



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DEISI NAVROSKI

**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS EM SOLOS SOB
APLICAÇÃO CONTÍNUA E INTERROMPIDA DE DEJETO
LÍQUIDO DE SUÍNOS**

Londrina
2018

DEISI NAVROSKI

**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS EM SOLOS SOB
APLICAÇÃO CONTÍNUA E INTERROMPIDA DE DEJETO
LÍQUIDO DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Adônis Moreira.
Coorientador: Dr. Arnaldo Colozzi Filho.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Navroski, Deisi Navroski.

Atributos microbiológicos em solos sob aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos / Deisi Navroski Navroski. - Londrina, 2018.
86 f. : il.

Orientador: Adônis Moreira Moreira.

Coorientador: Arnaldo Colozzi Filho Colozzi Filho.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. Atributos e diversidade microbiana em solo sobre aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos - Tese. 2. Atividade enzimática e atributos químicos do solo após aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos - Tese. I. Moreira, Adônis Moreira. II. Colozzi Filho, Arnaldo Colozzi Filho. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . IV. Título.

DEISI NAVROSKI

**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS EM SOLOS SOB APLICAÇÃO
CONTÍNUA E INTERROMPIDA DE DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr. Adônis Moreira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa

Dr. Marco Antonio Nogueira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa

Dra. Graziela Moraes de Cesare Barbosa
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

Londrina, 27 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PGAGR) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelos conhecimentos repassados durante as disciplinas ministradas.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) pela estrutura e materiais oferecidos para realização prática deste trabalho, em especial a pesquisadora Dra. Graziela Moraes de Cesare Barbosa, pela viabilização no uso da área experimental na estação de Palotina.

Ao meu orientador Dr. Adônis Moreira pela disponibilidade, orientação e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Arnaldo Colozzi Filho pela confiança e oportunidade de realizar o trabalho junto ao IAPAR, pela orientação, incentivo e paciência durante o desenvolvimento e deste trabalho.

Ao Dr. Marco Antonio Nogueira pela viabilização no uso do equipamento para realizar a DGGE, bem como os demais funcionários e doutorandos do laboratório de biotecnologia do solo da Embrapa Soja.

Aos funcionários, colaboradores e estagiários do Laboratório de Microbiologia do Solo e Laboratório de Química e Tecido Vegetal do IAPAR.

Aos funcionários e ao técnico Valdir Luiz Guerini da Estação Experimental do IAPAR em Palotina pelo auxílio nas coletas de solo.

À minha família pelo apoio afetivo, compreensão e incentivo.

*“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber”
(Confúcio)*

*“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”
(Louis Pasteur)*

NAVROSKI, Deisi. **Atributos microbiológicos em solos sob aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos**. 2018. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

RESUMO

O uso contínuo de dejetos líquidos de suínos (DLS) como fertilizante orgânico em áreas agrícolas é uma prática comum no Brasil e afeta vários atributos do solo. Objetivou-se avaliar atributos microbiológicos do solo submetido a aplicação contínua (28 anos) e interrompida (5 e 12 meses) de DLS. O experimento foi estabelecido em 1988 em um Latossolo Vermelho Distroférico sob sistema de plantio direto para produção de grãos, disposto em delineamento de blocos ao acaso. Durante 28 anos (1988 a 2016) foram aplicadas doses de 0, 15 e 30 m³ ha⁻¹ de DLS duas vezes ao ano, antecedendo as safras de verão e de inverno. Em 2016, as parcelas foram divididas (exceto controle) e houve a interrupção da aplicação de DLS em meia parcela, gerando o esquema fatorial 2 × 2 sendo duas doses de DLS (15 e 30 m³ ha⁻¹) e duas condições de aplicação (contínua ou interrompida). Foram realizadas duas coletas de solo, aos cinco e aos doze meses após a interrupção, nas profundidades de 0 – 10, 10 – 20 e 20 – 40 cm. Avaliou-se o carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM), respiração basal do solo (RBS), quociente metabólico (qCO₂) e microbiano (qMIC), e atividade das enzimas arilsulfatase (AR), β-Glicosidase (β-G), fosfatase ácida (FA) e básica (FB) e hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA). Alguns atributos químicos do solo como P disponível, carbono orgânico total (COT), pH, Al³⁺, acidez potencial (H⁺+Al³⁺), Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ também foram avaliados. A diversidade genética microbiana foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) para os domínios Bacteria, Archaea e Eukarya (fungos). A interrupção da aplicação de DLS reduziu o CBM em 5% na coleta 1 e 14% na coleta 2 em relação à aplicação contínua. O NBM e RBS também foram reduzidos quando a aplicação de DLS foi interrompida. O qCO₂ não foi alterado pela interrupção, mas mostrou-se elevado na dose 30 m³ ha⁻¹. O COT e o qMIC não foram influenciados pelos fatores testados. A aplicação contínua proporcionou maior atividade para as enzimas AR, β-G e FB. A FDA não foi influenciada pela interrupção, mas foi maior na dose 30 m³ ha⁻¹ de DLS. Os teores de P, Mg²⁺ e H⁺+Al³⁺ do solo variaram com o fator dose de DLS, mas não pela interrupção da aplicação. O perfil da comunidade de bactérias e arqueas mostrou similaridade acima de 60% entre os tratamentos. Os índices de diversidade e riqueza bacteriana foram mais altos em comparação aos encontrados para comunidade fúngica e de arqueas. A interrupção teve efeito acentuado sobre os fungos do solo, que tiveram a diversidade diminuída em função do aumento da dominância de espécies. A diversidade de microrganismos foi maior na dose de 15 m³ de DLS ha⁻¹, independente da interrupção. Foi possível concluir que a interrupção da aplicação de DLS até 12 meses têm efeito sobre a biomassa, diversidade e atividade de microrganismos do solo, mas não provoca efeito significativo sobre os atributos químicos.

Palavras-chave: Atividade microbiológica. Biomassa microbiana. Diversidade microbiana. Dejetos animais. Enzimas do solo.

NAVROSKI, Deisi. **Microbiological attributes in soils under continuous and interrupted application of pig slurry**. 2018. 86 p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

ABSTRACT

The continuous use of pig slurry (PS) as nutrient source in agricultural areas is a common practice in Brazil and affects several soil attributes. The aim was to evaluate the microbiological attributes of a soil submitted to continuous (28 years) and interrupted (5 and 12 months) application of PS. The experiment was established in 1988 on a Rhodic Ferralsols under no-tillage system for grain production, arranged in a randomized block design. For 28 years (1988 to 2016) doses of 0, 15 and 30 m³ ha⁻¹ of PS were applied twice a year before the summer and winter crops. In 2016, the plots were divided and the application was interrupted in half of the plot, generating a 2 × 2 factorial scheme, with two doses of PS (15 and 30 m³ ha⁻¹) and two application conditions (continuous or interrupted). Two soil samples were taken, at five and twelve months after the interruption, at depths of 0 - 10, 10 - 20 and 20 - 40 cm. Microbial biomass carbon (MBC) and microbial biomass nitrogen (MBN), soil basal respiration (SBR), metabolic (qCO₂) and microbial (qMIC) quotient, and arylsulfatase (AR), β-glucosidase (β-G), acid phosphatase (AP) and basic (BP) activities and hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) were assessed. Some soil chemical attributes such as available P, total organic carbon (TOC), pH, Al³⁺, potential acidity (H + Al), Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺ were also quantified. The microbial genetic diversity was evaluated through the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for the Bacteria, Archaea and Eukarya (fungi) domains. The interruption of PS application decreases MBC by 5% in the first sampling and by 14% in the second sampling. MBN and SBR were also reduced when application of PS was interrupted. The qCO₂ did not change with the interruption, but was higher in the dose of 30 m³ ha⁻¹. TOC and qMIC did not present differences for both factors tested. The continuous application provided higher activity of AR, β-G and BP enzymes. The FDA did not change with the interruption, but was higher with 30 m³ ha⁻¹ of PS. The levels of P, Mg²⁺ and H⁺+Al³⁺ in soil change with dose, but was not affected by interruption of application. The genetic profile of the communities of bacteria and archaea showed similarity above 60% among all treatments. The diversity and richness index of the bacteria were higher than fungal and archaeal communities. The interruption of PS application had an accentuated effect on the soil fungi, which had their diversity diminished, whereas dominance of species increased. The diversity of microorganisms was higher at 15 m³ ha⁻¹ of PS, regardless of the interruption. It was concluded that the interruption of the application of PS after 12 months affected the quantity, diversity and activity of the soil microorganisms, but did not have a significant effect on the chemical attributes.

Keywords: Microbiological activity. Microbial biomass. Microbial diversity. Animal manure. Soil enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Árvore filogenética universal baseada nas sequências do gene RNA ribossomal (RNAr) (WOESE; FOX, 1977).....25
- Figura 2** – Precipitação total e temperatura média durante o período do experimento. a: período total do experimento; b: intervalo correspondente ao período de 10 dias entre a aplicação de DLS e a coleta 1 do solo e c: intervalo correspondente ao período de 10 dias entre a aplicação de DLS e a coleta 2 do solo.....32
- Figura 3** – Perfis de DGGE da comunidade bacteriana de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos (DLS). Decorridos 5 meses (a) e 12 meses (b) após interrupção (Profundidade de amostragem 0 – 10 cm).....46
- Figura 4** – Perfis de DGGE da comunidade de Archaeas de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos (DLS). Decorridos 5 meses (a) e 12 meses (b) após interrupção (Profundidade de amostragem 0 – 10 cm).....47
- Figura 5** – Perfis de DGGE da comunidade fúngica de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos (DLS). Decorridos 5 meses (a) e 12 meses (b) após interrupção (Profundidade de amostragem 0 – 10 cm).....49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Composição química de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos (DLS). Média de duas coletas33
- Tabela 2** – Região alvo do DNAr de bactérias, arqueas e fungos, nome dos oligonucleotídeos iniciadores (primers), sequência 5'-3', e referências36
- Tabela 3** – Carbono da biomassa microbiana (CBM) e nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação de dejetos líquidos de suínos contínua por 28 anos e interrompida durante 5 meses (Coleta 1) e 12 meses (Coleta 2).....40
- Tabela 4** – Carbono orgânico total (COT) e quociente microbiano (qMIC) de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação de dejetos líquidos de suínos contínua por 28 anos e interrompida durante 5 meses (Coleta 1) e 12 meses (Coleta 2)42
- Tabela 5** – Respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico (qCO₂) de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação de dejetos líquidos de suínos contínua por 28 anos e interrompida durante 5 meses (Coleta 1) e 12 meses (Coleta 2)44
- Tabela 6** – Índice de riqueza de Menhinick (S), índice de diversidade de Shannon (H') e índice de dominância de Simpson (D) de bactérias, arqueas e fungos do solo influenciados por aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos.....51
- Tabela 7** – Atributos químicos de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua ou interrompida de dejetos líquidos de suínos (DLS) na estação experimental do IAPAR, Palotina-PR.....60
- Tabela 8** – Atividade das enzimas arilsulfatase (AR), β -Glicosidase (β -G), fosfatase ácida (FA), fosfatase básica (FB) e hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) em um Latossolo Vermelho Distroférico após cinco meses (coleta 1) de interrupção ou sob aplicação contínua de dejetos líquidos de suínos (DLS).....63

Tabela 9 –Atividade das enzimas arilsulfatase (AR), β -Glicosidase (β -G), fosfatase ácida (FA), fosfatase básica (FB) e hidrólise do diacetado de fluroesceína (FDA) de um Latossolo Vermelho Distroférico após doze meses (coleta 2) de interrupção ou sob aplicação contínua da aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS)	65
Tabela 10 –Correlações de Spearman (r , $p \leq 0,05$) entre variáveis enzimáticas e químicas de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação de DLS. Dados referentes a todos os tratamentos e profundidades do estudados.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
BMS	Biomassa microbiana do solo
CBM	Carbono da biomassa microbiana
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DLS	Dejeto Líquido de Suínos
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IAPAR	Instituto Agrônômico do Paraná
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MOS	Matéria Orgânica do Solo
NBM	Nitrogênio da Biomassa Microbiana do solo
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBS	Respiração Basal do Solo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNOS (DLS) NA AGRICULTURA	15
2.1.1	Uso de DLS e Biomassa Microbiana do Solo	17
2.1.2	Uso de DLS e Atividade Enzimática do Solo	20
2.2	DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO	22
3	ARTIGO A: ATRIBUTOS E DIVERSIDADE MICROBIANA EM SOLO SOBRE APLICAÇÃO CONTÍNUA E INTERROMPIDA DE DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNOS	28
3.1	RESUMO.....	28
3.2	ABSTRACT	28
3.3	INTRODUÇÃO	29
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.4.1	Área de Estudo e Amostragem.....	31
3.4.2	Análises Microbiológicas.....	33
3.4.3	Extração de DNA do Solo	34
3.4.4	Condições para Amplificação de Bactérias.....	34
3.4.5	Condições para Amplificação de Arqueas	35
3.4.6	Condições para Amplificação de Fungos.....	36
3.4.7	Análise Estatística e Perfis de DGGE	37
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.5.1	Atributos Microbiológicos	38
3.5.2	Perfis genéticos da comunidade microbiana por DGGE (Denaturing gradiente gel electrophoresis).....	45
3.6	CONCLUSÕES	51
4	ARTIGO B: ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO APÓS APLICAÇÃO CONTÍNUA E INTERROMPIDA DE DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNOS	53
4.1	Resumo	53

4.2	ABSTRACT	53
4.3	INTRODUÇÃO	54
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.4.1	Área de Estudo e Amostragem.....	56
4.4.2	Determinação de Atributos Químicos do Solo	57
4.4.3	Determinação das Atividades Enzimáticas do Solo.....	57
4.4.4	Análise Estatística	58
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.5.1	Atributos Químicos	58
4.5.2	Atividade Enzimática	61
4.6	CONCLUSÕES	67
5	CONCLUSÕES GERAIS	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICES	81
	APÊNDICE A – Perfil de DGGE da comunidade bacteriana de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquido de suínos (DLS). Coleta 1= Interrupção durante 5 meses.	81
	APÊNDICE B – Perfil de DGGE da comunidade bacteriana de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquido de suínos (DLS). Coleta 2= Interrupção durante 12 meses.	82
	APÊNDICE C – Perfil de DGGE da comunidade de archaea de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquido de suínos (DLS). Coleta 1= Interrupção durante 5 meses.	83
	APÊNDICE D – Perfil de DGGE da comunidade de archaea de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquido de suínos (DLS). Coleta 2= Interrupção durante 12 meses.	84

APÊNDICE E – Perfil de DGGE da comunidade de fungos de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquido de suínos (DLS). Coleta 1= Interrupção durante 5 meses.	85
APÊNDICE F – Perfil de DGGE da comunidade de fungos de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquido de suínos (DLS). Coleta 2= Interrupção durante 12 meses.	86

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade que tem grande relevância para desenvolvimento social e econômico do Brasil. Os Estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul são responsáveis por grande parte dos suínos abatidos no país, com a produção de grande volume de dejetos suínos. A produção de suínos é realizada, predominantemente, em sistema de confinamento, o que torna a forma líquida de dejetos a mais representativa, denominado DLS (dejeito líquido de suínos).

O DLS é muito utilizado como fertilizante orgânico nos solos agrícolas, pois apresenta em sua composição macro e micronutrientes, contribui para o fornecimento de matéria orgânica e fontes de carbono que estimulam a biomassa e a atividade microbiana. Além disso, pode apresentar vantagens econômicas por substituir parcialmente ou totalmente os fertilizantes minerais, reduzindo os custos de produção pelos agricultores. No entanto, o custo de transporte do DLS para áreas distantes é elevado, o que restringe seu campo de utilização e acaba fazendo com que seja aplicado em grandes quantidades e por período prolongado em uma mesma área.

Com isso, o uso excessivo do DLS em uma mesma área torna-se um fator de risco ambiental, pois pode modificar propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, devido ao acúmulo de sais, metais pesados e introdução de organismos patogênicos. Essas mudanças influenciam principalmente a microbiota do solo – por ser o compartimento vivo e mais sensível – de maneira direta e indireta. Os efeitos diretos estão ligados à própria toxicidade de elementos sobre os microrganismos, e os efeitos indiretos por afetar o desenvolvimento das plantas, que estimulam a microbiota através dos exsudatos radiculares.

Para prevenir efeitos negativos com o uso de DLS, uma das alternativas seria reduzir o número de aplicações anuais ou a dose aplicada. No entanto, a interrupção de DLS ainda precisa ser estudado. Diante disso, esta dissertação foi realizada com o objetivo de compreender o efeito que a interrupção provocaria avaliando-se atributos microbiológicos do solo em comparação à área que continuou a receber o resíduo. Para isso, os resultados deste trabalho, foram divididos em dois artigos.

No artigo A, buscou-se compreender os efeitos da interrupção da aplicação de DLS sobre o carbono e o nitrogênio microbiano, atividade metabólica e o perfil genético das comunidades microbianas.

No artigo B, o objetivo foi avaliar a atividade enzimática do solo sob aplicação contínua e interrompida de DLS, e as correlações das enzimas com os atributos químicos.

A hipótese testada neste trabalho foi de que a interrupção até 12 meses da aplicação de DLS em solo cujo dejetos foi aplicado durante 28 anos resulta em alterações na quantidade e atividade microbiana, na estrutura genética e na diversidade da comunidade microbiana do solo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar atributos microbiológicos em um Latossolo Vermelho Distroférrico sob aplicação contínua por 28 anos de dejetos líquido de suínos, em comparação à interrupção da aplicação por 5 e 12 meses.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNOS (DLS) NA AGRICULTURA

Segundo o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2017), em 2016 o Brasil foi o quarto maior produtor de carne suína no mundo, totalizando 3,73 milhões de toneladas. A região sul do Brasil foi a responsável por 69% do total de suínos abatidos no País, sendo o Estado de Santa Catarina o maior abatedor, seguido pelo Paraná e Rio Grande do Sul.

A suinocultura é uma das atividades mais importantes para economia nacional, devido à geração de emprego e renda (CARDOSO; OYAMADA; SILVA, 2015; SOUZA et al. 2013). Além disso, apresenta importância social pois essa atividade é praticada em pequenas propriedades rurais (SOUSA et al., 2014). Como consequência dessa produção, principalmente em sistema de confinamento, há um grande volume de dejetos suínos gerados. O dejetos líquido de suínos representa 95% do total de dejetos suínos, assim denominado como DLS (dejetos líquido de suínos) (KONZEN, 2003).

O DLS é um resíduo constituído de fezes, urina, restos de ração e água de lavagem das instalações (BERTONCINI, 2011) e sua composição química é muito variável em função de fatores como raça, idade, alimentação e eventuais tratamentos dos animais (CORRÊA et al., 2011).

Estima-se que o volume médio de efluentes produzidos por um suíno na fase de crescimento e terminação seja de 3,5 L/dia. Nessa estimativa, acrescenta-se 1 L de água por suíno, que é uma estimativa da quantidade de água usada pelos produtores para limpeza das baias, tem-se um volume de DLS produzido por suíno de 4,5 L/dia (OLIVEIRA; SILVA; PERDOMO, 2012). Assim, como em 2016 foram abatidas 42,3 milhões de cabeças de suínos (IBGE, 2017), estima-se que o volume de DLS gerado por dia ficou em torno de 192 milhões de litros.

O manejo do DLS gerado pode ser feito por meio de armazenagem ou tratamento, para sua posterior reutilização. Algumas alternativas mais utilizadas como forma de tratamento são as lagoas de decantação, biodigestores, compostagem, cama sobreposta, estequeiras e bioesterqueira (CARDOSO; OYAMADA; SILVA, 2015; CORRÊA et al., 2011; KUNZ; HIGARASHI; OLIVEIRA,

2005). A escolha de qual tratamento usar dependerá do sistema de produção, da quantidade de dejetos produzidos, do local e dos recursos financeiros do pecuarista.

O manejo de DLS mais comum no Brasil é o tratamento em esterqueiras e lagoas de decantação, pois possibilita uso posterior como fertilizante, apresentam facilidade operacional e, principalmente, baixo custo de instalação e manutenção (CARDOSO; OYAMADA; SILVA, 2015). O objetivo destes tratamentos antes da reutilização do DLS é ocasionar a fermentação biológica da matéria orgânica que acelera a mineralização dos nutrientes e diminui o potencial de inóculo de organismos com risco sanitário e ambiental (SEGANFREDO, 2012). A reutilização do DLS como fertilizante orgânico deve ser realizada de maneira criteriosa, levando-se em consideração o tipo de adubação (manutenção ou correção), a composição química DLS, o tipo de solo, a exigência da cultura e a época de aplicação (OLIVEIRA; SILVA; PERDOMO, 2012).

Seguindo os critérios acima, o uso de DLS nas áreas agrícolas acarretará em vantagens, como o aumento de matéria orgânica do solo (MOS) (LOURENZI et al., 2011; MORALES et al., 2016; PLAZA et al., 2004), aumento nos teores de nutrientes (CORRÊA et al. 2011; COUTO et al., 2013), maior atividade e diversidade da macrofauna e de microrganismos (BALOTA et al., 2014; LI et al., 2015; SILVA et al., 2014) e melhorias em atributos físicos ligados a estrutura do solo (RAUBER et al., 2012).

Além disso, o uso de DLS é vantajoso economicamente – quando comparado ao preço dos fertilizantes minerais – pois reduz os custos de produção durante a implantação das culturas agrícolas. No entanto, a viabilidade econômica do uso agrícola do DLS depende do conteúdo de massa seca e da distância entre a granja de suínos e a lavoura. Como o custo de transporte para áreas distantes é elevado, o DLS acaba sendo aplicado muitas vezes e em grande quantidade na mesma área, podendo ocasionar contaminação ambiental (ALVES; MESQUITA JÚNIOR ; ALVES NETO, 2016; BERTONCINI, 2011; MIYAZAWA; BARBOSA, 2015).

Quando o manejo do DLS como fertilizante é deliberado pelo uso prolongado e de doses excessivas na mesma área, pode-se observar danos ambientais como a contaminação de rios e lençóis subterrâneos, emissão de gases nocivos, acúmulo de nitratos, sais e metais pesados no solo e patógenos (BASSO et al., 2012; GIROTTO et al., 2010; KUNZ; HIGARASHI; OLIVEIRA, 2005; HERNÁNDEZ; POLO; PLAZA, 2013).

A aplicação de DLS nas áreas agrícolas tem sido objeto de diversos estudos, especificamente no campo da ciência do solo ao avaliar as propriedades físicas e químicas (COMIN et al. 2013; SCHERER; BALDISSERA; NESI, 2007; SCHERER, NESI; MASSOTTI, 2010; CHERUBIN et al., 2015), biológicas, microbiológicas e bioquímicas (BALOTA; MACHINESKI; TRUBER, 2011; BALOTA et al., 2014; PLAZA et al., 2004; SOUSA et al., 2014; SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2014). Apesar disso, dúvidas ainda persistem sobre o efeito do uso do DLS na dinâmica funcional do solo, principalmente em áreas que já fazem uso do DLS por período prolongado.

A atividade suinícola deve seguir a legislação ambiental, como a Lei nº 6.938 de 1981, que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente e objetiva preservar ou melhorar a qualidade ambiental, ressaltando importantes definições de poluição e poluidor (BRASIL, 1986). Outra legislação que apresenta relação direta com a suinocultura é a Lei nº 9.433/97, que estabelece a Política Nacional de Recursos Hídricos (BRASIL, 2000). Além disso, deve-se atentar aos valores orientadores de referência de qualidade (VRQ) que estipulam a concentração máxima permitida para Cu, Zn e Mn, conforme Resolução n. 420/2009 (alterada pela Resolução CONAMA nº 460/2013) do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2009).

2.1.1 Uso de DLS e Biomassa Microbiana do Solo

As aplicações de DLS podem resultar em aumento da biomassa, atividade, diversidade e funcionalidade dos microrganismos do solo (BALOTA, 2017; MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003; INSAM; HUTCHINSON; REBER, 1996; LI et al., 2015; SEGANFREDO; 2012), pois representa uma fonte de nutrientes e energia benéfica a biomassa microbiana do solo (BMS). No entanto, metais pesados e outros compostos deletérios podem estar presentes na composição do DLS, provocando diminuição da biomassa microbiana e, conseqüentemente, na qualidade do solo (BASSO et al., 2012; INSAM; HUTCHINSON; REBER, 1996; QUADRO et al., 2011). A redução da qualidade do solo compromete sua capacidade em sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde de pessoas, animais e plantas (DORAN; PARKIN, 1994).

Por serem sensíveis às mudanças no ambiente, atributos microbiológicos são amplamente usados como indicadores de qualidade do solo, devido ao manejo, adição de dejetos ou poluição (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007; HE et al., 2003; STEFANOWICZ et al., 2012). Os teores de C, N e P da biomassa microbiana (CBM, NBM e PBM), atividade enzimática e respiração microbiana são comumente usados por serem os atributos reconhecidamente sensíveis e confiáveis para monitorar a resposta microbiana frente às mudanças ambientais (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007; GREGORICH et al., 1994; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010).

A biomassa microbiana do solo (BMS) é o componente vivo e mais ativo da MOS (JENKINSON; LADD, 1981), sendo constituída principalmente por fungos, bactérias, protozoários e arqueas e essencial na ciclagem de C, N e P (SOUZA et al., 2010). A BMS é responsável pela decomposição de resíduos orgânicos e representa cerca de 1 a 5% do C, 3 a 5% do N (JENKINSON; POLWILSON, 1976) e 1 a 3% do P (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) totais do solo, representando um importante reservatório de nutrientes.

O P e N imobilizados nas células microbianas são liberados ao solo quando ocorre o rompimento e morte das células microbianas, em virtude do ciclo de vida, intensidade de manejo ou variações climáticas (BUCHANAN; KING, 1992). O CBM representa a quantidade de C imobilizado nas células microbianas (INSAM, 2001), e pode estimar a quantidade de microrganismos presentes. Apesar disso, determinações da quantidade de microrganismos no solo não fornecem indicações sobre os níveis de atividade das comunidades microbianas, visto que parte da biomassa pode estar inativa (TÓTOLA; CHAER, 2002; MENDES et al., 2011). Nesse contexto, lança-se mão de avaliações da quantidade de CO₂ liberada pela respiração dos microrganismos, ou, respiração basal do solo (RBS) para mensurar a atividade microbiana. Em definição, a RBS é a soma das funções metabólicas nas quais o CO₂ é produzido. Essa medida possui relação com as condições abióticas do solo, entre elas umidade, temperatura e aeração (CATTELAN; VIDOR, 1990).

O valor de CBM em associação com a RBS permite calcular o quociente metabólico do solo (qCO₂), que é a razão da RBS por unidade de CBM e tempo, e possibilita estimar a eficiência do uso de substratos pelos microrganismos do solo (ANDERSON; DOMSCH, 1993). Da mesma forma, a razão entre o CBM e o carbono orgânico total (COT) gera um índice chamado de quociente microbiano

(qMIC), que indica o acúmulo de MOS e qualidade dos resíduos orgânicos adicionados (POWLSON; BROOKES; CHRISTENSEN, 1987).

Estudos envolvendo atributos microbiológicos em áreas de aplicação de DLS são reportados por diversos autores. Lalande et al. (2000), observaram que a aplicação de até 90 m³ de DLS ha⁻¹ em um Gleissolo resultou em aumento nos teores de CBM e NBM na camada de 0 a 15 cm. Esses autores consideraram que os efeitos positivos sobre a biomassa microbiana ocorrem principalmente em função de o COT representar uma fonte de energia para o crescimento microbiano.

Plaza et al. (2004) verificaram diferenças entre o tratamento com aplicação de DLS e o tratamento com fertilizante mineral e controle (dose zero). Nesse trabalho, após o quarto ano de uso de 120 m³ DLS ha⁻¹ ano⁻¹, o CBM aumentou 69% em relação ao controle. Apesar disso, os teores de COT foram iguais para todos os tratamentos, portanto, o aumento de CBM foi atribuído ao aumento da oferta de N pelo DLS, utilizado pelos microrganismos para o metabolismo de proteínas. Esses autores sugerem ainda que a medida de CBM é mais efetiva do que o COT, pois responde mais rapidamente e com maior sensibilidade às mudanças do solo. Sendo assim, as medidas de curto prazo da biomassa microbiana podem refletir a tendência de longo prazo da MOS (POWLSON; BROOKES; CHRISTENSEN, 1987).

Sousa et al. (2014) relataram aumento do CBM (682 mg de C kg⁻¹ solo⁻¹) 60 dias depois da aplicação de DLS em Argissolo Vermelho Amarelo cultivado com café (*Coffea arabica*) e atribuíram este acréscimo ao incremento de material orgânico dissolvido presente no DLS. Já Plaza, García-Gil e Polo (2006), avaliaram o uso de DLS até 120 dias após a aplicação e verificaram que a maior parte do C orgânico foi prontamente decomposta em 30 dias, promovendo aumentos de CBM, qMIC, RBS e qCO₂. Esses autores concluíram que a quantidade e atividade da biomassa não foram persistentes, já que os valores iniciais medidos no solo com aplicação de DLS diminuíram e atingiram o mesmo valor apresentado pelo solo controle (sem aplicação) em um período relativamente curto.

Em experimento de longo prazo (15 anos), Balota et al. (2014) avaliaram as alterações nas propriedades microbiológicas e químicas de um Latossolo Vermelho de textura argilosa após a aplicação de diferentes doses de DLS em sistema plantio direto e convencional e observaram aumento no CBM, NBM e redução do qCO₂ em todas as doses, comparadas ao controle. Além disso, verificaram que as variáveis microbiológicas foram mais sensíveis que as químicas em detectar

mudanças no ambiente, sugerindo que os efeitos de curto prazo do DLS sobre os indicadores microbianos podem refletir tendências de longo prazo.

Silva et al. (2015) ao avaliarem a qualidade microbiológica do solo sob pastagens com diferentes históricos de uso de DLS concluíram que aplicações sucessivas em pastagem não influenciaram o CBM e a respiração microbiana. Matos et al. (2016) relataram que a aplicação durante dois anos de $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ em um Latossolo de textura arenosa sob pastagem promoveu aumentos da população de rizóbios e teores de CBM e NBM. Esses autores destacaram que os efeitos da aplicação de DLS foram marcantes em virtude do solo possuir baixos teores iniciais de matéria orgânica. Logo, o carbono orgânico adicionado via DLS representou importante fonte de energia e nutrientes para os microrganismos do solo, que provocou aumento da biomassa microbiana.

Em outro estudo, Morales et al. (2016) avaliaram atributos microbiológicos em solo que recebeu adubação com ureia, dejetos suíno líquido ou sólido durante nove anos e concluíram que as aplicações incrementaram a atividade microbiana do solo e o teor de MOS, principalmente na forma líquida.

Os diferentes valores de CBM e NBM, bem como de atividade microbiológica reportados na literatura dependem do tipo de solo, teores de C e N no DLS, da dose aplicada, do sistema de cultivo, de quanto tempo o DLS é aplicado na área e da periodicidade de aplicação (BALOTA et al., 2014; PLAZA et al., 2004; SOUSA et al., 2014; SILVA et al., 2015).

Zilli et al. (2003) comentam que as avaliações da biomassa microbiana são úteis em estimar a quantidade dos microrganismos, mas não considera sua composição em termos de diversidade ou estrutura genética da comunidade microbiana. Por isso, estudos envolvendo a diversidade genética e funcional de microrganismos do solo têm se tornado expressivos, especialmente com o advento das técnicas moleculares (MENDES et al., 2011).

2.1.2 Uso de DLS e Atividade Enzimática do Solo

Avaliações da atividade microbiana do solo podem ser verificadas pela quantificação de compostos metabólicos liberados pelos organismos, tais como as enzimas que têm participação essencial nos ciclos biogeoquímicos (DICK, 1997).

A atividade enzimática no solo tem origem a partir de enzimas produzidas por microrganismos, plantas e animais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No entanto, a maior parte das enzimas são produzidas por microrganismos, e quando se encontram no interior da célula recebem a denominação de endoenzimas. Quando estão ligadas à membrana externa ou quando excretadas, ou após a morte celular são denominadas enzimas extracelulares e podem permanecer ativas no solo (BALOTA et al., 2013). Essas enzimas têm relação com as condições abióticas e bióticas do solo, sendo que a temperatura, umidade, pH, teor de COT e nutrientes exercem influência sobre a atividade das enzimas no solo.

As enzimas do solo podem ser estudadas de acordo com os ciclos biogeoquímicos em que atuam. Por exemplo, no ciclo do carbono há uma série de enzimas envolvidas como as amilases, celulasas, β -glicosidase, desidrogenase, lipases, esterases e proteases. As amilases e as celulasas participam ativamente no processo de decomposição de resíduos, disponibilizando carbono para o crescimento dos microrganismos (DENG; TABATABAI, 1994). A β -glicosidase têm relação com o ciclo do C ao realizar a hidrólise de celobiose, tendo como produto final a glicose (TABATABAI, 1994). A hidrólise do diacetato de fluoresceína (ou hidrólise de FDA) determina a atividade de três enzimas, lipases, esterases e proteases (BALOTA et al., 2013), que também estão envolvidas com a decomposição da MOS.

As fosfatases são um grupo que tem relação com o ciclo do P por catalisar a hidrólise de ésteres e anidridos de ácido fosfórico (MARTINEZ-SALGADO et al., 2010), e segundo o pH ótimo de atividade são classificadas como ácida (pH 5,0-6,5) ou alcalina (pH 10,0-11,0), as quais atuam na mineralização do P orgânico, disponibilizando fontes inorgânicas de P para as plantas (DICK, 1994).

A arilsulfatase catalisa a hidrólise de ésteres de aril sulfatos orgânicos, responsável por parte da ciclagem de S nos solos, atuando na mineralização de S orgânico para SO_4^{2-} , forma absorvida pelas plantas (BALOTA, 2017). No ciclo do N, as ureases, glutaminases e asparaginase desempenham funções essenciais que modificam a dinâmica deste nutriente no solo (CARDOSO et al., 2013).

A adição de DLS pode aumentar a atividade enzimática do solo, pois os compostos orgânicos presentes representam suprimento de substratos para ação dos microrganismos (BALOTA, 2017). Além disso, o C orgânico presente no DLS protege as enzimas do ataque de enzimas proteolíticas, que permanecem estáveis no

solo pela formação de complexos enzimas-compostos húmicos (DENG; TABATABAI, 1997). Em geral, o aumento da atividade enzimática está associado ao aumento da atividade biológica no solo, considerado como um indicador importante da qualidade do solo (DICK, 1994).

Lalande et al. (2000) observaram que a aplicação de até 90 m³ de DLS ha⁻¹ aumentou a atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina, arilsulfatase, urease e desidrogenase na camada de 0 a 15 cm. Balota, Machineski e Truber (2011) estudaram a atividade enzimática de um Latossolo Vermelho sob sistema de plantio direto (SPD) e plantio convencional (PC) submetido a diferentes doses de DLS e observaram que houve aumento da atividade da amilase. No entanto, para as enzimas celulase, fosfatase e arilsulfatase, a relação foi inversa.

Plaza et al. (2004) compararam a atividade enzimática de um Luvisolo sob aplicação de DLS, sem aplicação ou com fertilização mineral e observaram que o DLS aumentou a atividade das enzimas desidrogenase, catalase, protease, β -glicosidase e urease, mas reduziu a atividade da fosfatase ácida.

Estes trabalhos demonstram a complexidade em avaliar a atividade microbiológica através das enzimas do solo, pois elas apresentam tendências diferentes conforme a enzima estudada (BALOTA; MACHINESKI; TRUBER, 2011). Assim, ainda há discussões a serem feitas sobre o uso do DLS e a atividade enzimática do solo.

2.2 DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO

O solo é um habitat extremamente dinâmico e sua natureza heterogênea permite que organismos com metabolismos díspares possam conviver lado a lado, interagindo em estado de equilíbrio, proporcionando assim condições ideais para uma biodiversidade extremamente elevada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A biodiversidade em microbiologia é definida como o número de espécies em uma comunidade dentro de um ambiente específico (LAMBALIS et al., 2005). A definição de biodiversidade do ponto de vista da ecologia molecular refere-se ao número de sequências de DNA divergentes presentes no DNA total de uma comunidade (GARBEVA; VEEN; ELSAS, 2004). Estima-se que a abundância média nos solos varie entre 10⁷ a 10⁹ células vivas por grama (ALEXANDER, 1977). Para espécies bacterianas são esperados que ocorram 20 a 40 mil espécies em 1 grama

de solo. Contudo, apenas 1% das bactérias do solo são conhecidas. Para os fungos do solo, estima-se que 5% deles tenham sido descritos (RUMJANEK et al., 1998).

A diversidade de microrganismos do solo tem papel fundamental na regulação dos processos biogeoquímicos formadores e mantenedores dos ecossistemas (KONOPKA, 2009), como exemplo, a formação e estruturação de solos, decomposição da MOS, ciclagem de nutrientes e biorremediação (ANDREOTE; CARDOSO, 2016).

Fatores bióticos e abióticos do solo modulam a composição da comunidade microbiana. Por exemplo, o tipo de solo e a textura (GIRVAN et al., 2003), a disponibilidade de nutrientes, pH, Al^{3+} (JESUS et al., 2009) e a espécie vegetal alteram as populações microbianas. Nas áreas agrícolas, o uso do solo pode ocasionar redução da diversidade microbiana em resposta à seleção de microrganismos mais adaptados. A redução da diversidade microbiana é um importante indicador da perda de resiliência (ZILLI et al., 2003), funcionalidade (COTTA, 2016) e, por consequência, da qualidade do solo.

A resiliência refere-se à capacidade de populações ou comunidades microbianas do solo em retomar seu estado original, taxonômica e funcionalmente após um impacto ambiental (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016). Isso é possível graças à redundância funcional, que se refere à ocorrência de funções similares em grupos microbianos sob distintas condições edafoclimáticas (JURBURG; SALLES, 2015).

Conceitos de riqueza e equabilidade de espécies também devem estar bem definidos na discussão sobre biodiversidade. A riqueza refere-se à abundância numérica de espécies presentes no solo, enquanto a equabilidade reflete a abundância proporcional de espécies que ocorrem na mesma área (MENDES et al., 2011). A diversidade demonstra a variedade de espécies em um habitat, que pode ser medida em vários níveis taxonômicos ou em termos de determinadas características genéticas ou fenotípicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e revela o equilíbrio entre os diversos organismos e os domínios funcionais no solo (LAVELLE, 2000).

A diversidade de espécies em um contexto espacial é classificada de três maneiras: i) a diversidade alfa (α) ou diversidade local e é expressa pelo número (riqueza) de espécies em um habitat, ii) a diversidade gama (γ) ou regional que corresponde ao número total de espécies observados em todos os habitats em uma grande área (ex: bioma, ilha) e iii) a diversidade beta (β) é a própria variação de

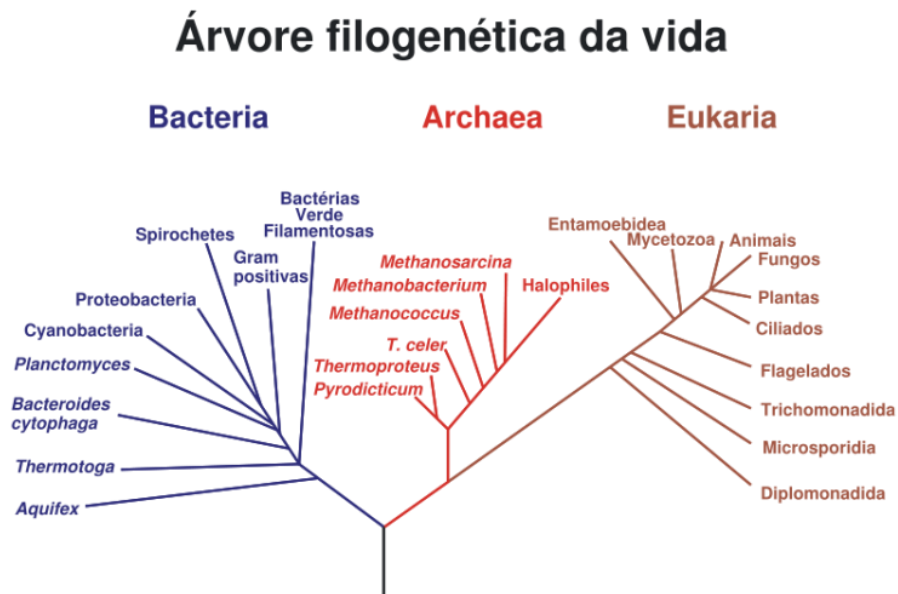
espécies ao longo de um gradiente ambiental, ou seja, mede o quanto a composição de espécies varia de um lugar para outro (WHITTAKER; WILLIS; FIELD, 2001).

A diversidade, densidade e funcionalidade microbiológica estão relacionadas a características intrínsecas do habitat solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e, portanto, são consideradas como os bioindicadores sensíveis frente a mudanças ambientais ocasionadas por atuações antrópicas ou naturais (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010).

Em ecossistemas inalterados (vegetação natural, floresta) ou em condições não estressantes, os microrganismos estão distribuídos no solo de forma equilibrada. Assim uma maior diversidade está ligada à estabilidade dos ecossistemas, pois o uso dos recursos disponíveis é mais eficiente, sendo menor o gasto de energia para sustentar a biomassa ali presente (TÓTOLA; CHAER, 2002). Já em agroecossistemas, pode haver variação da diversidade microbiana ao longo das estações do ano, haja vista, que o clima é modificado e há a substituição da cobertura vegetal que possibilitam a ocorrência de comunidades microbianas dominantes, acompanhadas de outras pouco abundantes (ZILLI et al., 2003). A redução da diversidade microbiana nos solos leva a extinção de espécies ou perda de alguma função que diminui a habilidade do ecossistema em resistir a períodos de estresse (GILLER et al., 1997).

A comunidade microbiana dos solos é constituída por representantes dos três domínios: Bacteria, Archaea e Eukarya (Figura 1), que são classificados por taxonomia cladística, também designada por sistemática-filogenética e baseada em dados de sequências genéticas (NICOLAU, 2017).

Figura 1 – Árvore filogenética universal baseada nas sequências do gene RNA ribossomal (RNAr) (WOESE; FOX, 1977).



Fonte: <http://www.evolucionismo.org>

As bactérias e arqueas são organismos procariotos e sua diversidade genética é estudada pela diversidade dos genes 16S DNAr (NIELSEN; WINDING, 2002). O gene 16S DNAr presente em procariotos possui aproximadamente 1.500 pares de bases e apresenta nove regiões conservadas intercaladas com nove regiões variáveis. O comprimento de cada região varia de organismo para organismo (PETROSINO et al., 2009). Essas regiões são denominadas regiões “V”, e podem ser amplificadas a partir de sequências homólogas de oligonucleotídeos iniciadores (primers).

O domínio Archaea se distingue do domínio Bacteria na filogenia e também por diferenças bioquímicas que lhes dão a capacidade de adaptação em ambientes adversos (alta salinidade, temperatura e acidez), cuja disponibilização do material energético é escasso. Tal capacidade advém de mecanismos bioquímicos e incluem modificações na composição da membrana que influenciam a permeabilidade, e numerosas adaptações secundárias entre as vias metabólicas (VALENTINE, 2007).

Dentro do domínio Eukarya, o reino Fungi possui uma grande diversidade. São organismos quimiorganotróficos e sua principal função é a decomposição de resíduos orgânicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A avaliação da

diversidade de fungos é baseada no gene ribossomal 18S DNAr (NIELSEN; WINDING, 2002). Em eucariotos, as regiões de interesse são chamadas de espaçadores transcritos internos (ITS - Internal Transcribed Spacer) localizadas entre os genes 18S-26S do rRNA (BOYER et al., 2001).

O desenvolvimento de técnicas moleculares tem contribuído na compreensão da estrutura e funcionamento de comunidades microbianas no solo (MENDES, et al., 2011). Embora o uso do conteúdo de G-C (guanina- citosina) do DNA fosse sugerido para taxonomia de bactérias desde a década de 1960, foi a partir dos estudos de Stackebrandt, Ludwig e Fox (1985), que o conhecimento sobre diversidade microbiana avançou (ZILLI et al., 2003).

Os estudos de diversidade genética atuais são baseados na extração e purificação do DNA das comunidades microbianas do solo, seguidas da amplificação dos genes que codificam o RNA ribossômico (RNAr) pela PCR (Polimerase Chain Reaction), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores universais, para espécies ou domínios específicos (MENDES et al., 2011). Posteriormente, os produtos da amplificação são separados por diferentes técnicas moleculares. As técnicas aplicadas podem ser quantitativas, como o caso da PCR em tempo real (real time), que é bastante sensível na quantificação do gene alvo em amostras ambientais (STUBNER, 2004). Além disso, através da clonagem e sequenciamento é possível inferir sobre a filogenia dos organismos componentes na amostra. Entretanto, o método que ainda é mais comum são as análises por eletroforese, obtendo-se um perfil da comunidade microbiana (fingerprinting) (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000), cujo padrão de bandas obtidos nessas análises reflete os genótipos dominantes e a diversidade genética (MENDES et al., 2011).

Das técnicas por eletroforese a DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) é amplamente utilizada em estudos de ecologia microbiana frente a diferentes formas do manejo do solo (BABUJIA et al., 2014; SILVA et al., 2013; SOUZA et al., 2012) e adubação mineral ou orgânica (FAISSAL et al., 2017; LI et al., 2015; MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003; YU et al., 2015; ZHEN et al., 2014)

Para a PCR-DGGE, primeiramente o DNA total é amplificado com primers que flanqueiam regiões hipervariáveis, sendo que uma sequência de oligonucleotídeos ricos em guanina e citosina (chamado de grampo G-C) é anexada

no final 5' do primer forward, modificando o comportamento de desnaturação e impedindo a completa separação de duplas fitas de DNA (MUYZER; SMALLA, 1998).

A técnica de DGGE se baseia na mobilidade eletroforética de fragmentos de DNA amplificados e parcialmente desnaturados de mesmos tamanhos, mas, de diferentes sequências de pares de base (pb), em um gel de poliacrilamida que contém gradiente linear desnaturante composto por ureia e formamida (MUYZER; WALL; UITTERLINDEN, 1993). Quando sequências de mesmos pb atingem o ponto de desnaturação em uma determinada posição no gel, a migração praticamente cessa. Sequências de pares de bases diferentes irão parar de migrar em diferentes posições devido à variação de gradiente de desnaturação (LERMAN et. al., 1984). O número e a posição dos fragmentos refletem os microrganismos dominantes na comunidade.

A partir dos perfis obtidos por DGGE é possível estimar os índices de diversidade. A forma mais comum de medir a diversidade é usar a riqueza de espécies, que consiste simplesmente no número de espécies que se obtém (PEET, 1974; WILSEY et al., 2005). Comumente são utilizados índices matemáticos que envolvem a abundância relativa de cada espécie na amostra. O índice de diversidade de Shannon combina dois atributos de uma comunidade, a riqueza de espécies e equabilidade (PEET, 1974).

Apesar da técnica de DGGE apresentar algumas vantagens quanto ao custo que é inferior comparado com técnicas de sequenciamento, apresenta algumas limitações quanto a prevalência de comunidades mais abundantes (SMIT et al., 1999), e em alguns casos fungos ou bactérias podem gerar múltiplas bandas, levando à falsa interpretação de que são de diferentes espécies (MUYZER; WALL; UITTERLINDEN, 1993). No entanto, para estudos comparativos, a DGGE ainda é uma técnica valorosa.

3 ARTIGO A: ATRIBUTOS E DIVERSIDADE MICROBIANA EM SOLO SOBRE APLICAÇÃO CONTÍNUA E INTERROMPIDA DE DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNOS

3.1 RESUMO

Objetivou-se avaliar os atributos microbiológicos e a diversidade microbiana do solo após a interrupção da aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS) ao solo após 28 anos de aplicação. O experimento foi estabelecido em 1988 em um Latossolo Vermelho Distroférico, sob sistema de plantio direto, em delineamento de blocos ao acaso com três repetições. As parcelas receberam doses de 0, 15 e 30 m³ ha⁻¹ duas vezes ao ano e em 2016 foram divididas e interrompeu-se a aplicação de DLS na metade da parcela, gerando o esquema fatorial 2 × 2 sendo duas doses de DLS (15 e 30 m³ ha⁻¹) e duas condições de aplicação (contínua ou interrompida). Realizaram-se duas amostragens de solo, aos cinco meses (coleta 1) e aos doze meses (coleta 2) após a interrupção da aplicação de DLS, nas profundidades de 0 – 10, 10 – 20 e 20 – 40 cm para determinar os teores de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM), respiração basal do solo (RBS), os quocientes metabólico (qCO₂) e microbiano (qMIC) e o carbono orgânico total (COT). A diversidade microbiana foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) para os domínios de Bacteria, Archaea e Eukarya (fungos). Houve efeito da interrupção da aplicação de DLS sobre o CBM na profundidade 0 – 10 cm que reduziu em 5% na coleta 1 e 14% na coleta 2. Também o NBM na profundidade 10 – 20 cm foi reduzido em 32% na coleta 1 e 29% na coleta 2 após a interrupção. A atividade microbiológica medida pela RBS também diminuiu após a interrupção. O qCO₂ não diferiu com a interrupção, mas mostrou-se elevado na dose 30 m³ ha⁻¹. O COT e o qMIC não diferiram entre as doses e com a interrupção das aplicações. Os perfis das comunidades de bactérias e arqueas apresentaram similaridade acima de 69% entre as aplicações contínuas e interrompidas. Os índices de diversidade e riqueza de bactérias foram mais altos em comparação aos encontrados para comunidade fúngica e de arqueas. Em contrapartida, a interrupção provocou efeito acentuado sobre os fungos do solo que tiveram sua diversidade diminuída em função do aumento da dominância de espécies. A diversidade de microrganismos foi maior na dose de 15 m³ de DLS ha⁻¹, independente da interrupção. A interrupção da aplicação de DLS até 12 meses tem efeito sobre a biomassa, diversidade e atividade dos microrganismos.

Palavras-chave: Atividade microbiológica. Biomassa microbiana. Dejetos animais. Diversidade microbiana.

ATTRIBUTES AND MICROBIAL DIVERSITY ON SOIL UNDER CONTINUOUS AND INTERRUPTED APPLICATION OF PIG SLURRY

3.2 ABSTRACT

We aimed to evaluate microbiological attributes and microbial diversity of the soil after the interruption of the application of pig slurry (PS) to the soil in an area with a historic of 28 years of application. The experiment was established in 1988 on a Rhodic Ferralsol under no-tillage system in a randomized block design with three replicates. The plots received doses of 0, 15 and 30 m³ ha⁻¹ twice a year and in 2016 were divided, with the interruption of the application of PS in half of the plot, generating the factorial

scheme 2 × 2 being two doses of PS (15 and 30 m³ ha⁻¹) and two application conditions (continuous or interrupted). Two soil samples were taken, at five months (sampling 1) and at twelve months (sampling 2) after the interruption of the application of PS, at depths of 0 - 10, 10 - 20 and 20 - 40 cm to determine the microbial biomass carbon (MBC) and microbial biomass nitrogen (MBN), soil basal respiration (SBR), metabolic quotient (qCO₂) and microbial (qMIC) and total organic carbon (TOC). The genetic microbial diversity was evaluated through the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for Bacteria, Archaea and Eukarya (fungi) domains. The interruption of the application of PS at depth 0 - 10 cm reduced the MBC by 5% in the sampling 1 and 14% in the sampling 2. Also the MBN reduced by 32% in sampling 1 and 29% in sampling 2 due to the interruption at depth 10 - 20 cm. The SBR decreased when the application of PS was interrupted. The qCO₂ did not change with the interruption, but was high in the dose 30 m³ ha⁻¹. TOC and qMIC did not differ between doses and between continuous or interrupted applications. The genetic profile of the bacteria and archaea communities showed similarity above 69% between continuous and interrupted applications. The diversity and richness index of the bacterial community were higher than those found for fungal and archaeal communities. In contrast, the interruption had a strong effect on the soil fungi, that had the diversity reduced by the increase of the species dominance. The diversity of microorganisms was higher at the dose of 15 m³ of PS ha⁻¹, regardless of the interruption. The interruption of the application of PS after 12 months has an effect on the biomass, diversity and activity of the microorganisms.

Key words: Microbiological activity. Microbial biomass. Animal manure. Microbial diversity.

3.3 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira destaca-se principalmente na região sul, que corresponde por 69% do total de suínos abatidos no País (ABPA, 2017). Como consequência, há geração de uma elevada quantidade de dejetos líquidos de suínos (DLS), constituído por fezes e urina dos animais, água de lavagem das instalações, restos de ração e outros rejeitos (BERTONCINI, 2011; BALOTA et al., 2014). Estima-se que o volume de DLS produzido no Brasil diariamente seja aproximadamente 192 milhões litros.

Uma das alternativas para reciclagem do DLS é o uso como fertilizante orgânico pois pode fornecer nutrientes essenciais às plantas, aumentar o teor de matéria (LOURENZI et al., 2011; MORALES et al., 2016; PLAZA et al., 2004; CORRÊA et al. 2011; COUTO et al., 2013) e possibilitar maior atividade e diversidade de microrganismos (BALOTA et al. 2014; LI et al., 2015; MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003). Apesar disso, quando o uso do DLS é deliberado quanto à

dose, época e periodicidade de utilização (OLIVEIRA; SILVA; PERDOMO 2012), torna-se um fator de risco ambiental.

Para monitorar o impacto do uso de DLS nas áreas agrícolas, uma das alternativas comumente empregadas são avaliações dos indicadores de qualidade do solo, como as medidas de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM) que representam a parte viva e ativa da matéria orgânica (JENKINSON; LADD, 1981) ou de atividade microbiana, como a respiração basal do solo (RBS) e atividade enzimática. Além destes, a diversidade microbiana é um indicador de qualidade responsivo às alterações ambientais em função das práticas de manejo e diferentes usos do solo (BABUJIA et al., 2014; COTTA, 2016; LAMBAIS et al., 2005; ZILLI et al., 2003).

A importância de avaliar a diversidade microbiana dos solos ocorre pelo fato de os microrganismos serem responsáveis por serviços ecossistêmicos essenciais (ANDREOTE; CARDOSO, 2016), que incluem os processos de pedogênese, decomposição da MOS e ciclagem de nutrientes (KENNEDY; DORAN, 2002), além de processos mais específicos, como a fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2014), biorremediação e biocontrole (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

Em áreas agrícolas, inúmeros trabalhos buscaram avaliar a diversidade microbiana usando a técnica de DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) em diferentes tipos de manejo (VAL-MORAES et al., 2009; BABUJIA et al., 2014; OVREAS; TORSVIK, 1998) e adubação (MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003; YU et al., 2015), isso porque mudanças na fertilidade do solo, como aumento ou redução de C orgânico e nutrientes afetam a diversidade microbiana do solo (RASCHE; CADISH, 2013) que a longo prazo determina a sustentabilidade do manejo adotado nas áreas. Alguns autores observaram que o uso de adubos orgânicos aumentou a diversidade de microrganismos em comparação aos adubos minerais ou sem adubação (FAISSAL et al., 2017; LI et al, 2015; ZHEN et al., 2014).

Trabalhos mostraram que os microrganismos, assim como plantas e animais, desenvolvem adaptações para sobreviverem nas condições ambientais em que são expostas (GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007; KAVAMURA et al., 2013). No solo, a intensidade de manejo, cultivo de diferentes plantas e adubações podem provocar distúrbios e, por consequência, selecionar determinados grupos microbianos (ANDREOTE; CARDOSO, 2016) que tem a capacidade de permanecer no ambiente

mesmo com a mudança. Neste caso, ocorre uma redução na diversidade que compromete sua funcionalidade.

Nesse contexto, a hipótese do trabalho é que a interrupção da aplicação de DLS modifica a microbiota em uma escala estrutural e funcional, que pode ser verificada por meio da variação de atributos como CBM, NBM, RBS e diversidade de genes 16S e 18S DNAr. Diante disso, o objetivo foi avaliar o efeito da interrupção da aplicação de DLS em uma área cujo dejetos foi aplicado durante 28 anos sobre os atributos microbiológicos e sobre a diversidade genética da comunidade microbiana.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Área de Estudo e Amostragem

O experimento foi estabelecido em 1988 na Estação Experimental do Instituto Agrônomo do Paraná localizado em Palotina, Estado do Paraná (24°17' LS, 53°50' LW). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa (subtropical úmido), com temperatura média anual de 20°C, precipitação anual total de 1800 mm (CAVIGLIONE et al., 2000).

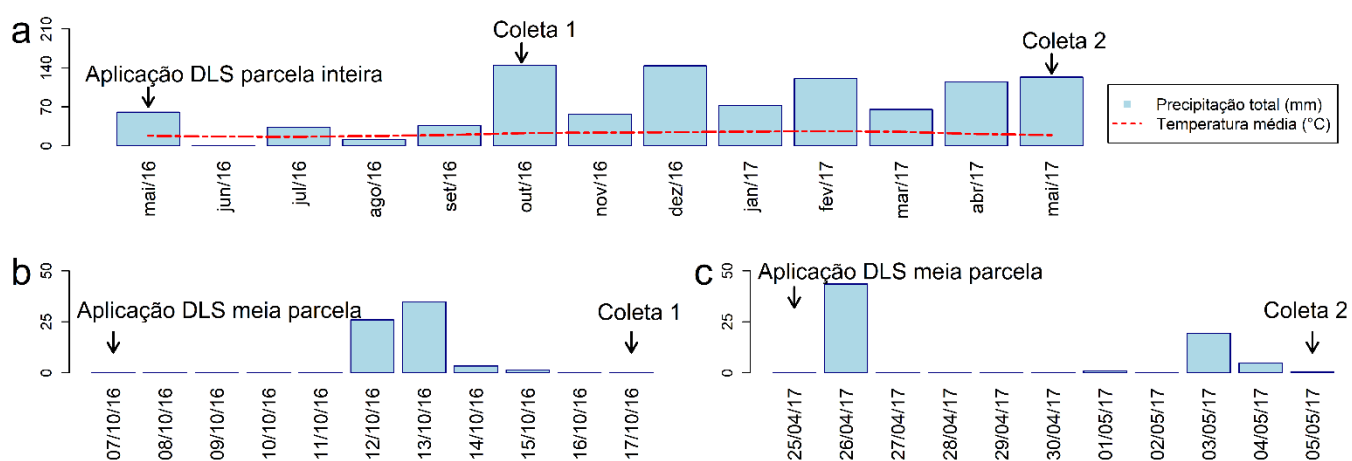
O solo foi classificado como um Latossolo Vermelho Distroférico de acordo com Santos et al. (2013). A granulometria foi determinada pelo método da pipeta conforme metodologia de Tavares Filho e Magalhães (2008), apresentando teor de argila de 695,4 g kg⁻¹, 134,2 g kg⁻¹ de silte e 170,4 g kg⁻¹ de areia.

O experimento consistiu de parcelas com 5,0 m de largura por 9,0 m de comprimento (45 m²) dispostas em delineamento de blocos ao acaso, com três repetições por tratamento. A área foi manejada sob sistema de plantio direto (SPD) em rotação de soja (*Glycine max* L.) ou milho (*Zea mays* L.) na safra de verão, e trigo (*Triticum aestivum* Lam.) ou aveia (*Avena sativa* L.) na safra de inverno. Durante os 28 anos, as aplicações de DLS ocorreram antecedendo as safras de verão e de inverno usando duas doses de DLS (15 e 30 m³ ha⁻¹) aplicadas duas vezes no ano, além de um controle (0 m³ ha⁻¹) que nunca recebeu DLS.

Em 2016, as parcelas foram divididas (exceto o tratamento controle), e interrompeu-se a aplicação de DLS em meia parcela gerando o esquema fatorial 2 x 2, sendo duas doses de DLS (15 e 30 m³ ha⁻¹) e duas condições aplicação (contínua

ou interrompida). A última aplicação de DLS na parcela inteira ocorreu em maio de 2016, a partir daí interrompeu-se a adição na metade da parcela para realizar as amostragens de solo, que ocorreram em outubro de 2016 (coleta 1) e maio de 2017 (coleta 2), cinco e doze meses após a interrupção. Os dados de precipitação e temperatura do referido período encontram-se na Figura 2.

Figura 2 – Precipitação total e temperatura média durante o período do experimento. a: período total do experimento; b: intervalo correspondente ao período de 10 dias entre a aplicação de DLS e a coleta 1 do solo e c: intervalo correspondente ao período de 10 dias entre a aplicação de DLS e a coleta 2 do solo.



Antes de ser aplicado, o DLS foi mantido em esterqueiras durante aproximadamente 70 dias para fermentação parcial e no dia da aplicação o mesmo foi agitado para homogeneização. A composição química média do DLS (coleta 1 e 2) apresentou 19,7 g L⁻¹ de matéria seca, 3,1 g L⁻¹ de N, 2,7 g L⁻¹ de P e 1,2 g L⁻¹ de K. Dez dias após a aplicação, coletou-se uma amostra composta por três subamostras de solo em cada uma das três repetições do tratamento. As amostras de solo foram obtidas com auxílio de uma pá reta nas profundidades de 0 – 10, 10 – 20 e 20 – 40 cm.

A caracterização dos atributos químicos da área foi realizada de acordo com procedimentos descritos por Pavan et al. (1992) para pH (CaCl₂ 0,01 M), teores de P e K⁺ (Mehlich-1), Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ (KCl 1 M), COT (Walkley-Black) e H⁺+Al³⁺ (Tampão SMP) (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos (DLS). Média de duas coletas.

	P	pH	Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺
	mg dm ⁻³	CaCl ₂	cmol _c dm ⁻³				
0 – 10 cm							
C	15,4	4,8	0,3	6,0	3,5	1,4	0,5
15IN	57,0	4,8	0,2	6,2	3,6	1,9	0,7
15CO	31,4	4,7	0,3	6,1	3,4	1,4	0,5
30IN	106,0	4,8	0,2	6,5	3,7	2,0	0,9
30CO	114,5	4,9	0,2	6,1	3,8	2,3	0,8
10 – 20 cm							
C	7,1	4,6	0,4	6,1	3,2	0,9	0,3
15IN	27,5	4,7	0,3	6,0	3,3	1,4	0,5
15CO	31,4	4,7	0,3	6,1	3,4	1,4	0,5
30IN	48,4	4,7	0,3	6,2	3,2	1,6	0,7
30CO	44,0	4,7	0,3	6,3	3,0	1,6	0,6
20 – 40 cm							
C	2,7	4,9	0,2	4,9	3,7	1,0	0,2
15IN	5,7	5,0	0,1	4,8	3,6	1,2	0,3
15CO	8,2	4,9	0,2	5,3	3,4	1,2	0,4
30IN	9,2	5,1	0,0	4,6	3,6	1,4	0,5
30CO	8,4	5,0	0,1	4,6	3,3	1,4	0,4

C= controle, 0 m³ ha⁻¹; 15IN= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação contínua.

3.4.2 Análises Microbiológicas

Para análises microbiológicas, as amostras de solo foram homogeneizadas, passadas por peneira de 4 mm e armazenadas a temperatura 7°C até a avaliação. A determinação da umidade foi realizada pelo método gravimétrico. Para determinar o C da biomassa microbiana do solo (CBM) e o N da biomassa microbiana (NBM), inicialmente, 20 gramas de solo foram pré-incubados e fumigados conforme descrito por Jenkinson e Powlson (1976), e após a fumigação ou não das amostras, foi realizada a extração do C e N pelo procedimento proposto por Vance, Brookes e Jenkinson (1987). Em seguida, o CBM foi determinado por titulação e os valores foram corrigidos pelo fator $K_c = 0,33$ (SPARLING; WEST, 1988). O NBM foi determinado por leitura colorimétrica (697 nm) e calculado usando fator de correção K_N de 0,54 (BROOKES et al., 1985).

A respiração basal do solo (RBS) foi determinada pelo método proposto por Jenkinson e Powlson (1976) com incubação das amostras por dez dias e posterior titulação. O quociente metabólico (qCO_2) foi obtido pela razão entre a RBS por unidade de CBM do solo no tempo de incubação, e o quociente microbiano ($qMIC$) foi calculado pela relação entre o CBM e o carbono orgânico total (COT).

3.4.3 Extração de DNA do Solo

A extração do DNA total foi realizada nas amostras da profundidade 0 – 10 cm, utilizando-se 3 gramas de solo de cada repetição que foram homogeneizadas e extraídas utilizando o Kit PowerMax® Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories), conforme instruções do fabricante. Verificou-se a pureza por eletroforese aplicando-se 5 μ L do DNA extraído mais 1 μ L de SYBR™ Gold em gel de agarose a 1% (m/v) em tampão TBE 1X, seguido pela visualização sob luz ultravioleta. A quantificação do DNA extraído foi realizada no equipamento NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

3.4.4 Condições para Amplificação de Bactérias

Após a extração do DNA realizou-se a amplificação da região V6 que codifica o gene 16S DNAr de Bacteria com os primers 968F-GC e 1401R (Tabela 2). As reações foram realizadas para volume final de 50 μ L contendo 2,5 mM de $MgCl_2$, 5 μ L de tampão 10X, 0,2 mM de cada dNPT, 0,4 mM de cada primer, 0,5 μ L de formamida, 5 unidades de DNA Taq Polimerase, 4 μ L de DNA total (7 a 15 ng) e completou-se para o volume final com água ultrapura. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 4 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 10 min; e 4°C para manutenção. Verificou-se a qualidade da amplificação por eletroforese em gel de agarose 1% e em seguida o DNA foi concentrado para volume de 13 μ L no Concentrator plus (Eppendorf). Os produtos da amplificação do 16S DNAr (~400 ng) foram submetidos à análise por DGGE (equipamento modelo DGGEK- 2401, C.B.S Scientific Company) usando um gel de poliacrilamida 6% (proporção de acrilamida: bisacrilamida, 37,5: 1) com gradiente desnaturante de 25% a 60%. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 0,5X (Tris base-ácido acético-EDTA 0,5M pH 8,0) a 60°C

por 16 h, a 85 V e 500 mA. Ao término da corrida o gel foi corado com brometo de etídio por 5 minutos, lavado com água visualizado sob luz ultravioleta.

3.4.5 Condições para Amplificação de Arqueas

Para amplificação do fragmento do gene 16S DNAr de Arqueas foram utilizados os primers ARCH21F e ARCH958R (Tabela 2) e, posteriormente na segunda PCR (Nested) utilizou-se os primers ARCH340F-GC e ARCH519R (Tabela 2). Ambas reações foram realizadas utilizando 1,8 mM de MgCl₂, 5 µL de tampão 10X 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada primer, 2,5 unidades de DNA Taq Polimerase, 0,02µl de BSA (5 mg.ml⁻¹), 3 µL de DNA total (7 a 15 ng) e água ultrapura para completar o volume para 50 µL. As condições para amplificação foram: 1 ciclo inicial de desnaturação por 5 min a 95°C; 30 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s, 72°C por 1 min e 1 ciclo final de extensão por 6 minutos a 72°C; e 4 °C para manutenção. O DNA amplificado foi concentrado para volume de 13 µL no Concentrator plus (Eppendorf) e aproximadamente 400 ng foram submetidos à análise por DGGE (equipamento modelo DGGEK- 2401, C.B.S Scientific Company) em gel de poli-acrilamida 8% (proporção de acrilamida: bisacrilamida, 37,5: 1) usando gradiente desnaturante de 20 a 65%. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 0,5X (Tris base-ácido acético-EDTA 0,5M pH 8,0) a 60°C por 6 h, a 200 V e 500 mA. Ao término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio por 5 minutos, lavado com água e visualizado sob luz ultravioleta.

Tabela 2 – Região alvo do DNAr de bactérias, arqueas e fungos, nome dos oligonucleotídeos iniciadores (primers), sequência 5'-3', e referências.

Região Alvo do DNAr	Primer	Sequência 5'-3'	Autor (Ano)
16S DNAr/ Bacteria	968F-GC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC	Felske, et al. (1996)
	1401R	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	Felske, et al. (1996)
16S DNAr/ Archaea	ARCH21F ARCH958R	TTC YGG TTG ATC CYG CCR GA YCC GGC GT GAN TCC AAT T	Moyer et al. (1998)
	ARCH340F- GC	CGC CCG CCG CGC GCC GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC CTA CGG GGY GCA SCA G	Ovreas et al. (1997)
	ARCH519R	TTA CCG CGG CKG CTG	
18S DNAr/Fungo (ITS)	EF4	GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG	Anderson; Campbell; Prosser (2003)
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. (1990)
	ITS1F-GC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA	Gardes; Bruns (1993)
	ITS2R	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	White et al. (1990)

3.4.6 Condições para Amplificação de Fungos

A primeira PCR para amplificação do DNAr de 18S foi realizada com 0,2 mM dos primers EF4 e ITS4 (Tabela 2), 1,2 µL de tampão 10X, 0,45 µL de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 2,5 unidades de DNA Taq Polimerase, 3 µL de DNA total (7 a 15 ng) e água ultrapura para volume final de 15 µL. A reação foi conduzida sob a seguinte condição: 94 °C durante 5 min (1 ciclo); 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min 30 s (34 ciclos); 72 °C durante 5 min (1 ciclo); e temperatura de manutenção de 4 °C até a remoção.

Para segunda PCR (Nested), 3 µL do produto da primeira reação foram misturadas com 0,4 mM de cada dNTP, 0,75 mM de MgCl₂, 5,0 µL de tampão 10X; 0,2 mM do primer ITS1, 0,2 mM do primer ITS2 (Tabela 2) 2,5 unidades de DNA Taq Polimerase e o volume final de 25 µL foi completado com água ultrapura. As condições da reação foram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min; 34 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C 30 s e 1 ciclo de extensão final a 72 °C durante 5 min, a temperatura de manutenção até a remoção foi 4 °C. Após

verificação dos produtos da segunda PCR em gel de agarose (1%), os mesmos foram submetidos à análise por DGGE (equipamento modelo DGGEK- 2401, C.B.S Scientific Company) em gel de poliacrilamida 8% (proporção de acrilamida: bisacrilamida, 37,5:1) usando gradiente desnaturante de 35 a 60%. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 0,5X (Tris base-ácido acético-EDTA 0,5 M pH 8,0) a 60 °C por 16 h, a 85 V e 500 mA. Ao término da corrida o gel foi corado com brometo de etídio por 5 minutos, lavado com água visualizado sob luz ultravioleta.

3.4.7 Análise Estatística e Perfis de DGGE

Os dados foram testados quanto à adequação dos resíduos à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Bartlett. As variáveis que apresentaram ausência de normalidade ou homocedasticidade, foram transformadas pelo método de Box-Cox e novamente testadas. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e, quando significativos, os efeitos das doses e aplicação contínua e interrompida foram analisados pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). O tratamento controle ($0 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$) e as doses contínuas e interrompidas, foram comparados pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram processadas utilizando software R (versão 3.3.2).

Os perfis de DGGE foram analisados pelo programa BioNumerics (Applied Maths, versão 6.6). O posicionamento no dendrograma foi realizado a partir do algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard com índice de tolerância de 1%. Com os perfis de bandas do DGGE, calculou-se os índices de riqueza de Menhinick (S), diversidade de Shannon (H') e dominância de Simpson (D) conforme as equações:

$$S = \frac{hi}{\sqrt{H}}$$

$$H' = \sum_{i=1}^n -\frac{hi}{H} \ln \frac{hi}{H}$$

$$D = \frac{\sum_{i=1}^n hi(hi - 1)}{H(H - 1)}$$

Onde, n é o número de bandas no perfil de DGGE; h é a intensidade (i) de bandas individuais e H é a intensidade total de todas bandas no perfil.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Atributos Microbiológicos

A interrupção da aplicação de DLS após cinco e doze meses influenciou os atributos microbiológicos. Para nenhum dos atributos a interação entre fatores foi significativa, mas houve efeito dos fatores isolados. Na profundidade 0 – 10 cm o CBM da aplicação interrompida apresentou redução de aproximadamente 5% na coleta 1 e 14% na coleta 2 em relação a aplicação contínua (Tabela 3), mostrando que a microbiota do solo responde à falta de DLS.

A biomassa microbiana do solo sob aplicação interrompida ficou limitada em usar apenas os nutrientes e compostos que haviam no solo pelas aplicações anteriores, por isso o CBM foi menor. Já na aplicação contínua a biomassa microbiana não ficou limitada pois recebeu DLS, e com ele uma carga de carbono lábil e outros elementos facilmente assimiláveis.

Além disso, o próprio DLS transfere uma carga de microrganismos para o solo que pode resultar em aumento de CBM, como observado por Sakamoto e Oba (1994) e Plaza et al. (2004).

Lalande et al. (2000) sugerem que o carbono lábil do DLS adicionado na superfície do solo fica disponível para os microrganismos autóctones como fonte de energia e nutrientes, assim assume-se que eles se desenvolvem sem limitações. Em contrapartida, os microrganismos zimógenos mostram pico de crescimento em resposta a adição de resíduo no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Logo, como a coleta de solo foi realizada após dez dias de aplicação, a biomassa de C foi maior na aplicação contínua.

Na coleta 1 o CBM também diferenciou com as doses, sendo maior na de 30 m³ ha⁻¹ (673,2 mg kg⁻¹) e menor na de 15 m³ ha⁻¹ (631,4 mg kg⁻¹) (Tabela 3). Como a quantidade de dejetos aplicada é duas vezes maior na parcela da dose 30 m³ ha⁻¹, esta possui um estoque maior de carbono e nutrientes que representam fonte de energia e são liberados gradualmente para a biomassa microbiana, que tende a se

manter alta, já que há mais substrato para crescimento. Esse resultado corrobora outros trabalhos, em que houve aumento de CBM em função das doses crescentes de DLS, como por exemplo, Lalande et al. (2000), Balota et al. (2014) e Matos et al. (2016), os quais observaram que a aplicação de $90 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de DLS resultou em aumento de CBM e NBM na camada superficial do solo.

Na profundidade 10 – 20 cm o NBM da aplicação interrompida apresentou redução de aproximadamente 32% na coleta 1 e 29% na coleta 2 em relação a aplicação contínua. Esse fato é também atribuído ao maior aporte de nutrientes provindos do DLS, como discutido acima sobre o teor de CBM. Quadro et al. (2011) observaram que houve aumento linear de NBM até 18 Mg ha^{-1} . Balota, Machineski e Matos (2012) concluíram que a biomassa microbiana foi enriquecida com N e P em virtude das doses crescentes de DLS.

Quando as áreas com aplicação contínua e interrompida foram comparadas com o tratamento controle ($0 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$), houve diferença nas três profundidades e para as duas coletas. Essas diferenças foram verificadas no teor de CBM, que foi menor no controle e maior nas doses de 15 e $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ contínuas ou interrompidas (Tabela 3). Isso ocorre em resposta à disponibilidade de nutrientes fornecidos à comunidade microbiana pelo DLS. A adição durante 28 anos de fontes carbono orgânico facilmente degradáveis, como o DLS, estimula a atividade biológica em comparação com parcelas que não recebem aplicação de material orgânico (FAUCI; DICK, 1994; MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003).

Tabela 3 – Carbono da biomassa microbiana (CBM) e nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação de dejetos líquidos de suínos contínua por 28 anos e interrompida durante 5 meses (Coleta 1) e 12 meses (Coleta 2).

	Coleta 1						Coleta 2					
	CBM		NBM		CBM		NBM		CBM		NBM	
	mg kg ⁻¹		mg kg ⁻¹		mg kg ⁻¹		mg kg ⁻¹		mg kg ⁻¹		mg kg ⁻¹	
0 – 10 cm												
Dose (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)
	Int.	Cont.		Int.	Cont.		Int.	Cont.		Int.	Cont.	
15 m ³ ha ⁻¹	604,7*	658,1*	631,4 b	49,9	57,3	53,6 a	515,6*	636,6*	576,1 a	37,0	52,3	44,7 a
30 m ³ ha ⁻¹	668,7*	677,8*	673,2 a	64,8	59,8	62,3 a	581,2*	637,2*	609,2 a	40,8	51,6	46,2 a
\bar{x} (A)	636,7 B	668,0 A		57,4 A	58,5 A		548,4 B	636,9 A		38,9 A	51,9 A	
0 m ³ ha ⁻¹	360,4			40,2			304,8			34,5		
CV (%)	2,6			30,2			5,2			27,6		
10 – 20 cm												
15 m ³ ha ⁻¹	518,8*	535,1*	526,9 a	24,3	34,7	29,5 a	450,7*	456,2*	453,5 a	24,9	38,9	31,9 a
30 m ³ ha ⁻¹	533,9*	548,5*	541,2 a	29,8	44,6*	37,2 a	448,0*	455,1*	451,5 a	30,1	38,9	34,5 a
\bar{x} (A)	526,4 A	541,8 A		27,1 B	39,6 A		449,3 A	455,6 A		27,5 B	38,9 A	
0 m ³ ha ⁻¹	349,7			24,6			294,4			33,9		
CV (%)	7,1			19,4			9,1			19,8		
20 – 40 cm												
15 m ³ ha ⁻¹	369,3	371,5	370,4 a	22,0	24,4	23,2 a	336,9*	398,0*	367,5 a	18,1	22,5	20,3 a
30 m ³ ha ⁻¹	384,3	397,9*	391,1 a	41,3	24,1	32,7 a	338,3*	400,2*	369,2 a	18,9	24,4	21,6 a
\bar{x} (A)	376,8 A	384,7 A		31,6 A	24,3 A		337,6 B	399,1 A		18,5 A	23,4 A	
0 m ³ ha ⁻¹	293,8			22,8			219,6			17,5		
CV (%)	7,5			55,5			2,6			23,6		

Letras minúsculas na coluna comparam doses (15 e 30 m³ ha⁻¹) e letras maiúsculas na coluna comparam aplicação (Cont.= contínua e Int.= interrompida). Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p≤0,05). Asterisco (*) indica diferença significativa do tratamento controle (0 m³ ha⁻¹) em relação as doses contínuas e interrompidas pelo teste de Dunnet (p≤0,05).

Estima-se que o CBM represente 1 a 5% do COT do solo (JENKINSON; POLWILSON, 1976), logo, é um importante compartimento dentro do ciclo biogeoquímico do C. Neste trabalho, o teor de COT foi estatisticamente igual para todos os tratamentos (Tabela 4). Isso demonstra a importância de se utilizar indicadores mais rápidos como o CBM e NBM, já que a interrupção de DLS ocorreu até 12 meses e segundo Sparling (1997) e Plaza, García-Gil e Polo (2006), alterações no COT podem demorar décadas para aparecer, pois a maior parte da matéria orgânica é não-viva e relativamente estável.

Assim como neste trabalho, os resultados encontrados por Balota et al. (2014), Cherubin et al. (2015), Rochette, Angers e Côté (2000) e Plaza et al. (2004), não apresentaram diferenças significativas para o teor de COT em função da aplicação de DLS.

As doses contínuas e interrompidas também não diferiram quanto ao qMIC nas duas coletas (Tabela 4), o que demonstra que mesmo tendo interrompido a aplicação de DLS durante doze meses, a quantidade de matéria orgânica do solo permaneceu em um nível estacionário. Segundo Anderson e Domsch (2010) valores de qMIC altos indicam acúmulo de matéria orgânica no solo.

Tabela 4 – Carbono orgânico total (COT) e quociente microbiano (qMIC) de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação de dejetos líquidos de suínos contínua por 28 anos e interrompida durante 5 meses (Coleta 1) e 12 meses (Coleta 2).

Coleta 1				Coleta 2								
COT g dm ⁻³		qMIC %		COT g dm ⁻³		qMIC %						
0 – 10 cm												
Dose (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)			
	Int.	Cont.		Int.	Cont.		Int.	Cont.				
15 m ³ ha ⁻¹	18,7	18,0	18,4 a	3,2	3,6	3,4 a	18,7	20,9	19,8 a	2,8	3,1	2,9 a
30 m ³ ha ⁻¹	18,5	18,0	18,3 a	3,6	3,8	3,7 a	19,7	20,0	19,8 a	3,0	3,2	3,1 a
\bar{x} (A)	18,6 A	18,0 A		3,4 A	3,7 A		19,2 A	20,4 A		2,9 A	3,1 A	
0 m ³ ha ⁻¹	17,6			2,1			19,3			1,6		
CV (%)	9,8			23,5			6,1			8,1		
10 – 20 cm												
15 m ³ ha ⁻¹	13,1	13,4	13,2 a	4,0	4,0	4,0 a	12,5	14,0	13,2 a	3,7	3,3	3,5 a
30 m ³ ha ⁻¹	12,3	11,9	12,1 a	4,4*	4,6*	4,5 a	13,5	12,7	13,1 a	3,3	3,6	3,4 a
\bar{x} (A)	12,7 A	12,6A		4,2 A	4,3 A		13,0 A	13,4 A		3,5 A	3,4 A	
0 m ³ ha ⁻¹	11,9			3,0			12,7			2,3		
CV (%)	4,3			8,5			5,9			10,2		
20 – 40 cm												
15 m ³ ha ⁻¹	9,2	10,1	9,7 a	4,0	3,7	3,9 a	7,8	9,3	8,5 a	4,4*	4,3*	4,3 a
30 m ³ ha ⁻¹	9,8	8,2	9,0 a	4,1	4,8*	4,5 a	8,7	8,2	8,4 a	4,1*	4,9*	4,5 a
\bar{x} (A)	9,5 A	9,2 A		4,0 A	4,3 A		8,3 A	8,7 A		4,2 A	4,6 A	
0 m ³ ha ⁻¹	9,3			3,2			8,7			2,7		
CV (%)	13,2			13,4			21,9			18,3		

Letras minúsculas na coluna comparam doses (15 e 30 m³ ha⁻¹) e letras maiúsculas na coluna comparam aplicação (Cont.= contínua e Int.= interrompida). Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Asterisco (*) indica diferença significativa do tratamento controle (0 m³ ha⁻¹) em relação as doses contínuas e interrompidas pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

A RBS foi alterada tanto em função da interrupção, quanto das doses aplicadas. Já aos 5 meses após a interrupção (coleta 1), a RBS foi reduzida (profundidade 10 – 20 cm) de 10,5 mg C-CO₂ kg⁻¹ dia⁻¹ para 8,6 mg C-CO₂ kg⁻¹ dia⁻¹ em virtude de parar de aplicar o DLS (Tabela 5). Quanto às doses, a RBS foi maior na dose 30 m³ ha⁻¹ na camada 0 – 20 cm, já na camada 20 – 40 cm a RBS foi igual estatisticamente para ambos fatores.

Na coleta 2, as diferenças para RBS foram verificadas apenas na camada 0 – 10 cm, seguindo o mesmo comportamento da coleta anterior. A RBS reduziu de 13,1 mg C-CO₂ kg⁻¹ dia⁻¹ para 8,4 mg C-CO₂ kg⁻¹ dia⁻¹ em função da interrupção de DLS, sendo maior na dose 30 m³ ha⁻¹ em comparação a dose 15 m³ ha⁻¹ (Tabela 5). Isso pode ser atribuído ao fato de a carga orgânica ser maior na aplicação contínua de 30 m³ ha⁻¹ que fornece carbono facilmente degradável pela biomassa microbiana que libera mais CO₂ no processo de biodegradação.

De acordo com Couto et al. (2013) os altos níveis de C lábil e baixa relação C:N do DLS estimulam a atividade microbiana do solo. Enquanto na aplicação interrompida o solo não havia recebido DLS por cinco e doze meses, na aplicação contínua o solo recebeu DLS dez dias antes da amostragem. Segundo Rochette, Angers e Côté (2000), pelo menos metade das emissões totais de CO₂ ocorrem durante a primeira semana após a adição de dejetos ao solo.

Plaza, García-Gil e Polo (2006) avaliaram a RBS até 120 dias após a aplicação de DLS e observaram que os picos de liberação de CO₂ ocorreram nos primeiros 14 dias após a aplicação de DLS e se estabilizaram após 30 dias.

O qCO₂ apresentou diferença somente na coleta 1 em função do fator dose e variou de 0,2 a 1,6 mgC–CO₂·g⁻¹ CBM·hora⁻¹ na profundidade 0 – 10 cm e 0,5 a 1,0 mgC–CO₂·g⁻¹ CBM·hora⁻¹ na profundidade 10 – 20 cm, em ambas profundidades foi maior na dose 30 m³ ha⁻¹ de DLS, e menor na de 15 m³ ha⁻¹ seguindo o mesmo comportamento de CBM e RBS (Tabela 5).

O tratamento controle em algumas profundidades apresentou RBS maior (Tabela 5), o que indica alta atividade microbiana. No entanto, quando analisados os dados em conjunto, nota-se que o baixo CBM e alto qCO₂, indicam falta de substrato disponível para crescimento e manutenção dos microrganismos.

Tabela 5 – Respiração basal do solo (RBS) e quociente metabólico (qCO₂) de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação de dejetos líquidos de suínos contínua por 28 anos e interrompida durante 5 meses (Coleta 1) e 12 meses (Coleta 2).

Coleta 1						Coleta 2						
RBS			qCO ₂			RBS			qCO ₂			
mg C-CO ₂ kg ⁻¹ dia ⁻¹			mg C-CO ₂ g ⁻¹ CBM hora ⁻¹			mg C-CO ₂ kg ⁻¹ dia ⁻¹			mg C-CO ₂ g ⁻¹ CBM hora ⁻¹			
0 – 10 cm												
Dose (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)
	Int,	Cont,		Int,	Cont,		Int,	Cont,		Int,	Cont,	
15 m ³ ha ⁻¹	14,6	22,2	18,4 b	1,0*	1,4*	1,2 b	7,3	11,3*	9,3 b	0,6	0,7	0,6 a
30 m ³ ha ⁻¹	25,1*	26,5*	25,8 a	1,6	1,6	1,6 a	9,5	14,9*	12,2 a	0,7	1	0,8 a
\bar{x} (A)	19,9 A	24,3 A		1,3 A	1,5 A		8,4 B	13,1 A		0,6 A	0,8 A	
0 m ³ ha ⁻¹	16,5			1,9			4,8			0,7		
CV (%)	15,5			14,9			13,1			27,1		
10 – 20 cm												
15 m ³ ha ⁻¹	5,3*	6,8*	6,1 b	0,4*	0,5*	0,5 b	3,7	3,3	3,5 a	0,3	0,3	0,3 a
30 m ³ ha ⁻¹	11,9	14,1	13,0 a	0,9*	1,1*	1,0 a	3,9	3,4	3,7 a	0,4	0,3	0,3 a
\bar{x} (A)	8,6 B	10,5 A		0,7 A	0,8 A		3,8 A	3,4 a		0,3 A	0,3 A	
0 m ³ ha ⁻¹	13,9			1,7			3,0			0,4		
CV (%)	9,8			15,6			21,8			23,9		
20 – 40 cm												
15 m ³ ha ⁻¹	3,8*	5,0*	4,4 a	0,4*	0,6*	0,5 a	2,2	1,7*	1,9 a	0,3*	0,2*	0,2 a
30 m ³ ha ⁻¹	4,1*	5,1*	4,6 a	0,4*	0,5*	0,4 a	2,1	1,9*	2,0 a	0,3*	0,2*	0,2 a
\bar{x} (A)	3,9 A	5,0 A		0,4 A	0,6 A		2,1 A	1,8 A		0,3 A	0,2 A	
0 m ³ ha ⁻¹	9,4			1,4			3,3			0,6		
CV (%)	21,4			23,6			28,3			28,7		

Letras minúsculas na coluna comparam doses (15 e 30 m³ ha⁻¹) e letras maiúsculas na coluna comparam aplicação (Cont.= contínua e Int.= interrompida). Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p≤0,05). Asterisco (*) indica diferença significativa do tratamento controle (0 m³ ha⁻¹) em relação as doses contínuas e interrompidas pelo teste de Dunnet (p≤0,05).

Valores altos de qCO_2 na maior dose de DLS ($30\text{ m}^3\text{ ha}^{-1}$) podem ser explicados por um estresse causado pela incorporação de materiais orgânicos exógenos frescos ou algumas substâncias tóxicas presentes no DLS, assim como reportado por Plaza, García-Gil e Polo (2006) e Anderson e Domsch (1993).

Em contrapartida, Plaza et al. (2004) e Balota et al. (2014) observaram valores de qCO_2 mais altos nas menores doses de DLS e discutiram esse fato em razão das condições abióticas do solo, como pH, diferenças na acessibilidade de substratos pelos microrganismos e mudança na composição da comunidade microbiana (INSAM; HUTCHINSON; REBER, 1996).

Neste trabalho o índice de riqueza (S) de bactérias foi maior que o de fungos (Tabela 6) o que pode provocar aumento de qCO_2 em função de haver um predomínio de populações de bactérias. Isso corrobora Dilly e Munch (1998) ao observarem que a redução de qCO_2 indica que a proporção de r – estrategistas diminui, em relação à população de K – estrategistas ou que a biomassa fúngica é maior em relação à biomassa bacteriana, devido a uma maior eficiência no uso de substrato pelos fungos, em comparação com as bactérias (SAKAMOTO; OBA, 1994; FREY, ELLIOTT; PAUSTIAN, 1999).

3.5.2 Perfis genéticos da comunidade microbiana por DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)

Os perfis de DGGE revelaram alta similaridade entre as aplicações contínuas e interrompidas. No caso de bactérias, observou-se que a interrupção de DLS teve efeito sobre o perfil deste grupo, mas foi menos pronunciado do que as doses que determinaram os agrupamentos nos dendrogramas de similaridade (Figura 3a e b). Na coleta 1, a similaridade entre os tratamentos 30CO e 30IN foi de 89% e entre 15CO e 15IN foi de 91%, e destes em relação ao controle (C) foi de 62% (Figura 3a).

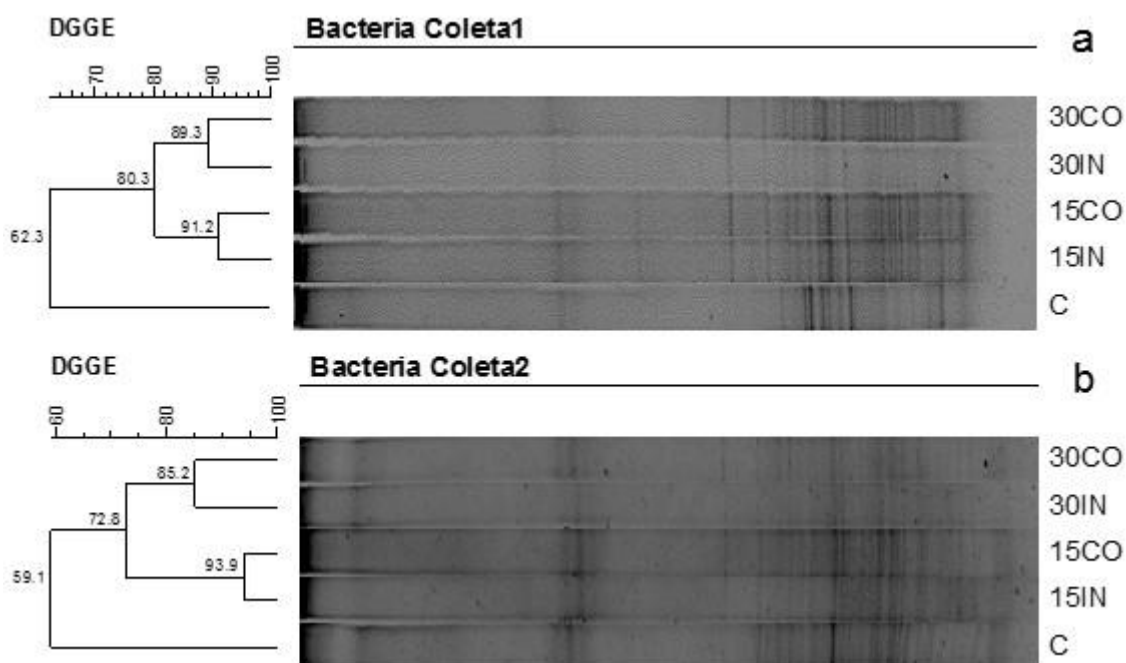
Na coleta 2, a similaridade também foi alta, sendo de 85% para tratamento 30CO e 30IN e 93% para 15CO e 15IN, e destes em relação ao controle a similaridade foi de 59% (Figura 3b). Apesar de o solo ter ficado 12 meses sem receber DLS, houve alta similaridade entre a aplicação contínua e interrompida dentro das doses. Isso pode ser explicado porque a fonte de carbono e nutrientes usada pelos

microrganismos foi a mesma, ou seja, aquela que veio do DLS, estimulando os microrganismos igualmente pois não há diversidade de substratos.

Souza et al. (2012) observaram que a estrutura das comunidades bacterianas de solos sob vegetação nativa apresentou baixa similaridade (35%) em relação às áreas cultivadas com soja e milho em plantio convencional e direto porque foi afetada pela vegetação de cobertura em virtude da liberação de formas específicas de carbono que representam fontes de energia.

Em relação ao tratamento controle (C), este foi 62% similar aos demais tratamentos na coleta 1 e 59% na coleta 2 (Figura 3a e b). Como o controle nunca recebeu DLS, a sua microbiota fica limitada em usar apenas o C dos resíduos culturais que ficam depositados no solo após a colheita como fonte de energia, tendo assim menor a diversidade de substratos.

Figura 3 – Perfis de DGGE da comunidade bacteriana de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos (DLS). Decorridos 5 meses (a) e 12 meses (b) após interrupção (Profundidade de amostragem 0 – 10 cm).

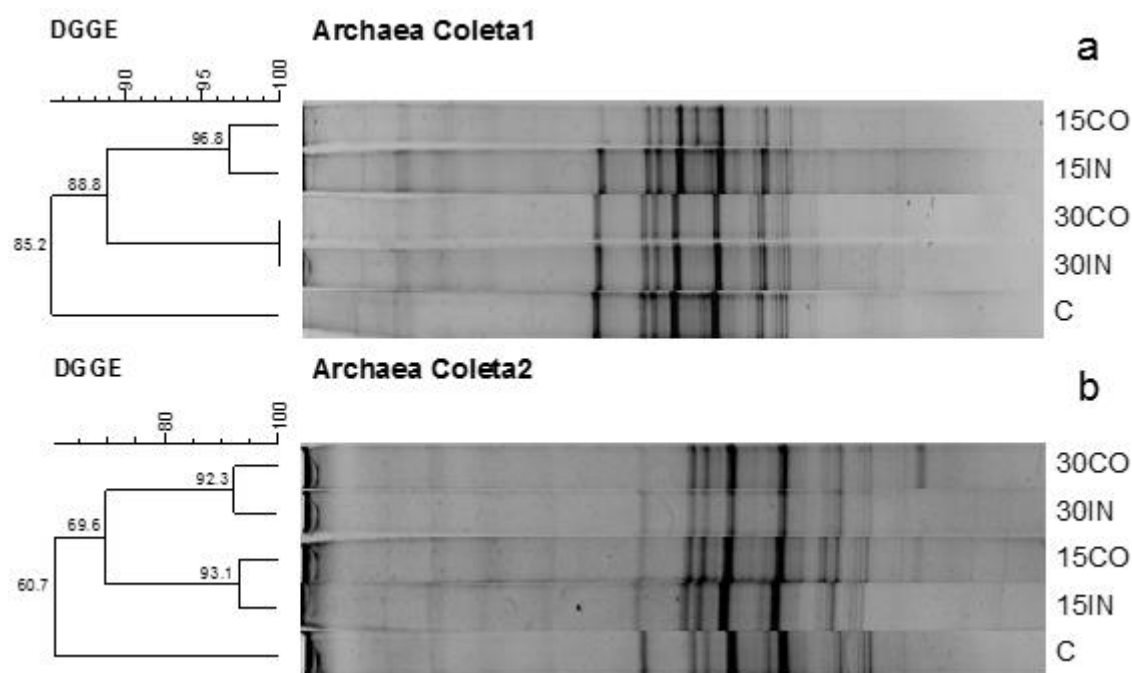


Fonte: o próprio autor. **Legenda:** C= controle, 0 m³ ha⁻¹; 15IN= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação contínua. Coleta 1= coleta realizada aos 5 meses após a interrupção. Coleta 2= coleta realizada aos 12 meses após a interrupção. Foto original: APÊNDICE A e B.

O comportamento do perfil da comunidade de Archaeas foi similar ao observado para Bactéria. Neste caso, a similaridade entre os tratamentos 15CO e 15IN foi de 96% na coleta 1 e 93% na coleta 2 (Figura 4a e b). E para os tratamentos 30CO e 30IN foi de 100% na coleta 1 e 92% na coleta 2 (Figura 4a e b).

Em relação ao tratamento controle, este foi similar em 85% na coleta 1 e 60% na coleta 2 com os demais tratamentos que receberam DLS (Figura 4a e b).

Figura 4 – Perfis de DGGE da comunidade de Archaeas de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos (DLS). Decorridos 5 meses (a) e 12 meses (b) após interrupção (Profundidade de amostragem 0 – 10 cm).



Fonte: o próprio autor. **Legenda:** C= controle, 0 m³ ha⁻¹; 15IN= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação contínua. Coleta 1= coleta realizada aos 5 meses após a interrupção. Coleta 2= coleta realizada aos 12 meses após a interrupção. Foto original: APÊNDICE C e D.

O perfil obtido para comunidade de fungos apresentou similaridade menor entre os tratamentos comparado ao de bactérias e arqueas (Figura 5a e b). Diferentemente do que ocorreu para os perfis de 16S, no caso dos fungos a interrupção na coleta 1 provocou efeitos sobre esse grupo. Ao estabelecer um corte em 70% de similaridade para formação de agrupamentos, na coleta 1 houve formação de três grupos (Figura 5a). Um grupo foi formado pela dose 30 m³ ha⁻¹, contínua ou

interrompida, e pela dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ contínua, apresentando similaridade de 85%. Os outros dois grupos foram formados pela dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ interrompida e o controle (C) que ficaram separados individualmente. Isso demonstra que a dose de DLS influenciou a separação pois o controle e 15IN eram as que possuíam menor carga líquida de DLS.

Na coleta 2 o comportamento do perfil da comunidade de fungos não foi o mesmo ao encontrado na coleta 1. Os tratamentos 15CO e 15IN apresentaram 65% de similaridade, 30CO e 30IN 68% e destes com o controle a similaridade, foi 41% (Figura 5b). Ou seja, com base no corte em 70% de similaridade, todos os tratamentos ficam isolados, demonstrando que as comunidades de fungos apresentam uma dinâmica muito diferente do que arqueas e bactérias.

A diferença entre os perfis de fungos da coleta 1 e coleta 2 pode ser explicada em função dos resíduos culturais após as colheitas de inverno e verão que pode ter modulado uma condição ambiental desigual que conduziu respostas diferentes e entre a coleta 1 e a coleta 2 para o grupo dos fungos. Além disso, a composição química e biológica do DLS pode ser muito variável

O tratamento controle (C) nunca recebeu DLS e o tratamento 15IN apresentava a menor carga de DLS, logo o perfil da comunidade de fungos foi modificada pela interrupção durante 5 meses pois nestas parcelas pode ter ocorrido uma seleção de espécies que conduziu à prevalência de K-estrategistas pois a disponibilidade de substrato é menor, corroborando Moreira e Siqueira, 2006. Isso é confirmado pelo índice de dominância (D), que foi maior no tratamento controle (C) e 15IN na coleta 1 para fungos, em contraste à diversidade que foi menor (Tabela 6).

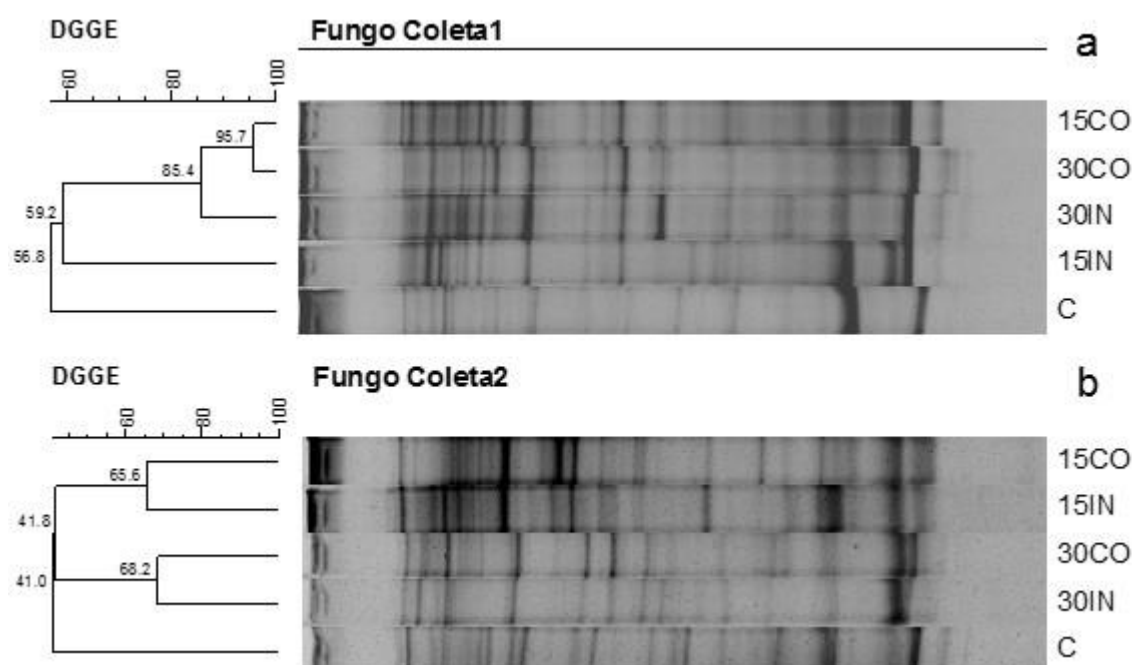
As diferenças na composição da matéria orgânica e a disponibilidade do substrato podem ser um dos motivos das diferenças na estrutura da comunidade microbiana, pois geralmente compostos prontamente decomponíveis como ácidos orgânicos e carboidratos são provavelmente utilizados principalmente por bactérias do solo, enquanto os fungos decompõem os materiais mais recalcitrantes e de menor solubilidade (MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003). Além disso, os fungos micorrízicos também são afetados negativamente pelas adições de DLS em razão do seu alto teor de P (BALOTA et al., 2016).

Neste trabalho, a adição de material orgânico, que pode levar a um rápido aumento da biomassa e da atividade microbiana e favorecer o crescimento de

organismos copiotróficos comparados aos oligotróficos, conforme verificado por Moreira e Siqueira (2006) e Hu, Bruggen e Grünwald (1999).

Diferentemente, Marschner, Kandeler e Marschner (2003), ao avaliarem 5 adubações orgânicas e inorgânicas durante 31 anos, observaram que os tratamentos tiveram efeitos sobre a biomassa e estrutura da comunidade bacteriana do solo, mas não houve efeito sobre a estrutura da comunidade fúngica.

Figura 5 – Perfis de DGGE da comunidade fúngica de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos (DLS). Decorridos 5 meses (a) e 12 meses (b) após interrupção (Profundidade de amostragem 0 – 10 cm).



Fonte: o próprio autor. **Legenda:** C= controle, 0 m³ ha⁻¹; 15IN= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação contínua. Coleta 1= coleta realizada aos 5 meses após a interrupção. Coleta 2= coleta realizada aos 12 meses após a interrupção. Foto original: APÊNDICE E e F.

Considerando o índice de diversidade de Shannon (H'), foi possível observar que a diversidade de microrganismos foi maior quando o DLS foi aplicado, do que no controle sem aplicação (Tabela 6). Este resultado corrobora Faissal et al. (2017) em que o índice de Shannon foi significativamente maior no solo fertilizado com dejetos de aves e gado do que no solo de referência (sem fertilização) e com o trabalho de Zhen et al. (2014), ao concluírem que a aplicação de dejetos animais pode

melhorar a estrutura genética da comunidade microbiana e a diversidade nos solos. Li et al. (2015) observaram que tanto a abundância (S), quando a diversidade (H) de bactérias foi maior no tratamento que usou fertilizante mineral + dejetos suíno do que no solo não fertilizado e no que recebeu apenas fertilizante mineral.

Em relação às doses, independentemente da aplicação contínua ou interrompida, a dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ foi a que apresentou maior índice de Shannon (H') e na maioria dos casos seguiu o padrão $15 > 30 > 0$ (C) $\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$ (Tabela 6).

As diferenças em relação ao tratamento controle ocorrem em virtude deste nunca ter recebido DLS. Logo, a diversidade genética da comunidade microbiana é menor pois ele não recebeu o aporte de nutrientes e compostos orgânicos como ocorreu nas doses 15 e $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$. Além disso o DLS transfere uma carga de microrganismos exógenos que pode aumentar a diversidade genética no solo

Apesar disso, a aplicação de DLS proporcionou aumento na diversidade genética de microrganismos até a dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$, já na dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ a diversidade diminuiu. É possível que isso tenha ocorrido em função de uma seleção de microrganismos anaeróbios em detrimento aos aeróbios. O DLS possui uma elevada DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e quando aplicado no solo tende a reduzir a pressão parcial de O_2 na atmosfera do solo favorecendo os microrganismos anaeróbios. Aliado a isso, a forte ocorrência de chuvas no período da aplicação até a coleta do solo (65 mm na coleta 1 e 69 mm na coleta 2, conforme Figura 2b e c) diminuiu ainda mais o O_2 disponível no solo. Lalande et al. (2000) comentam que doses elevadas de DLS podem criar zonas anaeróbicas temporárias no solo.

Comparando os três domínios em relação ao índice de Menhinick (S), foi possível verificar que houve maior riqueza (S) de bactérias e baixa dominância (D) em relação às arqueas e fungos (Tabela 6). Isso relaciona-se positivamente com a diversidade, ou seja, quanto menor a dominância de espécies, maior será a diversidade deste solo (ZILLI et al., 2003).

Tabela 6 – Índice de riqueza de Menhinick (S), índice de diversidade de Shannon (H') e índice de dominância de Simpson (D) de bactérias, arqueas e fungos do solo influenciados por aplicação contínua e interrompida de dejetos líquidos de suínos. (Profundidade de amostragem 0 – 10 cm).

Índice	Coleta 1					Coleta 2				
	15CO	15IN	30CO	30IN	Controle	15CO	15IN	30CO	30IN	Controle
Bacteria										
S	1,229	1,445	1,204	1,634	0,981	1,520	1,588	1,317	1,510	1,186
D	0,037	0,033	0,041	0,054	0,072	0,033	0,031	0,042	0,041	0,049
H'	3,324	3,434	3,196	3,102	2,736	3,416	3,398	3,166	3,160	3,020
Archaea										
S	1,050	0,999	1,07	0,902	0,905	1,025	0,957	1,015	1,070	0,593
D	0,076	0,061	0,076	0,071	0,067	0,074	0,077	0,094	0,083	0,093
H'	2,917	3,036	2,856	2,891	2,095	2,919	2,893	2,742	2,810	2,528
Fungo										
S	0,759	0,65	0,764	0,712	0,697	0,802	0,782	0,755	0,664	0,774
D	0,053	0,077	0,065	0,061	0,105	0,066	0,058	0,067	0,097	0,059
H'	3,000	2,687	2,876	2,895	2,472	2,986	3,002	2,848	2,497	3,000

C= controle, 0 m³ ha⁻¹; 15IN= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação contínua. Coleta 1= coleta realizada aos 5 meses após a interrupção. Coleta 2= coleta realizada aos 12 meses após a interrupção.

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que a interrupção da aplicação de DLS por 12 meses tem efeito acentuado sobre a biomassa e atividade da comunidade microbiana, mas também modifica a estrutura e a sua diversidade. Embora o uso de índices ecológicos com base no perfil de DGGE sem o posterior sequenciamento das bandas seja limitado (BARRANTES; SANDOVAL, 2009; MELO, 2008; SMIT et al., 1999; MUYZER; WALL; UITTERLINDEN, 1993), estas ainda são ferramentas valiosas para avaliar de maneira comparativa diferenças na estrutura genética da comunidade microbiana do solo.

3.6 CONCLUSÕES

A interrupção da aplicação de DLS durante cinco e doze meses afeta a microbiota, causando diminuição da biomassa microbiana medida pelo CBM e NBM e reduz sua atividade.

A aplicação de 30 m³ de DLS ha⁻¹ aumenta o carbono da biomassa microbiana, respiração do solo e eleva o quociente metabólico.

A estrutura genética da comunidade de bactérias e arqueas é menos afetada pela interrupção da aplicação de DLS do que a comunidade de fungos, que tiveram sua diversidade diminuída em função do aumento da dominância de espécies após a interrupção das aplicações.

A diversidade de bactérias no solo com DLS é maior do que a diversidade de fungos e arqueas.

A aplicação de DLS proporciona maior diversidade de microrganismos, especialmente na dose de $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de DLS, mesmo após 12 meses da interrupção das aplicações. Em contrapartida, a menor diversidade foi verificada no tratamento controle que nunca recebeu DLS.

4 ARTIGO B: ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO APÓS APLICAÇÃO CONTÍNUA E INTERROMPIDA DE DEJETO LÍQUIDO DE SUÍNOS

4.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar atividades enzimáticas e atributos químicos de um solo sob aplicação contínua (28 anos) ou após interrupção por 5 e 12 meses de dejetos líquidos de suínos (DLS). O experimento foi conduzido em Latossolo Vermelho Distroférico sob sistema de plantio direto, estabelecido desde 1988, disposto em delineamento de blocos ao acaso. Durante 28 anos (1988 a 2016) foram aplicadas doses de 0, 15 e 30 m³ ha⁻¹ de DLS antecedendo as safras de verão e de inverno. Em 2016, as parcelas foram divididas (exceto controle, 0 m³ ha⁻¹) e houve a interrupção da aplicação de DLS em meia parcela, gerando o esquema fatorial 2 × 2 sendo duas doses de DLS (15 e 30 m³ ha⁻¹) e duas condições de aplicação (contínua ou interrompida). Realizaram-se duas coletas de solo, aos cinco e doze meses após a interrupção das aplicações, nas profundidades de 0 – 10, 10 – 20 e 20 – 40 cm. Avaliaram-se os atributos químicos P disponível, carbono orgânico total (COT), pH, Al³⁺, H⁺+Al³⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ e as enzimas arilsulfatase (AR), β-Glicosidase (β-G), fosfatase ácida (FA) e básica (FB), hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA). O teor de P, Mg²⁺ e a acidez potencial (H⁺+Al³⁺) variaram com as doses, mas não com a interrupção das aplicações. Houve efeito da interrupção sobre a atividade das enzimas AR, β-G e FB. A aplicação contínua de DLS aumentou a atividade da enzima AR em ambas as coletas. O mesmo comportamento ocorreu com as enzimas β-G e FB em uma das coletas. A FDA não foi influenciada pela interrupção das aplicações, mas na dose 30 m³ ha⁻¹ de DLS aumentou a atividade. Os atributos químicos não foram sensíveis o suficiente para dar uma resposta rápida à 12 meses após a interrupção das aplicações. Entretanto, a atividade de algumas enzimas reduziu em resposta a interrupção da aplicação de DLS.

Palavras-chave: Atividade microbiana. Carbono orgânico. Ciclos biogeoquímicos. Dejetos animais.

ENZYMATIC ACTIVITY AND CHEMICAL ATTRIBUTES OF THE SOIL AFTER CONTINUOUS AND INTERRUPTED APPLICATION OF PIG SLURRY

4.2 ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate enzymatic activities and chemical attributes of a soil under continuous (28 years) or interrupted (5 and 12 months) application of pig slurry (PS). The experiment was performed in a Rhodic Ferralsol under no-tillage system, established since 1988, arranged in a randomized block design. For 28 years (1988 to 2016) doses of 0, 15 and 30 m³ ha⁻¹ of PS were applied before the summer and winter crops. In 2016, the plots were divided and the application was interrupted in half of the plot, generating a 2 × 2 factorial scheme, with two doses of PS (15 and 30 m³ ha⁻¹) and two application conditions (continuous or interrupted). The soil sampling was performed at five and twelve months after the interruption, at depths of

0 - 10, 10 - 20 and 20 - 40 cm. The chemical attributes available P, total organic carbon (TOC), pH, Al^{3+} , $\text{H}^{+}+\text{Al}^{3+}$, Ca^{2+} , Mg^{2+} and K^{+} , were assessed. In addition to the enzymes arylsulfatase (AR), β -glycosidase (β -G), acid (AP) and basic (BP) phosphatase, hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA). Available P, Mg^{2+} and potential acidity ($\text{H}^{+}+\text{Al}^{3+}$) varied with the doses, but not with the interruption of the application. The interruption affected the activity of the enzymes AR, β -G and BP. The continuous application of PS increased the activity of AR in both samplings, as well as the enzymes β -G and BP in one of the samplings. The FDA did not change significantly with interruption but, depending on the dose, showed that $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ of PS increased FDA activity. The chemical attributes were not sensitive enough to give fast response to the interruption of application after 12 months, however, the activity of some enzymes reduced in response to the interruption of PS application.

Key words: Microbial activity. Organic carbon. Biogeochemical cycles. Animal manure.

4.3 INTRODUÇÃO

O Brasil em 2016 abateu 42,3 milhões de suínos (IBGE, 2017), colocando-se como o quarto maior produtor mundial de carne suína (ABPA, 2017). Embora este resultado seja positivo do ponto de vista econômico, os dejetos produzidos pela cadeia suinícola, muitas vezes, excedem a capacidade de reciclagem do solo e acabam sendo aplicados em doses muito elevadas na mesma área. Estima-se que o dejetos líquido de suínos (DLS), represente mais de 95% do total de dejetos gerados pela suinocultura brasileira (KONZEN, 2003).

A reciclagem de DLS na forma de fertilizante orgânico em áreas agrícolas é comumente empregada no Brasil (SEGANFREDO, 2012; CORRÊA et al. 2011) e pode promover melhorias no solo, como o fornecimento de macro e micronutrientes (CORRÊA et al. 2011; COUTO et al., 2013) e aumento da matéria orgânica (MOS) (LOURENZI et al., 2011; LOURENZI et al., 2016; MORALES et al., 2016; PLAZA et al., 2004).

O DLS é um fertilizante de baixo custo, mas quando leva-se em consideração o custo de transporte as vantagens em seu uso desaparecem em vista do alto custo de transporte de cargas líquidas. Por isso, muitas vezes o DLS é aplicado excessivamente em áreas próximas à granja, o que pode, se negligenciada quanto à dose, época ou periodicidade de utilização (OLIVEIRA; SILVA; PERDOMO 2012), se tornar um fator de risco ambiental pelo excesso de cobre (Cu), zinco (Zn) (GIROTTO et al., 2010), manganês (Mn) (BASSO et al., 2012), potássio (K), fósforo (P) (SCHERER, NESI E MASSOTTI, 2010), além de

nitratos, com riscos de lixiviação e contaminação das águas superficiais e do lençol freático (HERNÁNDEZ; POLO; PLAZA, 2013). Pode também alterar a quantidade e atividade da comunidade microbiana (BALOTA et al., 2014; MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003).

O uso de indicadores que avaliem de forma sensível e rápida as alterações no solo é necessário para identificar mudanças na sua qualidade e funcionalidade (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007; GREGORICH et al., 1994; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). A atividade enzimática do solo é um indicador bioquímico que pode refletir as condições do ambiente edáfico, em razão das práticas agrícolas (CARDOSO et al., 2013; SILVA et al., 2015), pois as enzimas possuem estreita relação com as condições abióticas e bióticas do solo, como temperatura, umidade, pH, teor de COT e nutrientes, biomassa e atividade microbiana e diversidade de microrganismos (BALOTA et al., 2013).

As enzimas do solo são importantes dentro dos ciclos biogeoquímicos. A ação das fosfatases, por exemplo, permite a mineralização do P orgânico (DICK, 1994) e a ação da arilsulfatase promove a hidrólise de ésteres de arilsulfatos orgânicos, atuando na mineralização de S orgânico para SO_4^{2-} , forma absorvida pelas plantas (BALOTA, 2017). No ciclo do carbono, diversas enzimas atuam de diferentes formas como, por exemplo, a β -glicosidase que realiza a hidrólise de celobiose, tendo como produto final a glicose (TABATABAI, 1994). Além disso, a hidrólise de FDA (diacetato de fluoresceína) determina a atividade de três enzimas: lipases, esterases e proteases (BALOTA et al., 2013), que estão relacionadas à decomposição da matéria orgânica. Existem várias outras como as amilases, celulases e desidrogenase, que são relacionadas ao ciclo do carbono, e as ureases, glutaminases e asparaginase, relacionadas ao ciclo do nitrogênio (CARDOSO et al., 2013).

Diversos trabalhos foram realizados para medir a atividade enzimática do solo sob efeito de sucessivas aplicações de doses de DLS, culturas e condições climáticas (BALOTA; MACHINESKI; TRUBER, 2011; SILVA et al., 2015; PLAZA et al., 2004) mostrando diferentes tendências conforme a enzima estudada (BALOTA; MACHINESKI; TRUBER, 2011). Apesar disso, quando interrompe-se a aplicação do DLS, os efeitos sobre os componentes químicos e microbiológicos do solo ainda devem ser melhor detalhados, pois afetam o ciclo dos elementos, logo a fertilidade e a qualidade do solo.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar atributos químicos e atividade enzimática de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua (28 anos) ou interrompida (5 e 12 meses) de DLS.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Área de Estudo e Amostragem

O experimento foi estabelecido em 1988 na Estação Experimental do Instituto Agrônomo do Paraná, localizado em Palotina, Estado do Paraná (24°17' S, 53°50' W). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa (subtropical úmido), com temperatura média anual de 20°C, precipitação anual de 1800 mm (CAVIGLIONE et al., 2000).

O solo foi classificado como Latossolo Vermelho Distroférico de acordo com Santos et al. (2013). A granulometria foi determinada conforme Tavares Filho e Magalhães (2008), com teor de argila de 695,4 g kg⁻¹, 134,2 g kg⁻¹ de silte e 170,4 g kg⁻¹ de areia.

A área experimental foi constituída de parcelas com 5,0 m de largura por 9,0 m de comprimento (45 m²), com três repetições por tratamento, dispostas em delineamento de blocos ao acaso. A área foi manejada sob sistema de plantio direto (SPD) em rotação de soja (*Glycine max* L.) ou milho (*Zea mays* L.) na safra de verão e trigo (*Triticum sativum* Lam.) ou aveia (*Avena sativa* L.) na safra de inverno. Durante 28 anos, as aplicações de DLS ocorreram duas vezes ao ano, antecedendo as safras de verão e de inverno nas doses de 15 e 30 m³ ha⁻¹ de DLS, além de um controle que não recebeu o dejetos.

Em 2016, as parcelas foram divididas (exceto o tratamento controle, 0 m³ ha⁻¹), e interrompeu-se a aplicação de DLS em meia parcela gerando o esquema fatorial 2 × 2, sendo duas doses de DLS (15 e 30 m³ ha⁻¹) e duas condições de aplicação (contínua ou interrompida). Antes de ser aplicado o DLS foi mantido em esterqueiras durante aproximadamente 70 dias para fermentação parcial, e no dia da aplicação o mesmo foi agitado para homogeneização. A composição química média do DLS (coleta 1 e 2) apresentou 19,7 g L⁻¹ de matéria seca, 3,1 g L⁻¹ de N, 2,7 g L⁻¹ de P e 1,2 g L⁻¹ de K.

A última aplicação de DLS na parcela inteira ocorreu em maio de 2016, a partir daí interrompeu-se a aplicação na metade da parcela para realizar as coletas de solo, que ocorreram em outubro de 2016 (coleta 1) e maio de 2017 (coleta 2), cinco e doze meses após a interrupção (Figura 2). No período de dez dias entre a aplicação de DLS e as coletas do solo, houve acúmulo de precipitação de 65 mm na coleta 1 e 69 mm na coleta 2, conforme Figura 2b e c.

Coletou-se uma amostra composta por três subamostras de solo em cada uma das três repetições do tratamento com auxílio de uma pá reta nas profundidades de 0 – 10, 10 – 20 e 20 – 40 cm.

4.4.2 Determinação de Atributos Químicos do Solo

Os atributos químicos do solo foram avaliados de acordo com Pavan et al. (1992). Inicialmente, o solo foi seco a 60°C por 24 horas em estufa, depois foi moído e passado em peneira de 2 mm (terra fina seca ao ar – TFSA). Os teores de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} trocáveis foram extraídos por KCl 1,0 mol L⁻¹, e em seguida, determinaram-se Ca^{2+} e Mg^{2+} trocável por espectrofotometria de absorção atômica e Al^{3+} por titulação com hidróxido de sódio (NaOH 1 M). A extração de P disponível e K⁺ trocável foi realizada com solução extratora Mehlich-1 e quantificados por espectrofotometria (630 nm) e fotometria de chama, respectivamente. Para o carbono orgânico total (COT), o solo foi oxidado por dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) em meio sulfúrico com posterior titulação utilizando sulfato ferroso (FeSO_4) conforme método Walkley e Black. O pH foi determinado em uma suspensão na proporção 1:2,5 (*m:v*) de solo e CaCl_2 0,01M e a acidez potencial (H^+ + Al^{3+}) foi estimada pelo pH após equilíbrio com solução tampão SMP.

4.4.3 Determinação das Atividades Enzimáticas do Solo

Para as atividades enzimáticas, as amostras de solo foram homogeneizadas, passadas por peneira de malha 4 mm e armazenadas à temperatura de 7°C até a avaliação. A determinação da umidade das amostras foi efetuada pelo método gravimétrico. A atividade da enzima arilsulfatase (AR) e das enzimas fosfatase ácida (FA) e básica (FB), foram determinadas de acordo com Tabatabai (1994). Na determinação da AR, as amostras de solo foram incubadas (1

hora a 37°C) com substrato *p*-nitrofenil sulfato de potássio e posteriormente o produto de hidrólise (*p*-nitrofenol) foi lido em espectrofotômetro a 400 nm. Para fosfatase, o substrato utilizado foi *p*-nitrofenil fosfato de sódio com um tampão universal modificado (MUB) (pH 5,5 para FA e pH 11,0 para FB) e lido a 400 nm. A atividade da β -glicosidase (β -G) foi avaliada segundo a metodologia de Eivazi e Tabatabai (1988) empregando-se o *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como substrato e posterior determinação colorimétrica (410 nm). A hidrólise de FDA foi determinada pelo método descrito por Dick, Breakwell e Turco (1996) usando uma solução de 2 mg mL⁻¹ de diacetato de fluoresceína, incubando-se com o solo sob agitação durante 20 min a 24°C, e posteriormente avaliado no comprimento de onda de 490 nm.

4.4.4 Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à adequação dos resíduos à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Bartlett. As variáveis que apresentaram ausência de normalidade ou homocedasticidade, foram transformadas pelo método de Box-Cox e novamente testadas. Os dados da atividade enzimática foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando a interação entre os fatores foi significativa, os efeitos das doses e aplicação contínua ou interrompida foram analisados pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). O tratamento controle (0 m³ ha⁻¹) e as doses contínuas ou interrompidas, foram comparados pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Os atributos químicos do solo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e se significativos, os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A relação entre as variáveis enzimáticas e químicas foram calculadas por correlação de Spearman (r , $p \leq 0,05$). Todas análises estatísticas foram realizadas com o software R (versão 3.3.2).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Atributos Químicos

A interrupção da aplicação de DLS não influenciou os atributos químicos. Entretanto, o teor de P disponível, Mg²⁺ e acidez potencial (H⁺+Al³⁺) variaram com as doses de DLS (Tabela 7).

O teor de P na profundidade 0 – 10 cm foi significativamente maior na dose de 30 m³ ha⁻¹ em comparação com a dose 15 m³ ha⁻¹ e o controle (C), em ambas as coletas. Já na profundidade 10 – 20 cm houve diferença apenas das doses em relação ao controle (C) (Tabela 7). O DLS apresenta elevado teor de P que normalmente encontra-se em frações inorgânicas (CERETTA et al., 2010). Neste trabalho, o teor médio de P no DLS foi de 2,7 g L⁻¹, o que representa aproximadamente 2,7 kg de P a cada m³ de DLS aplicado. Considerando as espécies de cereais (milho/trigo/aveia) e oleaginosas (soja) cultivadas na área, o teor de P adicionado excede a capacidade de exportação pela colheita dessas culturas (PAULETTI; MOTTA, 2017), logo, parte fica acumulada principalmente na camada superficial do solo.

O aumento no teor de P disponível é linear à adição crescente de DLS (BALOTA et al., 2014; CERETTA et al., 2010; COUTO et al., 2013; LOURENZI et al., 2011; LOURENZI et al., 2016; MATOS et al., 2016), o que representa um risco potencial para contaminação de águas superficiais pelo seu carregamento pela chuva. Além disso, pode causar efeitos negativos sobre a população de fungos micorrízicos do solo, assim como observado por Balota et al., 2016.

Para o COT não houve diferença em nenhuma das profundidades, em ambas as coletas (Tabela 7), o que é consistente com os resultados de Balota et al. (2014); Comin et al. (2013), Scherer; Nesi e Massotti (2010) e Rochette, Angers e Côté (2000). É possível que o COT do solo não tenha variado em função da aplicação pois o DLS apresenta alto teor de N e baixa relação C:N (média de 3,1 g L⁻¹), o que, segundo Plaza et al. (2004) pode estimular o metabolismo microbiano que utiliza o COT nativo do solo, o que limitaria seu acúmulo mesmo com altas doses de DLS.

Na profundidade 20 – 40 cm, as doses de 30 m³ ha⁻¹ contínuas ou interrompidas resultam em menor acidez potencial (Tabela 7). Isso é atribuído ao fato de o DLS ser levemente alcalino (MIYAZAWA; BARBOSA, 2015), proporcionando condição favorável ao aumento da saturação por bases. Resultado semelhante foi encontrado por Lourenzi et al. (2016) em que teores de H⁺+Al³⁺ não diferiram na profundidade de 0 – 8 cm. Entretanto, abaixo desta camada, os tratamentos que receberam DLS apresentaram menores valores de H⁺+Al³⁺ do que a área controle.

O teor de Mg²⁺ aumentou com a aplicação de DLS, principalmente na camada 0 – 10 cm (Tabela 7). Esses incrementos também podem ser atribuídos à quantidade de Mg²⁺ que é aportado pelo DLS. Couto et al. (2013) também

encontraram aumento nos teores de P disponível e de Ca^{2+} e Mg^{2+} trocáveis no solo depois da adição de dejetos de suínos.

Tabela 7 – Atributos químicos de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação contínua ou interrompida de dejetos líquidos de suínos (DLS) na estação experimental do IAPAR, Palotina-PR.

Tratamento	Profundidade					
	0 – 10 cm		10 – 20 cm		20 – 40 cm	
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2
P (mg dm⁻³)						
C	17,6 a	19,3 a	11,9 a	12,7 a	9,3 a	8,7 a
15IN	18,7 a	18,7 a	13,1 a	12,2 a	9,2 a	7,8 a
15CO	18,0 a	20,9 a	13,4 a	14,0 a	10,1 a	9,3 a
30IN	18,5 a	19,7 a	12,3 a	13,6 a	9,8 a	8,7 a
30CO	18,0 a	20,0 a	11,9 a	12,7a	8,2 a	8,2 a
CV(%)	11,5	7,4	9,9	13,8	17,6	23,6
pH (CaCl₂)						
C	4,4 a	5,1 a	4,4 a	4,8 a	4,6 a	5,1 a
15IN	4,5 a	5,1 a	4,5 a	4,9 a	4,7 a	5,2 a
15CO	4,4 a	5,2 a	4,5 a	4,9 a	4,7 a	5,1 a
30IN	4,5 a	5,1 a	4,6 a	4,8 a	4,9 a	5,3 a
30CO	4,7a	5,1 a	4,6 a	4,7 a	4,8 a	5,2 a
CV(%)	5,6	3,4	4,1	3,8	3,5	3,3
Al³⁺ (cmol_c dm⁻³)						
C	0,5 a	0,13 a	0,4 a	0,5 a	0,2 a	0,13 a
15IN	0,3 a	0,08 a	0,3 a	0,2 a	0,2 a	0,04 a
15CO	0,3 a	0,04 a	0,3 a	0,3 a	0,2 a	0,10 a
30IN	0,4 a	0,09 a	0,3 a	0,3 a	0,1 a	0,00 a
30CO	0,3 a	0,04 a	0,3 a	0,4 a	0,1 a	0,00 a
CV(%)	72,0	49,0	60,0	77,0	55,3	93,0
H⁺+Al³⁺ (cmol_c dm⁻³)						
C	6,7 a	5,4 a	6,2 a	5,9 a	5,2 ab	4,6 a
15IN	6,9 a	5,6 a	6,2 a	5,8 a	5,3 ab	4,3 a
15CO	7,0 a	5,5 a	6,4 a	5,9 a	5,8 a	4,7 a
30IN	7,0 a	5,9 a	6,4 a	6,1 a	5,0 b	4,3 a
30CO	6,4 a	5,8 a	6,2 a	6,4 a	5,0 b	4,2 a
CV(%)	9,9	9,8	6,1	8,7	5,1	9,1
Ca²⁺ (cmol_c dm⁻³)						
C	3,2 a	3,9 a	3,1 a	3,3 a	3,4 a	4,0 a
15IN	3,3 a	3,9 a	3,0 a	3,5 a	3,3 a	3,9 a
15CO	3,1 a	4,6 a	3,2 a	3,6 a	3,3 a	3,6 a
30IN	3,3 a	4,2 a	3,1 a	3,4 a	3,4 a	3,8 a
30CO	3,5 a	4,1 a	2,9 a	3,1 a	3,1 a	3,5 a
CV(%)	19,1	14,7	16,6	21,6	11,6	15,9

Tabela 7 – Continuação...

Tratamento	Profundidade					
	0 – 10 cm		10 – 20 cm		20 – 40 cm	
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2
Mg²⁺ (cmol_c dm⁻³)						
C	1,0 c	1,8 b	0,8 b	1,0 b	1,0 a	1,0 b
15IN	1,5 ab	2,2 ab	1,2 ab	1,7 a	1,2 a	1,3 a
15CO	1,3 bc	2,6 a	1,2 ab	1,5 a	1,1 a	1,3 a
30IN	1,6 ab	2,5 ab	1,4 a	1,7 a	1,3 a	1,6 a
30CO	1,8 a	2,8 a	1,4 a	1,8 a	1,3 a	1,5 a
CV(%)	10,7	11,7	12,4	12,0	14,5	7,7
K⁺ (cmol_c dm⁻³)						
C	0,4 a	0,5 a	0,3 a	0,3 a	0,3 a	0,2 a
15IN	0,8 a	0,6 a	0,6 a	0,4 a	0,4 a	0,3 a
15CO	0,7 a	0,7 a	0,5 a	0,5 a	0,4 a	0,3 a
30IN	0,8 a	0,8 a	0,7 a	0,7 a	0,5 a	0,4 a
30CO	0,9 a	0,7 a	0,6 a	0,6 a	0,5 a	0,4 a
CV(%)	24,3	14,7	27,9	24,5	29,3	34,3

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna na mesma profundidade não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). C= controle, 0 m³ ha⁻¹; 15IN= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação contínua. Coleta 1= coleta realizada aos 5 meses após a interrupção. Coleta 2= coleta realizada aos 12 meses após a interrupção da aplicação de DLS.

4.5.2 Atividade Enzimática

A interrupção da aplicação de DLS influenciou a atividade das enzimas arilsulfatase (AR) β -Glicosidase (β -G) e fosfatase básica (FB). Na coleta 1, houve interação entre os fatores para atividade da AR na profundidade 20 – 40 cm. Neste caso, a dose de 30 m³ ha⁻¹ contínua promoveu atividade duas vezes maior que a mesma dose com aplicação interrompida (Tabela 8). No desdobramento da aplicação contínua, a dose 30 m³ ha⁻¹ apresentou maior atividade para AR do que a dose 15 m³ ha⁻¹ (Tabela 8).

A interrupção da aplicação de DLS por 5 meses (coleta 1) também promoveu efeitos significativos sobre a atividade da FB. Ainda que a interação tenha sido significativa apenas na profundidade 20 – 40 cm, nota-se que esta seguiu o mesmo comportamento nas três profundidades, em que a aplicação contínua e dose 30 m³ ha⁻¹ apresentaram maior atividade (Tabela 8). Quanto maior a carga de DLS, maior foi a atividade de ambas enzimas devido ao fornecimento de substratos com a adição de DLS, assim como reportado por Balota, Machineski e Truber (2011) e Lalonde et al. (2000).

Resultados semelhantes foram reportados em trabalhos anteriores, como por Balota et al. (2014), em que a aplicação de DLS teve efeito positivo sobre a atividade da fosfatase ácida e arilsulfatase. Lalande et al. (2000) observaram que a dose de 90 m³ ha⁻¹ de DLS promoveu a atividade das enzimas desidrogenase, fosfatase ácida e alcalina, arilsulfatase, urease. No entanto, os resultados reportados por Marschner, Kandeler e Marschner (2003) demonstraram que as atividades da maioria das enzimas não foram significativamente afetadas pelo uso de 5 tipos de fertilização porque a quantidade de compostos orgânicos adicionadas por ano via dejetos foram relativamente pequenas.

Segundo Tabatabai (1994) e Dick (1997), a maioria das arilsulfatases não são enzimas constitutivas, e sua síntese por microrganismos é controlada pelo teor de carbono e enxofre no ambiente. A determinação de enxofre não foi realizada neste experimento, mas a correlação da AR com o COT foi significativa (Tabela 10). O carbono orgânico é reservatório de ésteres de sulfato, que são os substratos das arilsulfatases (DENG; TABATABAI, 1997).

As fosfatases são produzidas principalmente por microrganismos e diversos trabalhos sugerem que são produzidas quando o teor de fósforo disponível atinge níveis críticos para crescimento vegetal e microbiano (BALOTA et al., 2014; DICK, 1997). A correlação da fosfatase ácida (FA) com o teor de P foi significativa, mas ao se testar a correlação da FB com o P no solo, verificou-se que a mesma não foi significativa (Tabela 10). Marschner, Kandeler e Marschner (2003), também não encontraram correlação significativa entre as atividades enzimáticas com parâmetros químicos do solo. Segundo esses autores, isso se deve à redundância funcional dos microrganismos do solo, pois as mudanças na estrutura da comunidade microbiana não conduzem necessariamente a mudanças nas atividades enzimáticas. Além disso, o aumento da atividade enzimática depende da capacidade metabólica das comunidades microbianas e sua capacidade de usar os substratos fornecidos (FALIH; WAINWRIGHT, 1996).

Tabela 8 – Atividade das enzimas arilsulfatase (AR), β -Glicosidase (β -G), fosfatase ácida (FA), fosfatase básica (FB) e hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) em um Latossolo Vermelho Distroférico após cinco meses (coleta 1) de interrupção ou sob aplicação contínua de dejetos líquido de suínos (DLS).

Coleta 1															
AR			β – G				FA			FB		FDA			
$\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ hora}^{-1}$															
0 – 10 cm															
Dose (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)
	Int.	Cont.		Int.	Cont.		Int.	Cont.		Int.	Cont.		Int.	Cont.	
15 m ³ ha ⁻¹	27,2	22,9	25,0 a	103,3	100,5	101,9 a	272,3	313,2	292,8 a	32,3*	49,6	40,9 a	65,3*	95,9	80,6 a
30 m ³ ha ⁻¹	25,1	26,0	25,5 a	87,3	107,9	97,6 a	258,2	279,5	268,9 a	41,2	58,2	49,7 a	67,7*	69,2*	68,4 a
\bar{x} (A)	26,1 A	24,5 A		95,3 A	104,2 A		265,3 A	296,4 A		36,8 B	53,9 A		66,5 A	82,6 A	
0 m ³ ha ⁻¹	20,7			97,6			294,7			59,6			120,2		
CV (%)	7,4			14,5			17,2			18,1			22,6		
10 – 20 cm															
15 m ³ ha ⁻¹	18,5	19,4	18,9 a	37,4	36,5	36,9 a	160,7	166	163,3 a	27,2	34,8	31,0 b	45,6*	49,9	47,7 a
30 m ³ ha ⁻¹	20,6	14,0	17,3 a	42,5	41,6	42,0 a	146,4	150,1	148,2 a	32,6	57,3*	45,0 a	43,1*	47,2	45,1 a
\bar{x} (A)	19,55 A	16,7 A		39,9 A	39,0 A		153,5 A	158,0 A		29,9 B	46,1 A		44,3 A	48,5 A	
0 m ³ ha ⁻¹	17,1			38,5			167,1			39,6			69,0		
CV (%)	20,8			17,8			7,9			16,5			15,2		
20 – 40 cm															
15 m ³ ha ⁻¹	14,9 A a	15,5 A b	15,2	32,7	34,4	33,5 a	131,1	150,1	140,6 a	33,4 A a	40,1 A b	36,75	44,8	40,2*	42,5 a
30 m ³ ha ⁻¹	11,1 B a	26,7 A a	18,9	37,4	35,9	36,6 a	158,9	138,1	148,5 a	32,2 B a	55,0* A a	43,6	36,7	30,5*	33,6 a
\bar{x} (A)	13,0	21,1		35,0 A	35,1 A		145,0 A	144,1 A		32,8	47,55		40,7 A	35,4 A	
0 m ³ ha ⁻¹	11,1			27,9			132,5			34,2			59,9		
CV (%)	31,5			24,4			26,4			12,8			17,9		

Letras maiúsculas na linha comparam o fator aplicação (Cont.=contínua e Int.=interrompida); letras minúsculas na coluna comparam fator dose (15 e 30 m³ ha⁻¹) e * indica diferença significativa do tratamento controle (0 m³ ha⁻¹) em relação aos demais pelo teste de Dunnet à ($p \leq 0,05$).

Na coleta 2 a atividade das enzimas AR e β -G reduziu em resposta à interrupção da aplicação de DLS, sendo que em ambas, na profundidade 0 – 10 cm, a dose 15 m³ ha⁻¹ contínua resultou em maior atividade que a dose 15 m³ ha⁻¹ interrompida (Tabela 9). O desdobramento do fator aplicação mostrou que a interrupção se diferenciou nos níveis do fator dose, sendo a dose 30 m³ ha⁻¹ interrompida foi superior à dose 15 m³ ha⁻¹ interrompida (Tabela 9). Novamente, quando maior a dose de DLS, maior foi a atividade microbiana no solo. Segundo Kandeler et al. (1999), alterações orgânicas a longo prazo no solo podem estimular atividades enzimáticas e a biomassa microbiana.

A FDA apresentou maior atividade na dose 30 m³ ha⁻¹ (Tabela 9). Essa enzima participa ativamente nas transformações da MOS, então sua atividade aumenta com as doses de DLS. Silva et al. (2015) também observaram aumento da atividade da FDA em área que recebeu DLS por 14 anos.

O aumento da atividade das enzimas β -G e hidrólise de FDA com a dose de DLS, pode ter ocorrido em função da disponibilização de substratos, já que ambas estão envolvidas no ciclo do carbono e apresentaram alta correlação com o teor de COT do solo (Tabela 10). Os compostos orgânicos adicionados levam ao aumento da atividade da β -Glicosidase que desempenha papel importante na degradação de carboidratos no solo (DENG; TABATABAI, 1996).

A alteração na atividade de enzimas do solo devido à aplicação de DLS pode ser uma resposta à maior capacidade de imobilização de nutrientes da comunidade microbiana. A adição crescente de compostos orgânicos aumenta o suprimento de substratos prontamente disponíveis, como carboidratos, para os microrganismos que produzem a maioria das enzimas do solo (BALOTA; MACHINESKI; TRUBER, 2011).

Em ambas as coletas, as atividades enzimáticas diminuíram com a profundidade (Tabela 8 e 9). Essa diminuição pode estar relacionada ao menor conteúdo de carbono lábil e menor disponibilidade de O₂, que diminui o número de microrganismos aeróbicos e sua atividade, em relação à camada superficial. Além disso, a precipitação pluvial nos 10 dias anteriores às duas coletas foi elevado (Figura 2), logo, a saturação de água no solo cria condições anaeróbicas temporárias que podem afetar o crescimento e a atividade microbiana.

Tabela 9 – Atividade das enzimas arilsulfatase (AR), β -Glicosidase (β -G), fosfatase ácida (FA), fosfatase básica (FB) e hidrólise do diacetado de fluoresceína (FDA) de um Latossolo Vermelho Distroférico após doze meses (coleta 2) de interrupção ou sob aplicação contínua da aplicação de dejetos líquido de suínos (DLS).

Coleta 2															
AR			β – G			FA			FB			FDA			
			$\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ hora}^{-1}$									$\mu\text{g FDA g}^{-1} \text{ hora}^{-1}$			
0 – 10 cm															
Dose (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)	Aplicação (A)		\bar{x} (D)
	Int.	Cont.		Int.	Cont.		Int.	Cont.		Int.	Cont.		Int.	Cont.	
15 m ³ ha ⁻¹	14,6 B b	21,6 A a	18,1	113,4 B b	181,8 A a	147,6	208,2	187,6	197,9 a	39,9	38,5	39,2 a	193,1	212,4	202,8 b
30 m ³ ha ⁻¹	23,3 A a	20,7 A a	22,0	166,8 A a	170,5 A a	168,6	211,2	205	208,1 a	63,8	42	52,9 a	235,7	236,2	235,9 a
\bar{x} (A)	17,7	22,5		140,1	176,2		209,7 A	196,3 A		51,8 A	40,3 A		214,4 A	224,3 A	
0 m ³ ha ⁻¹	15,8			132,4			220			45,2			218,7		
CV (%)	10,9			11,7			11,8			25,1			9,5		
10 – 20 cm															
15 m ³ ha ⁻¹	11,7	11,2	11,4 a	41,9	41,9	41,9 a	82,1	79,4	80,7 a	27,5	21,8	24,6 a	133,6	143,6	138,6 b
30 m ³ ha ⁻¹	11,8	12,2	12,0 a	46,9	51,3	49,1 a	81,3	72,7*	77,0 a	20,9	24,4	22,6 a	185,2	161,4	173,3 a
\bar{x} (A)	11,7 A	11,7 A		44,4 A	46,6 A		81,7 A	76,1 A		24,2 A	23,1 A		159,4 A	152,5 A	
0 m ³ ha ⁻¹	12,2			42,4			114,4			32,5			124,5		
CV (%)	19,6			18,2			13,8			14,4			10,3		
20 – 40 cm															
15 m ³ ha ⁻¹	6,8	4,4	5,6 a	24,5	25,4	25,0 b	49,5	43,8	46,6 a	32,9	31,5	32,2 a	110,6	124,3	117,4 a
30 m ³ ha ⁻¹	5,8	6,8	6,3 a	32,5	37,5	35,0 a	45,0	30,2*	37,6 a	32,6	23,7	28,1 a	118,4	115,2	116,8 a
\bar{x} (A)	6,4 A	5,6 A		28,5 A	31,4 A		47,2 A	37,0 A		32,7 A	27,6 A		114,5 A	119,8 A	
0 m ³ ha ⁻¹	7,5			26			65,5			31,8			110,3		
CV (%)	30,4			15,9			19,9			16,9			15,9		

Letras maiúsculas na linha comparam o fator aplicação (Cont.=contínua e Int.=interrompida); letras minúsculas na coluna comparam fator dose (15 e 30 m³ ha⁻¹) e * indica diferença significativa do tratamento controle (0 m³ ha⁻¹) em relação aos demais pelo teste de Dunnett à (p \leq 0,05).

As correlações entre as enzimas e delas com os atributos químicos foram positivas e significativas. Neste caso, observou-se que todas as enzimas, exceto a FB, tiveram correlação significativa com o COT (Tabela 10), demonstrando que o DLS fornece substratos para todas enzimas. Isso está em concordância com trabalhos encontrados na literatura que sugerem que as alterações nos teores de matéria orgânica pelo uso dos dejetos aumenta a atividade enzimática no solo (BALOTA et al., 2014; PLAZA et al., 2004). Além disso, COT também pode proteger as enzimas do solo pela associação com coloides orgânicos e inorgânicos que contribuem para a manutenção de sua capacidade catalítica (DENG; TABATABAI, 1997). Não houve correlação negativa significativa entre as enzimas e nem com os atributos químicos (Tabela 10).

Em ambas as coletas, maiores atividades enzimáticas foram observadas na maior quantidade de DLS aplicada (até 30 m³ ha⁻¹, dose máxima deste trabalho). Além disso, embora o DLS apresente potenciais riscos de contaminação ambiental, quando bem manejado é uma excelente fonte de nutrientes e energia para a atividade microbiana e estimula as atividades enzimáticas no solo.

Tabela 10 – Correlações de Spearman (r, p≤0,05) entre variáveis enzimáticas e químicas de um Latossolo Vermelho Distroférico sob aplicação de DLS. Dados referentes a todos os tratamentos e profundidades do estudados.

Variáveis	AR	β -G	FA	FB	FDA	P	COT	pH	Al	H+Al	Ca	Mg	K
AR	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -G	0,69*	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FA	0,99*	0,68*	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FB	0,44*	0,31*	0,55*	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FDA	-0,18	0,45*	-0,04	-0,07	1	-	-	-	-	-	-	-	-
P	0,57*	0,78*	0,55*	0,14	0,32*	1	-	-	-	-	-	-	-
COT	0,63*	0,87*	0,74*	0,27	0,45*	0,79*	1	-	-	-	-	-	-
pH	-0,38	-0,01	-0,38	-0,15	0,53*	-0,14	-0,06	1	-	-	-	-	-
Al	0,17	-0,01	0,17	-0,03	-0,26	0,18	0,06	-0,86*	1	-	-	-	-
H+Al	0,50*	0,44*	0,53*	0,17	-0,10	0,57*	0,51*	-0,79*	0,79*	1	-	-	-
Ca	-0,01	0,23	0,01	-0,05	0,48*	0,05	0,27	0,73*	-0,69*	-0,45*	1	-	-
Mg	0,2	0,63*	0,17	0,02	0,57*	0,72*	0,55*	0,42*	-0,30*	0,01	0,38	1	-
K	0,67*	0,74*	0,60*	0,24	0,15	0,85*	0,75*	-0,10	0,02	0,45*	0,12	0,63*	1

AR= arilsulfatase; β -G= β -Glicosidase; FA= fosfatase ácida; FB= fosfatase básica; FDA= hidrólise do diacetato de fluoresceína; P= fósforo disponível; COT= carbono orgânico total; pH=potencial hidrogeniônico; Al= alumínio trocável; H⁺+Al³⁺= acidez potencial; Ca= cálcio trocável; Mg= magnésio trocável; K= potássio trocável.

4.6 CONCLUSÕES

Os atributos químicos do solo não foram sensíveis o suficiente para responder à interrupção da aplicação de DLS ao solo por até 12 meses, tendo respondido apenas às doses.

As atividades das enzimas arilsulfatase, β -Glicosidase e fosfatase básica responderam sensivelmente à interrupção da aplicação de DLS, com redução resultante da menor oferta de substratos orgânicos pela interrupção da aplicação do dejetos ao solo.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A interrupção da aplicação de DLS durante cinco e doze meses após 28 anos de aplicação contínua provoca diminuição de carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana e redução da atividade microbiológica medida pela respiração basal do solo e atividade enzimática.

A interrupção da aplicação de DLS até 12 meses não causa redução no teor de carbono orgânico total e demais atributos químicos do solo, logo estes não são sensíveis o suficiente para dar uma resposta à condição de interrupção.

O comportamento enzimático do solo poderá ser alterado pela interrupção da aplicação de DLS, mas depende das enzimas avaliadas e sua relação com as condições bióticas e abióticas do solo.

A estrutura da comunidade de bactérias e arqueas é menos afetada pela interrupção da aplicação de DLS do que a comunidade de fungos que tiveram sua diversidade diminuída em função do aumento da dominância de algumas espécies.

A diversidade de bactérias no solo com DLS é maior do que a diversidade de fungos e arqueas.

A aplicação de DLS proporciona maior diversidade de microrganismos, especialmente na dose de $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de DLS, mesmo após 12 meses da interrupção das aplicações. Em contrapartida, a menor diversidade foi verificada no tratamento controle que nunca recebeu DLS.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2. ed. New York: John Wiley, 1977. 472 p.
- ALVES, A. G.; MESQUITA JÚNIOR, O.; ALVES NETO, A. J. A. Comparação de custos entre o uso de dejetos de suínos versus a utilização de fertilizantes na produção de milho segunda safra na região oeste do Paraná. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE EM GESTÃO DE NEGÓCIOS (COBRAGEN), n.4, 2016, Cascavel-PR. **Anais...** Cascavel-PR: UNIOESTE, 2016.
- ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 36-47, jan. 2003.
- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient for CO₂ ($q\text{CO}_2$) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.
- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K. H. Soil microbial biomass: the eco-physiological approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.42, n.12, p. 2039-2043, dez. 2010.
- ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Introdução á biologia do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: Editora ESALQ, 2016. p.9- 22.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p.66-75, set. 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. **Relatório anual**. 2017. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>> Acesso em: 20 junho 2017.
- BABUJIA, L. C.; SILVA, A. P.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial diversity in an Oxisol under no-tillage and conventional tillage in southern Brazil. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.45, n.5, p.863-870, 2014.
- BALOTA, E. L. **Manejo e qualidade biológica do solo**. 1.ed. Londrina: Mecenaz, 2017. 288 p.
- BALOTA, E. L.; MACHINESKI, O.; HAMID, K. I. A.; YADA, I. F. U.; BARBOSA, G. M. C.; NAKATANI, A. S.; COYNE, M. S. Soil microbial properties after long-term swine slurry application to conventional and no-tillage systems in Brazil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.490. p.397-404, ago. 2014.
- BALOTA, E. L.; MACHINESKI, O.; HONDA, C.; YADA, I. F.; BARBOSA, G.; NAKATANI, A. S.; COYNE, M. S. Response of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in

Different Soil Tillage Systems to Long-Term Swine Slurry Application. **Land Degradation and Development**, Chichester, v.27, n.4, p.1141-1150, 2016.

BALOTA, E. L.; MACHINESKI, O.; MATOS, M. A. Soil microbial biomass under different tillage and levels of applied pig slurry. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.16, n.5, p.487-495, mai. 2012.

BALOTA, E.L.; MACHINESKI, O.; TRUBER, P. V. Soil enzyme activities under pig slurry addition and different tillage systems. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.33, n.4, p. 729- 737, dez. 2011.

BALOTA, E.L.; NOGUEIRA, M.A.; MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; FAGOTTI, D.S.L.; MELO, G.M.P. SOUZA, R.C.; MELO, W.J. Enzimas e seu papel na Qualidade do Solo. In: ARAÚJO, A.P.; ALVES, B.J.R. (Eds.). **Tópicos em Ciência do Solo - Volume VIII**. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2013. p. 222-271.

BASSO, C. J.; CERETTA, C. A.; FLORES, E. M. M.; GIROTTI, E. Teores totais de metais pesados no solo após aplicação de dejetos líquidos de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.4, p.653-659, abr. 2012.

BARRANTES, G.; SANDOVAL, L. Conceptual and statistical problems associated with the use of diversity indices in ecology. **Revista de biología tropical**, San José, v.57, n.3, p. 451-460, set. 2009.

BERTONCINI, E. I. Dejetos da suinocultura- desafios para o uso agrícola. **Pesquisa e Tecnologia**, Campinas, v. 8, n. 2, p.1-10, dez. 2011.

BOYER, S. L.; FLECHTNER, V. R.; JOHANSEN, J. R. Is the 16S-23S rRNA Internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 18, n. 6, p.1057-1069, jun. 2001.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Lei n. 9.433. de 08 de janeiro de 1997. Política Nacional de Recursos Hídricos**. 2000. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9433.htm>. Acesso em: 03 agosto. 2017.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA n. 01. de 23 de janeiro de 1986. Política Nacional de Meio Ambiente**. 1986. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 20 de julho de 2017.

BROOKES, P. C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D. S. Chloroform fumigation and the release of nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.17, n.6, p.837- 842, 1985.

BUCHANAN, M.; KING, L. D. Seasonal fluctuations in soil microbial biomass carbon, phosphorus and activity in no- till and reduced-chemical-input maize agroecosystems. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 13, n.4, p.211-217, ago. 1992.

CARDOSO, E. J. B. N.; VASCONCELLOS, R. L. F.; BINI, D.; MIYAUCHI, M. Y. H.; SANTOS, C. A. D.; ALVES, P. R. L.; NOGUEIRA, M. A. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health?. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.70, n.4, p. 274-289, ago. 2013.

CARDOSO, B. F.; OYAMADA, G. C.; SILVA, C. M. Produção, tratamento e uso dos ejetos suínos no Brasil. **Desenvolvimento em Questão**, Ijuí, v. 13, n. 32, p. 127-145, dez. 2015.

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**, Viçosa, v. 14, n. 1, p.133-142, 1990.

CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina: IAPAR. 2000. Disponível em: < <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=677>>. Acesso em: 09 julho 2016.

CERETTA, C. A.; LORENSINI, F.; BRUNETTO, G.; GIROTTO, E.; GATIBONI, L. C.; LOURENZI, C. R.; TIECHER, T. L.; CONTII, L. D.; TRENTIN, G.; MIOTTO, A. Frações de fósforo no solo após sucessivas aplicações de dejetos de suínos em plantio direto. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 6, p. 593-602, jun. 2010.

CHERUBIN, M. R.; EITELWEIN, M. T.; FABBRIS, C.; WEIRICH, S.W.; SILVA, R. F.; SILVA, V. R.; BASSO, C. J. Qualidade física, química e biológica de um Latossolo com diferentes manejos e fertilizantes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.39, n.2, p.615-625, abr. 2015.

COMIN, J. J.; LOSS, A.; VEIGA, M.; GUARDINI, R.; SCHMITT, D. E.; OLIVEIRA, P. A. V.; BELLI FILHO, P.; COUTO, R. DA R.; BENEDET, L.; MULLER JÚNIOR, V.; BRUNETTO, G. Physical properties and organic carbon content of a Typic Hapludult soil fertilised with pig slurry and pig litter in a no-tillage system. **Soil Research**, Roma, v.51, n.5, p.459-470, jan. 2013.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução número 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Ministério do Meio Ambiente**. Brasília, 2009, p. 20. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br>>. Acesso em : 22 jan. 2018.

CORRÊA, J.C.; BARILLI, J.; REBELLATTO, A.; VEIGA, M. **Aplicações de dejetos de suínos e as propriedades do solo**. Concórdia. Embrapa Suínos e Aves, 2011. 18p.

COTTA, S. R. O solo como ambiente para a vida microbiana. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: Editora ESALQ, 2016. p.23- 36.

COUTO, R. R.; COMIN, J. J.; SOARES, C. R. F. S.; BELLI FILHO, P.; BENEDET, L.; MORAES, M. P.; BRUNETTO, G.; BEBER, C. L. Microbiological and chemical attributes of a Hapludalf soil with swine manure fertilization. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.7, p. 774-782, jul 2013.

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Cellulase activity of soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 26, n. 10, p. 1347-1354, out. 1994.

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: II. Glycosidases. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 22, n. 3, p. 208-213, mai. 1996

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 24, n. 2, p. 141-146, fev. 1997.

DICK, R. P. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Eds.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p.107-124.

DICK, R. P. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: PANKHURST, C. E.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R. (Eds.). **Biological Indicators of soil Health**. Wallingford: CAB International, 1997. p. 121- 156.

DICK, R. P.; BREAKWELL, D. P.; TURCO, R. Soil enzyme activities and biodiversity measurements. In DORAN, J. W.; JONES, A. J. (Eds.) **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996. P.247- 272.

DILLY, O.; MUNCH, J.C. Ratios between estimates of microbial biomass content and microbial activity in soils. **Biology and fertility of Soils**, Berlin, v. 27, n. 4, p. 374-379, set. 1998.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Eds.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p.107-124.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 20, n.5, p. 601-606, 1988. 353p.

FALIH, A. M. K; WAINWRIGHT, M. Microbial and enzyme activity in soils amended with a natural source of easily available carbon. **Biology and fertility of soils**, Berlin, v. 21, n. 3, p. 177-183, fev. 1996.

FAUCI, M. F.; DICK, R. P. Soil microbial dynamics: short-and long-term effects of inorganic and organic nitrogen. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 58, n. 3, p. 801-806, set. 1994.

FAISSAL, A.; OUZZANI, N.; PARRADO, J. R.; DARY, M.; MANYANI, H.; MORGADO, B. R.; BARRAGÁN, M. D.; MANDI, L. Impact of fertilization by natural

manure on the microbial quality of soil: Molecular approach. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S.I]. v.24, n.6, p.1437-1443, set. 2017.

FELSKE, A.; ENGELN, B.; NÜBEL, U.; BACKHAUS, H. (1996). Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.11, p.4162-4167, nov. 1996.

FREY, S. D.; ELLIOTT, E. T.; PAUSTIAN, K. Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 31, n. 4, p. 573-585, abr. 1999.

GARBEVA, P. ; VEEN, J. A. V. ; ELSAS, J. D. V. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, set. 2004.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular ecology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 113-118, abr. 1993.

GILLER, K. E; BEARE, M. H.; LAVELLE, P.; IZAC, A.M.N.; SWIFT, M. J. Agricultural intensification soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, n.1, p.3-16, ago. 1997.

GIROTTI, E.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; SANTOS, D. R. D.; SILVA, L. S.; LOURENZI, C. R.; LORENSINI, F.; VIEIRA, R.C.B.; SCHMATZ, R. Acúmulo e formas de cobre e zinco no solo após aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n.3. p.955-965, jun. 2010.

GIRVAN, M. S.; BULLIMORE, J.; PRETTY, J. N.; OSBORN, A. M.; BALL, A. S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.3, p.1800-1809, mar. 2003.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H.D.M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n.1 p. 135-141, mar. 2007.

GREGORICH, E. G.; CARTER, M. R.; ANGERS, D. A.; MONTREAL, C. M.; ELLIOT, B. H. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v.74, n.4, p.367-385, nov. 1994.

HE. Z. L.; YANG. X. E.; BALIGAR. V. C.; CALVERT. D. V. Microbiological and biochemical indexing systems for assessing quality of acid soils. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 78, p.89-138, mai. 2003.

HERNÁNDEZ. D.; POLO. A.; PLAZA. C. Long-term effects of pig slurry on barley yield and N use efficiency under semiarid Mediterranean conditions. **European Journal of Agronomy**, Oxford, v.44, p.78-86, jan. 2013.

HU, S. J.; BRUGGEN, A. H. C.V.; GRÜNWARD, N. J. Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue-amended soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 21-30, set. 1999.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; NAKATANI, A. S.; REIS-JUNIOR; F. B.; MORAIS, J. Z.; OLIVEIRA, M. C. N.; FERNANDES, M. F. Effects of the glyphosate-resistance gene and herbicides on soybean: Field trials monitoring biological nitrogen fixation and yield. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.158, p.43-54, mar. 2014.

INSAM, H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. **Geoderma**, Amsterdam, v. 100, n. 3, p. 389-402, mai. 2001.

INSAM, H.; HUTCHINSON, T. C.; REBER, H. H. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.28, n.4, p.691-694, mai. 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores IBGE**: Estatística da Produção Pecuária, Junho de 2017. 2017. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/>> Acesso em: 08 agosto 2017.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. (Org.). **Soil biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1981. p. 415-471.

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

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M.S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME journal**, London, v.3, n.9, p.1004-1011, set. 2009.

JURBURG, S. D.; SALLES, J .F. Functional redundancy and ecosystem function: the soil microbiota as a case study. In: LO, Y. H.; BLANCO, J. A.; ROY, S. (Eds.). **Biodiversity in ecosystems: linking structure and function**. 1.ed. Durham: InTech, 2015. p. 294.

KANDELER, E.; LUXHOI, J.; TSCHERKO, D.; MAGID, J. Xylanase, invertase and protease at the soil–litter interface of a loamy sand. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.31, n.8, p. 1171-1179, jul. 1999.

KASCHUK. G.; ALBERTON. O.; HUNGRIA. M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.42, n.1, p.1-13, jan. 2010.

KAVAMURA, V.N. et al. Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian caatinga biome. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, p. e73606, 2013.

KENNEDY, A.; DORAN, J. Sustainable agriculture: role of microorganisms. In: BITTON, G. (Org.). **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. New York: John Wiley & Sons, 2002. p. 3116-3126.

KONOPKA, A. What is microbial community ecology?. **The ISME Journal**, London, v. 3, n. 11, p. 1223 - 1230, nov. 2009.

KONZEN, E. A. **Fertilização de lavoura e pastagem com dejetos de suínos e cama de aves**. 1. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 10 p.

KUNZ, A.; HIGARASHI, M. M.; OLIVEIRA, P. A. Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 651-665, dez. 2005.

LALANDE, R.; GAGNON, B.; SIMARD, R. R.; CÔTÉ, D. Soil microbial biomass and enzyme activity following liquid hog manure application in a long-term field trial. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v.80, n.2, p.263- 269, 2000.

LAVELLE, P. Ecological challenges for soil science. **Soil Science**, Washington, v.165, n.1, p.73-86, 2000.

LAMBAIS, M. R.; CURY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BÜLL, R.C. **Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas**. Tópicos em Ciências do Solo, Viçosa, v. 4, p. 42-84, 2005. 42p.

LERMAN, L. S.; FISCHER, S. G.; HURLEY, I.; SILVERSTEIN, K.; LUMELSKY, N. Sequence-determined DNA separations. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, [S.l.], v.13. p. 399-423, 1984.

LI, J.; LI, Y. T.; YANG, X. D.; ZHANG, J. J.; LIN, Z. A.; ZHAO, B. Q. Microbial community structure and functional metabolic diversity are associated with organic carbon availability in an agricultural soil. **Journal of Integrative Agriculture**, [S.l.], v.14, n.12, p. 2500-2511, dez. 2015.

LOURENZI, C. R., SCHERER, E. E., CERETTA, C. A., TIECHER, T. L., CANCIAN, A., FERREIRA, P. A. A., BRUNETTO, G. Atributos químicos de Latossolo após sucessivas aplicações de composto orgânico de dejetos líquidos de suínos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n.3, p.233-242, mar. 2016.

LOURENZI, C. R.; CERETTA, C. A.; SILVA, L. S. D.; TRENTIN, G.; GIROTTO, E.; LORENSINI, F.; BRUNETTO, G. Soil chemical properties related to acidity under successive pig slurry application. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n.5, p.1827-1836, out. 2011.

MATOS, E. R.; DURRER, A.; ANDREOTE, F. D. Ecologia microbiana. In: CARDOSO, E. J. B. N; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: Editora ESALQ, 2016. p.37- 44.

MATOS, M. A.; COLOZZI FILHO, A.; BARBOSA, G. M. C.; CAVIGLIONE, J. H.; NOGUEIRA, M. A.; ANDRADE, D. S. Chemical and microbiological changes in a sandy soil with pig liquid waste application in Southern Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, [S.l.], v.11, n.49, p.5000-5007, dez. 2016.

MARTINEZ-SALGADO, M. M.; GUTIÉRREZ-ROMERO, V.; JANNSENS, M.; ORTEGA-BLU, R. Biological soil quality indicators: a review. **Formatex Research Center**, [S.l.;s.n.], p.319-328, 2010.

MELO, A. S. O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade?. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 21-27, set. 2008.

MARSCHNER, P.; KANDELER, E.; MARSCHNER, B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.35, n.3, p. 453-461, mar. 2003.

MENDES. I. C.; REIS JUNIOR. F. B.; HUNGRIA. M.; FERNANDES. M. F.; CHAER. G. M.; MERCANTE. F. M.; ZILLI. J. Microbiologia do solo e sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: FALEIRO. F. G.; ANDRADE. S. R. M. de; REIS JUNIOR. F. B. dos. (Ed.). **Biotecnologia estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina. DF: Embrapa Cerrados. 2011. p. 219-244.

MIYAZAWA, M.; BARBOSA, G. M. **Dejeto líquido de suíno como fertilizante orgânico: Método Simplificado**. 1. ed. Londrina,: IAPAR, 2015, 26 p.

MORALES, D.; VARGAS, M. M.; OLIVEIRA, M. P. D.; TAFFE, B. L.; COMIN, J.; SOARES, C. R.; LOVATO, P. Response of soil microbiota to nine-year application of swine manure and urea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.2, p.260-266, nov.2016.

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

MOYER, C.L.; TIEDJE, J.M.; DOBBS, F.C.; KARL, D.M. Diversity of deep-sea hydrothermal vent Archaea from Loihi Seamount, Hawaii. **Deep-sea Research**, Oxford, v. 45, p. 303-317, jan. 1998.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 37, n.1, p.127-141, jan. 1998.

MUYZER, G.; WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, mar. 1993.

NICOLAU, P. B. **História da classificação biológica**. 2017. Disponível em: <<https://repositorioaberto.uab.pt/handle/10400.2/6133>> Acesso em: 04 julho 2017.

NIELSEN, M. N.; WINDING, A. **Microorganisms as Indicators of Soil Health**. Denmark: National Environmental Research Institute. 2002.

OLIVEIRA, P. A. V.; SILVA, A. P.; PERDOMO, C. C. Aspectos construtivos na produção de suínos visando aos aspectos ambientais de manejo dos dejetos. In: SEGANFREDO, M. A. (Ed.). **Gestão ambiental na suinocultura**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012. E-book.

- OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 63, n.9, p. 3367-3373, 1997.
- OVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, New York, v.36, n.4, p.303-315, nov. 1998.
- PAULETTI, V.; MOTTA, A. C. V. (Orgs.). **Manual de adubação e calagem para o Estado do Paraná**. 1.ed. Curitiba: SBCS/NEPAR, 2017.482p.
- PAVAN, M. A.; BLOCH, M. F.; ZEMPULSKI, H. C.; MIYAZAWA, M.; ZOCOLER, D. C. **Manual de análise química de solo e controle de qualidade**. 1. ed. Londrina: IAPAR. 1992. 40 p.
- PEET, R. K. The measurement of species diversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, New York, v.5, p. 285-307, nov. 1974.
- PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, [S.l.], v. 55. n. 5, p. 856-866., mai. 2009.
- PLAZA, C.; GARCÍA-GIL, J. C.; POLO, A. Microbial activity in pig slurry-amended soils under aerobic incubation. **Biodegradation**, Dordrecht, v.18. n.2, p.159-165, jun. 2006.
- PLAZA, C.; HERNÁNDEZ, D.; GARCÍA-GIL, J. C.; POLO, A. Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, n. 10, p. 1577-1585, out. 2004.
- POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. 1987. Measurement of soil microbial biomass provides a early indication of changes in total organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.19, n.2, p.159-164, 1987.
- QUADRO, M. S.; CASTILHOS, D. D.; CASTILHOS, R. M. V.; VIVIAN, G. Biomassa e atividade microbiana em solo acrescido de dejetos suíno. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, n.1, mar. 2011.
- RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v.51, n. 3, p.167-177, abr. 2000.
- RASCHE, F.; CADISCH, G. The molecular microbial perspective of organic matter turnover and nutrient cycling in tropical agroecosystems. What do we know? **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, n.3, p. 251-262, abr. 2013.
- RAUBER, L. P.; PICCOLLA, C. D.; ANDRADE, A. P.; FRIEDERICHS, A.; MAFRA, Á. L.; CORRÊA, J. C.; ALBUQUERQUE, J. A. Physical properties and organic carbon

content of a Rhodic Kandiuox fertilized with pig slurry and poultry litter. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.36, n.4, p.1323-1332, ago. 2012.

ROCHETTE, P.; ANGERS, D.A.; CÔTÉ, D. Soil carbon and nitrogen dynamics following application of pig slurry for the 19th consecutive year I. Carbon dioxide fluxes and microbial biomass carbon. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, n. 4, p. 1389-1395, jul. 2000.

RUMJANEK, N.; ROSADO, A.; BARROS, E.; AZEVEDO, J. L.; PELLIZARI, V.; MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O.; MORAES, G.; SCHENBERG, A. C. **Estratégia Nacional de Diversidade Biológica: MICROORGANISMOS E BIODIVERSIDADE DE SOLOS**. 1998. Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/gtt10.pdf> Acesso em: 01 agosto 2017.

SAKAMOTO, K.; OBA, Y. Effect of fungal to bacterial biomass ratio on the relationship between CO₂ evolution and total soil microbial biomass. **Biology and Fertility of soils**, Berlin, v. 17, n. 1, p. 39-44, jan.1994.

SANTOS, H.G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353p.

SCHERER, E E.; NESI, C N.; MASSOTTI, Z. Atributos químicos do solo influenciados por sucessivas aplicações de dejetos suínos em áreas agrícolas de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p.1375-1383, ago. 2010.

SCHERER, E. E.; BALDISSERA, I. T.; NESI, C.N. Propriedades químicas de um Latossolo Vermelho sob plantio direto e adubação com esterco de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.31, n.1, p.123-131, fev. 2007.

SEGANFREDO, M. A. Uso de dejetos suínos como fertilizante e seus riscos ambientais. In: SEGANFREDO, M. A. (Ed.). **Gestão ambiental na suinocultura**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012. E-book.

SILVA, D. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S.; SILVEIRA, A. O.; SILVA, D. A. A.; RACHE, M. M.; PASSOS, V. H. G.; SILVA, B. R. Indicadores Microbiológicos de Solo em Pastagem com Aplicação Sucessiva de Dejetos de Suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, n.6, p.1585-1594, jul. 2015.

SILVA, R. F.; BERTOLLO, G. M.; CORASSA, G. M.; COCCO, L. B.; STEFFEN, R. B.; BASSO, C. J. Doses de dejetos líquidos de suínos na comunidade da fauna edáfica em sistema plantio direto e cultivo mínimo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.3, p.418-424, mar. 2014.

SILVA, A. P.; BABUJIA, L. C.; MATSUMOTO, L.S.; GUIMARÃES, M. F.; HUNGRIA, M. Bacterial diversity under different tillage and crop rotation systems in an Oxisol of southern Brazil. **The Open Agriculture Journal**, [S.l.], v. 7, p. 40-47, 2013.

- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; ELSAS, J. D. V.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2614-2621, mar.1999.
- SOUSA, F. A.; SILVA, E. B.; CAMPOS, A. T.; GANDINI, A. M. M.; CORRÊA, J. M.; GRAZZIOTTI, P. H. Atividade microbiana e produção da lavoura cafeeira após adubação com dejetos líquidos de suínos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30. n. 4, p. 1041-1049, ago. 2014.
- SOUZA, E. D.; ANDRADE COSTA, S. E. V. G.; ANGHINONI, I., LIMA, C. V. S.; FACCIO CARVALHO, P. C.; MARTINS, A. P. Biomassa microbiana do solo em sistema de integração lavoura-pecuária em plantio direto, submetido a intensidades de pastejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n.1, fev. 2010.
- SOUZA, L. M.; SCHLEMMER, F.; ALENCAR, P. M.; CASTRO LOPES, A. A.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; REIS JUNIOR, F. B. Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n.2, p. 269-276, fev. 2012.
- SPARLING, G. P.; WEST, A.W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labeled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 20, n.3, p.337-343, 1988.
- SPARLING, G.P. Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. In: PANKHURST, C.; DOUBLE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R. (Eds). **Biological indicators of soil health**. Cambridge: CAB International, 1997. p.97-120.
- STACKEBRANDT, E.; LUDWING, W.; FOX, G. E. **16S ribosomal RNA oligonucleotide cataloging**. Methods in Microbiology, London, v. 18, n. 1, p. 75-107, 1985.
- STEFANOWICZ, A. M.; KAPUSTA, P.; SZAREK-LUKASZEWSKA, G.; GRODZIŃSKA, K.; NIKLIŃSKA, M.; VOGT, R. D. Soil fertility and plant diversity enhance microbial performance in metal-polluted soil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 439, p.211-219, nov. 2012.
- STUBNER, S. Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 219-230, jun. 2004.
- TABATABAI, M. A. Enzymes. In: WEAVER, R. W.; AUGLE, S.; BOTTOMLY, P. J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Eds.). **Methods of Soil Analysis: Microbial and Biochemical Properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994, p. 775-833.
- TAVARES FILHO, J.; MAGALHÃES, F. S. Dispersão de amostras de Latossolo Vermelho eutroférrico influenciadas por pré- tratamento para oxidação da matéria orgânica e pelo tipo de agitação mecânica. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 1429-1435, ago. 2008.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. C. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. (Ed.) **Tópicos Especiais em Ciências do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p. 196-275.

VAL-MORAES S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS E. G. M.; CARARETO-ALVES, L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v 40, n. 1, p. 7-16, 2009.

VALENTINE, D. L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n.4, p. 316-323, abr. 2007.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil biomass carbon. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.19, n.6, p.703-707, 1987.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315- 322.

WHITTAKER, R. J.; WILLIS, K. J.; FIELD, R. Scale and species richness: towards a general. hierarchical theory of species diversity. **Journal of Biogeography**, Oxford. v.28. p.453-470. abr. 2001.

WILSEY, B. J.; CHALCRAFT, D. R.; BOWLES, C. M.; WILLIG, M. R. Relationships among indices suggest that richness is an incomplete surrogate for grassland biodiversity. **Ecology**, Washington, v.86, n.5, p.1178-1184, mai. 2005.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, New York, v. 74, n.11, p.5088-5090, nov. 1977.

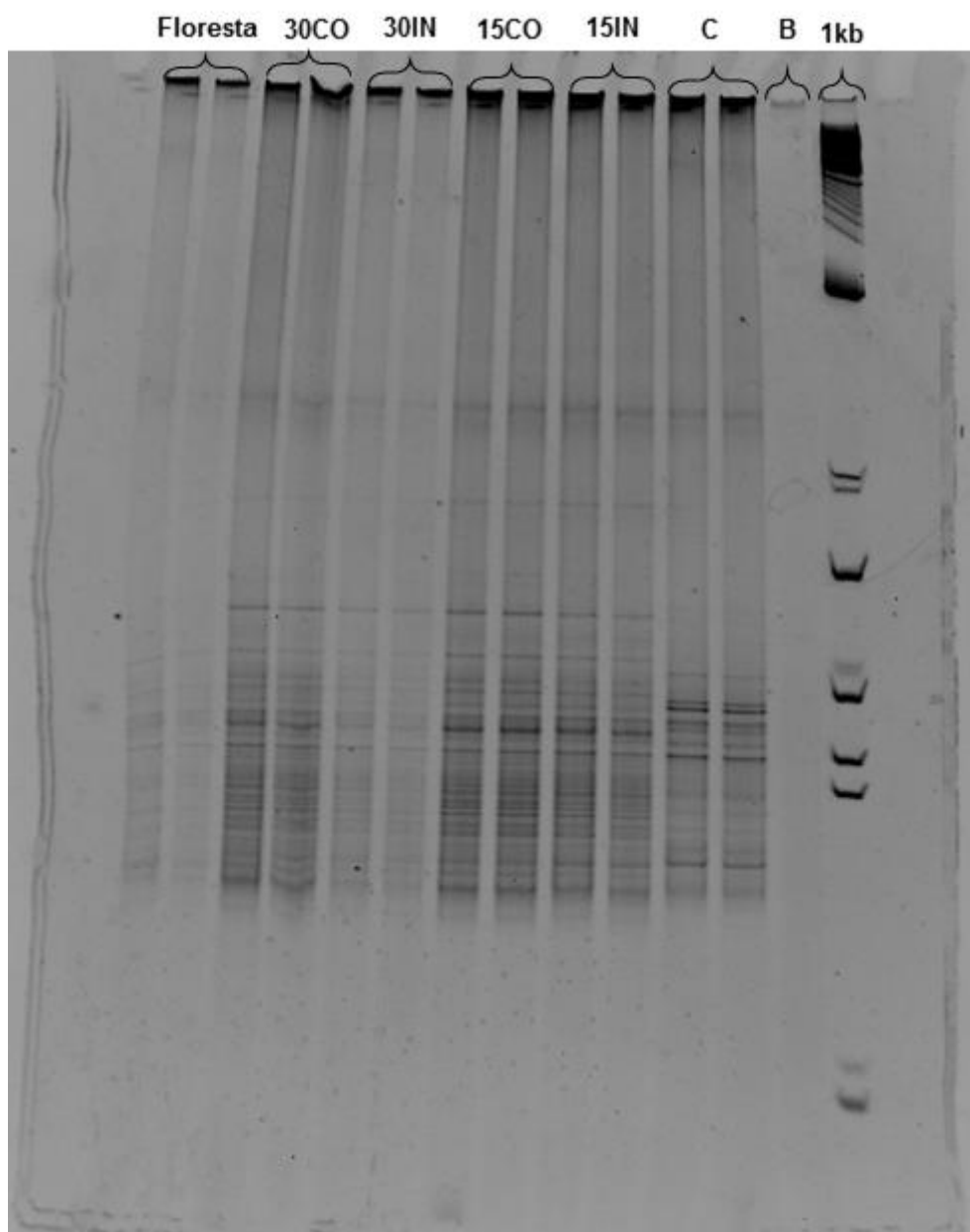
YU, C.; HU, X. M.; DENG, W.; LI, Y.; XIONG, C.; YE, C. H; LI, X. Changes in soil microbial community structure and functional diversity in the rhizosphere surrounding mulberry subjected to long-term fertilization. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.86, p. 30-40, fev. 2015.

ZHEN, Z.; LIU, H.; WANG, N.; GUO, L.; MENG, J.; DING, N; WU, G.; JIANG, G. Effects of manure compost application on soil microbial community diversity and soil microenvironments in a temperate cropland in China. **PLoS One**, San Francisco, v.9, n.10, e108555. out. 2014.

ZILLI, J. É.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília. v. 20, n.3, p.391-411, dez. 2003.

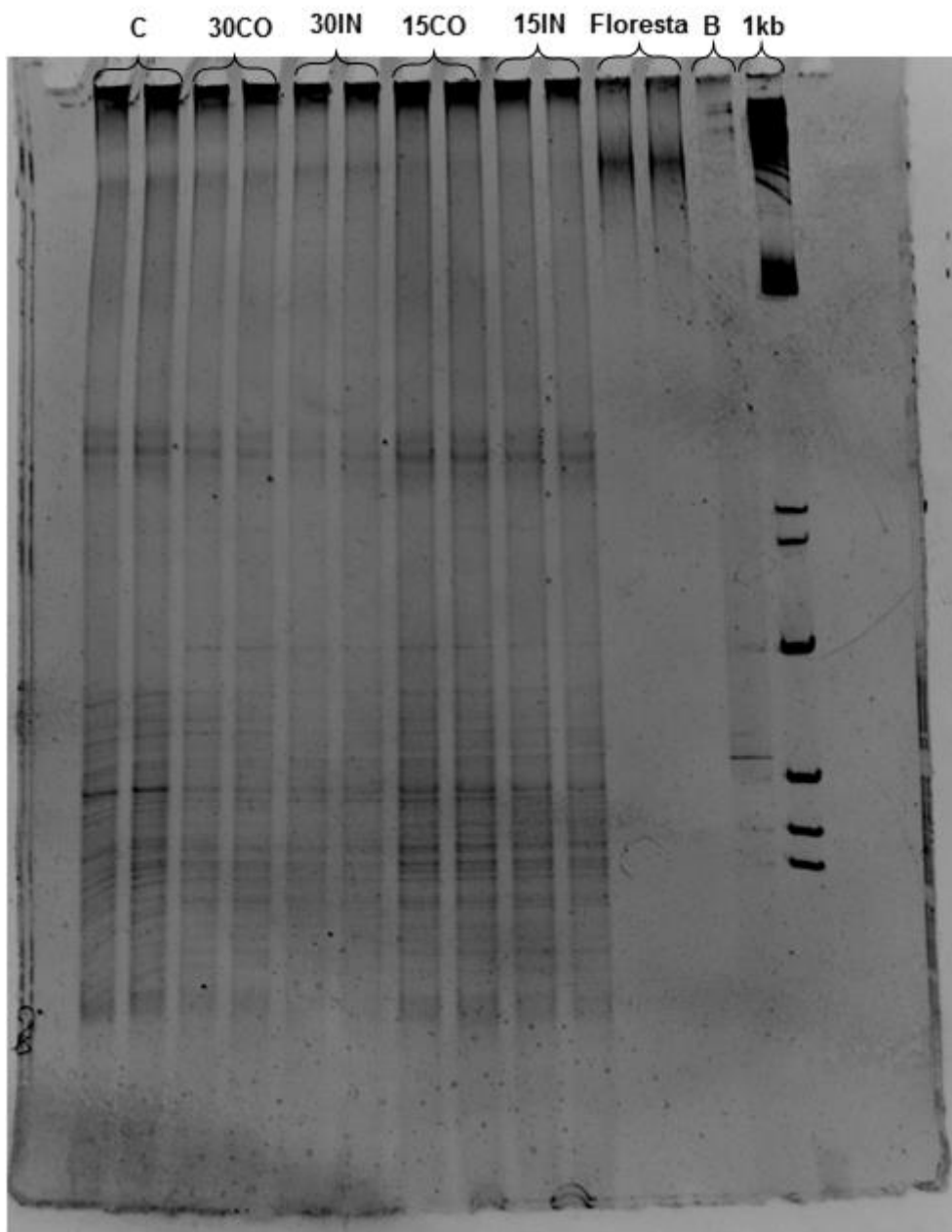
APÊNDICES

APÊNDICE A – Perfil de DGGE da comunidade bacteriana de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS). Coleta 1= Interrupção durante 5 meses.



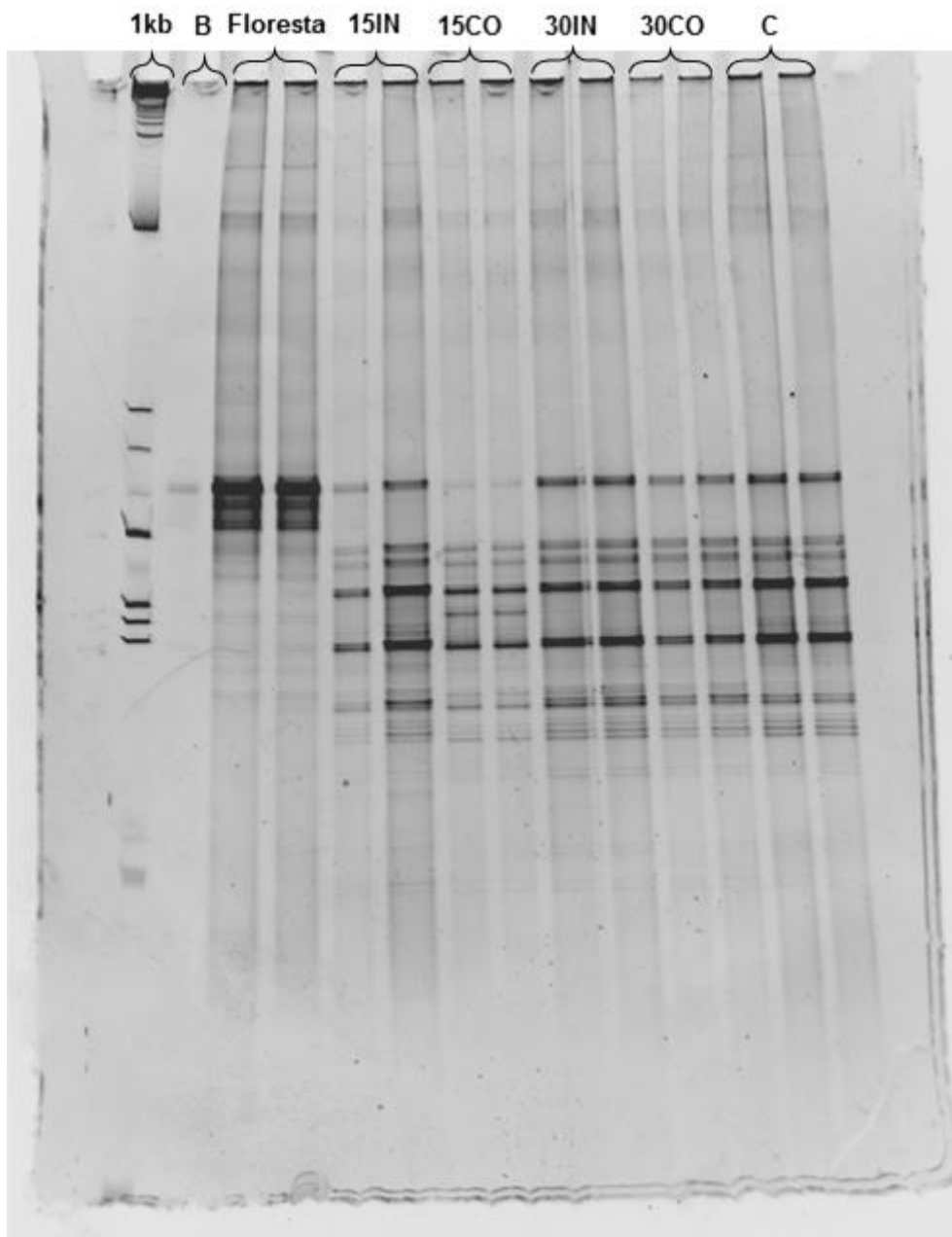
C= controle, $0 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$; 15IN= parcela da dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação contínua.

APÊNDICE B – Perfil de DGGE da comunidade bacteriana de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS). Coleta 2= Interrupção durante 12 meses.



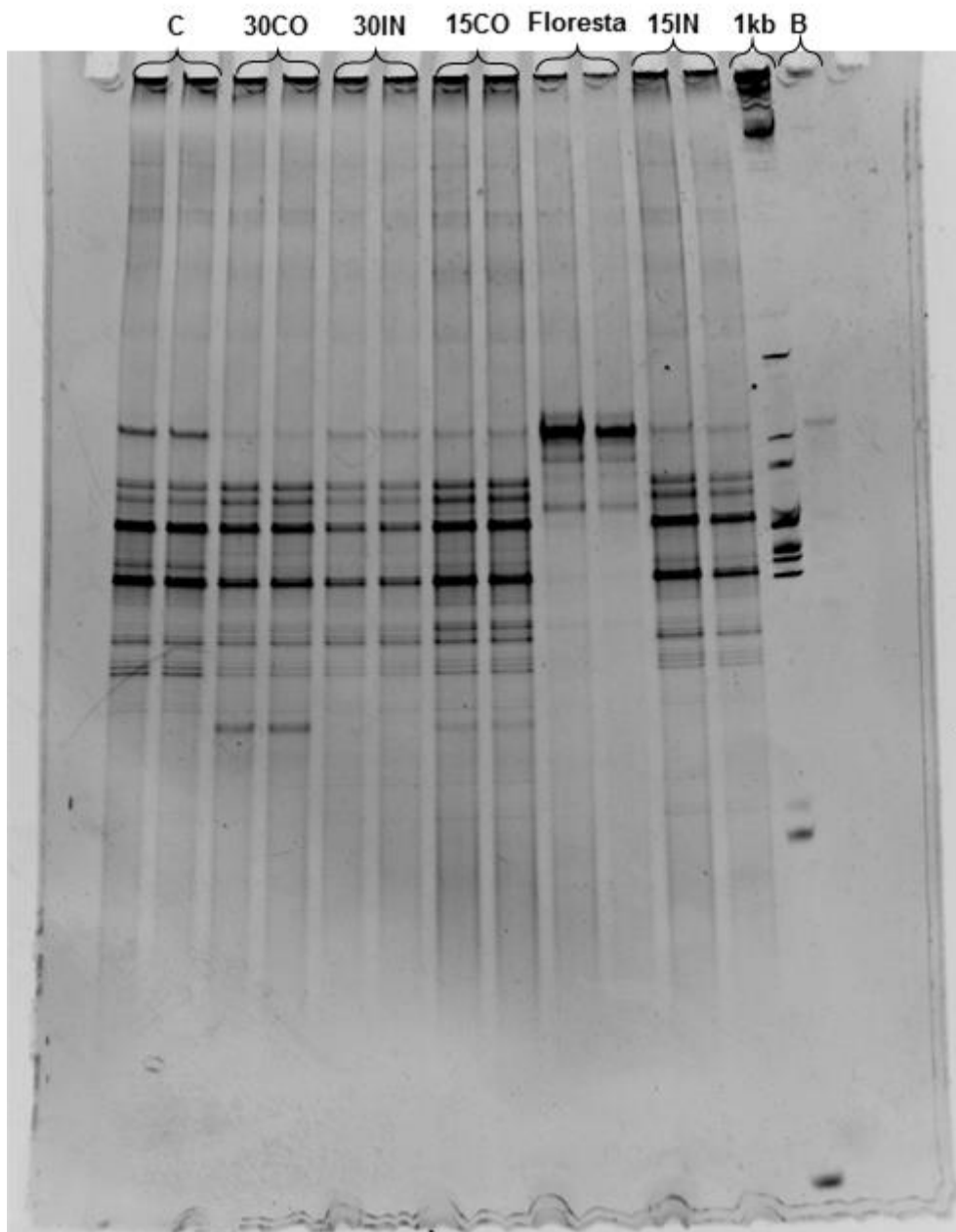
C= controle, $0 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$; 15IN= parcela da dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação contínua.

APÊNDICE C – Perfil de DGGE da comunidade de archaea de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS). Coleta 1= Interrupção durante 5 meses.



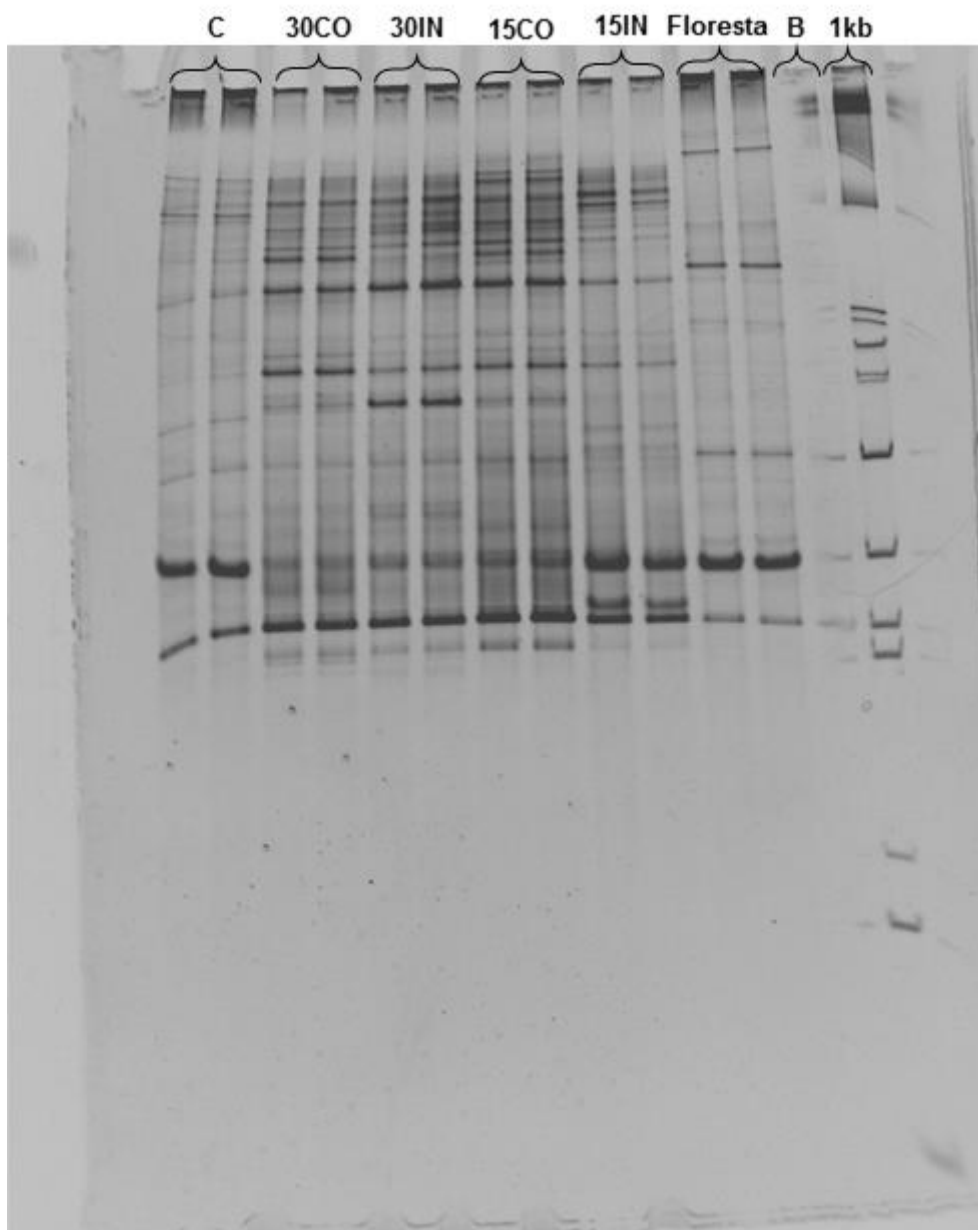
C= controle, 0 m³ ha⁻¹; 15IN= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose 15 m³ ha⁻¹ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose 30 m³ ha⁻¹ aplicação contínua.

APÊNDICE D – Perfil de DGGE da comunidade de archaea de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS). Coleta 2= Interrupção durante 12 meses.



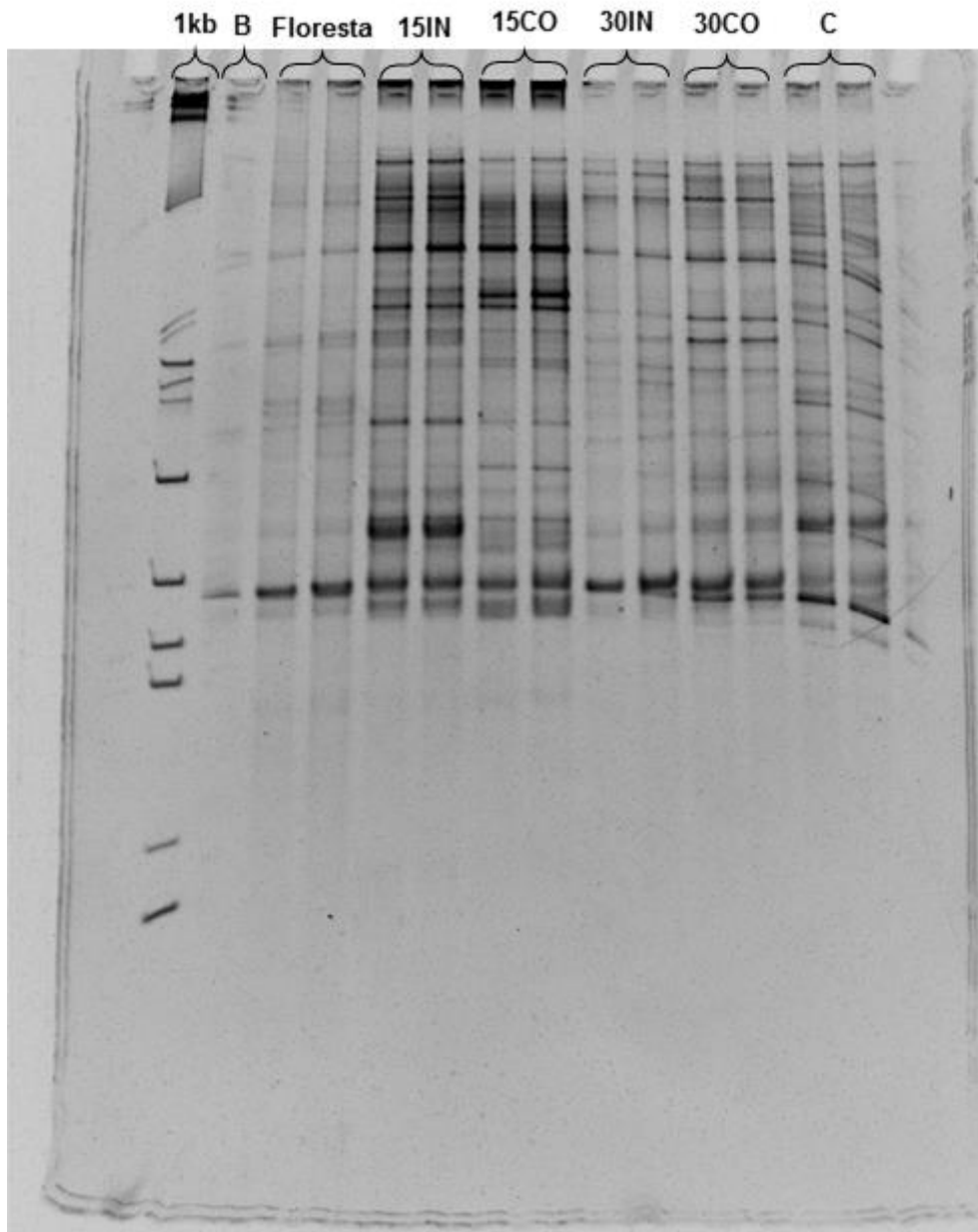
C= controle, $0 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$; 15IN= parcela da dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação contínua.

APÊNDICE E – Perfil de DGGE da comunidade de fungos de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS). Coleta 1= Interrupção durante 5 meses.



C= controle, $0 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$; 15IN= parcela da dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação contínua.

APÊNDICE F – Perfil de DGGE da comunidade de fungos de um Latossolo Vermelho Distroférico sob interrupção e aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS). Coleta 2= Interrupção durante 12 meses.



C= controle, $0 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$; 15IN= parcela da dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação interrompida; 15CO= parcela da dose $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação contínua; 30IN= parcela da dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação interrompida; 30CO= parcela da dose $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ aplicação contínua.