

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**  
**AGR99006 - DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Victória Dutra de Oliveira Tomás**  
**00287383**

**Metodologias associadas à saúde do solo**

**PORTO ALEGRE, março de 2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**  
**AGR99006 - DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Metodologias associadas à saúde do solo**

**Victória Dutra de Oliveira Tomás**  
**00287383**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do Grau de Engenheiro Agrônomo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Supervisor de Estágio: Professor Dr. Charles W. Rice

Orientador Acadêmico do Estágio: Professor Dr. Tales Tiecher

**COMISSÃO DE AVALIAÇÃO**

Prof. Sérgio Tomasini – Depto. de Horticultura e Silvicultura (Coordenador)

Prof. Clesio Gianello – Depto. de Solos

Prof. José Antônio Martinelli – Depto. Fitossanidade

Profa. Maite de Moraes Vieira – Depto. Zootecnia

Prof. Pedro Selbach – Depto. de Solos

Profa. Renata Pereira da Cruz – Depto. Plantas de Lavoura

Prof. Roberto Luis Weiler – Depto. Plantas Forrageiras e Agrometeorologia

PORTO ALEGRE, março de 2022

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Neide e Marcos, que nunca mediram esforços e sempre me incentivaram, nada do que sou e fiz seria possível sem vocês! Ao meu irmão pela paciência e por dividir a vida comigo.

Ao meu orientador, Tales Tiecher, por todo conhecimento transmitido e confiança, espero ter correspondido com teus esforços, é uma satisfação trabalhar contigo. Agradeço aos demais integrantes do IRGEB, em especial ao Luiz Gustavo Denardin e Lucas Aquino, que sempre se fizeram presentes e disponíveis para auxílio.

Ao meu supervisor de estágio, Charles Rice, que me mostrou um mundo de novas possibilidades. Aos membros do SMAL, Carlos Pires, Marcos Sarto, James Lin, Will Davis e Caroline Honorato, foi um prazer trabalhar com todos, vocês fizeram o Kansas parecer casa.

Aos amigos e futuros colegas de profissão, agradeço pela parceria e rede de apoio de anos.

Agradeço à UFRGS e todo corpo docente e de funcionários da Faculdade de Agronomia que comprovam diariamente a qualidade e excelência do ensino público brasileiro.

## RESUMO

O estágio curricular obrigatório foi realizado na Kansas State University (KSU), localizada no município de Manhattan, no estado do Kansas – Estados Unidos da América. Objetivou-se a busca pela pluralidade de experiências práticas, acadêmicas e culturais. Realizado sob supervisão do Dr. Charles Rice, as atividades desenvolvidas dentro do grupo de pesquisa Soil Microbial Agroecology Laboratory (SMAL) possuem diversas naturezas, variando entre análises de atributos químicos, físicos e microbiológicos do solo, coletas de solo manual e mecanizadas, adubação e condução de experimentos a campo além de encontros de promoção do desenvolvimento pessoal e acadêmico. Como frutos colhidos do período é plausível citar as diversas metodologias aprendidas assim como a apresentação de um trabalho em congresso internacional.

**Palavras-chave:** Saúde do solo; Microbiologia; Manejo conservacionista.

## LISTA DE FIGURAS

	Página	
<b>1</b>	<b>Secagem de amostras no N-EVAP</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Aparato para realização da cromatografia de silício</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Esquema ilustrativo da análise de ácido graxos de fosfolipídios</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Pipetagem durante análise de atividade enzimática extracelular</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>Esquema ilustrativo da análise de atividade enzimática extracelular</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>Esquema ilustrativo da análise de nitrogênio inorgânico</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>Esquema ilustrativo da análise de estabilidade de agregados em água</b>	<b>21</b>
<b>8</b>	<b>Organização de times para realização de coletas</b>	<b>22</b>
<b>9</b>	<b>Coleta manual de solo</b>	<b>23</b>
<b>10</b>	<b>Coleta mecanizada de solo</b>	<b>23</b>
<b>11</b>	<b>Dia de campo com exposição do experimento com plantas de cobertura</b>	<b>24</b>
<b>12</b>	<b>Distribuição manual de fertilizante orgânico</b>	<b>24</b>
<b>13</b>	<b>Auxílio em análises laboratoriais de alunos de pós-graduação</b>	<b>25</b>
<b>14</b>	<b>Efeito de plantas anuais e perenes na biomassa microbiana (MB), proporção de fungos: bactérias (F:B), fungos micorrizos arbusculares (AMF) e carbono orgânico total (TOC) na profundidade de 0-5 cm.</b>	<b>27</b>
<b>15</b>	<b>Efeito de plantas anuais e perenes na biomassa microbiana (MB), proporção de fungos: bactérias (F:B), fungos micorrizos arbusculares (AMF) e carbono orgânico total (TOC) na profundidade de 5-15 cm.</b>	<b>28</b>

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>7</b>
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>10</b>
<b>4. ATIVIDADES REALIZADAS</b>	<b>13</b>
4.1 Análises Microbiológicas	13
4.1.1 Ácidos Graxos de Fosfolipídios	13
4.1.2 Atividade Enzimática Extracelular	17
4.2 Nitrogênio Inorgânico	20
4.3 Estabilidade de Agregados em Água	21
4.4 Atividades em Campo	22
4.5 Oportunidades educacionais	25
<b>5. RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>26</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>29</b>
Referências Bibliográficas	30

## 1. INTRODUÇÃO

O estágio curricular obrigatório foi realizado na instituição Kansas State University (KSU), localizada no município de Manhattan, no estado do Kansas, Estados Unidos da América. O período de duração foi de 12 meses, tendo início em dezembro de 2019 e conclusão em dezembro de 2020, totalizando a carga horária de 950 horas, contudo apenas metade foi considerada com a finalidade de estágio obrigatório.

O estado do Kansas possui significativa liderança e influência na agricultura dos Estados Unidos da América, com destaque para cultivos de sorgo e trigo de inverno. Por natureza se classifica como um estado agrícola visto que 90% do seu território é dedicado a essa atividade (KANSASPEDIA, 2022). A pesquisa desenvolvida no período, foi realizada dentro da Faculdade de Agronomia da instituição, mais especificamente no Departamento de Solos e no grupo de pesquisa Soil Microbial Agroecology Laboratory (SMAL). A universidade em questão possui excelência no currículo agrícola, contando com corpo docente de destaque e atingindo sétimo lugar dentro do ranking de escolas estadunidenses (NICHE, 2022). A instituição possui grande influência na comunidade local e atividade agrícola do estado, contribuindo para o seu avanço com pesquisa e extensão.

A identificação com o tema do estudo desenvolvido advém do contato anterior realizado durante semestres de iniciação científica no Interdisciplinary Research Group of Environmental Biogeochemistry (IRGEB). Dessa forma o contato com estudantes e professores fez possível o suporte que culminou na oportunidade de estágio internacional, visando a experiência cultural, acadêmica e educacional desenvolvida no país norte americano.

Por conseguinte, o estágio objetivou a pluralidade de experiências práticas exercidas dentro do contexto acadêmico incluindo análises laboratoriais, participação em eventos locais e internacionais, reuniões para desenvolvimento de redação e organização de atividades do grupo de pesquisa, assim como experiências à campo como observação e condução de experimentos, preparo da área para dias de campo, coletas de solo, dados e material vegetal.

## 2. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO

Fundada em 1863, a Kansas State University possui seus valores direcionados a servir as necessidades da comunidade em que se insere, buscando promover progresso e melhorias no mundo por meio da educação e da pesquisa. A universidade com campus localizado na cidade de Manhattan, fomenta prosperidade para empreendimentos presentes no estado, contando com incentivos e investimentos advindos do setor público e privado. A missão da instituição inclui a busca pela permanência de jovens adultos no estado por meio da inovação, oportunidade e eficiência, algumas dessas iniciativas incluem: criação de novos empregos, investimentos interestaduais e internacionais, criação de novos negócios, globalização da indústria e das agências do governo.

A KSU trabalha diretamente com os produtores por meio do seu forte e efetivo programa de extensão rural, onde esforços interdisciplinares tornam possível a transformação, sustentação e adaptação do sistema de produção de alimentos. A instituição conta com quadro docente único com 1.205 membros e corpo estudantil com aproximadamente 21 mil alunos (KSU, 2021). O destaque individual da instituição é seu reconhecimento como laboratório do alimento do mundo, visto que soluciona problemas dentro do âmbito alimentício, contando com o fato de ser a única do mundo com laboratórios de agricultura com biossegurança de nível 3 (KSU, 2021) e instituição parceira localizada nas proximidades possuindo laboratório de ciências animais com biossegurança de nível 4. Esses diferentes níveis de segurança encontrados dentro e no entorno da universidade conferem aos cientistas um ambiente seguro para trabalhar com patógenos, sejam eles de perigo para plantas, animais ou humanos.

Apesar de estar localizada em uma cidade do interior do Kansas, possuindo população de 53 mil habitantes (WORLD POPULATION REVIEW, 2021), a universidade atrai diversos alunos de fora do estado e do país, sendo estudantes internacionais representativos de 7,4% do corpo estudantil (COLLEGE FACTUAL, 2018). No que se trata de formação de alunos, a KSU possui nove acudades entre as quais oferece mais de 250 cursos de graduação, 75 diferentes títulos para mestrado e 45 para doutorados (KSU, 2021). Além das dependências acadêmicas, a universidade conta com dependências esportivas, ginásio, academia e o Bill Snyder Family Stadium, estádio que



possui capacidade para 50.000 pessoas e é anfitrião para os diversos jogos que ocorrem durante a temporada de futebol americano.

A orientação do estágio realizado foi exercida pelo Professor Doutor Charles W. Rice, natural do estado de Illinois - EUA, formado em Geografia. Com mestrado em Ciência do Solo e doutorado em Microbiologia do Solo, iniciou sua carreira na KSU em 1988. Dr. Rice foi membro do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), cujo relatório foi premiado com Nobel da Paz no ano de 2007. Em 2011, Dr. Rice foi presidente da Soil Science Society of America (SSSA). Desde então participa em diversos outros cargos nas mais variadas instâncias governamentais e privadas relacionadas a ciência do solo e âmbitos gerais da agricultura.

Soil Microbial Agroecology Laboratory (SMAL) é um grupo de pesquisa com visão ecológica da microbiologia do solo, foi fundado e permanece sob direção do Dr. Rice. O grupo de pesquisa envolve alunos de graduação de variados currículos como agronomia, horticultura, biologia, geografia etc., e alunos de pós-graduação como mestrado, doutorado e pós-doutorado. Os objetivos centrais do grupo envolvem a compreensão das interconexões e funções desenvolvidas pela comunidade microbiológica do solo em sistemas agrícolas, assim como as aplicações e os impactos que esse conhecimento pode trazer para o manejo do sistema. O grupo na época possuía em adição ao Dr. Rice dois estudantes de mestrado, William Davis e James Lin, um estudante de doutorado, Carlos Pires, e um pesquisador pós-doutorado, Marcos Sarto.

O grupo de pesquisa conta com diversos experimentos e realiza análises com solos de vários locais do mundo, incluindo Brasil. Dentre os que estavam em condução durante o período de estágio vale citar: Soil Health Partnership (SHP), Saúde do solo ao longo do gradiente de precipitação do Kansas e Pivot Bio. O SHP demonstrou ser o principal projeto desenvolvido devido sua larga escala, envolvendo 16 estados e 200 fazendas além de englobar outros laboratórios dentro da instituição, como o de física do solo, o de química do solo e o laboratório especializado no cultivo do trigo. O projeto possuía como missão a promoção de práticas que contribuem para saúde do solo e o benefício econômico e ambiental (SHP, 2021). Atualmente extinto devido elevado custo operacional, o projeto envolveu diversos profissionais do mundo acadêmico, rural,

governamental, voluntariado e empresas privadas, criando uma rede de contatos para coleta e distribuição dos dados coletados facilitando o alcance dos resultados obtidos.

O experimento citado como “Saúde do solo ao longo do gradiente de precipitação do Kansas”, assim como anterior, já estava em desenvolvimento quando o estágio teve início. Contudo grande parte das análises foram realizadas no ano de 2020. O trabalho desenvolvido como requisito para o título de mestre de James Lin teve como direcionador o gradiente crescente de precipitação que ocorre no estado nas direções de oeste para leste. Dentro desse gradiente três locais foram definidos e tiveram seus parâmetros químicos, físicos e biológicos analisados e comparados com os tratamentos de campo nativo, plantio convencional e plantio direto. Esse estudo de grande complexidade envolveu análises de ácidos graxos de fosfolípidios, carbono orgânico do solo, nitrogênio inorgânico, nitrogênio mineralizado, teores de fósforo, potássio, pH do solo, atividade enzimática extracelular, respiração do solo, estabilidade de agregados, taxa de infiltração do solo e ainda comparativo de métodos de avaliação da estabilidade de agregados.

Pivot Bio™ é uma empresa que busca inovar o ramo de fertilizantes nitrogenados, modificando o uso de fertilizantes para o uso de microrganismos fixadores, seu produto comercial busca fornecer a inoculação de plantas não leguminosas para obtenção do nutriente com maior confiança, sustentabilidade e segurança (PIVOT BIO, 2022). O experimento realizado em parceria com a empresa fez parte do processo de obtenção do título de mestre de William Davis. William investigou o real benefício que o produto Proven™ possui em culturas de cereais como o milho e sorgo. O período do estágio coincidiu com um dos cultivos de milho no experimento, por conseguinte diversas atividades foram realizadas durante o período como delineamento do experimento, observação da semeadura, adubação manual, medições de características vegetais (altura, número de folhas, número de plantas, número de espigas, altura da espiga e Índice de Vegetação da Diferença Normalizada (NDVI)) e coletas de solo (com trado e mecanizada com sistema hidráulico).

Índice de Vegetação da Diferença Normalizada

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

Solo é um recurso natural não renovável que exerce funções essenciais para vida humana, é ambiente de desenvolvimento e nutrição de cultivos e pastagens sendo substancial para agricultura. Inobstante a sua importância, existe uma vulnerabilidade associada aos solos cujo manejo é realizado de forma inadequada. O manejo associado com sistemas conservacionistas direciona seus fundamentos para a preservação de recursos naturais mesmo quando associados com a produção de alimentos, visando concomitância entre produtividade do sistema agrícola e a saúde dos solos.

Dentro do amplo espectro contextual da Ciência do Solo, saúde do solo é termo em ascendência nas discussões científicas. Remetendo a década de 70, qualidade do solo foi definida pela capacidade do solo em produzir milho, soja e trigo quando associado à condição de alto nível de manejo (MAUSEL, 1971). Com o passar dos anos, culminando na década de 90, o termo adquiriu maior complexidade, adicionando conexões com a conservação e o equilíbrio ambiental. O termo saúde do solo foi posteriormente elaborado e buscou detalhar de forma minuciosa as variáveis apresentadas no solo, sendo então definido como a capacidade do solo em manter de forma contínua as suas funções essenciais e a qualidade do ambiente (PECHE, 2019). Dessa forma, segundo Doran e Parkin (1994), o termo agrega o componente de tempo e a ação do solo como sistema vivo.

À medida que os anos passam a complexidade associada à definição de um solo saudável aumenta. Esse amplo termo pode ser dividido em três grupos de atributos: químicos, físicos e microbiológicos. A interação entre esses atributos é aspecto essencial para o equilíbrio e sustentabilidade do sistema agrícola, sendo assim, a saúde edáfica envolve matéria orgânica, porosidade do solo, presença e disponibilidade de nutrientes, estabilidade de agregados, comunidade e atividade microbiológica etc. A microbiologia possui caráter consolidador dos demais atributos devido sua complexidade e capacidade de mediar fluxos de energia e matéria, interligando-se com os componentes químicos e físicos (BAYER, 2015). Microrganismos presentes no solo apresentam importante papel quanto a ciclagem de nutrientes, formação da matéria orgânica do solo (CHAER, 2014), além de operarem na estabilidade de agregados do solo devido sua capacidade de formação de micélios extra radiculares (BARBOSA, 2019) que influenciam a porosidade

do solo (SIDDIKY, 2012). A capacidade de produção e liberação de exsudatos como a glomalina também atuam na proteção física de agregados (SILVA, 2016).

A conversão de ambientes nativos em áreas agrícolas reflete diversas modificações no solo. Por sua natureza, ambientes nativos apresentam níveis de nutrientes e estrutura do solo que favorecem a microbiota edáfica e parâmetros considerados para saúde do solo (SARTO, 2020). Quando esses ecossistemas são alterados para viabilizar atividade agrícola, seus parâmetros se alteram. Contudo, a literatura disponível envolvendo análises da comunidade microbiológica edáfica associada ao manejo conservacionista do sistema de produção agrícola mostra uma relação positiva entre elas e, conseqüentemente, com a saúde do solo.

Fatores de manejo conservacionista, como não revolvimento do solo, possuem impactos positivos na microbiota edáfica, favorecendo abundância de bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, actinomicetos, fungos saprofitos e fungos micorrízicos arbusculares (PIRES, 2018). Em estudo realizado por Pires (2018), o aumento mostrou-se mais significativo para os grupos de fungos micorrízicos arbusculares e os fungos saprofitos. Esses, juntamente com actinomicetos, são de grande importância para decomposição de elementos orgânicos, formação de micélio e liberação de glomalina. A glomalina é uma glicoproteína que possui ação cimentante no solo contribuindo com a proteção física de agregados. Essa informação é corroborada pelo experimento realizado no estado de Goiás, onde avaliou-se os teores de glomalina facilmente extraível em agregados do solo. Segundo Silva (2016), a glomalina está relacionada com os teores de carbono no solo, estabilidade dos agregados e formação de microagregados, sendo favorecida por manejos conservacionistas. Não obstante, a atividade enzimática extracelular também se demonstra favorecida pela prática de plantio direto (PIRES, 2018), são enzimas como a Beta Glucosidade, a Fosfatase Ácida e a N-Acetil Glucosamina, que atuam intimamente na ciclagem de carbono, fósforo e nitrogênio, respectivamente.

Demais práticas relacionadas ao manejo conservacionista do solo como qualidade e quantidade do resíduo aportado no solo (HUANG, 2013), diversidade de culturas (STAINAUER, 2015) uso de inoculantes microbiológicos e disponibilidade de fósforo

(KÖHL, 2014) foram analisados e relacionados positivamente com a quantificação da comunidade microbiológica.

#### 4. ATIVIDADES REALIZADAS

Com objetivo de fornecer clareza ao trabalho desenvolvido, as atividades realizadas durante o período de estágio foram divididas no uso de metodologias de análises microbiológicas, análise química de nitrogênio inorgânico, análise física de estabilidade de agregados em água e atividades de campo. É válido citar que além das metodologias desenvolvidas de forma individual no laboratório, obteve-se experiências didáticas com alunos de graduação, pós-graduação e demais estagiários com transferência dos conhecimentos adquiridos.

##### 4.1 Análises Microbiológicas

Com a ascendência de temas que circundam o assunto de saúde do solo o grupo SMAL possui diversos experimentos em andamento nos quais foram realizadas amostragens e análises microbiológicas de solo. Dentre as principais análises de natureza microbiológica, serão tratadas as análises de ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA) e de atividade enzimática extracelular (EEA).

##### 4.1.1 Ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA)

A análise de ácidos graxos de fosfolipídios objetiva a quantificação de microrganismos vivos de diversos grupos como bactérias e fungos presentes no solo no momento de coleta. A análise é baseada em biomarcadores associados com tais microrganismos e o fato de que fosfolipídios se encontram presentes na membrana celular de todos os organismos vivos. Segundo o modelo “mosaico-fluido” elaborado por Singer e Nicholson em 1972, a membrana plasmática celular é formada por dupla camada de fosfolipídios e proteínas. Fosfolipídios são formados de uma cabeça hidrofílica com grupo de cadeias de fosfato e glicerol associada à duas caudas hidrofóbicas de ácidos graxos, podendo esses serem saturados ou insaturados (OPEN STAX, 2013).

A relevância dessa análise é sua capacidade de retratar a comunidade microbiológica do solo no momento de coleta, conhecimento valorizado devido o rápido

período de resposta que os microrganismos possuem de acordo com o manejo desenvolvido (BUCKLEY, 2003). Dessa forma, uma análise de PLFA se torna proveitosa para indicar os benefícios de práticas de manejo e conseqüentemente pode ser utilizada como indicador de saúde do solo.

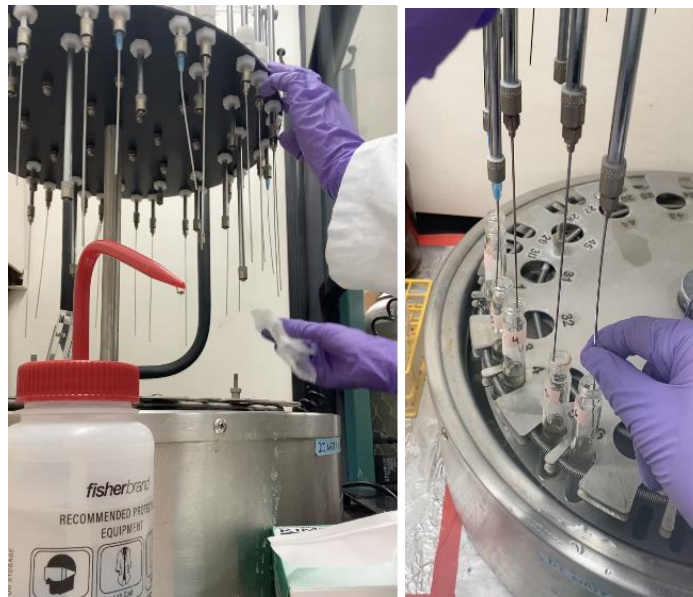
A metodologia utilizada é uma adaptação da descrita por White e Ringelberg (1998). O primórdio da análise é a realização da coleta de solo, com material estéril e cuidado para evitar possíveis contaminações, caso necessário o solo deve ser armazenado em ambiente refrigerado (4°C). O próximo passo é a liofilização do solo amostrado, um processo de desidratação por sublimação que permite a manutenção das características microbiológicas presentes na amostra. O maquinário utilizado pelo laboratório era uma Freeze Dryer LABCONCO com capacidade para aproximadamente 40 amostras. Após o tempo de secagem as amostras devem ser moídas e qualquer material vegetal retirado, a armazenagem após a liofilização deve ser realizada em temperaturas negativas.

Todo material utilizado deve ser lavado com máquina apropriada para vidraria laboratorial, esterilizado com solução de limpeza composta de ácido clorídrico e levado à mufla por quatro horas a 400°C. As soluções usadas para a análise são: solução tampão de fosfato, solução de ácido acético 1 N, solução de ácido clorídrico de 3 mol L<sup>-1</sup> e solução "Stock".

De forma geral a análise pode ser dividida em três passos: extração de lipídios, cromatografia de ácido silícico e metilação de lipídios (Figura 3). O primeiro passo necessita de dois dias para ser concluído tendo início com a pesagem de 5 gramas de solo, aos quais são adicionados 4 mL de solução tampão de fosfato, 10 mL de metanol e 5 mL de clorofórmio, essa combinação de elementos deve ser agitada por 30 segundos e descansar por três horas com agitação a cada hora. Passadas três horas, os tubos de ensaio devem ser centrifugados por 10 minutos com 1.800 rpm e força gravitacional de 1 G para separar as partículas de solo e a solução. A solução extraída é passada para um novo tubo de ensaio juntamente com 5 mL de clorofórmio e 5 mL de água nano pura, essa solução deve ser armazenada em local protegido da luz até o dia seguinte (8-12 horas depois).

No dia seguinte, a solução terá duas fases, sendo a inferior a fase orgânica e que se deseja remover. A remoção da fase orgânica deve ser realizada para um novo tubo de ensaio com auxílio de pipeta Pasteur de vidro, posteriormente a secagem dessa solução deve ser realizada em banho maria de 50°C com auxílio de evaporador de nitrogênio (N-EVAP) (Figura 1). A armazenagem das soluções secas deve sempre ser realizada em ambiente com temperatura negativa.

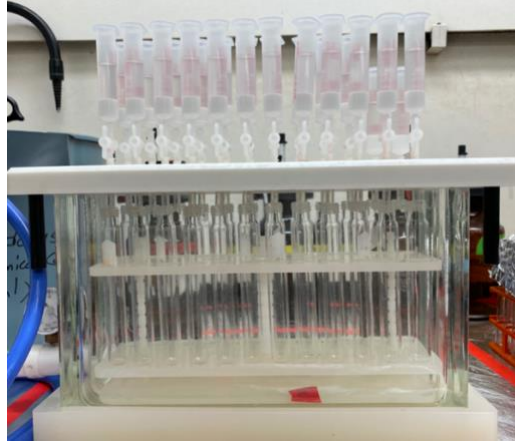
**Figura 1.** Secagem de amostras no N-EVAP.



Fonte: Victória Dutra (2020).

A cromatografia de silício envolve o uso de colunas de ácido silícico (Figura 2). Para realização correta é necessário o condicionamento da coluna com 5 mL de metanol, 5 mL de acetona e 5 mL de clorofórmio. A passagem dos líquidos é favorecida por um leve vácuo conectado ao equipamento com as colunas. Os líquidos do condicionamento são descartados e então inicia-se a extração do material com auxílio de pipetas de vidro e gotas de clorofórmio. O processo de extração é realizado com 10 mL de clorofórmio, 10 mL de acetona e 10 mL de metanol, os líquidos obtidos até a acetona são descartados, mantendo-se apenas o que é extraído pelos 10 mL de metanol. O mesmo procedimento anterior é realizado para secagem dos solventes no N-EVAP.

**Figura 2.** Aparato para realização da cromatografia de silício.



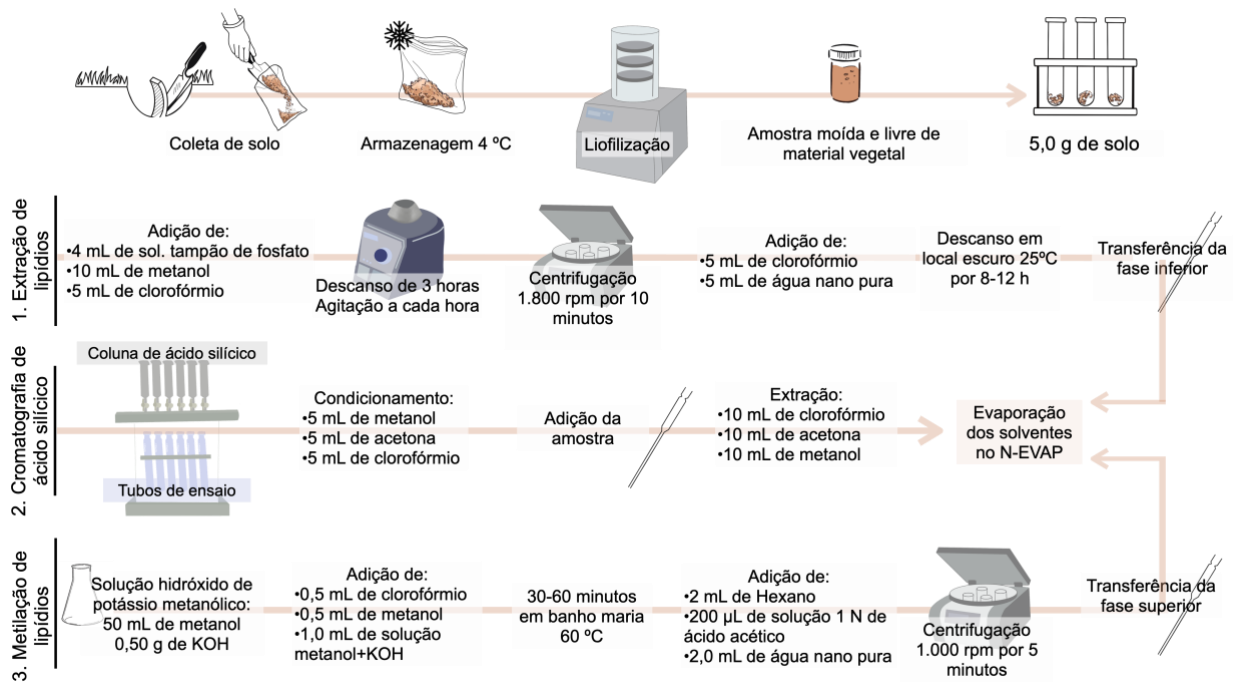
Fonte: Victória Dutra (2020).

O último passo, denominado de metilação de lipídios, é realizado com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) metanólico, que deve ser feita no dia de uso. A solução contém 50 mL de metanol em um frasco de Erlenmeyer e 0,50 g de KOH. Nas amostras secas no passo dois, adiciona-se 0,5 mL de clorofórmio, 0,5 mL de metanol e 1 mL da solução de KOH metanólico em cada tubo individual. Essas amostras são então tampadas e levadas para banho maria a 60°C por 30-60 minutos. Após esse tempo adiciona-se 2 mL de hexano e 200 µL da solução de ácido acético 1 N, a agitação desses componentes causa uma divisão de fases na amostra que será quebrada com adição de 2 mL de água nano pura. Após adição da água, as amostras devem ser centrifugadas por 5 minutos a 1.000 rpm separando novamente o líquido em duas fases. Com auxílio de pipeta de vidro transfere-se a fase superior para um novo tubo de ensaio, que será evaporado no N-EVAP com banho maria a 37°C.

Com a finalidade de preparar as amostras para leitura é necessário realizar uma solução padrão que é composta de 10 mL de solução “Stock” e 90 mL de hexano. Adiciona-se 1mL dessa solução padrão nas amostras secas e transferidas para frascos adequados para leitura na máquina de cromatografia gasosa (Thermo Scientific Trace GC-ISQ).



**Figura 3.** Esquema ilustrativo da execução da análise de ácido graxos de fosfolipídios.



Fonte: Victória Dutra (2022)

#### 4.1.2 Atividade Enzimática Extracelular (EEA)

A atividade enzimática está intimamente relacionada com atividade da microbiota e é importante parâmetro por agir como catalizadora de diversas reações bioquímicas presentes no solo (CHRÓST, 1990). As enzimas analisadas no período de estágio foram enzimas envolvidas no ciclo de carbono (Beta Glucosidade), fósforo (Fosfatase Ácida) e do nitrogênio (N-Acetil Glucosamina). A metodologia utilizada foi descrita por Zeglin (1998) e é similar para as três enzimas, mudando apenas o substrato químico utilizado. Novamente por se tratar de uma análise microbiológica, a coleta de solo para a respectiva análise deve ser realizada com constante higienização e cuidado para não ocorrer contaminação. Posteriormente é necessário pesar 1,0 g de cada amostra em tubos Falcon de 50 ml e devem ser armazenadas em ambiente refrigerado com temperatura aproximada de 4°C.

O preparo antecipado das soluções envolve seis diferentes processos (três substratos, solução tampão de acetato, solução padrão MUB e solução “STOP”) e devem

ser armazenados em ambiente refrigerado. Primeiramente os substratos denominados de BG, PHOS e NAG, são preparados em balões volumétricos individuais de 100 ml com volume completado de água nano pura. Para preparar o BG pesa-se 6,77 mg de 4-MUB-b-D-glucoside, para preparar PHOS, pesa-se 5,12 mg de 4-MUB-phosphate e para NAG pesa-se 7,59 mg de 4-MUB-acetyl-b-glucosaminide. Para o preparo da solução tampão de acetato o processo é dividido entre uma solução estoque e uma solução de trabalho, onde a diferença básica é o nível de diluição do acetato de sódio (NaOAc). A solução de estoque é preparada pela diluição de 41,01 g de NaOAc em 1 litro de água nano pura e o pH ajustado para 5 com solução de 3 mol L<sup>-1</sup> HCl. A solução de trabalho é constituída de 200 mL da solução de estoque associada com 1,8 litros de água nano pura. O preparo da solução padrão MUB também envolve soluções de estoque e trabalho, sendo a de estoque constituída por 8,81 mg de 4-methylumbelliferone em 500 mL de água nano pura, e a de trabalho ser 5 mL dessa solução com 45 mL de água nano pura. Por fim, a solução STOP tem como objetivo parar as reações viabilizando a leitura das amostras, é constituída de 20 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 1 litro de água nano pura.

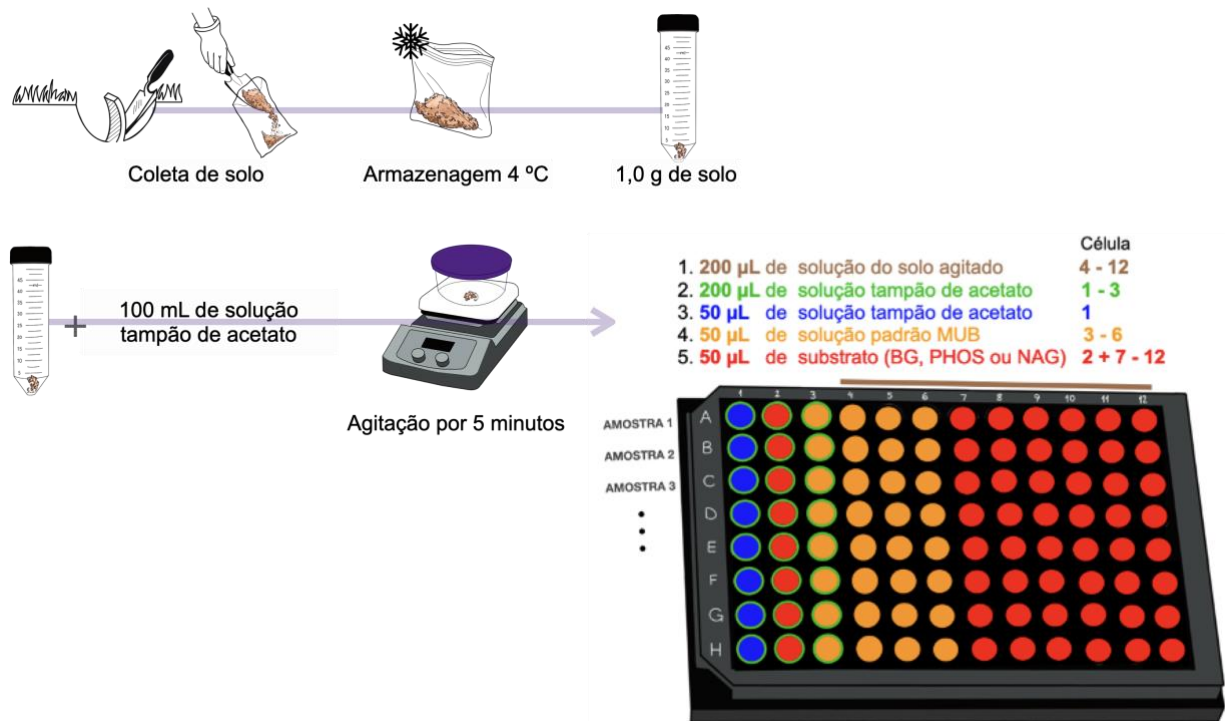
Para dar início ao processo contínuo de análise, utiliza-se de uma sequência de equipamentos incluindo um repipetador para 100 mL de solução tampão de acetato, agitador magnético, pipetas automáticas de 200 µL para solução de solo e solução tampão de acetato, 50 µL para solução padrão MUB e substratos (BG, PHOS e NAG) e placas de micro titulação com 96 células individualizadas (Figura 4). Dessa forma o passo a passo da análise pode ser dividido em seis etapas, onde a primeira ocorre a mistura do solo com solução tampão de acetato e agitação magnética por 5 minutos. No segundo passo ocorre a pipetagem de 200 µL dessa solução nas células de 4-12, sendo que cada placa possui capacidade para oito. O terceiro passo envolve a pipetagem de 100 µL da solução tampão nas células 1-3, seguida pelo quarto passo com a pipetagem de 50 µL da mesma solução apenas na célula 1. O quinto passo é formado pela pipetagem de 50 µL de MUB nas células 3-6 e finaliza-se o processo com 50 µL de cada substrato específico nas células 2 e 7-12 (Figura 5). Dessa forma cada placa é capaz de comportar oito amostras simultaneamente, sendo necessário uma placa para cada substrato.

**Figura 4.** Pipetagem durante análise de atividade enzimática extracelular.



Fonte: Victória Dutra (2020).

**Figura 5.** Esquema ilustrativo da análise de atividade enzimática extracelular.



Fonte: Victória Dutra (2022).

Assim que o substrato é adicionado inicia-se o tempo de incubação sendo ele de 2-3 horas para Beta Glucosidade e Fosfatase Ácida e 3-4 horas para N-Acetil Glucosamina. A anotação de todos os horários é essencial para obter dados precisos posteriormente.

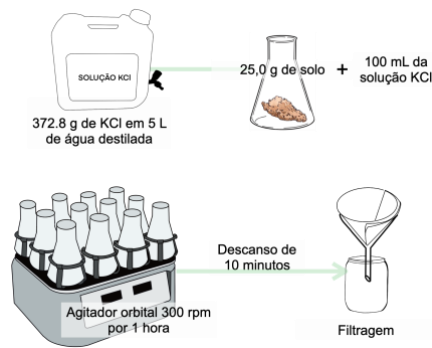
Passado o tempo de incubação em local escuro, as amostras recebem 10 µL da solução STOP antes de serem lidas pela máquina de absorvância florescente (FilterMax F5).

#### 4.2 Nitrogênio inorgânico

A metodologia utilizada para determinação do nitrogênio inorgânico no solo envolve a extração com cloreto de potássio (KCl) (KEENEY E NELSON, 1983). Essa análise foi realizada com objetivo de avaliar as diferenças na presença deste elemento no experimento de Pivot Bio™. Esse dado é relevante para o estudo devido aos processos de mineralização e imobilização que são dependentes da microbiota edáfica e envolvem a transformação do nitrogênio orgânico para inorgânico e consumo de nitrogênio inorgânico transformando-o em orgânico, respectivamente.

Os procedimentos iniciais envolvem a determinação da umidade da amostra de solo, sendo realizado pela pesagem prévia de 9-11 g de solo úmido em recipiente de alumínio que é levado para a estufa a 105°C por 24 horas ou até o peso estabilizar. Todos os valores envolvidos devem ser anotados, sendo necessários para cálculo das concentrações de n mineral em solo na base. A extração propriamente dita ocorre com 25,0 g de solo úmido em frasco de Erlenmeyer contendo 100 ml da solução de 372,8 g de KCl diluídos em 5 litros de água destilada. A mistura de solo e KCl deve ser levada para agitador orbital em 300 rpm por 1 hora (Figura 6). Posteriormente, as amostras devem decantar por 10 min para que então ocorra filtragem com papel filtro (Whatman 43). O filtrado é coletado, identificado e levado para análise de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  e  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  pelo método de calorimetria descrito por Gelderman e Beegle (1998), terceirizada no laboratório “Soil Testing Lab”.

**Figura 6.** Esquema ilustrativo da análise de nitrogênio inorgânico.



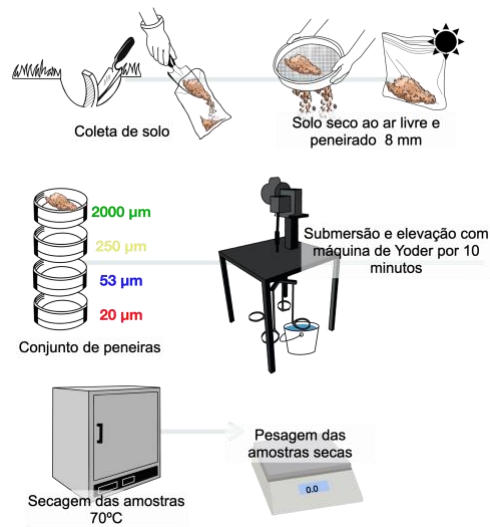
Fonte: Victória Dutra (2022)

#### 4.3 Estabilidade de agregados em água

Buscando relacionar os possíveis impactos que o manejo do sistema produtivo pode causar na estrutura física do solo, a medição da estabilidade de agregados em água se destaca devido sua capacidade de refletir processos erosivos além de relacionar-se com transporte e armazenamento da água, fluxo de gases e sequestro de carbono (CESÁRIO, 2010). Para o sucesso da análise o solo coletado necessita ser passado por uma peneira granulométrica com malha de 8 mm de abertura e posteriormente seco ao ar livre. O método utilizado foi adaptado de Kemper (1986) e envolve o uso de um conjunto de peneiras contendo diâmetros diferentes (2 mm, 0,250 mm, 0,053 mm e 0,02 mm), máquina de Yoder e baldes para submersão das peneiras.

A amostra de 100 g de solo seco deve ser colocada na peneira superior com malha de 2 mm, abaixo da qual encaixa-se as demais em ordem decrescente de abertura da malha. Durante o período de 10 minutos o equipamento faz o movimento vertical com as peneiras, repetindo o ato de completa elevação e posterior submersão, concluindo esse ciclo aproximadamente 30 vezes por minuto. Finalizados 10 minutos as amostras são então despejadas em recipientes de alumínio e levadas para estufa de secagem (70°C) até completamente secas (Figura 7). Fazendo uso de equações com valores prévios e posteriores à secagem obtém-se a distribuição em areia, silte e argila para posterior descrição das bases estruturais da amostra de solo.

**Figura 7.** Esquema ilustrativo da análise de estabilidade de agregados em água.



Fonte: Victória Dutra (2022)

#### 4.4 Atividades de campo

Diversas atividades de cunho prático foram executadas e observadas em nível de campo. Devido ao fato da maioria das análises necessitar a amostragem e coleta de solo, essa prática foi realizada diversas vezes durante o período de estágio, sendo realizadas de duas maneiras diferentes: manual ou mecanizada. Amostragem de solo é atividade rotineira para laboratórios que utilizam essa matéria prima em suas análises, durante a realização da amostragem busca-se estratégias que tragam maior representatividade ao ambiente amostrado. Dessa forma, leva-se em consideração fatores como mecanização e tráfego de máquinas, locais de adubação, histórico da área, características do relevo e demais variáveis relevantes para definição dos pontos a serem amostrados (Figura 8).

**Figura 8.** Organização de times para realização de coletas.



Fonte: Carlos Pires (2020)

A coleta manual no SMAL (Figura 9) se mostra peculiar por objetivarem a realização de análises microbiológicas, exigindo maiores cuidados a fim de evitar contaminação das amostras. É necessário o uso de luvas, uso de recipientes de plástico limpos para armazenagem e a higienização dos trados, pás, baldes e facas com acetona pura. As coletas variam de 0-30 cm de profundidade sendo divididas em camadas de 0-5, 5-10, 10-15 e 15-30cm.

A coleta mecanizada inclui o auxílio do maquinário “Giddings probe” anexado ao trator agrícola (Figura 10). O mesmo possui tubo metálico de 6,35 cm de diâmetro, tubo plástico interno de 6 cm de diâmetro e profundidade de amostragem de aproximadamente 100 cm. Com comandos e sistema hidráulico o tubo metálico perfura o solo e coleta a amostra de solo no interior do tubo plástico, restando apenas a divisão das profundidades para ser feita manualmente.

**Figura 9.** Coleta manual de solo.



Fonte: Victória Dutra (2020)

**Figura 10.** Coleta mecanizada de solo.



Fonte: Dorivar Ruiz Diaz (2020)

A condução do estudo associado com a empresa Pivot Bio™ demandou amostragens complementares incluindo medições de material vegetal. Realizou-se avaliação e anotações a respeito da altura de plantas de milho em diversos estádios de desenvolvimento, assim como a coleta, pesagem e secagem de plantas inteiras e espigas. Foi observado a avaliação do Índice de Vegetação da Diferença Normalizada (NDVI) com uso do aparelho de mão, GreenSeeker.

Demais atividades realizadas a campo incluem delineamento e divisão de glebas de experimentos, avaliação visual de desenvolvimento (Figura 11) e adubação manual com fertilizante mineral e fertilizante orgânico (Figura 12).

**Figura 11.** Dia de campo com exposição do experimento com plantas de cobertura.





Fonte: Carlos Pires (2020)

**Figura 12.** Distribuição manual de fertilizante orgânico.

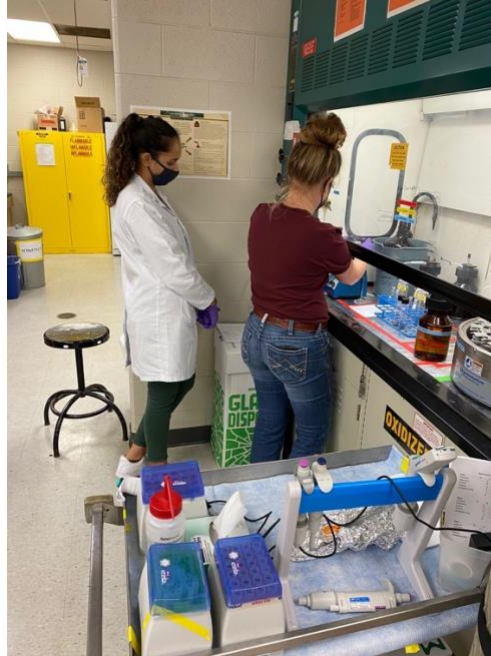


Fonte: Charles Rice (2020)

#### 4.5 Oportunidades educacionais

Além das reuniões semanais para discussão das tarefas e andamento da pesquisa do grupo, houve também reuniões mensais para discussão de técnicas de desenvolvimento da escrita científica. A oportunidade de acompanhar disciplinas ministradas pelo Dr. Rice para graduação e pós-graduação, veio acompanhada de aulas laboratoriais onde foi possível exercer o papel de assistente de ensino, acompanhando e instruindo os alunos sobre a realização das análises.

**Figura 13.** Auxílio em análises laboratoriais de alunos de pós-graduação.



Fonte: Marcos Sarto (2020)

Por se tratar de um grupo com diversas conexões internacionais, alunos de mestrado e doutorado sanduíche estavam presentes durante o ano e receberam auxílio na realização de suas análises, assim como alunos de outros laboratórios da instituição. Devido ao contato constate com químicos perigosos, foi fornecido e exigido pela universidade a realização de um treinamento de conscientização sobre resíduos perigosos.

O período de estágio coincidiu com o primeiro ano da pandemia COVID-19, contudo, nos meses iniciais do ano de 2020 foi possível atender a dois eventos presenciais: Kansas Corn Symposium e Microbiomes of Aquatic, Plant and Soil System Across Kansas Symposium (MAPS). Em novembro de 2020, ocorreu de forma remota o encontro internacional anual da American Society of Agronomy (ASA), Crop Science Society of America (CSSA) e Soil Science Society of America (SSSA), no qual apresentou-se o trabalho intitulado “Effect of Annual and Perennial Biofuel Crops on Soil Microbial Community” nas modalidades de pôster e resumo.

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

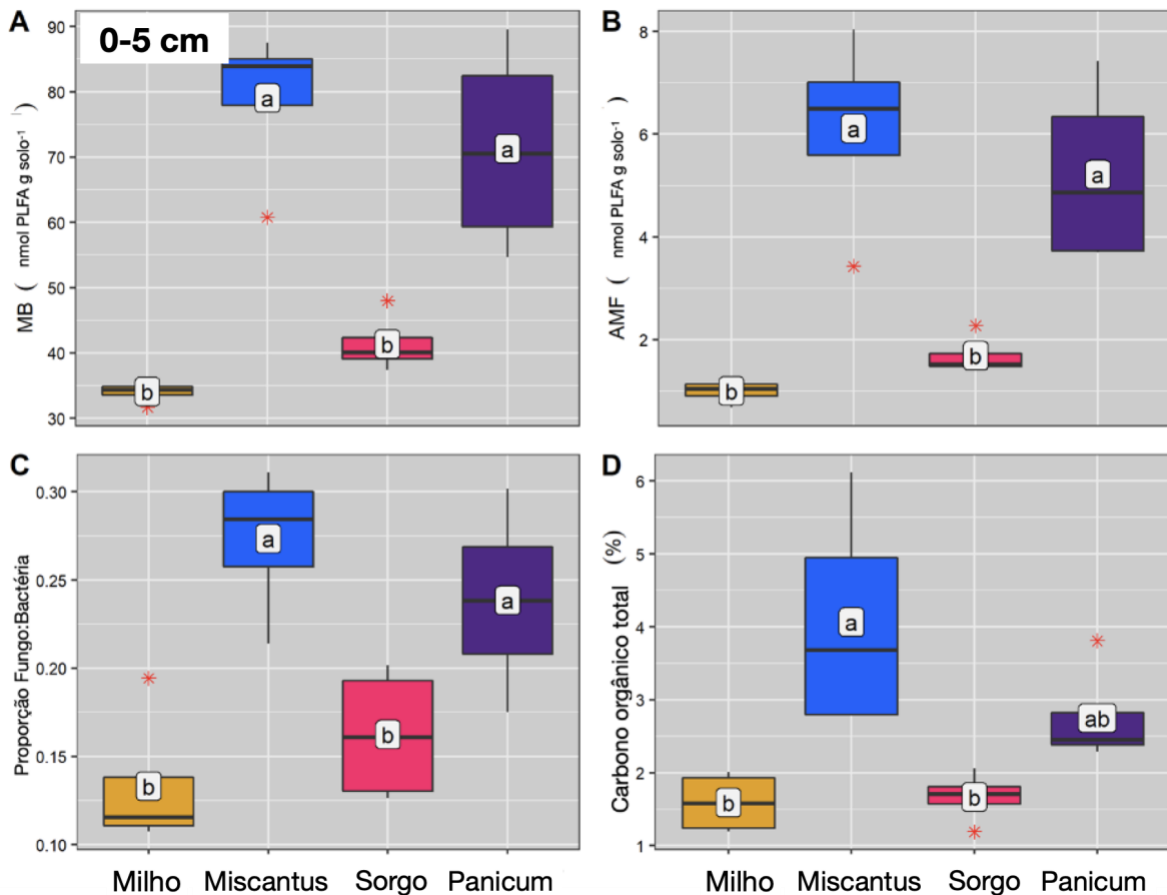
Os solos são parte essencial do sistema agrícola, apresentando um ambiente complexo e dinâmico que possui interações bióticas e abióticas, além de ser fonte de nutrientes e substrato para o crescimento vegetal. A agricultura provoca impactos no solo, como a perda de biodiversidade que ocorre devido o uso restrito de espécies com objetivo extrativista. Sendo o solo um recurso não renovável e pensando na crescente demanda mundial por alimentos, é iminente a necessidade de soluções que possibilitem a preservação do solo e produtividade do sistema agrícola.

A denominação do estudo de saúde do solo é relativamente recente na linha do tempo da agricultura. O termo e consciência ganhou força na década de 1990, sendo definido como capacidade contínua do solo em exercer suas funções vitais agindo como ecossistema vivo e sustentando a sobrevivência de plantas, animais e humanos (DORAN, 2000). Associado a essa definição ainda é valido citar a necessidade de atributos como estrutura do solo, resposta à intervenção agrícola, ciclagem de nutrientes e regulação de pestes e doenças (PANKHURST, 1997). Décadas seguintes, atualmente o termo se mostra presente no âmbito acadêmico, sendo foco de diversos estudos relacionando o tema com práticas de manejo, mudanças climáticas, aporte de material orgânico, disponibilidade de nutrientes, produtividade vegetal etc.

Como resultado relacionado à comunidade microbiológica e à saúde do solo, foi apresentado em novembro de 2020, no encontro internacional anual da ASA, CSSA e SSSA o trabalho de título “Effect of Annual and Perennial Biofuel Crops on Soil Microbial Community”. O experimento realizado desde 2017 na fazenda experimental da KSU, mostrou diferenças na comunidade microbiológica com uso de plantas perenes, miscantus (*Miscanthus sacchariflorus*) e panicum (*Panicum virgatum* L.), e anuais, milho (*Zea mays* L.) e sorgo fotossensível (*Sorghum bicolor* L.), para produção de biocombustível. A produção de biocombustível exige a retirada de grande parte da biomassa presente acima do solo, o que provoca impactos na comunidade microbiológica. O estudo realizado em blocos casualizados e quatro repetições, incluiu análise de carbono orgânico total (TOC) e PLFA para as profundidades de 0-5 (Figura 14) e 5-15 cm (Figura 15). A análise estatística dos dados foi realizada com teste de ANOVA.

Segundo dados obtidos, tratamentos contendo plantas perenes apresentaram maior biomassa microbiana, maior proporção de fungo: bactéria (F:B) e maior população de fungos micorrizos arbusculares (AMF). Miscantus se mostrou a espécie com maior média para todas as variáveis e profundidades excluindo apenas AMF e F: B na camada de 5-15cm, os teores de TOC observados neste tratamento são o dobro dos observados com milho e sorgo. Esses resultados mostram a sensibilidade da análise e que plantas perenes com sua presença mais duradoura no campo e maior crescimento radicular podem favorecer a microbiota edáfica.

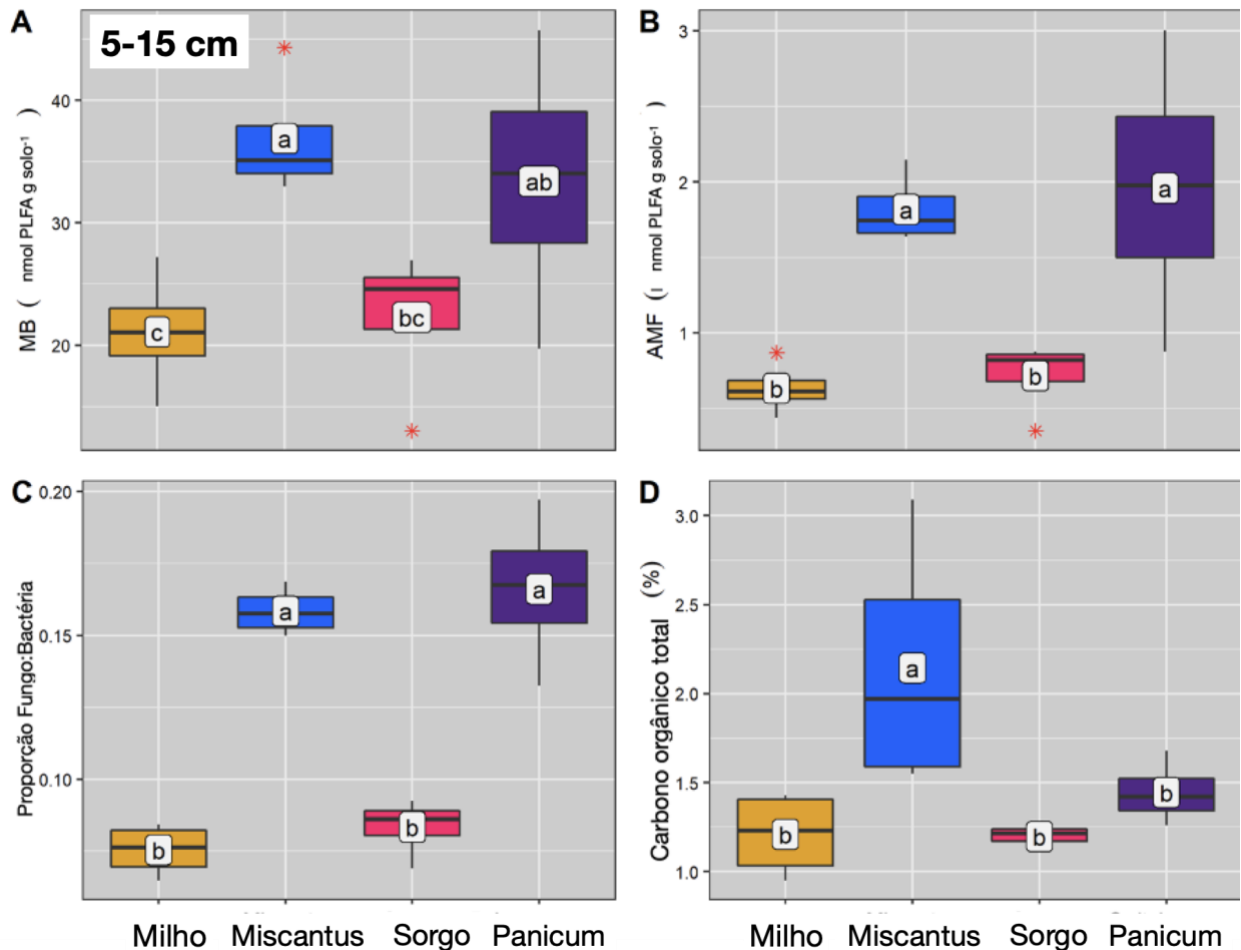
**Figura 14. Efeito de plantas anuais e perenes na biomassa microbiana (MB), proporção de fungos: bactérias (F:B), fungos micorrízicos arbusculares (AMF) e carbono orgânico total na cama de solo de 0-5 cm.**



Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste ANOVA ( $P < 0,05$ ). A posição da letra de média indica a média. Os asteriscos vermelhos indicam valores "outliers"

Fonte: Victória Dutra (2020).

**Figura 15. Efeito de plantas anuais e perenes na biomassa microbiana (MB), proporção de fungos: bactérias (F:B), fungos micorrízicos arbusculares (AMF) e carbono orgânico total na camada de solo de 5-15 cm.**



Letras diferentes indicam diferença estatística com teste ANOVA ( $P < 0,05$ ). A posição da letra de média indica a média. Os asteriscos vermelhos indicam valores "outliers"

Fonte: Victória Dutra (2020).

Devido ao amplo espectro de aspectos e interações químicas, físicas e microbiológicas, associadas com a jovialidade do assunto é evidente que ainda se tem muita informação a ser obtida. Contudo, é com clareza que se afirma que saúde do solo é questão de extrema importância e influência para produção de alimentos, não podendo ser vista como assunto lateral. É necessário preencher lacunas ainda presentes no conhecimento da área e obter total compreensão das interconexões que ocorrem no subsolo.

Tendo em vista que produtores ainda possuem resistência à adoção atividades conservacionistas e promotoras de saúde do solo, algumas ações práticas e atrativas

vêm sendo realizadas pela iniciativa privada e governo estadunidense. Atualmente no estado de Minnesota, localizado a 1.160 km do Kansas, existe o programa de certificação para produtores que realizam práticas conservacionista. O “Minnesota Agricultural Water Quality Certification Program” é um programa de certificação voltado à qualidade da água em propriedades agrícolas, porém dentre as práticas fundamentais para receber o certificado, incluem-se práticas conservacionistas do solo como uso de plantas de cobertura. Acredita-se que futuramente certificações que promovam a saúde do solo venham a adquirir impacto de larga escala, tornando-se algo de consciência do consumidor e fator decisório ao realizar suas compras.

Iniciativas governamentais que também se fazem presentes nos EUA incluem a Natural Resources Conservation Service (NRCS) que faz parte do United States Department of Agriculture (USDA) e possui diversos projetos direcionados ao apoio técnico e financeiro dos fazendeiros do país, criando alianças, eventos e cursos para difundir os conhecimentos acerca do tema de conservação e saúde do solo. Projetos como o Environmental Quality Incentives Program (EQUIP) e Conservation Stewardship Program (CSP) fornecem incentivos e apoio técnico para produtores que adotem práticas conservacionistas e que favoreçam a saúde do solo, da água e do ar, além de incentivarem adoção de novas práticas. Certificações, suporte financeiro e apoio técnico são apenas alguns incentivos que tornam o tema deste trabalho relevante, todavia os reais benefícios são realizados em serviços ecossistêmicos e a aproximação do equilíbrio ambiental.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As oportunidades educacionais e troca cultural durante o período de estadia na KSU possuem caráter imensurável. O período foi de grande proveito, apesar de ter coincidido com momento de grandes incertezas globais e preocupações do início da pandemia de COVID-19. O conhecimento adquirido, tanto de análises laboratoriais ou em atividades de campo, foi assertivo da necessidade e importância da Ciência do Solo para a produção de alimentos no mundo.

O contato com a vida acadêmica norte-americana em uma instituição de renome internacional elevou a experiência e trouxe luz aos fatores que fazem dos Estados Unidos

um país que desenvolve pesquisa inovadora, produzindo dados significativos e de amplo espectro de aplicação. Buscou-se a proximidade do entendimento do o que faz o ramo de estudos agrônômicos tão singular e as respostas são numerosas.

A identificação e paixão pela Ciência do Solo, pesquisa e extensão foram maximizadas após essa experiência. A oportunidade de vivenciar a agricultura em outra parte do mundo, seus costumes, tradições e individualidade, elucidaram os próximos passos na vida pessoal e carreira acadêmica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**2022 Best Colleges for Agricultural Sciences.** Niche. Disponível em: <https://www.niche.com/colleges/search/best-colleges-for-agricultural-sciences/>.

Acesso em: 2 fev. 2022.

BARBOSA, M.V.; PEDROSO, D.F.; CURI, N.; *et al.* Do different arbuscular mycorrhizal fungi affect the formation and stability of soil aggregates? **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, p. e003519, 2019.

BAYER, C.; DIECKOW, J.; CONCEIÇÃO, P.C.; *et al.* XXXV - SISTEMAS DE MANEJO CONSERVACIONISTA E A QUALIDADE DE SOLOS, COM ÊNFASE NA MATÉRIA ORGÂNICA. p. 30, .

BAYER, C.; MAFRA, Á.L. FUNDAMENTOS DO MANEJO DO SOLO. p. 15, 2015.

**Biosafety Levels.** KSU. Disponível em: <https://www.k-state.edu/safety/lab/labsafety/topics/biologicalsafety/biosafetyLevels.html>.

Acesso em: 2 fev. 2022.

**Biosafety Levels.** KSU. Disponível em: <https://www.k-state.edu/safety/lab/labsafety/topics/biologicalsafety/biosafetyLevels.html>.

Acesso em: 3 fev. 2022.

BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ Microbiol* 5: 441-452. **Environmental microbiology**, v. 5, p. 441–52, 2003.

BURLAGE, R. S.; ATLAS, R.; STAHL, D.; *et al.* **Techniques in Microbial Ecology**. [s.l.]: Oxford University Press, 1998.

CESÁRIO, F.V.; DONAGEMMA, G.K; RUIZ, H.A.; *et al.* Estabilidade de agregados em água. p. 7, 2010.

CHAER, G.M.; GAIAD, S. Caracterização microbiológica do solo. p. 15, 2014.

CHRÓST, R. **Microbial Enzymes In Aquatic Environments**. [s.l.: s.n.], 1990.

**Concepts of Biology**. OpenStax. Disponível em: <https://openstax.org/details/books/concepts-biology>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and Assessing Soil Quality. *In: Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. [s.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 1994, p. 1–21. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2136/sssaspecpub35.c1>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 1, p. 3–11, 2000.

HUANG, Z.; WAN, X.; HE, Z.; *et al.* Soil microbial biomass, community composition and soil nitrogen cycling in relation to tree species in subtropical China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 62, p. 68–75, 2013.

**Kansas Historical Society**. Kansapedia. Disponível em: <https://www.kshs.org/kansapedia/crops/14186>>. Acesso em: 2 fev. 2022.



**Kansas State University International.** College Factual. Disponível em: <<https://www.collegefactual.com/colleges/kansas-state-university/student-life/international/>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

KASSAM, A; FRIEDRICH, T; DERPSCH, R; *et al.* Overview of the Worldwide Spread of Conservation Agriculture. **Field Actions Science Reports**, p. 12 .

KEENEY, D.r.; NELSON, D.w. Nitrogen—Inorganic Forms. *In: Methods of Soil Analysis.* [s.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 1983, p. 643–698. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c33>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

KEMPER, W. D.; ROSENAU, R. C. Aggregate Stability and Size Distribution. *In: Methods of Soil Analysis.* [s.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 1986, p. 425–442. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c17>>. Acesso em: 11 fev. 2022.

KÖHL, L.; OEHL, F.; VAN DER HEIJDEN, M. Agricultural practices indirectly influence plant productivity and ecosystem services through effects on soil biota. **Ecol. Appl.**, v. 24, 2014.

**World Population Review - Manhattan, Kansas Population 2022 (Demographics, Maps, Graphs).** Disponível em: <<https://worldpopulationreview.com/us-cities/manhattan-ks-population>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

MAUSEL, P. W. Soil Quality in Illinois—an Example of a Soils Geography Resource Analysis\*. **The Professional Geographer**, v. 23, n. 2, p. 127–136, 1971.

**News and Communications Services.** KSU. Disponível em: <<https://www.k-state.edu/media/newsreleases/2021-09/fall-21-enrollment93021.html>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

PANKHURST, E.; DOUBE, B.; VADAKATTU, G.. Biological Indicators of Soil Health. *In:* [s.l.: s.n.], 1997, p. 419–435.

PECHE, A. F. **Gerenciamento da saúde do solo**. Febrapdp. Disponível em: <<https://febrapdp.org.br/noticias/779/gerenciamento-da-saude-do-solo>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

PIRES, C. A. B. Comunidade microbiana do solo e atividade enzimática em um latossolo subtropical sob plantio direto de longa duração e rotação de culturas. p. 58, 2018.

**Pivot Bio**. Pivot Bio. Disponível em: <<https://www.pivotbio.com>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

SARTO, M. V. M.; BORGES, W. L. B.; BASSEGIO, D.; *et al.* Soil microbial community, enzyme activity, C and N stocks and soil aggregation as affected by land use and soil depth in a tropical climate region of Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 10, p. 2809–2824, 2020.

SIDDIKY, R.K., KOHLER, J.; COSME, M.; RILLING, M.C.. Soil biota effects on soil structure: Interactions between arbuscular mycorrhizal fungal mycelium and collembola. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 50, p.33-39, 2012

SILVA, A. M. M.. Estabilidade de agregados, carbono orgânico e glomalina do solo em diferentes sistemas de manejo no Quilombo de Mesquita - GO. p. 62, 2016.

**Soil Health Partnership - A Farmer-Led Soil Management Project**. Soil Health Partnership. Disponível em: <<https://www.soilhealthpartnership.org/>>. Acesso em: 11 fev. 2022.

STEINAUER, K.; TILMAN, D.; WRAGG, P. D.; *et al.* Plant diversity effects on soil microbial functions and enzymes are stronger than warming in a grassland experiment. **Ecology**, v. 96, n. 1, p. 99–112, 2015.

WHITE, D.C. Signature Lipid Biomarker Analysis. **Techniques in Microbial Ecology**, G. Geesey and G. Sayler. p. 255–272, 1998.