



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIVIAN NOGUEIRA MARQUES CERVANTES

**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO AUXILIAM NA
EXPLICAÇÃO DE NÍVEIS DE PRODUTIVIDADE DE SOJA
SOB PLANTIO DIRETO NO PARANÁ**

VIVIAN NOGUEIRA MARQUES CERVANTES

**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO AUXILIAM NA
EXPLICAÇÃO DE NÍVEIS DE PRODUTIVIDADE DE SOJA
SOB PLANTIO DIRETO NO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C419a	<p>Cervantes, Vivian Nogueira Marques.</p> <p>Atributos microbiológicos do solo auxiliam na explicação de níveis de produtividade de soja sob plantio direto no Paraná / Vivian Nogueira Marques Cervantes. — Londrina, 2012. 58 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia - Mestrado em Microbiologia, 2012. Orientador: Dr. Marco Antonio Nogueira.</p> <p>1. Qualidade de solo. 2. Biomassa microbiana. 3. Enzimas do solo. I. Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia – Mestrado em Microbiologia. II. Nogueira, Marco Antonio. III. Título.</p> <p>CDU 631.461</p>
-------	---

VIVIAN NOGUEIRA MARQUES CERVANTES

**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO AUXILIAM NA
EXPLICAÇÃO DE NÍVEIS DE PRODUTIVIDADE DE SOJA SOB
PLANTIO DIRETO NO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marco Antonio Nogueira
EMBRAPA – Londrina - PR

Ph.D. Mariangela Hungria
EMBRAPA – Londrina - PR

Dr. André Shigueyoshi Nakatani
EMBRAPA – Londrina - PR

Londrina, 23 de abril de 2012.

AGRADECIMENTOS

Ao final desta importante etapa na vida acadêmica, é de fundamental importância dar o devido reconhecimento às pessoas que tornaram este sonho uma meta alcançada:

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela oportunidade de realizar esse curso;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À Embrapa Soja, pelos recursos disponíveis para a realização das análises;

Ao meu orientador Marco Antonio Nogueira pela amizade, atenção, confiança, paciência, dedicação e disponibilidade durante a realização deste trabalho. Esses três anos sob sua orientação, desde o TCC, contribuíram para minha formação acadêmica.

À Mariangela Hungria, ao André Luiz Martinez de Oliveira e ao André Shigueyoshi Nakatani por dedicarem seu tempo e pelas importantes contribuições ao trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia do Solo pelos momentos de descontração e auxílio no desenvolvimento do trabalho. Em especial agradeço à Dáfila por se dedicar a sanar minhas várias dúvidas, pelo interesse no trabalho e pelo grande auxílio nas análises estatísticas, e à Paula pelo companheirismo e ajuda indispensável.

Ao Engenheiro Agrônomo Cássio de Oliveira Kossatz, por disponibilizar as áreas para as amostragens; e ao seu colaborador Diogo Hubert Thomaz, por fornecer os dados de produtividade e análises químicas do solo.

Aos meus pais Brígida e Antonio, ao meu irmão Thiago e à minha avó Teresinha, pelo exemplo de honestidade, perseverança e dedicação, por sempre me incentivar e proporcionar as condições necessárias para meus estudos.

Ao meu esposo Fernando pelo amor, apoio, incentivo, compreensão, paciência e por sempre me ouvir nos momentos mais difíceis.

E a Deus pela proteção e por colocar as pessoas certas em meu caminho.

CERVANTES, Vivian Nogueira Marques. **Atributos microbiológicos do solo auxiliam na explicação de níveis de produtividade de soja sob plantio direto no Paraná.** 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Atributos microbiológicos e bioquímicos do solo auxiliam a explicar níveis de produtividade de grãos em áreas sob plantio direto? Esses atributos são geralmente negligenciados ao se relacionar a fertilidade do solo e a produtividade das culturas. O objetivo deste trabalho foi avaliar alguns bioindicadores de qualidade de solo e relacioná-los com a produtividade de soja em áreas de produção comercial cultivada sob plantio direto no Paraná. As amostragens foram realizadas em janeiro e setembro de 2011 em Ponta Grossa, PR. Foram coletadas 4 amostras compostas de solo em 7 áreas, nas profundidades 0-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm, sendo uma área de fragmento florestal como referência e seis áreas agrícolas sob plantio direto com histórico de diferentes produtividades de grãos. Foram avaliadas a respiração basal (RB), biomassa microbiana de carbono (BMC) e nitrogênio (BMN), atividade das enzimas desidrogenase, celulase, glutaminase e fosfatase ácida, e estrutura da comunidade bacteriana por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Calculou-se o quociente metabólico (qCO_2) pela razão entre RB e BMC. Os dados foram submetidos à análise de componentes principais (ACP), análise discriminante, correlação simples de Pearson e correlação múltipla por stepwise. Na ACP, os bioindicadores avaliados foram relacionados principalmente às áreas de alta produtividade de grãos. Ao adicionar os dados do fragmento florestal à ACP, as áreas de alta produtividade tenderam a permanecer mais próximas das áreas nativas no plano fatorial do que as áreas de média e baixa produtividade, o que sugere que os bioindicadores em níveis mais próximos aos observados na área referência auxiliam a explicar maiores níveis de produtividade. Os bioindicadores decrescem com a profundidade do solo e não apresentam relação clara com os níveis de produtividade nas profundidades maiores que 10 cm. A análise dos perfis de DGGE mostrou similaridade entre as áreas de 75% e agrupamentos semelhantes aos obtidos na ACP baseada em atributos microbiológicos. A análise discriminante evidenciou a capacidade da BMC e da atividade enzimática em discriminar as áreas de acordo com os níveis de produtividade. A regressão múltipla mostrou que a produtividade é principalmente influenciada pelo teor de C orgânico, e a correlação de Pearson mostrou-se significativa entre o C orgânico e a BMC, BMN, CTC, e atividade enzimática. Conclui-se que o sistema de produção sob plantio direto altera a atividade microbiana no solo em relação às áreas nativas, e que bioindicadores RB, BMC e atividade das enzimas celulase, glutaminase e fosfatase ácida, na camada 0-10 cm, podem ser usados para auxiliar a explicar níveis de produtividade de soja em áreas de produção agrícola comercial.

Palavras-chave: Qualidade de solo. Biomassa microbiana. Enzimas do solo. Plantio direto. Produtividade agrícola. Microbiologia do solo.

CERVANTES, Vivian Nogueira Marques. **Soil microbial attributes help to explain levels of soybean yields under no-tillage at Paraná state**. 2012. 58 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Does soil microbiological and biochemical attributes influence levels of grain yields in areas under no-tillage? These attributes have generally been neglected when relationships between soil fertility and crop yields are correlated. The objective of this study was to assess some bioindicators of soil quality and relate them to soybean yields in commercial crops under no-tillage at Paraná state. Four composite samples of soil were taken in January and September 2011 in seven areas at 0-10, 10-20, 20-40 and 40-60 cm of soil depth at Ponta Grossa, Paraná, being one in a native forest and six in agricultural areas under no-tillage with a history of different grain yield. We assessed the basal respiration (BR), soil microbial biomass of carbon and nitrogen (MB-C and MB-N), dehydrogenase, cellulase, acid phosphatase, and glutaminase activities, and analysis of bacterial community structure by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The metabolic quotient (qCO_2) was taken by the ratio between BR and MB-C per hour. Data were analyzed by principal component analysis (PCA), discriminant analysis, simple Pearson's correlation, and multiple correlations by stepwise. In the PCA the bioindicators were mainly related to agricultural areas of higher grain yields. When the native forest data were added to the PCA, the areas with higher grain yields tended to be closer to native forest than the areas of medium and lower yields, suggesting that the bioindicators at similar levels observed in the native forest may help to explain the higher levels of crop yields in the agricultural soils. The bioindicators decreased with soil depth and did not respond clearly to the levels of grain yields in depths greater than 10 cm. DGGE profiles analysis showed 75% of similarity between the areas and showed a grouping pattern similar to PCA based on microbiological attributes. The discriminant analysis showed high capacity of MB-C and soil enzymes activities to discriminate areas according to yield levels. The multiple regressions showed that soybean yield is mainly influenced by the soil organic carbon content, and the Pearson's correlation was significant between organic C and MB-C, MB-N, CTC, and soil enzymes activities. We conclude that the no-tillage system changes the microbial activity in soil in comparison to native forest, and that bioindicators BR, MB-C, cellulase, acid phosphatase, and glutaminase activities, at 0-10 cm of soil depth, can help to explain levels of soybean grain yields in commercial agricultural areas.

Keywords : Soil quality. Microbial biomass. Soil enzymes. No-tillage. Agricultural productivity. Soil microbiology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Pontos de amostragem de solo em Ponta Grossa-PR: 1-4 (BP1), 5-8 (AP1), 9-12 (BP2), 13-16 (AP2), 17-20 (FF), 21-24 (MP1), 25-28 (MP2). (A) Fazenda Santa Maria; (B) Fazenda Suruvi. Imagem obtida do Google Earth. BP = baixa produtividade, MP = média produtividade, AP = alta produtividade e FF = fragmento florestal.....26
- Figura 2** – Análise de componentes principais (ACP) baseada em variáveis microbiológicas e variáveis explicativas de áreas cultivadas com soja no verão, sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos. Profundidade 0-10 cm da amostragem de verão. RB = respiração basal, BMC = biomassa microbiana de carbono, BMN = biomassa microbiana de nitrogênio, qCO₂ = quociente metabólico.(A) apenas áreas agrícolas; (B) considerando um fragmento florestal (FF) na análise.36
- Figura 3** – Análise de componentes principais (ACP) baseada em variáveis microbiológicas e variáveis explicativas de áreas cultivadas com soja no verão, sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos. Profundidade 0-10 cm da amostragem de inverno. RB = respiração basal, BMC = biomassa microbiana de carbono, BMN = biomassa microbiana de nitrogênio, qCO₂ = quociente metabólico. (A) apenas áreas agrícolas; (B) considerando um fragmento florestal (FF) na análise38
- Figura 4** – Dendrograma de similaridade obtido da análise da imagem do gel de DGGE, do gene 16S rRNA de amostras de solo de áreas cultivadas com soja sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos, no programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e índice de tolerância de 5%. FF = fragmento florestal.....46

- Figura 5 –** Análise canônica discriminante (ACD) com base nas variáveis microbiológicas obtidas na profundidade 0-10 cm das áreas de cultivo de soja com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos. (A) verão, (B) inverno. Áreas agrupadas no mesmo círculo não diferem entre si pelo teste de Wilks' Lambda ($P > 0,05$).....48
- Figura 6 –** Correlação simples de Pearson do C com variáveis microbiológicas do solo e capacidade de troca de cátions (CTC) considerando a profundidade 0-10 cm das áreas de cultivo de soja, sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos, na amostragem de verão. BMC = biomassa microbiana de carbono, BMN = biomassa microbiana de nitrogênio, AR = açúcares redutores, PNP = p-nitrofenol.....50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Identificação dos pontos de amostragem de solo georreferenciados, produção de soja safra 2010/2011 e rotação de culturas adotada de 2006 a 201128
- Tabela 2** – Atributos microbiológicos e bioquímicos em áreas de cultivo de soja sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos, e em fragmento florestal (FF). Amostragem de verão em Ponta Grossa, PR. (n=4).....40
- Tabela 3** – Atributos microbiológicos e bioquímicos em áreas de cultivo de soja sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos, e em fragmento florestal (FF). Amostragem de inverno em Ponta Grossa, PR. (n=4).....41
- Tabela 4** – Resultado de análises químicas e granulométricas de amostras de solo das áreas cultivadas com soja sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos, e de um fragmento florestal (FF), de Ponta Grossa, PR. (n = 4).....45
- Tabela 5** – Coeficientes canônicos padronizados (CCP) da função canônica discriminante 1 e 2, r (coeficiente de correlação canônico) e TDP (taxa de discriminação paralela) discriminando as áreas agrícolas de cultivo de soja sob plantio direto, com diferentes produtividades de grãos, na profundidade 0-10 cm, considerando os atributos microbiológicos do solo no verão e inverno47
- Tabela 6** – Resumo do stepwise para regressão múltipla com base nas variáveis microbiológicas e químicas das áreas agrícolas na amostragem de verão (profundidade 0-10 cm), considerando a produtividade de grãos como variável dependente, segundo o modelo: Produtividade (kg ha⁻¹) = 2785 + 20.6*RB – 115.9*K – 17.2*CTC + 110.3*C49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
3	JUSTIFICATIVA	13
4	REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1	PLANTIO DIRETO NO BRASIL: HISTÓRICO E EXPANSÃO	14
4.2	BENEFÍCIOS DO PLANTIO DIRETO	15
4.3	AGRICULTURA DE PRECISÃO	17
4.4	BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO	18
4.4.1	Indicadores Microbiológicos	19
4.4.1.1	Respiração basal	20
4.4.1.2	Biomassa microbiana do solo	20
4.4.1.3	Quociente metabólico (qCO_2)	22
4.4.2	Indicadores Bioquímicos	22
4.4.3	Eletroforese Em Gel Com Gradiente Desnaturante (DGGE)	24
5	MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1	DESCRIÇÃO DAS ÁREAS E PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM	26
5.2	RESPIRAÇÃO BASAL (DESPRENDIMENTO DE CO_2)	29
5.3	BIOMASSA MICROBIANA DE CARBONO E NITROGÊNIO	29
5.4	DESIDROGENASE	30
5.5	CELULASE	30
5.6	GLUTAMINASE	30
5.7	FOSFATASE ÁCIDA	31
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS MICROBIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	31
5.9	ANÁLISE DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA	32
5.9.1	Extração do DNA Total Do Solo	32
5.9.2	Amplificações Do Gene <i>16S rRNA</i>	33
5.9.3	Eletroforese Em Gel Com Gradiente Desnaturante (DGGE)	34
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

O plantio direto é um sistema de manejo do solo que teve início no Brasil na década de 1970 e é caracterizado pela manutenção da cobertura do solo com restos vegetais, e mínimo revolvimento, limitado à linha de semeadura.

Inicialmente, o plantio direto apresentou limitações para sua adoção como a falta de máquinas adequadas para a semeadura e problemas no controle de plantas daninhas. Com o desenvolvimento de herbicidas e semeadoras mais eficientes, o plantio direto se difundiu no Brasil em razão de suas vantagens econômicas e ambientais. Atualmente, mais da metade da área destinada à produção de grãos no país, cerca de 25 milhões de hectares, utiliza esse sistema.

O plantio direto permite maior conservação do solo e da água, melhoria da fertilidade do solo e da atividade biológica, garantindo maior sustentabilidade ao sistema de produção. Além disso, também é um dos sistemas mais eficientes para melhoria da qualidade e do potencial produtivo do solo agrícola.

O plantio direto aliado às ferramentas da agricultura de precisão permite ao agricultor identificar manchas de alta e baixa produtividade das culturas e administrar essas diferenças, que geralmente são decorrentes de variações nas propriedades químicas e físicas do solo. Mesmo após realizar as devidas correções químicas e físicas do solo, há relatos de níveis de produtividade das culturas em áreas próximas em uma mesma propriedade, supostamente homogêneas. Essas diferenças não podem ser explicadas apenas pelas características químicas e físicas do solo. Nesses casos, atributos microbiológicos e bioquímicos relativos à qualidade do solo podem contribuir para melhor compreender essas discrepâncias, uma vez que os microrganismos desempenham papel importante na sustentabilidade dos agroecossistemas.

Embora não existam valores de referência estabelecidos para indicadores microbiológicos e bioquímicos de qualidade do solo, estes são mais sensíveis a alterações no ambiente que os indicadores químicos e físicos. Uma alternativa é a comparação de áreas de cultivo com áreas de referência, como fragmentos florestais nativos para avaliar a qualidade dos solos, e relacionar com a sustentabilidade dos sistemas de produção.

Diante do exposto, duas questões se apresentam para investigação: estariam atributos microbiológicos e bioquímicos do solo influenciando os níveis de produtividade de grãos em áreas de produção comercial sob plantio direto? Quais atributos estariam mais relacionados a essas diferenças?

2 OBJETIVOS

Avaliar atributos microbiológicos e bioquímicos como bioindicadores de qualidade de solo em áreas agrícolas sob plantio direto e relacioná-los com a produtividade de soja, em áreas de produção comercial de grãos sob agricultura de precisão no município de Ponta Grossa, Paraná.

Comparar os resultados dos bioindicadores das áreas agrícolas com os obtidos em fragmentos florestais, como áreas referência de sustentabilidade.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos demonstram que o plantio direto melhora as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo em relação ao solo sob plantio convencional (BABUJIA et al., 2010; SILVA et al., 2010; HUNGRIA et al., 2009; FRANCHINI et al., 2007). Desse modo, a ampla adoção do sistema plantio direto no Brasil é devida às suas vantagens econômicas e ambientais, e às pesquisas realizadas que comprovaram essas vantagens no cultivo em longo prazo. Entretanto, mesmo com as vantagens da adoção de sistemas de produção mais tecnificados e conservacionistas, respostas em termos de produtividade de grãos não são explicadas completamente pela interpretação de atributos químicos e físicos do solo.

Esse trabalho representa um avanço nas pesquisas envolvendo manejo do solo e resposta das culturas por comparar áreas agrícolas comerciais de cultivo de soja manejadas sob plantio direto e agricultura de precisão com a finalidade de esclarecer quais atributos microbiológicos e bioquímicos do solo contribuem para explicar os níveis de produtividade obtidos sob esse sistema de manejo.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PLANTIO DIRETO NO BRASIL: HISTÓRICO E EXPANSÃO

O plantio direto caracteriza-se pela semeadura realizada diretamente sobre os restos da cultura anterior, sem preparo do solo, como aração ou gradagem (COLOZZI FILHO; ANDRADE, 2006). Uma definição mais detalhada do plantio direto é sugerida em Derpsch (1984): sistema de semeadura no qual a semente é colocada diretamente no solo não revolvido, utilizando-se máquinas específicas. Nesse processo, é aberto um sulco de profundidade e largura suficiente para garantir uma boa cobertura e contato da semente com o solo, e não mais que 25 a 30% da superfície do solo é revolvida. O controle de plantas daninhas antes e depois do plantio é geralmente realizado com herbicidas.

Os primeiros experimentos sobre o plantio direto no Brasil se iniciaram em abril de 1971, em Londrina, Paraná, através de um projeto da Missão Agrícola Alemã junto ao extinto IPEAME (Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária Meridional, atual EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Nesse projeto, parcelas de demonstração foram estabelecidas na fazenda de Herbert Bartz, em Rolândia, Paraná. Esses bem sucedidos experimentos motivaram o fazendeiro a importar uma máquina dos Estados Unidos, transformando-se no primeiro agricultor a utilizar o plantio direto no Brasil, com o plantio de soja em outubro de 1972 (DERPSCH, 1984; 1998).

A partir de 1976 o IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná) iniciou pesquisas intensivas sobre plantio direto em cooperação com a ICI (Imperial Chemical Company), e um ano mais tarde, com GTZ (Cooperação Técnica Alemã), com o objetivo de esclarecer as dúvidas sobre o sistema no país, e com enfoque em plantas de cobertura e rotação de culturas (DERPSCH, 2002).

No início, a falta de máquinas adequadas para a semeadura e a dificuldade de controlar as plantas invasoras foram as principais limitações da adoção do plantio direto pelos agricultores (DERPSCH, 1984). Apesar das dificuldades iniciais, de acordo com dados da Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha (2012), a área de plantio direto no Brasil passou de 180 hectares em 1972 para 2 milhões de hectares em 1992, e alcançou 25,5 milhões de hectares em 2006, um aumento de mais 140 mil vezes, e representa 70% da área destinada à produção

de grãos no país, sendo um dos líderes mundiais em área de adoção do plantio direto (DERPSCH; FRIEDRICH, 2009).

Inicialmente, o plantio direto se expandiu principalmente nos Estados da região sul do Brasil, para conservar o solo devido aos consideráveis danos causados por erosão em áreas cultivadas; e posteriormente, na década de 90, a maior expansão do plantio direto ocorreu na região dos Cerrados (DERPSCH, 1998; 2002). Algumas das razões para a ampla expansão da área sob plantio direto no Brasil foram: o controle eficiente da erosão e da degradação físico-química dos solos provocada pela agricultura intensiva; desenvolvimento de herbicidas mais eficientes e máquinas de semeadura adequadas; e retorno econômico ao produtor, principalmente aos que utilizavam adubos verdes e rotação de culturas para redução da infestação por plantas invasoras (DERPSCH, 2000).

4.2 BENEFÍCIOS DO PLANTIO DIRETO

Um fragmento florestal em estado clímax é considerado autossustentável e se encontra em equilíbrio. Com a retirada da cobertura vegetal nativa para o cultivo, por exemplo, esse equilíbrio é perturbado e os processos microbianos relacionados ao fluxo de nutrientes e carbono podem ser afetados (IZQUIERDO et al., 2005). A cobertura vegetal original contribui para manter uma comunidade biológica estável no solo, além de fornecer carbono e energia através dos exsudatos das raízes e restos vegetais (PASCUAL et al., 2000). O sistema de plantio direto tende a se reaproximar do que ocorre em uma área com vegetação nativa, no que se refere ao teor de matéria orgânica, com viabilidade econômica, incluindo ganhos em produtividade e maior sustentabilidade do agroecossistema.

No plantio direto, a permanência dos resíduos vegetais na superfície do solo o protege contra a erosão no período entre dois cultivos e favorece a atividade microbiana pelo acúmulo de matéria orgânica e nutrientes, sendo estes os aspectos mais positivos do sistema em médio e longo prazo. A cobertura vegetal também contribui para manutenção de temperaturas amenas e maior retenção de água no solo em períodos quentes e prolongados de estiagem (COLOZZI FILHO; ANDRADE, 2006).

Tanto os resíduos das culturas de interesse econômico, em rotação ou sucessão, como os das plantas de cobertura ao longo dos anos, acarretam um

aumento lento e gradual no teor de matéria orgânica após seis ou sete anos da adoção do plantio direto, principalmente na camada de 0 a 10 cm, pois a taxa de decomposição da palha mantida na superfície é menor do que quando incorporada ao solo (LOPES et al., 2004).

A matéria orgânica do solo é a principal fonte de carbono e energia para os microrganismos e, também, é fonte de nutrientes para as plantas. É também responsável por aumentar a capacidade de troca catiônica e retenção de água, melhorar a estrutura e a estabilidade de agregados do solo (IZQUIERDO et al., 2005). O carbono presente no interior dos agregados permanece preservado e, portanto, sua mineralização pelos microrganismos do solo é mais lenta, diminuindo as perdas de nutrientes por lixiviação e volatilização (MENDES et al., 2003).

O plantio direto aumenta os estoques de C no solo e diminui a emissão de gás carbônico para a atmosfera e, conseqüentemente, é importante no que se refere à mitigação do aquecimento global. Na região da mata atlântica, na camada 0-20 cm, há um sequestro de C na ordem de 0,2 a 0,8 Mg ha⁻¹ ano⁻¹. No cerrado, a taxa de acúmulo de C no solo sob plantio direto em relação ao cerrado nativo, em 15 anos, foi de 1,47 Mg ha⁻¹ ano⁻¹, na camada de 1 metro de profundidade (CARVALHO et al., 2010).

A redução dos teores de matéria orgânica resulta em declínios na qualidade do solo e na produtividade das culturas (GREGORICH et al., 1994). Com relação à qualidade do solo, estudos têm mostrado que a adoção do sistema plantio direto melhora as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, na maioria das vezes, trazendo modificações favoráveis para a sustentabilidade da produção (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). O plantio direto favorece as propriedades químicas do solo, como teores adequados dos macro e micronutrientes, pH, capacidade de troca de cátions, entre outras, o que favorece a atividade microbiana (FRANCHINI et al., 1999).

Por essas razões, o plantio direto é considerado o sistema de manejo mais adequado às condições tropicais e subtropicais, com redução dos custos de produção e aumento da rentabilidade, além de promover a manutenção da matéria orgânica e a qualidade do solo (ROLDÁN et al., 2007; FACCI, 2008).

4.3 AGRICULTURA DE PRECISÃO

O termo “agricultura de precisão” se refere ao gerenciamento da propriedade rural que leva em conta a variabilidade espacial e temporal para manejar as interações dos diferentes fatores de produção de uma área agrícola (PIRES; COSTA, 2001).

A agricultura de precisão prevê o uso eficiente dos recursos pelo gerenciamento localizado das unidades de manejo com base nas suas características específicas. A finalidade é conhecer os diversos fatores que influenciam na expressão do potencial produtivo de uma cultura, como as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, para entender a variabilidade espacial e temporal da produtividade e estabelecer um processo eficiente de gerenciamento localizado para as intervenções de manejo (SANTI, 2007).

O uso de satélites permitiu a localização de qualquer ponto na superfície terrestre por meio do Sistema de Posicionamento Global (GPS). Esta ferramenta, em conjunto com um sistema de análise de dados (Sistema de Informações Geográficas - SIG ou GIS), e outros equipamentos, possibilita identificar a variabilidade de fatores de produção das áreas cultivadas, bem como o gerenciamento de máquinas agrícolas capazes de minimizar esta variabilidade (PIRES; COSTA, 2001; SANTI, 2007).

A variabilidade espacial do rendimento, observada através de mapas de produtividade, pode refletir uma complexa interação de fatores como os relacionados a aspectos fisiológicos da cultura, problemas decorrentes de intempéries climáticas ou de atributos referentes à qualidade do solo. O uso dessas ferramentas permite o manejo localizado de áreas agrícolas, trazendo benefícios ambientais e econômicos (PIRES; COSTA, 2001).

De acordo com Santi (2007), em um experimento realizado no Rio Grande do Sul, em áreas comerciais manejadas sob plantio direto e agricultura de precisão, os indicadores de fertilidade do solo (P, K, Ca, Mg, saturação de bases, pH e matéria orgânica do solo) estavam em níveis elevados, mas explicaram baixa porcentagem da variabilidade do rendimento das colheitas. Desse modo, mesmo após realizar a adubação localizada das áreas agrícolas com as ferramentas e equipamentos da “agricultura de precisão”, foram encontrados níveis de

produtividade. Nesse caso, os bioindicadores de qualidade do solo poderiam contribuir para melhor compreender essas diferenças.

4.4 BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO

A qualidade do solo é definida como a capacidade de manter a produtividade biológica, qualidade ambiental, promover a saúde de plantas e animais, resultando na manutenção da produtividade e da sustentabilidade do agroecossistema. O seu estudo é importante para fornecer informações sobre os efeitos do manejo do solo e assegurar a melhor forma de utilização desse recurso natural não renovável. Um solo equilibrado proporciona condições para o desenvolvimento adequado das plantas e maior expressão do seu potencial produtivo (DORAN; PARKIN, 1994).

O solo, ambiente onde habitam microrganismos fundamentais aos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, dentre outros, tem propriedades físicas, químicas e biológicas que interagem de maneira complexa, determinando sua qualidade e capacidade de uso. Dessa forma, a qualidade do solo pode ser inferida a partir das mudanças em seus atributos, conhecidos como indicadores (SEYBOLD et al., 1997). Esses indicadores têm a finalidade de identificar melhores estratégias de manejo e uso do solo, importantes principalmente em áreas tropicais, onde os solos têm maior susceptibilidade à degradação (SPACCINI et al., 2001).

O principal desafio na interpretação dos índices de qualidade de solo é saber o que significam, visto que não existem parâmetros pré-estabelecidos. Uma alternativa é a comparação dos índices e/ou valores com aqueles obtidos de áreas adotadas como referência. Uma mata nativa em estado clímax é considerada um sistema autossustentável, onde a ciclagem do carbono e dos nutrientes encontra-se num estado de equilíbrio, e que, portanto poderia ser adotado como referência (NOGUEIRA et al., 2006).

Para se avaliar a qualidade do solo é possível utilizar-se de atributos químicos, físicos, microbiológicos e bioquímicos, uma vez que os ecossistemas e sua funcionalidade são governados pela interação destes atributos. Entretanto, existem limitações (tempo, custo e mão-de-obra) que tornam inviáveis adotar ao mesmo tempo todos esses indicadores, devendo-se selecionar os mais promissores.

Desse modo, há estudos para a definição de um número mínimo de indicadores de qualidade de solo (SOUZA et al., 2008). Os critérios para a escolha das variáveis mais adequadas devem estar relacionados à capacidade do bioindicador responder de forma rápida e acurada a um distúrbio no solo, possuir método de avaliação, ser economicamente viável, apresentar distribuição universal e independente de sazonalidade, e refletir sensivelmente os processos que ocorrem nesse sistema heterogêneo, complexo e dinâmico que é o solo (ZILLI et al., 2003).

Islam e Weil (2000) dividiram os indicadores de qualidade do solo em três grandes grupos: os *permanentes*, que são intrínsecos ao solo, como profundidade, camadas restritivas, textura, mineralogia; os *temporários*, cujas alterações ocorrem em curto espaço de tempo ou são modificados pelas práticas de cultivo, tais como umidade do solo, densidade, pH e disponibilidade de nutrientes; e os *intermediários*, como exemplo a agregação, biomassa microbiana do solo, quociente metabólico (qCO_2), carbono orgânico total, entre outros. Esses indicadores seriam, segundo os autores, mais relevantes, por possuírem grande influência sobre a capacidade do solo em desempenhar suas funções essenciais.

Determinar a qualidade do solo em áreas agrícolas utilizando um único parâmetro é impraticável, devido à dificuldade em se estabelecer valores de referência absolutos e confiáveis (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). Portanto, as estratégias de avaliação que consideram um conjunto de atributos são as que resultam em um índice mais confiável para avaliar a qualidade do solo (DORAN; PARKIN, 1994), muito embora sejam necessários estudos para a definição de quantos e quais indicadores deverão ser adotados (SOUZA et al., 2008).

4.4.1 Indicadores Microbiológicos

Consideram-se como bioindicadores do solo, as propriedades biológicas que indicam o estado do ecossistema e que podem ser utilizadas no biomonitoramento da qualidade do solo (DORAN; PARKIN, 1994).

Os microrganismos respondem rapidamente às mudanças na qualidade do solo, característica que, em geral, não é observada nos indicadores químicos ou físicos. Assim, há relatos de que alterações na microbiota podem preceder mudanças nas propriedades químicas e físicas do solo, sendo, portanto indicadores valiosos dos impactos positivos ou negativos (FRANCHINI et al., 2007;

HUNGRIA et al., 2009; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). Embora os microrganismos sejam utilizados como bioindicadores sensíveis da qualidade do solo, existe uma relação desses com outros atributos do solo, de forma que nenhum indicador individual pode quantificar todos os aspectos da qualidade do solo. Além disso, existem dificuldades na busca por correlações entre indicadores biológicos e a produtividade agrícola, devido à falta de pesquisas com essa abordagem (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010).

4.4.1.1 Respiração basal

A respiração basal (RB) do solo ou respirometria, que representa a oxidação de compostos orgânicos a CO_2 por microrganismos aeróbios, é um indicador sensível da decomposição de resíduos e de distúrbios à comunidade microbiana no ecossistema. Uma alta taxa de respiração basal pode ser interpretada como um sinal de rápida decomposição de resíduos orgânicos, disponibilizando nutrientes para as plantas, ou também pode ser resultante da intensa decomposição da matéria orgânica estável, a fração húmica, e perda de carbono para a atmosfera. Sendo assim, altas taxas de respiração basal podem reduzir os teores de matéria orgânica do solo e levar ao deterioramento dos processos químicos e físicos, como a agregação, a capacidade de troca de cátions e a capacidade de retenção de água, ocasionando perdas de nutrientes (ISLAM; WEIL, 2000).

4.4.1.2 Biomassa microbiana do solo

A biomassa microbiana do solo é considerada a fração viva da matéria orgânica, composta por bactérias, fungos e protozoários (MOREIRA; MALAVOLTA, 2004) constituindo, em média, entre 1 a 4% do carbono orgânico total do solo e de 3 a 5% do nitrogênio (FERREIRA et al., 2007).

As bactérias e os fungos são responsáveis por cerca de 90% da atividade da biomassa microbiana (SIQUEIRA et al., 1994), sendo as bactérias as mais abundantes e com maior diversidade, apresentando elevada capacidade de degradação de diferentes substratos no solo (BRANDÃO, 1992).

A biomassa microbiana do solo responde de maneira diferenciada aos manejos agrícolas adotados em cada agroecossistema e, portanto, pode ser

classificada como um bioindicador da qualidade de solo. O estudo da biomassa microbiana fornece informações sobre seus aspectos quantitativos, o que permite fazer uma avaliação mais adequada da qualidade de um solo (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). Nogueira et al. (2006) ao compararem áreas agrícolas e nativas encontraram valores significativamente maiores de biomassa microbiana nas áreas com cobertura florestal nativa.

A biomassa microbiana é considerada bioindicadora da qualidade do solo devido a sua atuação na formação e na estabilização de agregados e ciclagem de carbono e nutrientes, podendo atuar como dreno de nutrientes, por meio da imobilização, ou como fonte, por meio da mineralização (HATCH et al., 2000). Entretanto, essa imobilização é temporária, pois com a morte celular esses nutrientes são disponibilizados gradativamente às plantas.

O não revolvimento do solo é fator relevante para a manutenção da biomassa microbiana, que favorece a preservação das hifas fúngicas e maior presença de raízes, as quais aumentam a entrada de substratos orgânicos no sistema, via exsudatos radiculares. O somatório desses fatores favorece a biomassa microbiana em áreas nativas quando comparadas com áreas cultivadas (MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2003; NOGUEIRA et al., 2006).

Um dos métodos mais utilizados para se estimar a biomassa microbiana do solo é a técnica de fumigação-extração, proposta por Vance, Brookes e Jenkinson (1987), que envolve a lise das células microbianas do solo pelo clorofórmio e quantificação do carbono e do nitrogênio liberados após extração.

O método de fumigação-extração para a determinação da biomassa microbiana de carbono é recomendado para os solos brasileiros pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo desde 2004 (ROSCOE et al., 2006). Entretanto, a determinação da biomassa microbiana fornece apenas uma análise quantitativa, pois não discrimina a composição ou estrutura da microbiota do solo.

É importante agregar informações sobre a atividade e a diversidade da biomassa microbiana, permitindo uma avaliação mais adequada da qualidade de um solo (ZILLI et al. 2003; ARAUJO; SANTOS; MONTEIRO, 2008). Em conjunto, essas análises poderiam revelar se a perda de biomassa microbiana também reflete em perda de diversidade genética ou funcional (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010).

4.4.1.3 Quociente metabólico ($q\text{CO}_2$)

Esse índice, proposto por Anderson e Domsch (1985), é a razão entre a respiração basal do solo e o carbono da biomassa microbiana, e revela a sua eficiência em utilizar o carbono disponível para a biossíntese pela proporção entre a produção de CO_2 em relação ao C imobilizado na biomassa microbiana.

Klumpp et al. (2003) recomendam a utilização do $q\text{CO}_2$ como indicador do impacto da poluição por metais em solos. Segundo os autores, esse parâmetro apresenta correlação negativa e significativa com as áreas impactadas. Desse modo, quanto menor esse valor, menos C é perdido como CO_2 pela respiração, e maior a eficiência da comunidade microbiana em manter a sua biomassa. Condições desfavoráveis (por exemplo, excesso de metais pesados, limitações de nutrientes, baixo pH) e perturbações (cultivo, queimada) reduzem a eficiência microbiana (WARDLE; HUNGRIA, 1994; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). Em geral, um baixo $q\text{CO}_2$ reflete um ambiente estável ou próximo do seu estado de equilíbrio; ao contrário, valores elevados são indicativos de ecossistemas submetidos a alguma condição de estresse ou de distúrbio (SAKAMOTO; OBO, 1994).

Além de indicar que a comunidade microbiana se encontra em condição de estresse metabólico, altos valores de $q\text{CO}_2$ também podem indicar a disponibilidade de substratos orgânicos de fácil degradação (ANDERSON; DOMSCH, 1993). Sendo assim, a interpretação do $q\text{CO}_2$ deve ser cautelosa e integrada com os dados de atividade enzimática que reflitam o estado metabólico dos microrganismos do solo, como a desidrogenase.

4.4.2 Indicadores Bioquímicos

As enzimas são mediadoras de importantes processos bioquímicos como a mineralização e ciclagem de carbono e nutrientes, a formação e decomposição da matéria orgânica do solo, além de degradação de substâncias xenobióticas como os pesticidas. A atividade enzimática é sensível às mudanças no manejo dos solos e assim pode antecipar mudanças em sua qualidade, com maior antecedência do que indicadores químicos e físicos (MATSUOKA; MENDES;

LOUREIRO, 2003; ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2007), e, também, ser utilizada como indicadora de diversidade funcional microbiana (NAYAK; BABU; ADHYA, 2007).

Algumas características devem ser observadas na escolha de atividades enzimáticas como indicadores de qualidade do solo, dando preferência às que apresentam maior sensibilidade ao manejo, simplicidade na análise, importância na ciclagem de nutrientes e na decomposição da matéria orgânica. Algumas das enzimas mais comumente utilizadas são aquelas ligadas ao ciclo do carbono, nitrogênio e fósforo (TABATABAI, 1994).

Os microrganismos representam as principais fontes de enzimas do solo. As exoenzimas podem, mesmo após a lise celular, continuarem ativas no solo, adsorvidas aos colóides minerais ou imobilizadas em complexos húmicos (BADIANE et al., 2001; NADEAU et al., 2007).

A enzima desidrogenase tem atividade intracelular e é utilizada como indicadora da atividade microbiológica no solo, sendo responsável por reações de transferência de energia através da cadeia transportadora de elétrons (BASTIDA et al., 2006), refletindo assim a atividade oxidativa da biomassa microbiana. Por ser intracelular e permanecer ativa apenas em células viáveis (TRIPATHI et al., 2007), serve como indicadora de atividade microbiana total.

Enzimas como a celulase, relacionada ao ciclo do carbono, atuam na hidrólise de celulose aos seus monômeros que são fontes importantes de energia e carbono para os microrganismos. Diferentes coberturas vegetais, com resíduos qualitativamente distintos (relação C/N, teor de celulose, teor de lignina, presença de resinas, monoterpenos, taninos), podem influenciar na atividade de celulases no solo. A atividade desta enzima pode variar tanto com a época do ano quanto com a qualidade da fonte de celulose. Isso indica que sua atividade depende da qualidade do substrato sobre o qual atua (DOYLE et al., 2006).

A glutaminase atua no ciclo do nitrogênio catalisando a hidrólise de L-glutamina, produzindo ácido L-glutâmico e NH_3 . Essa e outras enzimas são responsáveis pela mineralização do nitrogênio orgânico, disponibilizando-o para plantas e microrganismos na forma de NH_4^+ (VICTORIA; PICCOLO; VARGAS, 1992).

Enzimas relacionadas ao ciclo do fósforo, como as fosfatases, hidrolisam formas orgânicas de fósforo, liberando formas minerais para plantas e microrganismos. A fosfatase ácida, produzida tanto por microrganismos quanto por

plantas, é assim classificada devido ao seu pH ótimo ser 6,5. Dentre outros fatores, o pH é um importante fator que influencia a atividade enzimática do solo.

Os resultados obtidos por Balota et al. (2004) demonstram que a atividade enzimática é um indicador sensível de alterações na qualidade do solo, pois desempenham funções essenciais nos ecossistemas.

4.4.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Essa técnica é usada para separar fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com sequência de bases nucleotídicas diferentes (XAVIER et al., 2004). A vantagem do DGGE e de outros métodos independentes de cultivo microbiano reside na capacidade de detectar microrganismos que não conseguem se desenvolver quando se utilizam técnicas tradicionais de plaqueamento em meio de cultura. Entretanto, da mesma forma que outros métodos, apresenta limitações intrínsecas. No DGGE pode haver subestimação da diversidade microbiana do solo, pois espécies dominantes podem sobressair, e podem ocorrer amplicons com mais de uma espécie se sequências diferentes com comportamento de desnaturação semelhante migrarem para posição idêntica no gel (MARRIEL et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2006). Portanto, não é possível estabelecer uma relação direta entre a quantidade de bandas detectadas por DGGE e o número de espécies presentes na amostra. Para a identificação das espécies, é necessário fazer a excisão do amplicon do gel, reamplificar o DNA e sequenciá-lo (MUYZER; SMALLA, 1998; LAMBAIS et al., 2005).

Para a técnica do DGGE, faz-se a extração de DNA total do solo e amplificação com iniciadores específicos da região que codifica o gene *16S rRNA* (bactérias) ou *18S rRNA* (fungos). Os fragmentos de DNA amplificados flanqueados por esses iniciadores são aplicados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante de uréia e formamida. Os fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, mas que apresentam diferentes sequências de ácidos nucleicos tem padrão de desnaturação diferente. Ao ser submetido à eletroforese em condições crescentes de desnaturação, os fragmentos de DNA permanecem em dupla fita, até que atinjam condições necessárias para a desnaturação. Em um dos iniciadores da reação em cadeia da polimerase (PCR) anexa-se um grampo CG de 30 a 50 nucleotídeos para formar uma ligação tripla forte, com alta resistência à desnaturação, que dificulta a

completa dissociação da fita dupla do DNA em fita simples. Esse grampo impede que a fita passe de helicoidal para desnaturada, e faz com que a migração da molécula no gel seja interrompida (SHEFFIELD et al., 1989; MUYZER; SMALLA, 1998).

Assim, teoricamente, cada banda no gel representa uma espécie ou um grupo de espécies de bactéria, e a imagem final do gel corresponderá a um padrão de “códigos de barra” referente à comunidade bacteriana do solo estudado (XAVIER et al., 2004).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS E PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM

As amostragens de solo foram feitas no município de Ponta Grossa, Paraná, nos dias 26 e 27 de janeiro (verão) e 19 e 20 de setembro (inverno) de 2011, com trado holandês nas profundidades 0-10, 10-20, 20-40 e 40-60 cm, nas entrelinhas das culturas.

Essa profundidade foi adotada porque, para a cultura da soja, cerca de 50-65% do sistema radicular é distribuído nos primeiros 10 cm, 95% na camada 0-40 cm e quase não há raízes abaixo de 60 centímetros (BABUJIA et al., 2010).

Foram coletadas 4 amostras de solo (compostas por 12 subamostras) em 7 áreas, sendo uma sob fragmento florestal, usado como referência, e seis áreas agrícolas sob plantio direto com histórico de diferentes produtividades de grãos (Figura 1).

Figura 1 - Pontos de amostragem de solo em Ponta Grossa-PR:



Fonte: Imagem obtida do Google Earth

1-4 (BP1), 5-8 (AP1), 9-12 (BP2), 13-16 (AP2), 17-20 (FF), 21-24 (MP1), 25-28 (MP2). (A) Fazenda Santa Maria; (B) Fazenda Suruvi.. *BP* = baixa produtividade, *MP* = média produtividade, *AP* = alta produtividade e *FF* = fragmento florestal.

As áreas de amostragem foram denominadas BP (baixa produtividade), MP (média produtividade) e AP (alta produtividade), conforme dados de produtividade média dos talhões (Tabela 1), e critérios propostos por Molin (2002). As áreas com valores superiores a 105% da produtividade média da soja no Estado do Paraná (3360 kg ha^{-1}) constituíram a classe de alta produtividade. As áreas com 95% a 105% da média estadual constituíram a classe de média produtividade, e as áreas com menos de 95% da média estadual, a classe de baixa produtividade. O Paraná e a Bahia, na safra de soja 2010/2011, foram os Estados que apresentaram as maiores produtividades do país, com 3360 kg ha^{-1} (CONAB, 2011).

Na coleta de verão as áreas agrícolas estavam sob cultivo de soja (*Glycine max*), em estágio de R3 a R6 (início de formação de vagem a grão cheio); e na coleta de inverno, estavam sob cultivo de cevada (*Hordeum vulgare*) na área AP1; e aveia preta (*Avena stringosa*) nas demais áreas. As áreas amostradas são manejadas sob plantio direto com rotação de culturas e agricultura de precisão desde 2006. Cada ponto de amostragem foi georreferenciado com uso de GPS, e as amostras simples foram obtidas num raio de 30 metros (Tabela 1).

O solo foi homogeneizado, peneirado (4 mm) e armazenado a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização das análises: respiração basal do solo, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, e enzima desidrogenase. Nas amostras da camada 0-10 cm também foram avaliadas as atividades das enzimas celulase, glutaminase e fosfatase ácida, e a diversidade do domínio *Bacteria* por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) após amplificação do DNA por PCR; neste caso, as amostras foram mantidas a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração do DNA do solo. As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia de Solos da Embrapa Soja, em Londrina, Paraná.

As análises químicas e granulométricas do solo das áreas agrícolas foram realizadas em 2009 pelo Laboratório Interparter e os resultados gentilmente cedidos por Cássio de Oliveira Kossatz, engenheiro agrônomo responsável pelas fazendas onde foram realizadas as coletas de solo (Tabela 4). Também foram disponibilizados os dados de produtividade de soja da safra 2010/2011, e da rotação de culturas realizada nas fazendas de 2006 a 2011 (Tabela 1).

Tabela 1- Identificação dos pontos de amostragem de solo georreferenciados, produção de soja safra 2010/2011 e rotação de culturas adotada de 2006 a 2011.

N°	Denominação	Latitude S	Longitude W	Produtividade (kg ha ⁻¹)	Verão						Inverno					
					2011	2010	2009	2008	2007	2006	2011	2010	2009	2008	2007	2006
1	Área de baixa produtividade da Fazenda Santa Maria BP1	25° 16' 27.37"	50° 6' 7.45"	2977	Soja	Milho	Soja	Soja	Milho	Soja	Aveia (Formação de grãos)	Trigo	Aveia	Cevada	Trigo	Aveia
2		25° 16' 22.06"	50° 5' 57.14"													
3		25° 16' 17.45"	50° 5' 44.53"													
4		25° 16' 44.90"	50° 6' 3.94"													
5	Área de alta produtividade da Fazenda Santa Maria AP1	25° 16' 24.13"	50° 6' 6.43"	4405	Soja	Milho	Soja	Soja	Milho	Soja	Cevada (Formação de grãos)	Trigo	Aveia	Cevada	Trigo	Aveia
6		25° 16' 17.90"	50° 6' 6.78"													
7		25° 16' 10.54"	50° 6' 0.78"													
8		25° 16' 8.02"	50° 5' 53.05"													
9	Área de baixa produtividade da Fazenda Santa Maria BP2	25° 15' 29.90"	50° 6' 34.11"	2850	Soja	Milho	Soja	Milho	Soja	Milho	Aveia (Formação de grãos)	Trigo	Aveia	Trigo	Aveia	Trigo
10		25° 15' 24.31"	50° 6' 34.54"													
11		25° 15' 23.80"	50° 6' 48.87"													
12		25° 15' 20.62"	50° 6' 48.89"													
13	Área de alta produtividade da Fazenda Santa Maria AP2	25° 14' 56.13"	50° 7' 17.27"	3790	Soja	Soja	Milho	Soja	Soja	Milho	Aveia (Recém rolada)	Aveia	Trigo	Aveia	Aveia	Trigo
14		25° 14' 44.50"	50° 6' 43.72"													
15		25° 14' 42.86"	50° 6' 26.06"													
16		25° 14' 44.23"	50° 6' 41.22"													
17	Fragmentos florestais, Fazenda Santa Maria FF	25° 15' 24.76"	50° 7' 15.77"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18		25° 15' 57.29"	50° 7' 39.57"													
19		25° 16' 43.19"	50° 6' 39.92"													
20		25° 16' 44.87"	50° 6' 42.63"													
21	Área de média produtividade da Fazenda Suruvi MP1	25° 2' 29.24"	50° 24' 51.00"	3563	Soja	Milho	Soja	Milho	Soja	Milho	Aveia (Dessecada/ herbicida)	Trigo	Aveia	Trigo	Aveia	Trigo
22		25° 2' 27.61"	50° 24' 46.90"													
23		25° 2' 29.55"	50° 24' 54.22"													
24		25° 2' 24.31"	50° 24' 50.73"													
25	Área de média produtividade da Fazenda Suruvi MP2	25° 4' 3.77"	50° 24' 51.63"	3204	Soja	Milho	Soja	Milho	Soja	Milho	Aveia (Dessecada/ herbicida)	Trigo	Aveia	Trigo	Aveia	Trigo
26		25° 4' 0.00"	50° 24' 47.22"													
27		25° 3' 58.56"	50° 24' 44.98"													
28		25° 3' 53.14"	50° 24' 42.13"													

5.2 RESPIRAÇÃO BASAL (DESPRENDIMENTO DE CO₂)

A respiração basal (RB) foi avaliada incubando-se 50 g de solo de cada amostra com umidade ajustada a 60% da capacidade de retenção de água (CRA), em frascos hermeticamente fechados, contendo 10 mL de uma solução de NaOH 0,5 N em béquer para capturar o CO₂ liberado (ALEF, 1995). Após 7 dias, o NaOH remanescente foi quantificado pela titulação com HCl na mesma concentração, com auxílio do indicador fenolftaleína.

5.3 BIOMASSA MICROBIANA DE CARBONO E NITROGÊNIO

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi determinado pelo método da fumigação-extração modificado de Vance, Brookes e Jenkinson (1987); e o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) pelo método proposto por Brookes et al. (1985).

Foram pesadas duas subamostras de solo de 20 g, com umidade ajustada a 60% da CRA, em frasco de vidro, sendo que uma delas foi fumigada com clorofórmio por 24 horas e a outra não sofreu fumigação. Ambas subamostras foram submetidas à extração do carbono e nitrogênio com 50 mL de K₂SO₄ (0,5 mol L⁻¹) após agitação por uma hora, e posterior centrifugação por 10 minutos a 2500 rpm.

O carbono da biomassa microbiana foi estimado por meio de reações colorimétricas pela oxidação do carbono orgânico com uma solução de permanganato de potássio em meio ácido e leitura em espectrofotômetro a 495 nm (BARTLETT; ROSS, 1988).

O nitrogênio da biomassa microbiana foi determinado por uma reação colorimétrica após a digestão sulfúrica de uma alíquota do extrato e leitura em espectrofotômetro a 630 nm. Os compostos orgânicos de N, quando digeridos com H₂SO₄ são convertidos em NH₄⁺, que ao reagirem com hipoclorito de sódio e fenol, em meio alcalino, formam uma solução de coloração azul, “azul de indofenol” (FEIJE; ANGER, 1972).

A biomassa microbiana de C e N foi estimada com base na diferença entre os teores de C e N presentes no extrato da amostra fumigada e da amostra não fumigada, usando como fatores de correção K_C e K_N de 0,33 e 0,54, respectivamente (SPARLING; WEST, 1988; BROOKES et al., 1985).

A razão entre a respiração microbiana diária e a biomassa microbiana de C forneceu a taxa de respiração específica (coeficiente metabólico ou q_{CO_2}) (ANDERSON; DOMSCH, 1993).

5.4 DESIDROGENASE

Na avaliação da atividade da desidrogenase (CASIDA; KLEIN; SANTORO, 1964) foi utilizada uma solução 1,5% de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) como substrato aceptor de elétrons, na proporção 1:1 (v/m) com a amostra de solo em umidade de campo, sendo que o composto reduzido, trifetil tetrazólio formazana (TTF), apresenta coloração avermelhada. Após incubação a 37 °C por 24 h realizou-se extração com metanol, e o extrato foi lido em espectrofotômetro a 485 nm. A atividade enzimática foi calculada com o auxílio da curva-padrão construída com TTF e expressa em μg de TTF $\text{g}^{-1} \text{dia}^{-1}$.

5.5 CELULASE

A atividade da celulase foi avaliada pela incubação de 5 g da amostra em 15 mL de tampão acetato pH 5,5 na presença de 15 mL de uma solução de carboximetil celulose 0,7%. Os açúcares redutores (AR) produzidos pela hidrólise enzimática foram quantificados em espectrofotômetro a 690 nm (SCHINNER; VON MERSI, 1990). A atividade foi calculada com o auxílio de uma reta-padrão de glicose monohidratada (28 mg L^{-1}) e expressa em μg de AR g^{-1} . Por esse método, endoglucanase e β -glucosidase podem ser estimadas, exceção para exoglucanase.

5.6 GLUTAMINASE

A glutaminase catalisa a hidrólise da L-glutamina, produzindo ácido L-glutâmico e amônia. A atividade da glutaminase foi determinada em tampão THAM 0,1 M pH 10, na presença do substrato L-glutamina (0,5 M). Nove mL do tampão e 1 mL do substrato foram incubados a 37 °C por 2 h com 1 g de amostra. A quantidade de amônia liberada na reação foi determinada por destilação a vapor com MgO e posterior titulação com ácido sulfúrico (FRANKENBERGER JR; TABATABAI, 1991).

5.7 FOSFATASE ÁCIDA

A atividade da fosfatase ácida foi avaliada com o uso de uma solução de *p*-nitrofenil fosfato (0,05 M) como substrato (TABATABAI; BREMNER, 1969). As amostras (0,25 g de solo) foram incubadas a 37°C por 30 minutos em tampão MUB pH 6,5 (2,4 g de Tris hidroximetil aminometano, 2,3 g de ácido maleico, 2,8 g de ácido cítrico em 1,3 g de ácido bórico em 98 mL de NaOH 1 N e completou-se a solução para volume final de 200 mL com água destilada, ajustou-se o pH e completou-se a solução para volume final de 1 L com água destilada) com 1 mL do substrato. Após paralisação da reação com 1 mL CaCl₂ 0,5 M e 4 mL de NaOH 0,5 M, a mistura foi filtrada, o *p*-nitrofenol foi quantificado pela leitura em espectrofotômetro a 420 nm. Os resultados foram expressos em µg *p*-nitrofenol g⁻¹.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS MICROBIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

A análise multivariada DCA (detrended correspondence analysis) do conjunto de dados apresentou comprimento de gradiente menor que 3, indicando que os dados são lineares, e portanto, a aplicação da análise de redundância (RDA) e/ou análise de componentes principais (ACP), que são as mais adequadas para descrever o conjunto de dados.

A RDA foi utilizada para verificar quais atributos químicos e granulométricos do solo, na profundidade 0-10 cm, foram significativos ($P < 0,05$) e não redundantes (fator de inflação menor que 20) para explicar a variação dos atributos microbiológicos entre as áreas. As variáveis químicas e granulométricas do solo foram consideradas “variáveis explicativas” para o conjunto de variáveis microbiológicas. O teste de permutações de Monte Carlo revelou quais variáveis explicativas foram significativas, ou seja, que contribuíram para explicar a atividade microbiana no solo ($P < 0,01$).

Com os resultados da RDA, na profundidade 0-10 cm, foi realizada a ACP com todas as variáveis microbiológicas avaliadas, e também com as variáveis químicas e granulométricas do solo consideradas significativas e não redundantes selecionadas.

A análise de componentes principais (ACP) foi utilizada para

relacionar os bioindicadores com as áreas agrícolas com níveis de produtividade de grãos, utilizando o programa Canoco versão 4.5 (LEPS; SMILAUER, 2003). A ACP foi realizada por profundidade e época de amostragem, considerando-se a inclusão ou não dos dados da área de floresta nativa como referência.

A análise discriminante (AD) das áreas agrícolas, na profundidade 0-10 cm, foi realizada utilizando o programa Statistica 7 para verificar quais variáveis microbiológicas mais contribuem para discriminar as áreas sob plantio direto no verão e inverno, assim como verificar a distância entre os grupos, sendo consideradas significativas as diferenças a $P < 0,05$.

A análise de correlação simples de Pearson entre as variáveis microbiológicas, químicas e granulométricas do solo também foi realizada no programa Statistica 7.

A análise de correlação múltipla (stepwise) das áreas agrícolas, na profundidade 0-10 cm, foi realizada considerando as variáveis microbiológicas, químicas e granulométricas do solo, com o auxílio do programa SAS (versão 9.1), para verificar quais variáveis mais contribuem para explicar os níveis de produtividade de grãos de soja em áreas sob plantio direto.

5.9 ANÁLISE DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA

5.9.1 Extração do DNA Total do Solo

As quatro amostras de solo da profundidade 0-10 cm de cada área foram reunidas para extração do DNA com base no teste de homogeneidade de variâncias para os bioindicadores RB, BMC, BMN, qCO_2 , atividade das enzimas celulase e glutaminase, que demonstrou homogeneidade entre as repetições (BARBIN, 2003). A extração de DNA total do solo foi realizada com o “UltraClean Soil DNA Isolation Kit” (MOBIO, EUA) conforme especificações do fabricante. Para certificar a eficiência da extração de DNA, foi preparado um gel de agarose 1% em TBE 1X (10,8 g de Tris-base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA 0,5 M, pH 8, para cada litro de solução) e aplicados 3 μ L do DNA extraído com 3 μ L do tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol e 40 % de sacarose). A eletroforese foi conduzida a 75 V por 40 minutos. As bandas de DNA foram coradas em solução de brometo de etídio por 5 minutos e visualizadas sob luz UV.

5.9.2 Amplificações do Gene *16S rRNA*

A região do DNA que codifica para o gene *16S rRNA* foi amplificada com os oligonucleotídeos iniciadores fD1 (3' -AAGGAGGTGATCCAGC C-5') e rD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), descritos por Weisburg et al. (1991), gerando fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases (pb). Para isso, alíquotaram-se em microtubos 36,3 µL de água deionizada, 3,0 µL de dNTP (1,5 mM), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 5 µL de tampão 10 X (20 mM tris-HCl, pH 8,4), 1,5 µL do iniciador fD1 (10 pmoles/µL), 1,5 µL de do iniciador rD1 (10 pmoles/µL), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 1 µL do DNA extraído da amostra de solo. A primeira amplificação por PCR foi realizada usando os seguintes passos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos; 15 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos; 93 °C por 45 segundos; anelamento dos iniciadores a 55 °C por 45 segundos; e extensão a 72 °C por 2 minutos. Após o término dos ciclos os tubos permaneceram a 4°C até serem retirados do termociclador.

Na segunda etapa, os produtos de PCR obtidos foram amplificados com os iniciadores F (5'-GCCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACG GGGGGAACGCGAAGAACCTTC-3') e R (5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3'), um dos quais contém o grampo CG, e que amplificam uma região menor de aproximadamente 433 pb do gene *16S rRNA* (NUBEL et al., 1996). A PCR foi realizada com a seguinte composição: 12,7 µL de água deionizada, 5,0 µL de dNTP (1,5 mM), 1,3 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,5 µL de tampão 10 X, 1,0 µL do iniciador F (10 pmoles), 1,0 µL do iniciador R (10 pmoles), 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 1 µL do produto obtido na primeira reação com os iniciadores fD1 e rD1. A amplificação se deu através dos seguintes passos: 94°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 1 min, 60°C por 2 min, 72°C por 2 min (2 ciclos); 94°C por 1 min, 59°C por 2 min, 72°C por 2 min (2 ciclos); e assim por diante, e ciclos de 2 vezes, até que foram atingidos 55°C, temperatura de anelamento dos iniciadores visando diminuir a probabilidade de formação de anelamentos inespecíficos. Os tubos permaneceram a 4 °C até serem retirados do termociclador. Os produtos de PCR tiveram sua pureza confirmada por eletroforese em gel de agarose (1% em TBE 1X, utilizando 1 Kb Plus DNA Ladder, corados com brometo de etídio por 5 minutos e visualizados sob luz UV), e então, submetidos à análise de DGGE.

5.9.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

O preparo de gel foi realizado conforme metodologia descrita por Myers, Maniatis e Lerman (1987), em que são preparadas duas soluções: uma desnaturante, chamada “solução 100%”, contendo uréia 7 M e formamida a 40%, e outra, chamada “solução 0%”, sem qualquer agente desnaturante. Preparou-se um gel de poliacrilamida a 6%, com gradiente desnaturante entre 35% e 55% (uréia-formamida) formado a partir das soluções 100% e 0%. Ao gel, foram aplicados 20 µL do produto da segunda PCR e 20 µL do tampão de carregamento (2% azul de bromofenol, 2% xileno cianol, glicerol 100% e água deionizada). A eletroforese foi realizada em um sistema vertical DCode (BioRad), com tampão 0,5 X de TAE (70 mL de TAE 50X em 6930 mL água destilada), 85 V a 60°C, por 16 h. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 5 min, e visualizado sob luz UV.

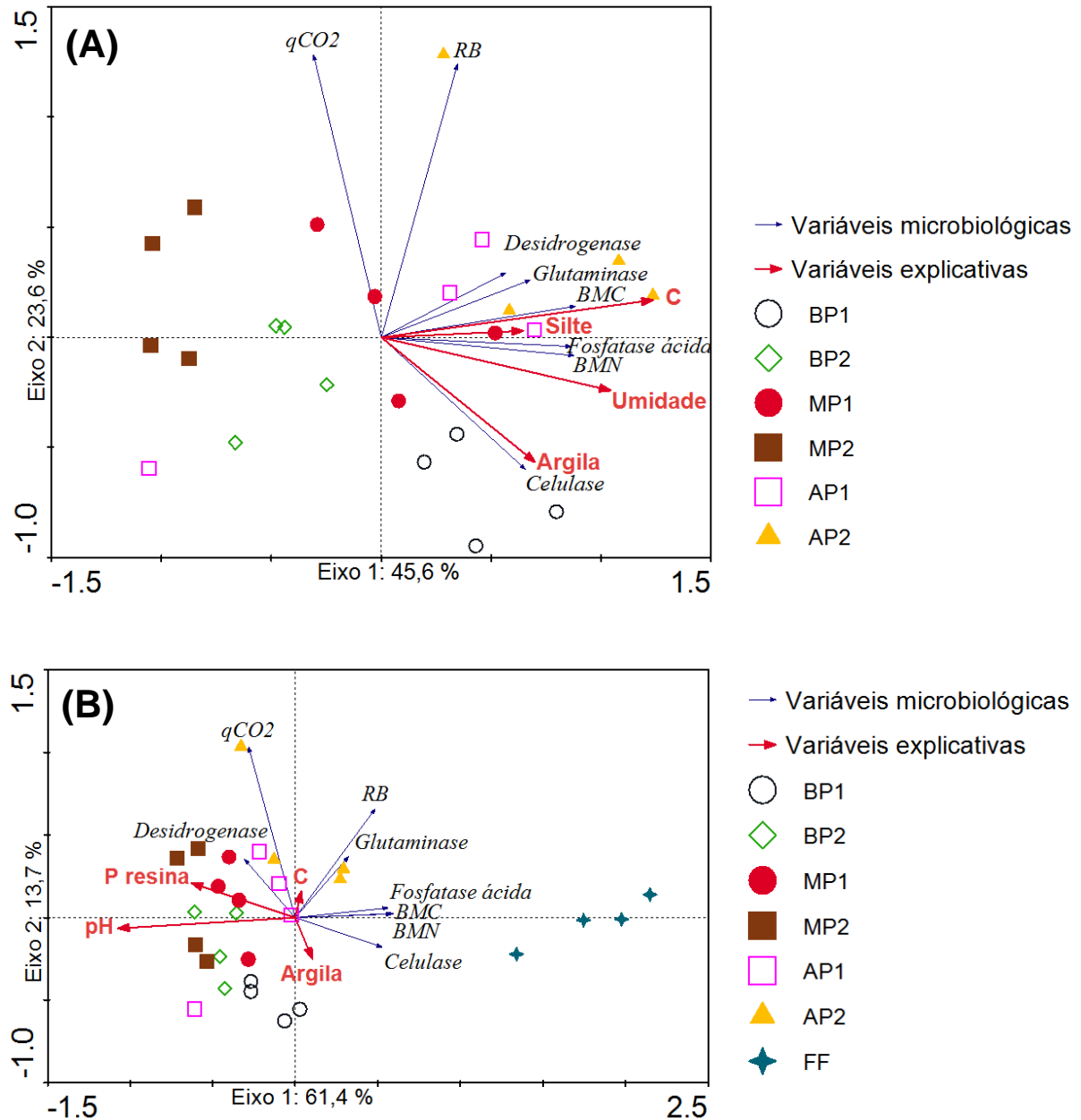
A imagem do gel de DGGE foi analisada pelo programa Bionumerics (versão 4.6), com algoritmo UPGMA, coeficiente de Jaccard e índice de tolerância de 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ACP indicou que na profundidade 0-10 cm da amostragem de verão (Figura 2A), considerando apenas as áreas agrícolas com níveis de produtividade, essas foram separadas no plano fatorial, sendo que aquelas com alta produtividade foram relacionadas à maior RB, BMC, BMN, e atividades da desidrogenase, glutaminase e fosfatase ácida. Essas variáveis estiveram associadas ao maior teor de C, silte e umidade, fatores que favorecem maior atividade microbiana e ciclagem de C e nutrientes. Similarmente, Balota et al. (2004) encontraram alta correlação entre a BMC e atividade da fosfatase ácida ($r = 0,79$), o que demonstra que a maior atividade enzimática está associada à maior quantidade de microrganismos, os quais são a principal fonte de enzimas do solo. Uma das áreas de baixa produtividade (BP1) foi altamente relacionada à atividade da enzima celulase, e também ao teor de argila como variável explicativa (Figura 2A). A maior atividade da celulase nessa área pode ser devida à proteção dessa enzima da ação de proteases através da adsorção em partículas de argila.

Ao incluir os dados obtidos do fragmento florestal à ACP (Figura 2B), as variáveis que mais se relacionaram com a área nativa foram BMC, BMN, atividade da celulase e fosfatase ácida; provavelmente devido à maior diversidade vegetal e, principalmente, qualidade de resíduos orgânicos ao solo via serrapilheira e exsudação radicular. Nesse caso, as áreas sob plantio direto apresentaram menor acidez e maior teor de P no solo em relação à área de mata nativa, o que é consequência das práticas de adubação e calagem. As áreas agrícolas também foram ligeiramente separadas em agrupamentos de alta, média e baixa produtividade de grãos, sendo que as áreas com alta produtividade se relacionaram com a atividade da desidrogenase e qCO_2 , sugerindo estresse à comunidade microbiana em comparação à área referência. Entretanto, essa separação não foi tão clara quando comparada à PCA sem considerar os resultados do fragmento florestal (Figura 2A). Duas amostras de área de alta produtividade (AP2) foram altamente relacionadas à atividade da enzima glutaminase e à RB, sugerindo maior disponibilidade de N pela mineralização do N orgânico e maior atividade biológica, respectivamente.

Figura 2 - Análise de componentes principais (ACP) baseada em variáveis microbiológicas e variáveis explicativas de áreas cultivadas com soja no verão, sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos.



Profundidade 0-10 cm da amostragem de verão. RB = respiração basal, BMC = biomassa microbiana de carbono, BMN = biomassa microbiana de nitrogênio, qCO_2 = quociente metabólico. (A) apenas áreas agrícolas; (B) considerando um fragmento florestal (FF) na análise.

Na ACP da profundidade de 0-10 cm da amostragem de inverno (Figura 3A), as áreas de alta produtividade foram separadas das demais áreas agrícolas e se relacionaram à RB, atividade da desidrogenase, fosfatase ácida e, em menor grau, à atividade da glutaminase, assim como observado na amostragem de verão. Entretanto, a BMC e BMN estiveram mais relacionadas à área de baixa produtividade (BP1), que no verão já estava também relacionada à maior atividade da celulase.

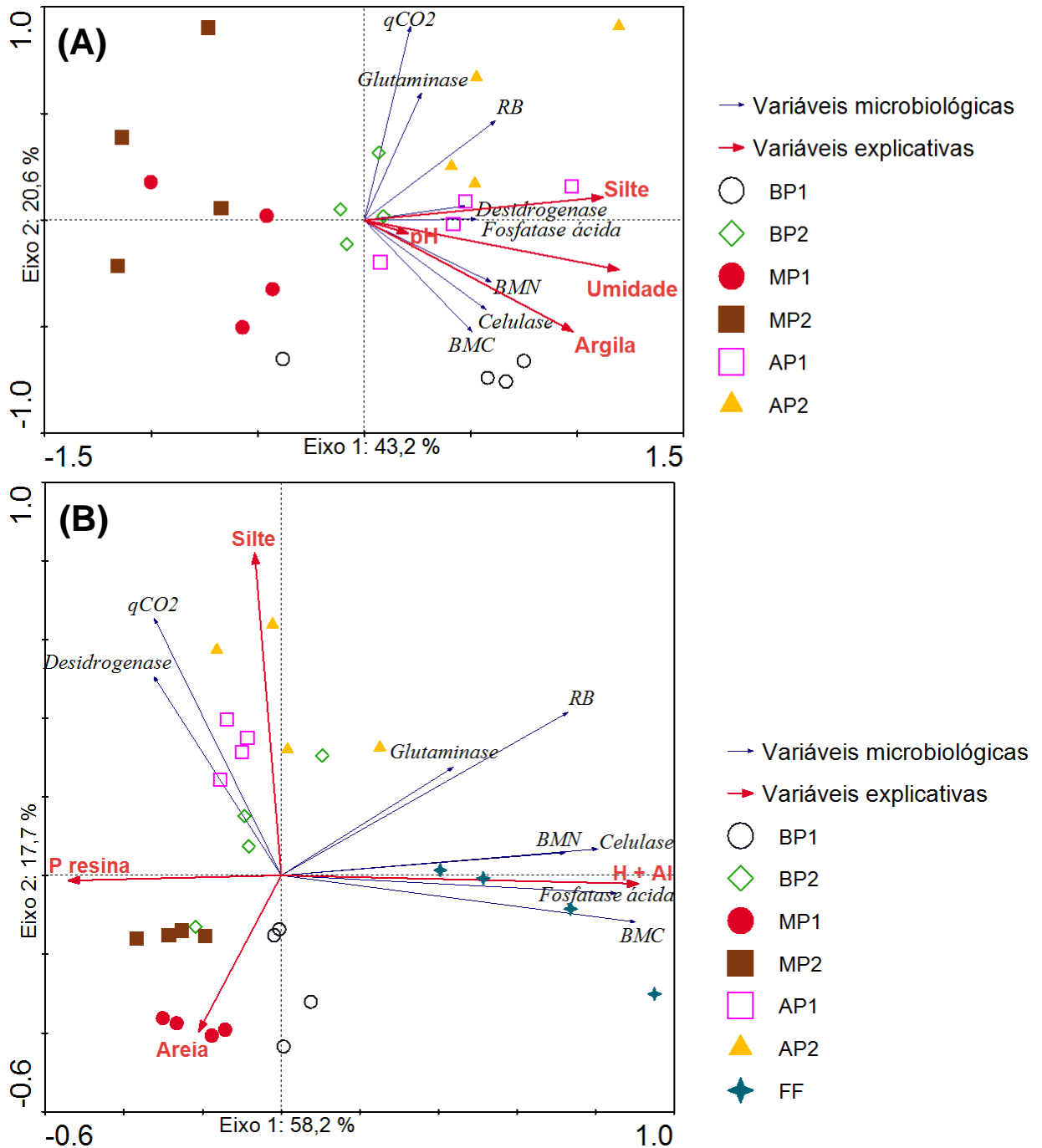
Em todas as profundidades avaliadas na amostragem de inverno, as duas áreas pertencentes à Fazenda 2 (MP1 e MP2) ficaram agrupadas (dados não apresentados). Essas áreas se encontravam sob cultivo de aveia preta que já havia sido dessecada com herbicida para a instalação da cultura de soja e se relacionaram negativamente com os bioindicadores avaliados (Figura 3A).

Ao incluir os dados obtidos do fragmento florestal à ACP (Figura 3B), os bioindicadores avaliados forneceram respostas semelhantes às da amostragem de verão para mata nativa, a qual se manteve relacionada à maior BMC, BMN, atividade da celulase e fosfatase ácida; e para as áreas de alta produtividade de soja, que se mantiveram relacionadas à atividade da desidrogenase e qCO_2 , e em menor intensidade, à atividade da glutaminase.

No entanto, na amostragem de inverno (Figura 3B), as áreas de baixa produtividade assumiram posição intermediária no plano fatorial em relação às áreas de alta e média produtividade, o que sugere um efeito negativo, na comunidade microbiana, da dessecação da cultura de cobertura por herbicida nas áreas MP1 e MP2 (Tabela 1). A área de mata nativa também foi relacionada à maior acidez potencial do solo (H+Al), enquanto que as áreas de alta produtividade foram relacionadas ao teor de silte, e as áreas de média produtividade foram relacionadas ao teor de areia e inversamente relacionadas à respiração basal, atividade de celulase, glutaminase, fosfatase ácida e à BMC e BMN.

Kaschuk, Alberton e Hungria (2010) reuniram resultados de vários estudos sobre os efeitos de herbicidas aplicados em diversas culturas e tipos de solos após períodos de incubação que variaram de 2 semanas a 2 meses, e mostraram que os herbicidas comprometeram a BMC e atividade microbiana. Na maioria das vezes houve diminuição da eficiência no uso de fontes de C no solo, resultando em maiores valores de qCO_2 .

Figura 3 - Análise de componentes principais (ACP) baseada em variáveis microbiológicas e variáveis explicativas de áreas cultivadas com soja no verão, sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos.



Profundidade 0-10 cm da amostragem de inverno. RB = respiração basal, BMC = biomassa microbiana de carbono, BMN = biomassa microbiana de nitrogênio, qCO_2 = quociente metabólico. (A) apenas áreas agrícolas; (B) considerando um fragmento florestal (FF) na análise.

Esses comportamentos podem estar relacionados à condição adversa encontrada nas áreas da Fazenda 2 na amostragem de inverno, visto que a comunidade microbiana já não dispunha das entradas constantes de C orgânico de fácil degradação proveniente da exsudação radicular.

A atividade da fosfatase ácida no solo proveniente do fragmento florestal, na amostragem de verão, foi elevada ($1453 \mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1}$ de solo), o que correspondeu ao dobro da atividade encontrada nos solos agrícolas ($657 \mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1}$ de solo) (Tabela 2). Na coleta de inverno, a atividade no solo de mata ($751 \mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1}$ de solo) correspondeu a 2,6 vezes à do solo cultivado ($290 \mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1}$ de solo) (Tabela 3). Maior atividade da fosfatase ácida no solo de mata nativa em relação a áreas cultivadas sob plantio direto também foi encontrada por Conte, Anghinoni e Rheinheimer (2002) e Mendes et al. (2003), demonstrando a importância dessa enzima no fornecimento de P de origem orgânica às plantas em áreas naturais, condicionando o crescimento dos vegetais à ciclagem de P da serapilheira e da matéria orgânica do solo. Nesse processo, há sincronia entre a liberação de P dos resíduos orgânicos e a necessidade das plantas, reduzindo, dessa forma, a interferência da fração mineral do solo (CONTE; ANGHINONI; RHEINHEIMER, 2002).

Em solos cultivados, a adição de fertilizantes fosfatados solúveis poderia reduzir a atividade da fosfatase ácida, pela maior disponibilidade de fósforo inorgânico (CONTE; ANGHINONI; RHEINHEIMER, 2002), atuando como retroinibidor da atividade enzimática. Entretanto, além da aplicação localizada dos fertilizantes fosfatados que favorece sua concentração nos sulcos de semeadura, o fósforo é facilmente fixado nos colóides e óxidos de ferro e de alumínio do solo, o que reduz o seu efeito inibidor sobre a atividade da fosfatase (CONTE; ANGHINONI; RHEINHEIMER, 2002). Dessa forma, o fósforo orgânico proveniente da matéria orgânica do solo pode ser disponibilizado às plantas pela atividade da fosfatase ácida, mesmo com adições de fertilizantes fosfatados ao solo. Isso demonstra que, mesmo em áreas cultivadas, os microrganismos e as exoenzimas produzidas têm seu papel na disponibilidade de fósforo às plantas.

Tabela 2 - Atributos microbiológicos e bioquímicos em áreas de cultivo de soja sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos, e em fragmento florestal (FF). **Amostragem de verão** em Ponta Grossa, PR. (n=4)

Área	Profundidade (cm)	Umidade (%)	Respiração basal (mg C-CO ₂ kg ⁻¹ d ⁻¹)	Biomassa microbiana (mg kg ⁻¹ solo)		qCO ₂ (mg C-CO ₂ g ⁻¹ C-BMC h ⁻¹)	Desidrogenase (µg TPF g ⁻¹) ^b	Celulase (µg AR g ⁻¹) ^c	Glutaminase (mg N kg ⁻¹)	Fosfatase ácida (µg PNP g ⁻¹) ^d
				C	N					
BP1	0-10	34.5 ± 1.9 ^a	16.2 ± 3.1 ^a	260.2 ± 36.8 ^a	51.9 ± 4.7 ^a	2.6 ± 0.4 ^a	11.8 ± 2.0 ^a	277.9 ± 40.4 ^a	814.8 ± 220.1 ^a	784.9 ± 46.6 ^a
	10-20	33.9 ± 1.6	15.9 ± 5.2	139.8 ± 28.2	28.6 ± 3.4	4.9 ± 1.8	5.1 ± 1.1	-	-	-
	20-40	39.8 ± 3.3	13.7 ± 6.6	71.6 ± 19.6	26.3 ± 5.8	7.9 ± 3.1	2.9 ± 0.9	-	-	-
	40-60	40.6 ± 2.9	22.6 ± 2.9	99.9 ± 19.1	14.7 ± 3.1	9.5 ± 1.2	1.8 ± 0.5	-	-	-
AP1	0-10	32.8 ± 0.6	28.5 ± 10.6	255.5 ± 75.9	48.2 ± 13.9	4.6 ± 0.8	10.4 ± 4.3	262.4 ± 44.6	711.7 ± 155.4	650.0 ± 72.3
	10-20	32.3 ± 0.6	27.2 ± 8.9	204.3 ± 43.1	32.5 ± 17.2	5.5 ± 1.4	6.4 ± 2.8	-	-	-
	20-40	37.7 ± 0.5	27.4 ± 7.2	84.0 ± 4.1	21.2 ± 5.6	13.5 ± 3.4	2.7 ± 1.4	-	-	-
	40-60	39.4 ± 1.1	16.6 ± 3.7	44.4 ± 38.4	6.8 ± 1.1	28.0 ± 20.1	1.4 ± 0.4	-	-	-
BP2	0-10	25.9 ± 2.6	25.1 ± 4.4	217.2 ± 27.6	42.6 ± 6.0	4.8 ± 0.8	8.6 ± 4.4	279.4 ± 35.8	315.9 ± 63.8	540.1 ± 60.1
	10-20	27.6 ± 1.7	22.4 ± 7.8	162.2 ± 36.0	23.2 ± 6.8	5.9 ± 2.0	3.0 ± 2.4	-	-	-
	20-40	31.0 ± 2.6	20.0 ± 5.6	72.7 ± 13.5	22.1 ± 2.1	11.4 ± 1.4	4.2 ± 3.5	-	-	-
	40-60	31.7 ± 2.1	24.6 ± 3.7	71.3 ± 7.1	11.5 ± 1.1	14.6 ± 3.2	1.9 ± 1.5	-	-	-
AP2	0-10	34.5 ± 0.9	36.6 ± 8.6	290.7 ± 67.8	59.4 ± 14.1	5.4 ± 1.4	12.2 ± 3.8	262.4 ± 62.1	1107.1 ± 249.1	799.1 ± 25.1
	10-20	34.1 ± 1.6	24.2 ± 2.6	121.9 ± 3.5	26.3 ± 3.2	8.3 ± 1.1	3.5 ± 0.8	-	-	-
	20-40	37.8 ± 2.6	24.5 ± 4.1	118.0 ± 28.4	26.4 ± 7.4	9.1 ± 3.1	1.2 ± 0.3	-	-	-
	40-60	38.9 ± 2.4	19.8 ± 3.6	68.6 ± 9.9	16.4 ± 3.9	12.1 ± 1.6	1.4 ± 0.6	-	-	-
MP1	0-10	20.8 ± 2.4	26.1 ± 3.9	236.5 ± 18.7	49.4 ± 10.7	4.6 ± 1.0	13.8 ± 5.6	207.8 ± 33.0	750.8 ± 138.6	679.1 ± 67.3
	10-20	20.2 ± 2.4	19.9 ± 7.4	118.4 ± 16.3	20.1 ± 3.5	7.2 ± 2.9	3.5 ± 1.2	-	-	-
	20-40	20.8 ± 0.7	19.4 ± 8.0	99.4 ± 24.0	15.4 ± 3.8	8.5 ± 4.1	1.9 ± 1.4	-	-	-
	40-60	21.2 ± 2.0	12.5 ± 2.4	67.8 ± 3.9	6.8 ± 2.8	7.7 ± 1.4	0.7 ± 0.2	-	-	-
MP2	0-10	16.9 ± 0.9	24.2 ± 3.2	189.8 ± 27.0	30.5 ± 5.6	5.4 ± 1.1	6.4 ± 1.6	144.6 ± 18.9	683.6 ± 157.1	489.8 ± 37.0
	10-20	17.0 ± 0.9	18.6 ± 5.5	92.8 ± 26.6	13.7 ± 1.9	8.4 ± 1.4	2.7 ± 0.7	-	-	-
	20-40	19.0 ± 1.2	24.4 ± 5.6	67.9 ± 8.9	8.0 ± 2.6	15.0 ± 2.8	1.8 ± 1.2	-	-	-
	40-60	18.9 ± 1.9	27.1 ± 8.6	58.0 ± 18.7	9.1 ± 0.6	19.7 ± 3.9	1.1 ± 0.9	-	-	-
FF	0-10	29.5 ± 6.6	54.4 ± 7.5	729.2 ± 26.9	136.2 ± 30.4	3.1 ± 0.3	2.4 ± 0.6	536.0 ± 143.8	1019.2 ± 315.3	1452.9 ± 376.4
	10-20	28.8 ± 6.7	39.5 ± 4.9	415.7 ± 114.8	68.8 ± 14.5	4.2 ± 1.2	1.6 ± 0.6	-	-	-
	20-40	29.0 ± 7.4	30.0 ± 12.6	218.1 ± 72.2	43.8 ± 6.5	5.8 ± 2.3	1.6 ± 0.8	-	-	-
	40-60	26.5 ± 6.9	31.8 ± 3.0	128.0 ± 14.5	20.1 ± 2.6	10.4 ± 0.4	0.7 ± 0.5	-	-	-

^a Média ± desvio padrão

^b TPF: 2,3,5-trifenil formazan

^c AR: açúcares redutores

^d PNP: *p*-nitrofenol

Tabela 3 - Atributos microbiológicos e bioquímicos em áreas de cultivo de soja sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos, e em fragmento florestal (FF). **Amostragem de inverno** em Ponta Grossa, PR. (n=4)

Área	Profundidade (cm)	Umidade (%)	Respiração basal (mg C-CO ₂ kg ⁻¹ d ⁻¹)	Biomassa microbiana (mg kg ⁻¹ solo)		qCO ₂ (mg C-CO ₂ g ⁻¹ C-BMC h ⁻¹)	Desidrogenase (µg TPF g ⁻¹) ^b	Celulase (µg AR g ⁻¹) ^c	Glutaminase (mg N kg ⁻¹)	Fosfatase ácida (µg PNP g ⁻¹) ^d
				C	N					
BP1	0-10	36.7 ± 1.1 ^a	7.7 ± 1.0 ^a	295.5 ± 36.0 ^a	57.8 ± 18.8 ^a	1.1 ± 0.1 ^a	11.7 ± 3.8 ^a	449.5 ± 69.7 ^a	510.6 ± 200.6 ^a	280.2 ± 61.8 ^a
	10-20	34.7 ± 0.5	7.1 ± 1.8	143.8 ± 56.4	45.6 ± 10.8	2.2 ± 0.8	6.3 ± 3.7	-	-	-
	20-40	39.3 ± 1.4	4.6 ± 0.5	170.0 ± 68.6	33.4 ± 11.8	1.3 ± 0.6	1.6 ± 0.3	-	-	-
	40-60	40.4 ± 1.7	4.6 ± 0.6	74.1 ± 27.7	22.0 ± 9.0	3.0 ± 1.5	0.9 ± 0.1	-	-	-
AP1	0-10	37.0 ± 1.3	9.0 ± 1.3	185.1 ± 12.8	60.3 ± 16.6	2.0 ± 0.2	13.2 ± 4.2	428.9 ± 26.6	588.3 ± 206.4	321.3 ± 40.4
	10-20	35.9 ± 1.9	5.6 ± 0.2	107.7 ± 32.4	27.8 ± 13.7	2.3 ± 0.6	4.0 ± 0.7	-	-	-
	20-40	39.0 ± 0.4	4.0 ± 0.2	108.3 ± 32.1	10.7 ± 2.2	1.7 ± 0.6	1.3 ± 0.2	-	-	-
	40-60	40.9 ± 1.0	6.1 ± 1.1	53.6 ± 4.9	13.9 ± 5.8	4.7 ± 0.4	0.8 ± 0.1	-	-	-
BP2	0-10	31.6 ± 3.2	8.4 ± 0.2	193.9 ± 16.1	32.6 ± 10.1	1.8 ± 0.1	11.4 ± 6.7	385.2 ± 83.6	629.7 ± 236.8	274.4 ± 7.9
	10-20	29.9 ± 3.7	5.3 ± 1.4	129.6 ± 30.5	27.8 ± 9.5	1.7 ± 0.4	3.2 ± 1.9	-	-	-
	20-40	31.5 ± 1.7	4.4 ± 1.6	101.7 ± 29.5	14.9 ± 1.6	1.8 ± 0.7	1.5 ± 0.8	-	-	-
	40-60	33.3 ± 1.7	4.7 ± 0.6	69.6 ± 11.9	15.7 ± 4.1	2.9 ± 0.9	0.6 ± 0.2	-	-	-
AP2	0-10	36.7 ± 2.0	12.5 ± 4.6	225.5 ± 36.7	42.6 ± 7.0	2.3 ± 0.5	15.5 ± 1.8	341.0 ± 22.7	871.0 ± 182.2	332.4 ± 20.4
	10-20	34.2 ± 0.5	6.2 ± 2.0	159.9 ± 22.4	29.5 ± 4.6	1.7 ± 0.7	6.0 ± 1.8	-	-	-
	20-40	38.0 ± 1.1	4.7 ± 0.9	174.4 ± 36.7	27.5 ± 6.3	1.2 ± 0.2	2.1 ± 0.1	-	-	-
	40-60	37.8 ± 1.4	4.7 ± 0.8	139.8 ± 30.4	18.0 ± 5.2	1.5 ± 0.4	0.9 ± 0.2	-	-	-
MP1	0-10	22.9 ± 1.9	4.0 ± 0.7	168.8 ± 40.4	26.8 ± 7.3	1.0 ± 0.2	9.2 ± 1.4	218.1 ± 36.6	608.3 ± 213.3	304.4 ± 48.4
	10-20	20.4 ± 2.3	1.9 ± 0.0	66.2 ± 14.4	14.7 ± 1.2	1.2 ± 0.3	4.2 ± 0.5	-	-	-
	20-40	21.3 ± 3.2	2.3 ± 0.6	89.0 ± 26.4	12.8 ± 3.3	1.2 ± 0.5	1.9 ± 0.5	-	-	-
	40-60	21.2 ± 3.4	2.2 ± 1.0	42.6 ± 10.5	13.2 ± 2.1	2.3 ± 1.4	0.9 ± 0.2	-	-	-
MP2	0-10	19.3 ± 1.1	4.8 ± 1.2	118.8 ± 38.8	23.2 ± 7.5	1.9 ± 1.0	7.1 ± 1.0	224.5 ± 21.4	567.5 ± 267.7	222.2 ± 16.5
	10-20	20.1 ± 6.1	2.1 ± 0.7	51.6 ± 12.8	13.3 ± 0.3	1.7 ± 0.6	3.2 ± 0.5	-	-	-
	20-40	18.4 ± 1.8	1.7 ± 0.9	48.4 ± 12.5	13.9 ± 2.7	1.4 ± 0.6	2.2 ± 0.2	-	-	-
	40-60	19.5 ± 1.2	2.9 ± 0.1	30.4 ± 16.8	10.3 ± 3.8	4.8 ± 2.2	0.8 ± 0.1	-	-	-
FF	0-10	34.5 ± 11.3	16.5 ± 1.9	647.2 ± 152.4	90.2 ± 30.4	1.1 ± 0.2	3.2 ± 1.1	755.0 ± 79.4	933.2 ± 272.7	751.1 ± 174.9
	10-20	31.8 ± 9.5	10.5 ± 2.2	480.8 ± 39.0	72.0 ± 19.2	0.9 ± 0.1	1.9 ± 0.8	-	-	-
	20-40	31.5 ± 8.4	6.0 ± 1.1	244.7 ± 18.5	46.9 ± 9.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.5	-	-	-
	40-60	30.2 ± 8.4	4.1 ± 0.9	138.4 ± 28.1	21.1 ± 7.0	1.3 ± 0.5	1.0 ± 0.7	-	-	-

^a Média ± desvio padrão

^b TPF: 2,3,5-trifenil formazan

^c AR: açúcares redutores

^d PNP: *p*-nitrofenol

Nas demais profundidades (10-20, 20-40 e 40-60 cm), a ACP, considerando os atributos microbiológicos, não apresentou uma relação clara com os níveis de produtividade de soja (dados não apresentados). Isso pode ser explicado porque, no sistema plantio direto, os restos culturais se depositam na superfície do solo e não há revolvimento para sua incorporação, o que diminui a taxa de decomposição da matéria orgânica do solo, favorecendo sua manutenção e acúmulo (ROSCOE et al., 2006). Dessa forma, a atividade microbiana predomina na camada 0-10 cm de solo, enquanto que nas demais profundidades, a atividade é menor e mais homogênea. A diminuição da atividade e da BMC e BMN com a profundidade de amostragem (Tabelas 2 e 3) estão diretamente relacionadas com a diminuição dos teores de matéria orgânica (BABUJIA et al., 2010).

Quando se adicionam os resultados do fragmento florestal à ACP, as áreas de produção de grãos consideradas de alta produtividade tendem a permanecerem mais próximas das áreas nativas no plano fatorial do que as áreas consideradas de média e baixa produtividade. Esse comportamento sugere que os atributos microbiológicos do solo em níveis mais próximos aos observados no fragmento florestal possam estar auxiliando a suportar maiores níveis de produtividade de grãos no solo agrícola. Os resultados da área de alta produtividade (AP2) e do fragmento florestal tendem a ser mais próximos na profundidade 40-60 cm, principalmente pela BMC e BMN, tanto na amostragem de verão quanto de inverno (Tabelas 2 e 3).

A média da BMC nas áreas agrícolas tanto no verão (242 mg C kg^{-1} solo) quanto no inverno (198 mg C kg^{-1} solo) foi inferior aos dados compilados por Kaschuk, Alberton e Hungria (2010), em que a BMC variou entre 491 e 591 mg C kg^{-1} solo. Entretanto, a média da BMC no fragmento florestal no verão (729 mg C kg^{-1} solo) e no inverno (647 mg C kg^{-1} solo) foram semelhantes aos dados encontrados pelos autores, que variou entre 683 e $1520 \text{ mg C kg}^{-1}$ solo.

A BMN variou de 13 a 81 mg N kg^{-1} solo na profundidade 0-10 cm, e de 11 a 60 mg N kg^{-1} solo na profundidade 10-20 cm, enquanto que em um experimento de longa duração conduzido no IAPAR, em Londrina, PR, após 16 anos de plantio direto de milho ou soja em sucessão ao trigo, a BMN variou de 20 a 67 mg N kg^{-1} solo, na profundidade 0-20 cm. Considerando que esse N será liberado gradualmente no solo e pode ser prontamente assimilável pela cultura, a microbiota pode contribuir parcialmente com as exigências das plantas por esse nutriente

(COLOZZI FILHO; ANDRADE, 2006) e complementar o fertilizante mineral, aumentando sua eficiência.

Todas as variáveis microbiológicas e bioquímicas avaliadas diminuíram com o aumento da profundidade do solo, com exceção do qCO_2 , que na coleta de verão, aumentou de acordo com a profundidade do solo, o que indica estresse da comunidade microbiana das camadas inferiores em relação à camada superficial (0-10 cm), pela menor disponibilidade de C e nutrientes (Tabelas 2 e 3) (BABUJIA et al., 2010).

A análise química do solo das áreas agrícolas mostrou maior teor de carbono orgânico nas áreas de alta produtividade em relação às áreas de baixa e média produtividade, e também em relação à área de fragmento florestal (Tabela 4), o que contraria estudos prévios (MENDES et al., 2003; MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2003; SANTOS et al., 2004) em que geralmente demonstram maior teor de C orgânico nas áreas de mata nativa em relação às áreas cultivadas.

Santos et al. (2004) avaliaram o teor de carbono orgânico em solo sob diferentes sistemas de manejo e encontraram maiores valores em plantio direto e mata nativa. Pôde-se verificar uma redução de apenas 5% no teor de carbono orgânico do solo sob plantio direto há 17 anos, em comparação ao solo sob mata nativa. Isso foi atribuído ao não revolvimento do solo, o que resultou em menor mineralização dos resíduos orgânicos no sistema sob plantio direto.

Um maior teor de C nas áreas agrícolas pode ser devido ao cultivo de gramíneas. A rotação de culturas é uma das características essenciais do plantio direto, por disponibilizar mais C ao solo quando é cultivada uma gramínea ou de fixar N atmosférico quando é cultivada uma leguminosa (VENZKE FILHO et al., 2008). A maioria dos produtores da região sul do Brasil, incluindo a área amostrada, adota a sequência de culturas milho ou soja no verão, e aveia ou trigo no inverno (Tabela 1).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento, a região Centro-Sul do Brasil passou por períodos com baixas precipitações pluviométricas durante o desenvolvimento da cultura da soja na safra 2010/2011. No Estado do Paraná, a semeadura também sofreu atrasos, mas todo o plantio foi realizado dentro do calendário ideal para a cultura, o qual finalizou no mês de dezembro (CONAB, 2011). Amado et al. (2007) avaliaram a variabilidade espacial e temporal de culturas sob plantio direto e ressaltaram que, em anos de precipitação normal, a soja se

desenvolveu de modo mais homogêneo. Por sua vez, em anos com restrição hídrica, a diferença de produtividade entre as áreas foi mais acentuada, de modo que áreas de baixo potencial produtivo de soja foram as mais sensíveis ao estresse ambiental. Portanto, baseados em mapas de produtividade, esses autores inferiram que a soja, por ser mais rústica, somente em situação de estresse ambiental discrimina eficientemente as diferenças de qualidade do solo detectadas pelas demais culturas, como o milho e trigo.

A análise da estrutura da comunidade bacteriana, através do dendrograma formado com base nos perfis de DGGE (Figura 4), mostra que a similaridade final entre as áreas foi de 75%. Foram formados 3 sub-grupos, sendo que o primeiro foi formado pelas áreas BP1 e AP1 (83% de similaridade); o segundo, pelas áreas BP2, MP2 e MP1 (95% de similaridade); e o terceiro, pelas áreas AP2 e FF (96% de similaridade). Esse agrupamento foi similar ao obtido pela ACP com os atributos microbiológicos e bioquímicos e variáveis explicativas (Figura 2B). As áreas BP2 e MP2 apresentam similaridade de 100% entre si.

O perfil de DGGE (Figura 4) demonstrou algumas bandas que estiveram presentes em todas as áreas de cultivo de soja sob plantio direto e também no fragmento florestal, indicando que, provavelmente, certas espécies representam os microrganismos dominantes e mais resilientes do solo (BABUJIA, 2010). Também foram visualizadas algumas bandas presentes em todas as áreas agrícolas e ausentes no fragmento florestal, evidenciando que, apesar de ser um sistema conservacionista, o plantio direto altera a comunidade microbiana do solo em relação às áreas de mata nativa.

A análise canônica discriminante (ACD) aplicada aos dados da profundidade 0-10 cm da amostragem de verão (Tabela 5) indicou que a atividade da celulase, glutaminase e fosfatase ácida foram as variáveis que contribuíram significativamente para discriminar as áreas agrícolas de produção de soja, sendo que a celulase foi mais importante na função discriminante 2 (dimensão 2), e as demais foram importantes na função discriminante 1 (dimensão 1) devido aos maiores valores de TDP associados a cada função discriminante. Já na amostragem de inverno (Tabela 5), a BMC e a atividade da celulase discriminaram significativamente as áreas agrícolas, e ambas as variáveis foram mais importantes na função discriminante 1.

Tabela 4 - Resultado de análises químicas e granulométricas de amostras de solo das áreas cultivadas com soja sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos, e de um fragmento florestal (FF), de Ponta Grossa, PR. (n = 4)

Área	pH ^a	H + Al ^b	Al ³⁺ ^c	Ca ²⁺ ^c	Mg ²⁺ ^c	K ⁺ ^d	SB ^e	CTC ^f	P resina mg dm ⁻³	C g dm ⁻³	V ^g	m ^h	Argila %	Silte	Areia
BP1	5.1 ±	43.2 ±	0.5 ±	38.9 ±	22.9 ±	5.0 ±	66.8 ±	109.9 ±	17.8 ±	23.1 ±	60.4 ±	0.9 ±	52.1 ±	18.6 ±	29.5 ±
	0.1 ⁱ	4.1 ⁱ	0.4 ⁱ	4.0 ⁱ	2.5 ⁱ	0.6 ⁱ	6.8 ⁱ	5.3 ⁱ	3.0 ⁱ	2.1 ⁱ	3.8 ⁱ	0.7 ⁱ	3.7 ⁱ	1.1 ⁱ	2.9 ⁱ
AP1	5.3 ±	41.1 ±	0.0 ±	31.9 ±	17.9 ±	3.8 ±	53.6 ±	94.7 ±	25.3 ±	25.0 ±	56.4 ±	0.0 ±	43.4 ±	25.6 ±	31.0 ±
	0.1	2.4	0.0	2.1	1.1	1.0	3.0	2.5	5.6	1.4	2.5	0.0	1.2	0.8	1.1
BP2	5.2 ±	46.3 ±	1.7 ±	36.1 ±	21.6 ±	4.6 ±	62.3 ±	108.6 ±	20.0 ±	19.5 ±	56.8 ±	3.5 ±	37.2 ±	20.1 ±	42.5 ±
	0.5	14.7	2.6	11.8	9.0	1.1	19.7	12.2	5.6	1.9	13.7	5.0	4.0	2.7	7.4
AP2	4.9 ±	66.6 ±	1.6 ±	37.3 ±	21.5 ±	5.6 ±	64.3 ±	130.9 ±	31.1 ±	27.5 ±	49.3 ±	2.8 ±	31.0 ±	23.7 ±	45.3 ±
	0.3	14.5	1.4	8.2	4.7	0.8	13.1	10.4	15.8	1.5	10.0	2.9	4.2	4.0	7.0
MP1	4.7 ±	54.9 ±	3.8 ±	20.1 ±	10.5 ±	3.3 ±	33.9 ±	88.8 ±	45.6 ±	20.8 ±	37.9 ±	10.5 ±	20.9 ±	9.8 ±	69.3 ±
	0.1	4.5	1.6	1.1	0.5	1.5	3.2	6.5	19.7	2.5	1.8	3.8	1.7	1.0	0.9
MP2	5.2 ±	41.7 ±	0.0 ±	25.6 ±	12.4 ±	3.6 ±	41.6 ±	83.2 ±	21.8 ±	15.1 ±	50.0 ±	0.0 ±	13.5 ±	10.6 ±	75.0 ±
	0.1	7.6	0.0	5.1	2.5	0.3	7.6	6.3	3.6	1.2	8.7	0.0	2.0	0.8	3.3
FF	3.8 ±	114.1 ±	9.6 ±	10.5 ±	7.5 ±	3.3 ±	21.3 ±	135.4 ±	8.5 ±	19.7 ±	15.5 ±	33.8 ±	33.0 ±	12.4 ±	54.8 ±
	0.1	15.2	2.3	4.9	3.4	1.4	9.4	18.7	1.9	2.9	6.5	13.4	14.1	2.1	15.5

^a CaCl₂ 0,01M, ^b SMP, ^c KCl 1N, ^d Melich, ^e soma de bases, ^f capacidade de troca de cátions, ^g saturação por bases, ^h saturação por Al, ⁱ média ± desvio padrão

Figura 4 - Dendrograma de similaridade obtido da análise da imagem do gel de DGGE, do gene *16S rRNA* de amostras de solo de áreas cultivadas com soja sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos, no programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e índice de tolerância de 5%. FF = fragmento florestal.

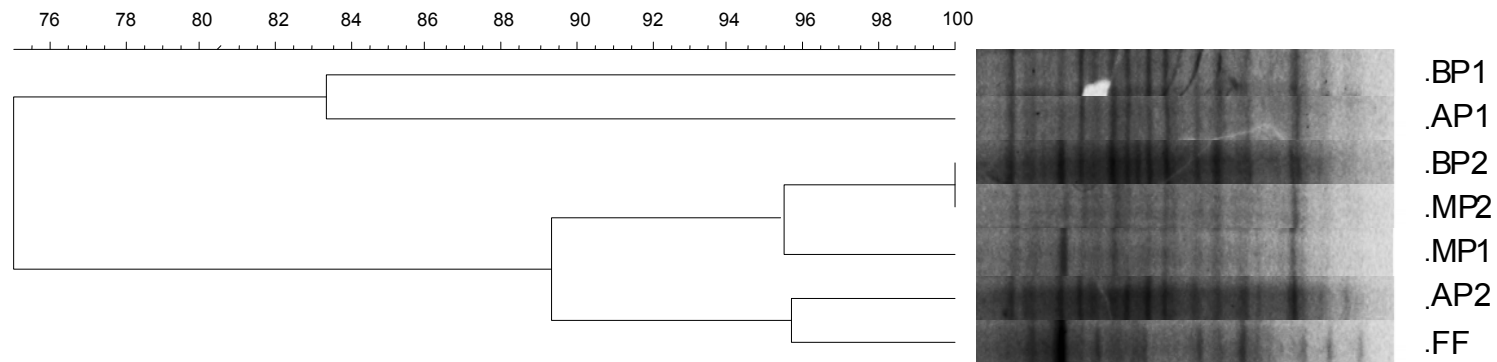


Tabela 5 - Coeficientes canônicos padronizados (CCP) da função canônica discriminante 1 e 2, r (coeficiente de correlação canônico) e TDP (taxa de discriminação paralela) discriminando as áreas agrícolas de cultivo de soja sob plantio direto, com diferentes produtividades de grãos, na profundidade 0-10 cm, considerando os atributos microbiológicos do solo no verão e inverno.

Verão						
	Função Discriminante 1			Função Discriminante 2		
	CCP	r	TDP	CCP	r	TDP
Celulase	1.22	-0.05	-0.06	-0.51	-0.43	0.22
Glutaminase	-0.94	-0.36	0.34	1.04	0.19	0.20
Fosfatase ácida	-1.06	-0.54	0.57	-0.57	-0.41	0.23
Inverno						
	Função Discriminante 1			Função Discriminante 2		
	CCP	r	TDP	CCP	r	TDP
BMC	1.11	0.48	0.53	-1.52	-0.17	0.26
Celulase	0.71	0.58	0.41	0.81	0.20	0.16

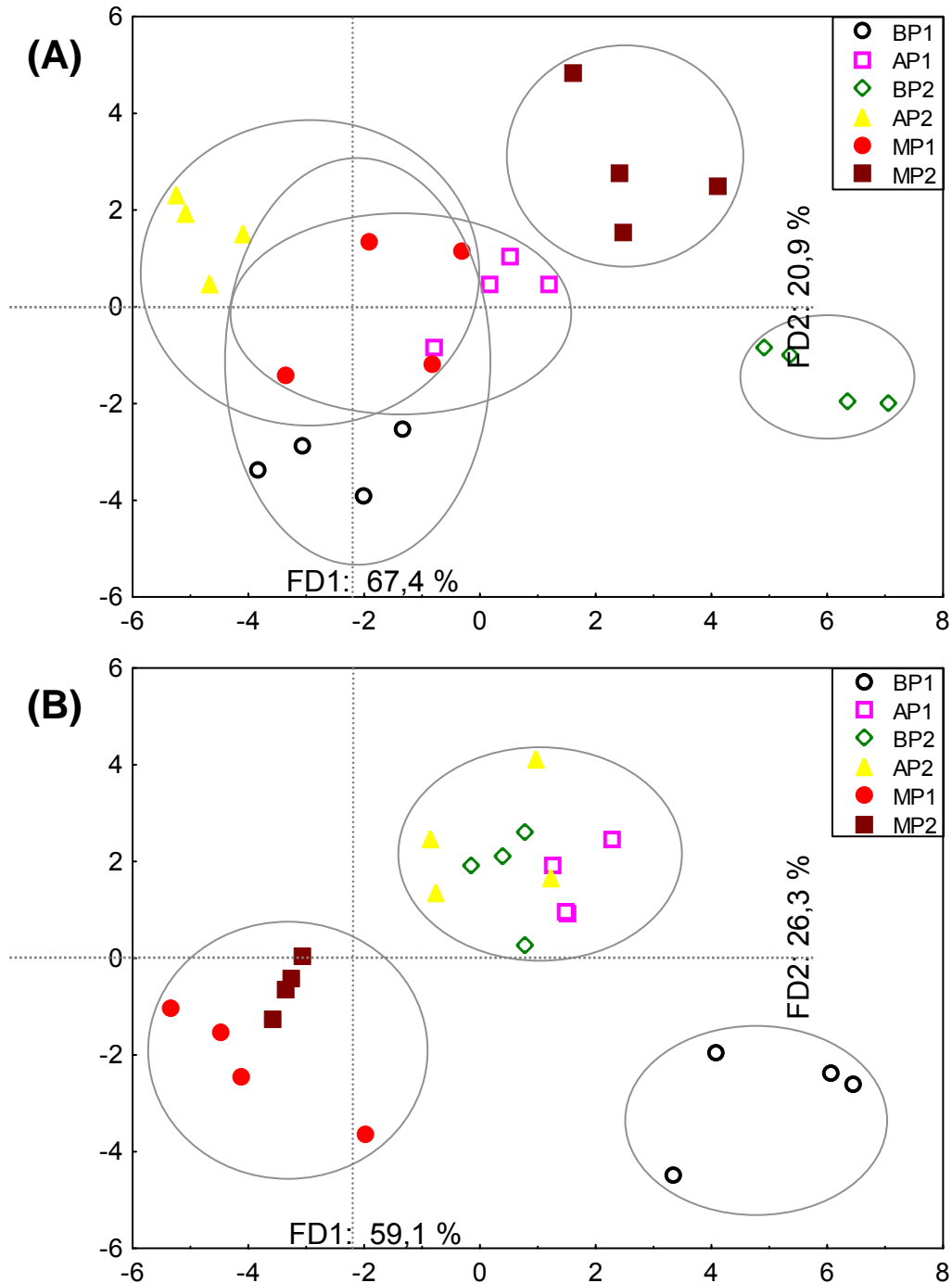
A análise canônica discriminante (ACD) das áreas agrícolas de cultivo de soja sob plantio direto, na profundidade 0-10 cm das amostragens de verão e inverno (Figura 5), mostrou agrupamentos semelhantes aos obtidos na análise de componentes principais (ACP) (Figuras 2A e 3A). Na amostragem de verão (Figura 5A), foram formados três grupos, de modo que a área MP1 assumiu posição intermediária às áreas de alta produtividade e à área BP1; e mais 2 grupos, um com as amostras da área BP2 e outro com as amostras da área MP2. Na amostragem de inverno (Figura 5B), foram formados três grupos, sendo um deles composto pelas áreas de alta produtividade em conjunto com a área BP2, outro grupo com as áreas de média produtividade e outro com as amostras da área BP1. As áreas com níveis de produtividade ficaram melhor separadas no plano fatorial a partir dos dados da amostragem de inverno (Figura 5B).

A ACD evidenciou a capacidade da atividade enzimática e da BMC em discriminar áreas de produção de soja sob plantio direto com níveis de produtividade de grãos. A atividade da celulase apresentou maior potencial como bioindicador de produtividade agrícola, por ter sido significativa nas duas épocas de amostragem (Tabela 5 e Figura 5).

A BMC pode estar relacionada a diversos processos do solo, incluindo a decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, degradação de compostos xenobióticos, estruturação do solo, armazenamento de matéria orgânica, controle biológico e supressão de patógenos de plantas, e por

essa razão, tem sido apontada como um componente importante para a manutenção da qualidade do solo e produtividade das plantas (NOGUEIRA et al., 2006; ROSCOE et al, 2006).

Figura 5 - Análise canônica discriminante (ACD) com base nas variáveis microbiológicas obtidas na profundidade 0-10 cm das áreas de cultivo de soja com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos. (A) verão, (B) inverno.



Áreas agrupadas no mesmo círculo não diferem entre si pelo teste de Wilks' Lambda ($P > 0,05$).

A análise de regressão múltipla com os dados da amostragem de verão, na profundidade 0-10 cm (Tabela 6), resultou em um modelo matemático, no qual a produtividade de grãos, nas áreas sob sistema plantio direto, varia em função do teor de C, CTC, RB e K. Um resultado interessante que, de acordo com o modelo, áreas com maior teor de matéria orgânica e maior RB são mais produtivas. Isso demonstra a importância da atividade microbiana na produtividade agrícola.

Devido ao C orgânico total ser o principal atributo associado à produtividade de grãos conforme a regressão múltipla (Tabela 6), os gráficos a seguir (Figura 6) indicam a relação entre os teores de C orgânico total com as variáveis microbiológicas e a CTC. Todas as relações evidenciaram que as áreas de alta produtividade, principalmente a área AP2, apresentaram maior teor de C, CTC, BMC, BMN, atividade da celulase, fosfatase ácida e glutaminase, o que indica que o maior teor de matéria orgânica, densidade e atividade microbiana nessas áreas ajudam a manter a maior produtividade de grãos ano após ano. Já a área MP2 apresentou menores valores desses indicadores, e as demais áreas permaneceram intermediárias.

Balota et al. (2004) também observaram correlações significativas entre o C orgânico e a atividade das enzimas celulase ($r = 0,66$) e fosfatase ácida ($r = 0,81$) em solo sob plantio direto e rotações de culturas.

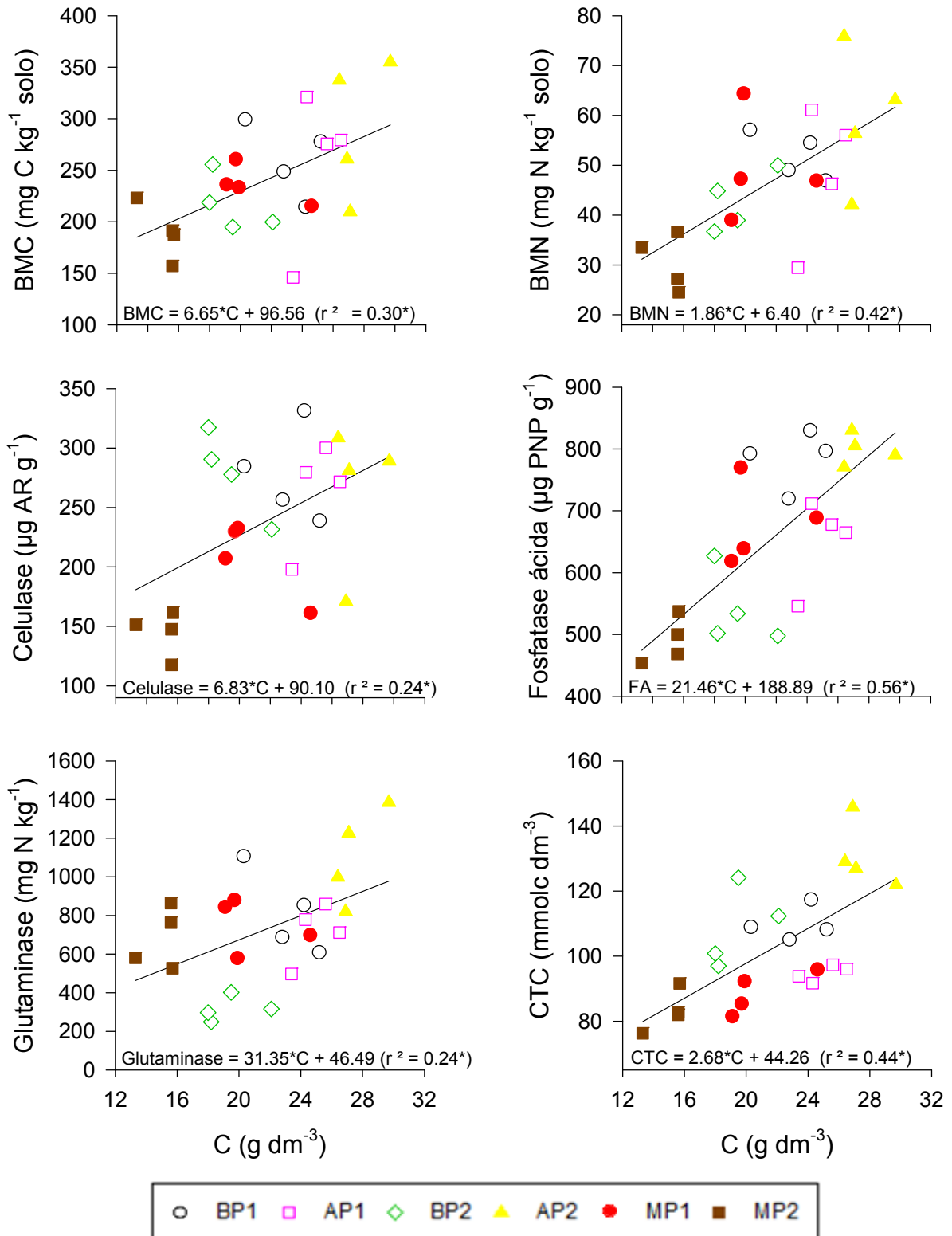
Não há como abordar a produtividade agrícola sem mencionar a qualidade do solo. Além da matéria orgânica, quantidade e diversidade de microrganismos, as atividades microbiológicas e bioquímicas são chaves para se obter agroecossistemas com maior sustentabilidade e maiores níveis de produtividade.

Tabela 6 - Resumo do stepwise para regressão múltipla com base nas variáveis microbiológicas e químicas das áreas agrícolas na amostragem de verão (profundidade 0-10 cm), considerando a produtividade de grãos como variável dependente, segundo o modelo: $\text{Produtividade (kg ha}^{-1}\text{)} = 2785 + 20.6*\text{RB} - 115.9*\text{K} - 17.2*\text{CTC} + 110.3*\text{C}$.

Step	Variável	R ² parcial	R ² modelo	Pr > F
1	C	0.28	0.28	0.007
2	CTC ^a	0.27	0.55	0.002
3	RB ^b	0.08	0.63	0.048
4	K	0.04	0.67	0.147

^a CTC: capacidade de troca de cátions, ^b RB: respiração basal. Todas as variáveis do modelo são significativas a $P < 0,15$.

Figura 6 - Correlação simples de Pearson do C com variáveis microbiológicas do solo e capacidade de troca de cátions (CTC) considerando a profundidade 0-10 cm das áreas de cultivo de soja, sob plantio direto, com níveis (BP = baixa, MP = média, AP = alta) produtividade de grãos, na amostragem de verão. BMC = biomassa microbiana de carbono, BMN = biomassa microbiana de nitrogênio, AR = açúcares redutores, PNP = *p*-nitrofenol.



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema de produção sob plantio direto altera a atividade microbiana do solo em relação às áreas de vegetação nativa. Os indicadores microbiológicos e bioquímicos, avaliados na camada 0-10 cm, apresentaram maior capacidade de separação entre as áreas com níveis de produtividade de grãos, indicando que alguns atributos do solo relativos à ciclagem de C e nutrientes podem auxiliar a explicar os níveis de produtividade da cultura da soja.

O teor de carbono orgânico do solo e os bioindicadores respiração basal, biomassa microbiana de carbono, atividade das enzimas celulase, fosfatase ácida e glutaminase apresentam maior capacidade de explicar e discriminar níveis de produtividade de grãos em áreas de cultivo de soja no Paraná.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTÍNEZ, V. et al. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p. 35-45, 2007.
- ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, p. 214-219, 1995.
- AMADO, T. J. C. et al. Variabilidade espacial e temporal da produtividade de culturas sob sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 8, p. 1101-1110, 2007
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. **Biology and Fertility of Soils**, v. 1, n. 2, p. 81-89, 1985.
- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient from CO₂ (qCO_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 & Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 393-395, 1993.
- ARAUJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; MONTEIRO, R. T. R. Responses of soil microbial biomass and activity for practices of organic and conventional forming systems in Piauí state, Brazil. **European Journal of Soil Biology**, v. 44, p. 225-230, 2008.
- BABUJIA, L. C. **Bioindicadores de qualidade do solo avaliados em diferentes profundidades sob plantio direto e convencional**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.
- BABUJIA, L. C. et al. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 2174-2181, 2010.
- BADIANE, N. N. Y. et al. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. **Applied Soil Ecology**, v. 18, p. 229–238, 2001.
- BALOTA, E. L. et al. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in subtropical agro-ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 300-306, 2004.
- BARBIN, D. **Planejamento e Análise Estatística de Experimentos Agronômicos**. Arapongas, PR: MIDAS, 2003. v. 1. 208 p.
- BARTLETT, R. J.; ROSS. D. S. Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. **Soil Science Society of America Journal**, v. 52, p. 1191-1192, 1988.
- BASTIDA, F.; MORENO, J. L.; HERNÁNDEZ. T.; GARCÍA, C. Microbiological activity in a soil 15 years after its devegetation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 2503-2507, 2006.

BRANDÃO, E. M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. cap.1, p.1-15.

BROOKES, P. C. et al. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 17, p. 837-842, 1985.

CARVALHO, J. L. N. et al. Potencial de sequestro de carbono em diferentes biomas do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 277-289, 2010.

CASIDA, L. E.; KLEIN, D. A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v. 98, p. 371-376, 1964.

COLOZZI FILHO, A.; ANDRADE, D. S. Organismos do solo e atividade microbiana no plantio direto. In: CASÃO JUNIOR, R.; SIQUEIRA, R.; MEHTA, Y. R.; PASSINI, J. J. (Ed.). **Sistema plantio direto com qualidade**. Londrina: IAPAR; Foz do Iguaçu: ITAIPU Binacional, 2006. p. 39-52.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, safra 2010/2011, décimo segundo levantamento, setembro 2011**. Brasília : Conab, 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_09_19_09_49_47_boletim_setembro-2011..pdf>. Acesso em: 12 mar. 2012.

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

DERPSCH, R. Evolução do sistema de plantio direto no Brasil e no mundo. In: ENCONTRO NACIONAL DE PLANTIO DIRETO NA PALHA, 8., 2002, Águas de Lindóia. **Resumos: Conservando a água e preservando a vida**. Águas de Lindóia: FEBRAPD, 2002. p. 75-77.

DERPSCH, R. Expansão Mundial do Plantio Direto. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, set./out. 2000.

DERPSCH, R. Historical review of no-tillage cultivation of crops. In: JIRCAS SEMINAR ON SOYBEAN RESEARCH, 1., 1998, Foz do Iguaçu. **Proceedings: no-tillage Cultivation and Future Research Needs**. Foz do Iguaçu: JIRCAS, 1998. p. 1-18. (Working Report 13), Disponível em: <<http://www.rolf-derpsch.com/notill.htm#5>>. Acesso em: 15 dez. 2011.

DERPSCH, R. Histórico, requisitos, importância e outras considerações sobre plantio direto no Brasil. In: TORRADO, P. V.; ALOISI, R. R. (Coord.). **Plantio Direto no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1984. p. 1-12.

DERPSCH, R.; FRIEDRICH, T. Global Overview of Conservation Agriculture Adoption. In: WORLD CONGRESS ON CONSERVATION AGRICULTURE, 4., 2009, New Delhi. **Paper presented to...**, New Delhi: FAO, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/ca/doc/Derpsch-Friedrich-Global-overview-CA-adoption3.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2012.

DORAN, J. W., PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W. et al. **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. v. 35, p. 3-21.

DOYLE, J.; PAVEL, R.; BARNES, G.; STEINBERGER, Y. Cellulase dynamics in a desert soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 371-376, 2006.

FACCI, L. D. **Variáveis microbiológicas como indicadores da qualidade do solo sob diferentes usos**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico, Campinas, 2008.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE PLANTIO DIRETO NA PALHA. **Evolução da área cultivada no sistema de plantio direto na palha – Brasil**. Disponível em: <http://www.febrapdp.org.br/download/Ev_area_pd_brasil.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2012.

FEIJE, F.; ANGER, V. Spot test in inorganic analysis. **Analytical Chemistry Acta**, v. 149, p. 363-367, 1972.

FERREIRA, E. A. B. et al. Dinâmica do carbono da biomassa microbiana em cinco épocas do ano em diferentes sistemas de manejo do solo no cerrado. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, p.1625-1635, 2007.

FRANCHINI, J. C. et al. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v. 92, n. 1-2, p. 18-29, 2007.

FRANCHINI, J. C. et al. Alterações químicas em solos ácidos após a aplicação de resíduos vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 533-542, 1999.

FRANKENBERGER JR., W. T.; TABATABAI, M. A. L-Glutaminase activity of soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 869-874, 1991.

GREGORICH, E. G. et al. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 74, p. 367-385, 1994.

HATCH, D. J. et al. Nitrogen mineralization and microbial activity in permanent pastures amended with nitrogen fertilizer or dung. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.288-293, 2000.

HUNGRIA, M. et al. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. **Applied Soil Ecology**, v. 2, n. 3, p. 288-296, 2009.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Soil quality indicator properties in mid-Atlantic soils as influenced by conservation management. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 55, p. 69-78, 2000.

- IZQUIERDO, I. et al. Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 30, p. 3-10, 2005.
- 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 & Biochemistry**, v.42, n.1, p.1-13, 2010.
- KLUMPP, A. et al. Bioindication of air pollution effects near a copper smelter in Brazil using mango trees and soil microbiological properties. **Environmental Pollution**, v. 126, p. 313-321, 2003.
- LAMBAIS, M. R.; CURY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BULL, R. C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J. (Org.). **Tópicos em ciências do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2005. v. 4, p. 43-84.
- LEPS, J.; SMILAUER, P. **Multivariate analysis of ecological data using canoco**. New York: Cambridge University Press, 2003.
- LOPES, A. S.; WIETHÖLTER, S.; GUILHERME, L. R. G.; SILVA, C. A. **Sistema Plantio Direto**: bases para o manejo da fertilidade do solo. São Paulo: ANDA, 2004.
- MARRIEL, I. E. et al. P. **Aplicação da técnica eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) na caracterização de microrganismos dominantes na rizosfera de plantas cultivadas em solo ácido**. Sete Lagoas: Embrapa, 2005. (Circular Técnica 72).
- MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste, MT. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 425-433, 2003.
- MENDES, I. C. et al. Propriedades biológicas em agregados de um latossolo vermelho-escuro sob plantio convencional e direto no Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 435-443, 2003.
- MOLIN, J.P. Definição de unidades de manejo a partir de mapas de produtividade. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 83-92, 2002.
- MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. Dinâmica da matéria orgânica e da biomassa microbiana em solo submetido a diferentes sistemas de manejo na Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1103-1110, 2004.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127-141. 1998.

- MYERS, R. M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L. S. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 501-527, 1987.
- NADEAU, J. A.; QUALLS, R. G.; NOWAK, R. S.; BLANK, R. R. The potential bioavailability of organic C, N, and P through enzyme hydrolysis in soils of the Mojave Desert. **Biogeochemistry**, v. 82, p. 305-320, 2007.
- NAYAK, D.R.; BABU, Y.J.; ADHYA, T.K. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aeric Endoaquept planted to rice under flooded condition. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1897-1906, 2007.
- NOGUEIRA, M. A. et al. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 115, p. 237-247, 2006.
- NUBEL, U. et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5636-5643, 1996.
- PASCUAL, J. A. et al. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation process. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, p.1877-1883, 2000.
- PIRES, J. L. F.; COSTA, J. A. Agricultura de Precisão: realidade e perspectivas. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, 2001.
- ROLDÁN, A. et al. Soil sustainability indicators following conservation tillage practices under subtropical maize and bean crops. **Soil & Tillage Research**, v. 93, p. 273-282, 2007.
- ROSCOE, R. et al. Biomassa microbiana do solo: fração mais ativa da matéria orgânica. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; SALTON, J. C. (Org.). **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas: modelagem matemática e métodos auxiliares**. Dourados: Embrapa, 2006. p.163-198.
- SAKAMOTO, K.; OBO, Y. Effects of fungal to bacterial ratio on the relationship between CO₂ evolution and total soil microbial biomass. **Biology and Fertility of Soils**, v. 17, n. 1, p. 39-44, 1994.
- SANTI, A. L. **Relações entre indicadores de qualidade do solo e a produtividade culturas em áreas com agricultura de precisão**. 2007. 175 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- SANTOS, V. B. et al. Biomassa, atividade microbiana e teores de carbono e nitrogênio totais de um planossolo sob diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 10, n. 3, p. 333-338, 2004.
- SCHINNER, F.; VON MERISI, W. Xylanase-, CM-cellulase- and invertase activity in soil: an improved method. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 511-515, 1990.

SEYBOLD, C. A. et al. Quantification of soil quality. In: LAL, R.; KIMBLE, J. M.; FOLLET, R. F.; STEWART, B. A. (Ed.). **Soil processes and the carbon cycle**. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, p. 387-404, 1997.

SHEFFIELD, V. C.; COX, D. R.; LERMAN, L. S.; MYERS, R. M. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 232-236, 1989.

SILVA, A. et al Microbial biomass under various soil- and crop-management systems in short and long-term experiments in Brazil. **Field Crops Research**, v. 119, p. 20–26, 2010.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. de J.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Microorganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**.

Brasília: EMBRAPA-SPI; Goiânia: EMBRAPA-CNPAP; Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1994. (Embrapa-CNPAP. Documentos, 45)

SOUZA, R. A. et al. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 83-91, 2008.

SPACCINI, R.; ZENA, A.; IGWE, C. A.; MBAGWU, J. S. C.; PICCOLO, A. Carbohydrates in water-stable aggregates and particle size fractions of forested and cultivated soils in two contrasting tropical ecosystems. **Biogeochemistry**, v. 22, p. 1-22, 2001.

SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial-C: calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C-labelled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 337-343, 1988.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S.; BOTTOMLEY P. S. (Ed.). **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994, p. 775–834.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrofenol phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 1, p. 301-307, 1969.

TRIPATHI, S.; CHAKRABORTY A.; CHAKRABARTI K.; BANDYOPADHYAY B. K. Enzyme activities and microbial biomass in coastal soils of India. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2840-2848, 2007.

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

VENZKE FILHO, S. de P.; FEIGL, B. J.; PICCOLO, M. de C.; SIQUEIRA NETO, M.; CERRI, C. C. Biomassa microbiana do solo em sistema de plantio direto na região de Campos Gerais - Tibagi, PR. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32. p. 599-610, 2008.

VICTORIA, R. L. et al. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. cap. 8, p. 105-121.

XAVIER, G. R.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. **Estudo da comunidade microbiana do solo através de clonagem, eletroforese em géis desnaturantes (DGGE/TGGE) e conformação de fita simples do DNA (SSCP)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 172).

WARDLE, D. A.; HUNGRIA, M. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994, p.193-216.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

ZILLI, J. E.; 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**, v. 20, p. 391-411, 2003.