delas que entre a sucessão milho-milho e milho-soja não houve diferenças significativas. Porém, quando a alfafa foi adicionada aos sistemas, a atividade da enzima foi superior. Enquanto no segundo local, em nenhum dos sistemas de culturas avaliados foram identificadas diferenças.

Observa-se pelos resultados referentes à atividade da enzima urease no presente trabalho, juntamente com os da literatura, que há variação dos efeitos provocados pelos sistemas de culturas, indicando que estes geram

impactos ao solo não tão nítidos quanto aqueles observados nas comparações entre sistemas de preparo.

4.4 Índice Integralizador dos Parâmetros

O índice utilizado em trabalho de Hinojosa et al. (2004), para avaliar parâmetros microbiológicos e bioquímicos em solos contaminados com metais pesados, tem como objetivo fornecer uma visão global dos diferentes parâmetros microbiológicos. É considerada apenas a grandeza numérica de cada indicador, de forma que valores de BM e atividade respiratória, por exemplo, que normalmente são superiores numericamente aos obtidos nas determinações de atividade de enzimas, acabam por ter maior influência no resultado. Porém, esta ferramenta possibilita uma melhor compreensão do conjunto de indicadores, os quais, quando avaliados de forma isolada, dificultam a análise dos efeitos provocados, no caso deste trabalho, pelos diferentes tipos de preparos de solo.

No presente trabalho, foram utilizados seis parâmetros bioquímicos para a avaliação da qualidade de solo, sendo dois gerais (BM e respiração) e quatro específicos aos ciclos dos elementos N, P, S e C (atividade de enzimas), o que é uma quantidade relativamente representativa, tendo em vista que, segundo Trasar-Cepeda et al. (2008), uma das razões para a obtenção de resultados discrepantes entre diferentes pesquisas em qualidade de solo, é o fato de que, na maioria destes estudos, não são usados mais do que três ou quatro indicadores.

A Tabela 14 apresenta a integralização dos resultados dos seis indicadores microbiológicos utilizados no presente trabalho. Percebe-se que,

de maneira geral, os índices obtidos corroboram o comportamento isolado de cada parâmetro. O sistema referencial não apresenta diferenças significativas na primeira e segunda amostragem, porém, nas duas últimas, o CN foi superior ao PD. Em relação ao PC, em todas as avaliações ele foi significativamente inferior aos demais sistemas de manejo.

Tabela 14. Índice integralizador dos parâmetros microbiológicos nos sistemas de manejo nas quatro épocas de amostragem (PD= plantio direto, PC= preparo convencional e CN= campo nativo).

Preparo de solo	Época							
	1		2		3		4	
CN	197,0	a	123,3	a	213,7	a	167,3	a
PD	217,7	a	145,0	a	169,3	b	146,0	b
PC	97,3	b	96,7	b	120,3	c	87,3	c

Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Estes resultados mostram um comportamento semelhante entre o CN e o PD, enquanto o PC nitidamente demonstra uma defasagem no conjunto dos indicadores avaliados. Entretanto, as diferenças entre CN e PD nas duas primeiras e nas duas últimas avaliações podem sugerir que, tendo em vista que a instalação do experimento foi realizada em uma área de solo que nunca havia sido utilizada para a agricultura, num primeiro momento o PD iniciou um processo leve de degradação, não perceptível pelos indicadores. Porém, já a partir da terceira avaliação, esta diminuição de qualidade tornou-se sensível. De forma semelhante, García-Ruiz et al. (2008), utilizando o mesmo índice em trabalho que comparava sistema orgânico e convencional de produção de olivas na Espanha, através da determinação da atividade de enzimas do solo, observou que a expressão matemática foi eficiente em distinguir os dois

maneios, que se diferiam principalmente pela menor movimentação de solo no cultivo orgânico durante a condução dos olivais.

No PC, a perturbação condicionada por este sistema foi identificada desde a primeira avaliação, isto é, seis anos após a instalação do experimento, indicando que provavelmente o processo de degradação do solo já poderia ter sido observado em anos anteriores.

4.5 Diversidade Funcional

O índice de diversidade de Shannon foi aplicado sobre os dados das leituras de absorvância para cada fonte de carbono em relação ao total das mesmas. Não foram identificadas diferenças significativas para os sistemas de manejo, como mostra a Tabela 15. Isto se deve ao fato de que as reações positivas, obtidas a partir do índice de desenvolvimento da cor, demonstraram que todos os tratamentos utilizaram quantidades semelhantes de fontes de carbono. Porém, houve diferenças nos tipos de fontes utilizadas, indicando diferenciação funcional das comunidades microbianas entre os tratamentos. Comportamento semelhante foi observado em estudo de Sall et al. (2006), que avaliou a capacidade da microbiota de solo sob pousio de 21 anos e de 4 anos de cultivo após 17 anos sem atividade agrícola em degradar 21 fontes de carbono. Naquele trabalho, os autores observaram que o tratamento sob pousio apresentou maior capacidade de metabolizar os substratos fornecidos, indicando uma maior funcionalidade da biomassa microbiana.

Tabela 15. Índice de diversidade de Shannon para diversidade funcional da comunidade microbiana do solo em diferentes sistemas de manejo (PD= plantio direto, PC= preparo convencional, Suc.= sucessão de culturas, Pou.= Pousio, Rot.= rotação de cultura e CN= campo nativo).

Sistema	Índice de Shannon
PD Suc	7.83 a
PC Suc	7.82 a
CN	7.80 a
PCRot	7.79 a
PD Pous	7.76 a
PD Rot	7.70 a
PC Os	7.68 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade

Embora o índice de Shannon tenha sido semelhante, houve diferenças quanto ao tipo de substrato utilizado pela comunidade microbiana em cada tratamento. Estas diferenças foram detectadas na análise multivariada, como é observado na Figura 1.

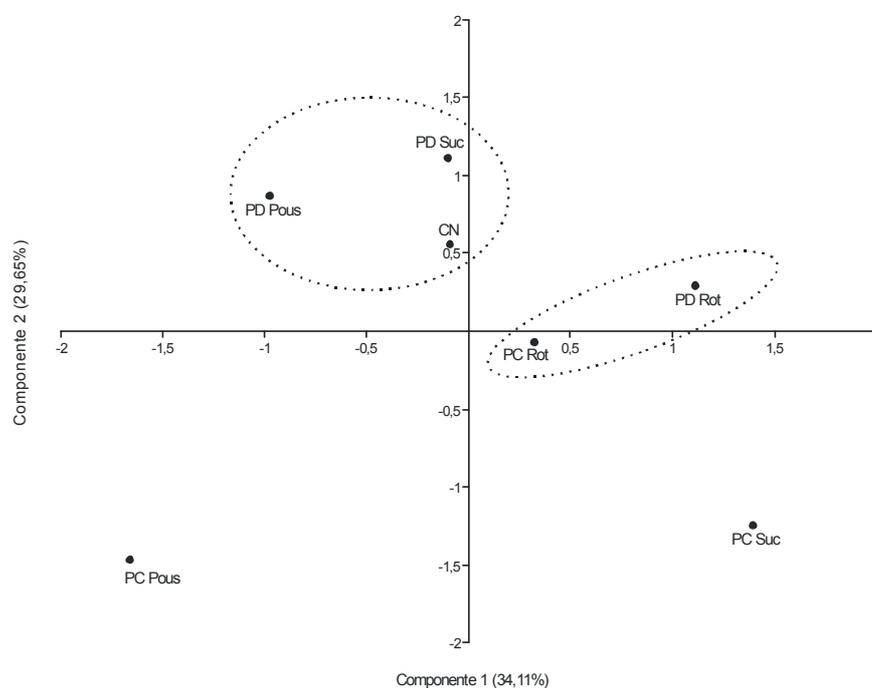


Figura 1. Componente principal relacionando os manejos com padrão de utilização de fontes de carbono (PD = plantio direto, PC = preparo convencional, Suc. = sucessão de culturas, Pou. = Pousio, Rot. = rotação de cultura e CN = campo nativo).

A variabilidade obtida na análise multivariada foi explicada em 34,11% e 29,56% pelos componentes principais 1 e 2, respectivamente, perfazendo um total de 63,76% de variação da utilização das fontes de carbono. O gráfico do componente principal mostra a formação de dois grupos com comportamentos metabólicos distintos. Um grupo reúne o campo nativo (condição preservada do solo) juntamente com o plantio direto nos sistemas de cultivo sucessão de culturas e pousio. Por este resultado, o plantio direto apresenta tendência a assemelhar-se com o campo nativo, exceto quando em rotação de culturas, que neste caso, juntamente com o sistema convencional, formou um outro grupo, o que pode estar determinando uma influência mais intensa do fator sistema de culturas sobre o tipo de preparo de solo, em relação ao padrão metabólico da comunidade microbiana nestes sistemas. Os resultados parecem indicar que os sistemas que teoricamente propiciam maior acúmulo de carbono (plantio direto) e diversidade de espécies vegetais (rotação) se aproximaram mais do campo nativo, no que se refere a capacidade da fração culturável da microbiota do solo em utilizar diferentes fontes de carbono.

Em trabalho de Bending et al. (2002), utilizando *BIOLOG* para avaliar o efeito de diferentes solos e de resíduos orgânicos adicionados ao solo na diversidade funcional da comunidade microbiana, os autores concluíram que a quantidade de carbono no solo influencia mais o comportamento fisiológico dos microrganismos do que a qualidade do resíduo e o tipo de solo. Os autores também observaram que a resposta da diversidade metabólica é marcadamente instantânea, modificando-se com o tempo em função da decomposição dos substratos disponíveis no solo, ao contrário da

determinação da atividade de enzimas, que, segundo os autores, fornece um histórico das perturbações ocorridas no solo.

Por este mesmo raciocínio, os tratamentos que envolveram o PC com os sistemas pousio e sucessão de culturas foram os que ficaram mais distantes do campo nativo em termos de utilização de fontes de carbono. Isto é, são aqueles em que há o menor aporte de resíduos ao sistema, menor diversidade de espécies e onde se pratica o revolvimento do solo.

Segundo Zack (1994), a cobertura vegetal e o manejo de solo em sistemas agrícolas vão determinar a estrutura funcional da microbiota do solo, afirmação que corrobora o resultado desse trabalho, tendo em vista a tendência de sistemas que possibilitam condições semelhantes à condição nativa do solo apresentaram comportamento fisiológico da microbiota coincidentes.

A avaliação da diversidade funcional da microbiota do solo, no presente trabalho, através da análise multivariada, demonstrou ser uma ferramenta com potencial para avaliar simultaneamente diferentes preparos do solo e sistemas de culturas.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e considerando as condições em que o experimento foi conduzido, pode-se concluir que:

convicente

1- As determinações da biomassa microbiana e da atividade respiratória, juntamente com a análise da atividade das enzimas fosfatase ácida, β -glucosidase, urease e arilsulfatase apresentaram sensibilidade para diferenciar os preparos de solo PD e PC, além do sistema referencial CN.

2- Os resultados obtidos a partir dos parâmetros bioquímicos utilizados nesse trabalho indicam que o sistema de preparo que utiliza baixa movimentação de solo (PD) foi o que mais se assemelhou com o referencial (CN), podendo-se inferir a partir disso que este preparo foi capaz de manter a qualidade original do solo.

3- Os sistemas de culturas utilizados no presente trabalho não promoveram impactos que fossem capazes de ser determinados por nenhum dos indicadores bioquímicos utilizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBOYE, M.K.A.; IWUAFOR, E.N.O.; AGBENIN, J.O. The effects of crop rotation and nitrogen fertilization on soil chemical and microbial properties in Guinea Savana Alfisol of Nigéria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.281, p.97-107, 2006.

ACTON, D.F.; PADBURY, G.A. A conceptual framework for soil quality assessment and monitoring. in: ACTON, O.F. (Ed.). **A Program to Assess and Monitor Soil Quality in Canada: Soil Quality Evaluation Program Summary**. Ottawa: Centre for Land and Biological Resources Research, 1993. p. 2-7.

ALBIACH, R.; CANET, R.; POMARES, F.; INGELMO, F. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 75, p. 43-48, 2000.

ANGERS, D.A.; BISSONNETTE, A.; LÉGÈRE, A.; SAMSON, N. Microbial and biochemical changes induced by rotation and tillage in a soil under barley production. **Canadian journal of soil Science**, Ottawa, v.73, p.39-50, 1992.

ALVAREZ, R. Soil organic carbon, microbial biomass and CO₂-C production from tree tillage systems. **Soil and Tillage Research**, New York, v.31, n.1, p.17-28, 1995.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**. Menlo Park:Cummings Publishing, 1998. 693p.

AVIDANO, L.; GAMARELO, E.; COSSA, P.G.; CARRARO, E. Characterization of soil health in a italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. **Applied soil ecology**, Amsterdam, v.30, p.21-33, 2005.

BANDICK, A.K.; DICK, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.31, p.1471-1479, 1999.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.22, p.641-649, 1997.

BAYER, C; MIELNICZUK, J. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de cultura. **Revista brasileira de ciência do solo**, Viçosa, v.21, p.235-239, 1997.

BENDING, G.D.; TURNER, M.K.; JONES, J.E. Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.34, p.1073-1082, 2002.

BEZDICEK, D.F.; PAPENDICK, R.I.; LAL, R. Importance of soil quality to health and sustainable land management In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (eds.) **Methods for assessing soil quality**. Madison: SSSA, 1996. p.1-8. (SSSA Special Publication, 49).

BRADFORD, J.M.; PETERSON, G.A. Conservation Tillage, In: SUMNER, M.E. (Ed). **Handbook of Soil Science**. Boca Raton: CRC Press, 2000. P.247-266.

BRADLEY, P. ;DEGENS, P. Microbial functional diversity can be influenced by the addition of simple organic substrates to soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford , v. 30, p. 1981-1988. 1998a.

BRADLEY, P. ; DEGENS, P. Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 30, p.1989-2000, 1998b.

BREMPPONG, A.S.; GANTNER, S.; ADIKU, S.G.K.; ARCHER, G.; EDUSEI, V.; TIEDJE, J.M. Changes in the biodiversity of microbial populations in tropical soils under different fallow treatments. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.40, p.2811–2818, 2008.

CAMPBELL, C.D.; GRAYSTON, J.; HIRST, D.J. Use for rhizosphere carbon sources in sole carbon source test to discriminate soil microbial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.30, p.33-41, 1997.

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**, New York , v.68, p.23–30, 2002.

CARTER, M.R. Microbial biomass as an index for tillage-induced changes in soil biological properties. **Soil and Tillage Research**, New York, v.7, p.29-40, 1986.

CARTER, M.R. The influence of tillage on the proportion of organic carbon and nitrogen in the microbial biomass of medium-textured soils in a humid climate. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.11, p.135-139, 1991

CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Campinas, v. 14, p.133-142, 1990.

CHANDER, K.; GOYAL, S.; MUNDRA, M.C.; KAPOOR, K.K. Organic matter, microbial biomass and enzyme activity of soils under different crop rotations in the tropics. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 24, p.306-310, 1997.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO RS/SC. **Recomendação de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre, 2004. 400 p.

CONTI, M.E.; PALMA, R.M.; ARRIGO, N.M.; ZOURARAKIS, D.P.; CAPPELLETTI, C.A. 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**, New York, v.49, p.267-270, 1998.

COSTANTINI, A.; COSENTINO, I.; SEGAT, A. Influence of tillage systems on biological properties of a Typic Argiudoll soil under continuous maize in central Argentina. **Soil and Tillage Research**, New York, v.38, p. 265-271, 1996.

DENG, S.P.; TABATABAI, M.A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. phosphatases and arylsulphatase. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.24, p.141-146, 1997.

DERRY, A.M.; STADDON, W.J.; TREVORS, J.T. Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole-carbon-source-utilization. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.14, p.571-578, 1998.

DICK, R.P. Influence of long-term tillage and crop rotation combinations on soil enzyme activities. **Soil Science Society of America**, Stanford, v.48, p.569-574, 1984.

DICK, R.P. A review: long term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.40, p.25-36, 1992.

DICK, R.P.; BREACKWELL, D.P.; TURCO, R.F. 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, 1996. p.247-271. (SSSA Special Publication, 49).

DICK, R.P.; SANDOR, J.A., EASH, N.S. Soil enzyme activities after 1500 years of terraced agriculture in the Colca Valley, Peru. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.50, p.123-131, 1994.

DORAN, J. W. Soil quality and sustainability. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., Rio de Janeiro, 1997. **Anais...** Rio de Janeiro, 1997. CD-Rom.

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

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa, 2006. 306p.

FRANZLUEBBERS, A.J.; HONS, F.M.; ZUBERER, D.A. In situ and potential CO₂ evolution from a Fluventic Ustochrept in southcentral Texas as affected by

tillage and cropping intensity. **Soil and Tillage Research**, New York, v.47, p.303-308, 1998.

FRIEDEL, J.K.; MUNCH, J.C.; FISCHER, W.R. Soil microbial properties and the assessment of available soil organic matter in a haplic luvisol after several years of different cultivation and crop rotation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.28, p.479–488, 1996.

GARCIA-RUIZ, R.; OCHOA, V.; HINOJOSA, M.B. ; CARREIRA, J.A. Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. **Soil biology and biochemistry**, Elmsford, v. 40, p.2137–2145, 2008.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v.57, p. 2351–2359, 1991.

GARLAND, J.L. Patterns of potencial C source utilization by rizosphere communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.28, p.223-230, 1996.

GIL-SOTRES, F.; CEPEDA-TRASAR, C.; LEIRÓS, M.C.; SEOANE, S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.37, p.877-887, 2005.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. **Past**, versão 1.18. Copyright Hammer e Harper. Disponível em: <http://folk.uio.no/ohammer/past>, 2003.

HARCH, B.D.; CORREL, R.L.; MEECH, W.; KIRKBY, C.A; PANKHURST, C.E. Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilisation data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam , v.30, p.91-101, 1997.

HAYNES, R.J. Size and activity of the soil microbial biomass under grass and arable management. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.30, p.210-216, 1999.

HINOJOSA, M.B.; GARCÍA-RUIZ, R.; VIÑEGLA, B.; CARREIRA, J.A. Microbiological rates and enzyme activities as indicators of functionality in soils affected by the Aznalcóllar toxic spill. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.36, p.1637–1644, 2004.

HORWATH, et al. Defining a realistic control for the chloroform fumigation-incubation method using microscopic counting and ¹⁴C-substrates. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v.76, p.459-467, 1996.

IBEKWE, A.M.; KENNEDY.A.C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and

greenhouse conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.26, p.151–163, 1998.

IZQUIERDO, I.; CARAVACA, F.; ALGUACIL, M.M.; ROLDÁN, A. Changes in physical and biological soil quality indicators in a tropical crop system (Havana, Cuba) in response to different agroecological management practices. **Environmental Management**, New York, v.32, p.639-645, 2003.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil – V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.8, n.3, p. 209-213, 1976.

JENKINSON, D.S.; LADD, J.M. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. in: PAUL, E.A.; LADD, J.M (Ed.). **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1981. v.5, p. 415-571.

JENKINSON, D. S. Studies on the decomposition of plant material in soil II. Partial sterilization of soil and the soil biomass. **Journal of Soil Science**, Oxford, v.17, p.280-302, 1966.

KANDELER, E.; EDER, G. Effect of cattle slurry in grassland on microbial biomass and on activities of various enzymes. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.16, p.249–254, 1993.

KANDELER, E.; TSCHERKO, D.; SPIEGEL, H. Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralisation and enzyme activities of a Chernozem under different tillage management. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.24, p.343-351, 1999.

KLOSE, S.; TABATABAI, M.A. Urease activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.31, p.191-199, 2000.

LOGOMARSINO, A.; MOSCATELLI, M.C.; DI TIZIO, A.; MACINELLI, R.; GRGO, S.; MARINARI, S. Soil biochemical indicators as a tool to assess the short-term impact of agricultural management on changes in organic C in a mediterranean environment. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v.3, p.518-527, 2009.

LÄHDESMÄK, P.; PIISPANEN, R. Soil enzymology: role of protective colloid systems in the preservation of exoenzyme activities in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.24, p.1173-1177, 1995.

LEE, J. J.; PHILLIPS, D. L.; LIU, R. The effect of trends in tillage practices on erosion and carbon content of soils in the US corn belt. **Water, Air, and Soil Pollution**, Amsterdam, v.70, p.389-401, 1993.

LI, Z.; WU, X.; CHEN, B. Changes in transformation of soil organic C and functional diversity of soil microbial community under different land uses **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v.6, p.1235-1245, 2007.

MALUF, J.R.T.; CAIAFFO, M.R.R. Regiões ecoclimáticas do Estado do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 12.; REUNIÃO LATINO-AMERICANA DE AGROMETEOROLOGIA, 3., 2001, Fortaleza. **Anais...: Água e agrometeorologia no novo milênio.** Fortaleza, 2001. p.151-152.

MATSUOKA, M.; MENDES, I.C.; LOUREIRO, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.2, p.425-433, 2003.

MELERO, S.; VANDERLINDENA, K.; RUIZA, J.C.; MADEJONB, E. Long-term effect on soil biochemical status of a Vertisol under conservation tillage system in semi-arid Mediterranean conditions. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v.44, p.437–442, 2008.

MERILES, J.M.; GIL, S.V.; CONFORTO, C.; FIGONI, G.; LOVERA, E.; MARCH, G.J.; GUZMÁN, C.A. Soil Microbial communities under different soybean cropping systems: characterisation of microbial populations dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acids profiles. **Soil and Tillage Research**, New York, no prelo, 2008.

MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. (Eds) **Fundamentos da matéria orgânica dos solos**. Porto Alegre: Gênese, 1999. p 1-9.

MIJANGOS, I.; PÉREZ, R.; ALBIZU, I.; GARBISU, C. Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. **Enzyme and microbial technology**, Amsterdam, v.40, p. 100-106, 2006

MILLER, M.; DICK, R.P. Thermal stability and activities of soil enzymes as influenced by crop rotations. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.27, p.1161-1166, 1995.

MINA, B.L.; SASHA, S.; KUMAR, N.; SRIVASTVA, GUPTA, H.S. Changes in soil nutrient content and enzymatic activity under conventional and zero-tillage practices in a Indian sandy clay loam soil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht , v.88, p.273-281, 2008.

MOORE, J.M.; KLOSE, S.; TABATABAI, M.A. Soil microbial biomass carbon and nitrogen as affected by cropping systems. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.31, p.200–210, 2000.

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

O'DONNELL, A. G.; GÖRES, H. E. 16S rDNA methods in soil microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 225-229, 1999.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego : Academic press, 1996. 339p.

PARTON, W.J.; SCHIMEL, D.S.; COLE, C.V.; OJIMA, D.S. Analysis of factors controlling soil organic matter levels in great plains grassland. **Soil Science Society of América**, Stanford, v.51, p.1173-1179, 1987.

POWLSON, D.S. The soli microbial biomass: before, beyond and back. in: RITZ, K et al. (Ed.). **Beyond the Biomass**. Chichester: John Wiley & Sons, 1994. p 3-22

POLSON, D.S.; BROOKES, P.C. Measurement of soil microbial biomass provides na early indication of changes in total soil organic mater due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.19, n.2, p.159-164, 1987.

RANGEL, O.J.P; SILVA, C.A. Estoques de carbono e nitrogênio e frações orgânicas de latossolo submetido a diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista brasileira de ciência do solo**, Viçosa, v.31, p.1609-1623. 2007.

REEVES, D.W. The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. **Soil and Tillage Ressearch**, New York , v.43, p.131–167, 1997.

REINERT, D.J.; ALBUQUERQUE, J.A.; REICHERT, M.; AITA, C.; ANDRADA, M.M.C. Limites críticos de densidade do solo para o crescimento de raízes de plantas de cobertura em Argissolo vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, p.1805-1816, 2008.

ROBINSON, C.A.; CRUSE, R.M.; GHAFARZADEH, M. Cropping systems and nitrogen effects on mollisol organic carbon. **Soil Science Society of America**, Stanford, v.60, p.264–269, 1996.

ROLDÁN, A.; CARAVACA, F.; HERNÁNDEZ; GARCÍA, C.;SÁNCHEZ-BRITO, C. VELÁSQUEZ, M. TISCAREÑO, M. No-tillage, crop residue additions, and legume cover cropping effects on soil quality characteristics under maize in Patzcuaro watershed (Mexico). **Soil and Tillage research**, New York, v.72, p. 65-73, 2003.

ROLDÁN, A.; SALINAS-GARCÍA, J.R.; ALGUACIL, M.M.; CARAVACA, F. Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.30, p.11–20, 2005a.

ROLDÁN, A.; SALINAS-GARCIA, J.R.; ALGUACIL, M.M.; DÍAZ, E.; CARAVACA, F. Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillages practices in sorghum cultivation under subtropical conditions. **Geoderma**, Amsterdam, v.128, p.178-185, 2005b.

ROLDÁN, A.; SALINAS-GARCÍA, J.R.; ALGUACIL, M.M.; CARAVACA, F. Soil sustainability indicators following conservation tillage practices under Subtropical maize and bean crops. **Soil and Tillage Research**, New York, v.93, p.273–282, 2007.

SALL, N.S.; MASSE, D.; NDOUR, N.Y.B.; CHOTTE, J. Does cropping modify the decomposition function and the diversity of the soil microbial community of tropical fallow soil? **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.31, p.211-219, 2006.

STEFANOWICZ, A. The biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v.15, p.669-676, 2006.

TABATABAI, M.A. Soil enzymes. In: WEAVER, R.W.; SCOTT, A.; BOTTOMELEY, P.J.(Eds.) **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. Part 2, p.778-835. (Special Publication, 5).

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, J.S. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre : Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS, 1995. 174p.(Boletim Técnico de Solos, 5).

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.782–787, 1990.

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**, Viçosa, v. 31, p.1173-1184, 2007.

TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M.C.; SEOANE, S.; GIL-SOTRES, F. Biochemical properties of soils under crop rotation. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.39, p.133-143, 2008.

VAN DEN BOSSCHE, A.; DE BOLLE, S.; DE NEVE, S.; HOFMAN, G. Effect of tillage intensity on N mineralization of different crop residues in a temperate climate. **Soil and Tillage Research**, New York, no prelo, 2008.

VAN ELSAS, J. D.; GARBEVA, P. ; SALLES, J. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. **Biodegradation**, Dordrecht, v.13, p.29-40, 2002.

VARGAS, L.K. O papel da microbiologia no estudo nos estudos de qualidade do solo. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.8, p.57-67,2003.

VARGAS, L. K.; SHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N mineral de um Podzólico Vermelho Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p.35-42, 2000.

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

VONG, P.C.; DEDOURGE, O.; GUCKERT, A. Immobilization and mobilization of labelled sulphur in relation to soil arylsulphatase activity in rizosphere soil of field-grown rape, barley and fallow. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.258, p.227-239, 2004.

WARDLE, D.A.; GILER, K.E. The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.28, p. 1549-1554, 1996.

ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.26, p.1101–1108, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE 01.

Solução de **p-nitrofenol- β -D-glucosidase 0,05M (PNG)**: Foi realizada dissolução de 0,654g de PNG em cerca de 40 mL de MUB pH 6,0 e diluído para 50 mL com o mesmo tampão. A solução foi estocada sob refrigeração e utilizada num período máximo de 10 dias.

APÊNDICE 02.

Tampão universal modificado (MUB), pH 6: O preparo do tampão foi realizado a partir da produção de uma solução estoque de **tampão universal modificado (MUB)** o qual era preparado através da dissolução de 12,1g de tris (THAM), 11,6g de ácido maleico, 14,0g de ácido cítrico e 6,3g de ácido bórico em 488ml de hidróxido de sódio 1M e posteriormente diluída a solução para 1 L com água e acondicionado sob refrigeração. Para o preparo do tampão MUB a pH 6,0, foi colocado 200 mL de solução estoque de MUB em um becker de 500mL contendo agitador magnético. A solução foi titulada a pH 6,0 com ácido clorídrico 1M, e posteriormente transferida para um frasco volumétrico de 1L e ajustado o volume para 1 L com água.

APÊNDICE 03.

Solução extratora THAM, 0,1M, pH 12: Foi realizada a dissolução de 12,2g de THAM em cerca de 800 mL de água, e ajustado o pH para 12 através de titulação com NaOH 0,5 M e posteriormente diluído para 1 L com água.

APÊNDICE 04.

Solução Padrão de p-nitrofenol: Era procedida a dissolução de 1,0 g de p-nitrofenol em cerca de 700 mL de água e em seguida a solução foi diluída para 1 L com água. A solução era mantida sob refrigeração.

APÊNDICE 05.

Solução de p-nitrofenil-fosfato 0,05M (PNF): Foi realizada a dissolução de 0,840g de PNP em cerca de 40 mL de MUB pH 6,5 e em seguida a solução era diluída para 50 mL com o mesmo tampão. O substrato era mantido sob refrigeração por no máximo 10 dias.

APÊNDICE 06.

Tampão universal modificado, pH 6,5: Foi colocado 200 mL de solução estoque de MUB em um becker de 500mL contendo agitador magnético. Em seguida, a solução foi titulada a pH 6,5 com ácido clorídrico 1M, e transferida para um frasco volumétrico com o volume ajustado para 1 L com água.

APÊNDICE 07.

Solução de p-nitrofenil-sulfato (PNS), 0,05 M: Foi realizada a dissolução de 0,614g de PNS em cerca de 40 mL de tampão acetato pH 5,8 e

em seguida a solução era diluída para 50 mL com o mesmo tampão. O substrato era mantido sob refrigeração por no máximo 10 dias.

APÊNDICE 08.

Solução tampão acetato de sódio, 0,5 M, pH 5,8: Era realizada a dissolução de 68g de acetato de sódio em cerca de 700mL de água, adicionando-se em seguida 1,7 mL de ácido acético glacial (99%), e então o volume era diluído 1L.

APÊNDICE 09.

Tampão Tris (hidroximetil) aminometano (THAM), 0,05 M, pH 9: Era procedida a dissolução de 6,1 g de THAM em cerca de 700 mL de água, titulando-se em seguida para pH 9,0 com $\text{H}_2\text{SO}_4 \sim 0,2 \text{ M}$ e posteriormente o volume era ajustado para 1L com água.

APÊNDICE 10.

Solução de cloreto de potássio – sulfato de prata (KCl 2,5 M – Ag_2SO_4 100 ppm): Foi dissolvido 100 mg de Ag_2SO_4 em cerca de 700 mL de água, em seguida acrescentado 188 g de KCl nesta solução (a dissolução deve ser feita sempre nesta ordem, sob pena de não ocorrer diluição do Ag_2SO_4), e então era realizada uma diluição para 1L com água. É recomendável armazenar a solução a 4°C e utiliza-la com esta temperatura, para aumentar a inibição da enzima pelo efeito térmico.