



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LETÍCIA CARLOS BABUJIA

**BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO
AVALIADOS EM DIFERENTES PROFUNDIDADES SOB
PLANTIO DIRETO E CONVENCIONAL**

Londrina
2010

LETÍCIA CARLOS BABUJIA

**BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO
AVALIADOS EM DIFERENTES PROFUNDIDADES SOB
PLANTIO DIRETO E CONVENCIONAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catálogo-na-Publicação (CIP)

B115b__Babujia, Leticia Carlos.

Bioindicadores de qualidade do solo avaliados em diferentes profundidades
sob plantio direto e convencional / Leticia Carlos Babujia. – Londrina, 2010.
115f. ; il. + anexo no final da obra.

Orientador: Mariangela Hungria.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia microbiana – Teses. 2. Microorganismos biotecnológicos –
Teses. 3. Solos – Manejo – Teses. 4. Biomassa – Teses. I. Hungria, Mariangela.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 631.461

LETÍCIA CARLOS BABUJIA

**BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO
AVALIADOS EM DIFERENTES PROFUNDIDADES SOB
PLANTIO DIRETO E CONVENCIONAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Mariangela Hungria
EMBRAPA-CNPSO

Dra. Diva de Souza Andrade
IAPAR – Londrina - PR

Dra. Luciana Grange
UFPR – Palotina - PR

Londrina 28 janeiro 2010

OFEREÇO

Aos meus pais.

Aos meus irmãos Patrícia e Marcelo

Meus sobrinhos Vítor Hugo e Arthur, são os maiores presentes de Deus à minha vida.
Em especial ao Everson pelo amor, força, amizade, incentivo e por ter compartilhado vários momentos de alegria.

A eterna memória de meu avô **Pedro**,
pelo exemplo de vida e carinho nunca esquecidos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me dar força, proteção e amparo ao longo do meu caminho.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade da realização do curso.

À Embrapa Soja, pela realização de todo o experimento.

À Fapeagro e Funape, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu namorado, Everson, pelo amor, atenção, apoio e sua (pouca) paciência; mas principalmente por ser essa pessoa tão especial em minha vida.

À minha orientadora Mariangela, por me inspirar como exemplo de competência, sabedoria, honestidade e ética profissional, você é um exemplo a ser seguido! Muito obrigada pela confiança, conforto nas horas difíceis e estímulo constante. Obrigada por ser minha “mãe científica”.

Ao Júlio Franchini, pela orientação firme, confiança e amizade. Por sua orientação que contribuiu de modo valioso para minha formação acadêmica;

À amiga Glaciela por toda atenção, ajuda indispensável, interesse ao trabalho e pelas valiosas sugestões e críticas na revisão desse trabalho.

Ao Odair por estar sempre disposto em esclarecer dúvidas agronômicas.

Aos membros da banca examinadora André, Diva e Luciana por dedicarem seu tempo em colaborar com o trabalho.

Aos professores da química que foram essenciais em minha formação: Wagner, Moisés, Suzana, João Carlos, Galão, Flaveli e principalmente ao Alfredão que me inspirou profissionalmente.

Às pesquisadora Maria Cristina, Ivani e à assistente Tânia, do Departamento de Biometria da Embrapa soja, pela orientação e realização da análise estatística nos resultados dessa pesquisa.

À Rosinei pela ajuda oferecida no início do estágio de graduação, sobre a metodologia da biomassa microbiana.

À Elisete, pela amizade, atenção, incentivo e sua dedicação em ensinar ao próximo.

À Lígia, por seu auxílio e colaboração dedicada ao longo do trabalho.

Aos funcionários da física e química do solo Bianca, Waldemar, Mara, Gustavo, e principalmente o Donizete por sempre estar disposto a esclarecer qualquer dúvida.

À Renata Carrara, por toda dedicação e ajuda oferecida nos experimentos.

À Eduara recém chegada no laboratório mais amiga, obrigada pelos conselhos e suas histórias engraçadas

Aos meus queridos amigos Renata, Renan e Pâmela, sempre dispostos a me ajudar, Luciana que sempre apareceu nos momentos difíceis. Obrigada também pelos momentos de trabalho, companheirismo e diversão.

À Adriana pela ajuda nas correções finais e aos momentos de descontração.

Aos grandes amigos conquistados que fizeram parte desta história Osvaldino, Manézinho, Leny, Thais, Josi, Adalgisa, Douglas, Maria, Simone, Jesiane, Gesiele, Rinaldo, Ilmara, Aline, Ênio, Andréia, Adriana Marques e Edmar pessoas maravilhosas as quais sempre pude contar durante toda esta minha jornada.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Biotecnologia que contribuíram para minha formação;

Aos colegas do mestrado, Lú Grade, Leandro, Anelise, Vanessa, Leandra, Renata, Kelen, Cristina, Rafael, Thais e Luciana.

À todos meus tios, tias, primos e primas que me incentivaram;

À Aninha, minha quase irmã, pela incondicional amizade, pela força e por todas as palavras de carinho e orações;

À Elydia e Salvador pelo constante incentivo;

À Ana, Edson, Jú e Emerson pelos momentos de descontração e conselhos.

À minhas avós Angelina e Elza, e meu avó Zé, exemplos de sabedoria e amor;

Ao Marcelo, por estar sempre disposto a me ajudar nos momentos difíceis, você e a Pati são as melhores pessoas do mundo pra mim...

À Patrícia e Fábio, obrigada por terem me ajudado no início da graduação, sem vocês seria tudo mais difícil. Obrigada por me conceder as pessoas mais importantes, meus sobrinhos Vitor Hugo e Arthur, alegrias da minha vida.

Aos meus pais, José e Chirle, por me proporcionaram suporte inicial para que pudesse alcançar meus objetivos e cumprir minhas metas. Amo vocês!

E finalmente aos bichinhos de minha vida: Thed, Laika e Léo, amo vocês.

MUITO OBRIGADA!

Mariangela

“ Cada pequeno Olá, cada pequeno sorriso, cada pequena ajuda, é capaz de salvar um coração machucado.

VOCÊ é especial.

Há um milagre chamado amizade.

Você não sabe como ela aconteceu, ou quando começou, mas você sabe a alegria que ela traz e percebe que a amizade é um dos dons mais preciosos que Deus nos concedeu.

Amigos são jóias preciosas, realmente.

Eles nos fazem sorrir e nos encorajam para o sucesso.

Eles estão sempre ali para nos ouvir, para nos elogiar, e estão sempre de coração aberto para nos receber.”

(autor desconhecido)

BABUJIA, Letícia Carlos. **Bioindicadores de qualidade do solo avaliados em diferentes profundidades sob plantio direto e convencional**. 2010 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Estudos quantitativos e qualitativos da microbiota evidenciam as alterações ocorridas em um agroecossistema em virtude do sistema de manejo adotado. Diversos estudos têm concluído que o sistema de manejo do solo, conhecido como plantio direto (PD) é superior ao sistema de plantio convencional (PC) para preservar a qualidade do solo. Somente pela comparação dos dois sistemas com as profundidades seria possível verificar o impacto real causado ao solo pelos sistemas de PD e PC. As análises deste estudo foram realizadas em ensaio conduzido na Embrapa Soja, em Londrina (PR), em Latossolo Vermelho Eutroférico estabelecido no verão de 1988/89. Em janeiro de 2009 as amostras foram coletadas nas entrelinhas, em sete profundidades, de 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 e 50-60 cm, sob PC e PD nas parcelas de sucessão intercalando-se soja (verão) e trigo (inverno). O delineamento experimental do ensaio foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial com quatro repetições. Foram estudadas as seguintes variáveis: densidade aparente do solo, análises químicas (pH, estoques de carbono total (CT) e nitrogênio total (NT) e macronutrientes), carbono (CBM) e nitrogênio (NBM) da biomassa microbiana, quociente metabólico (qCO_2), quociente microbiano ($qMic$), respiração basal (RB), respiração induzida por substrato (RBI), análise enzimática da β -Glicosidase e gel de eletroforese com gradiente desnaturante (DGGE) para análise das comunidades bacteriana e fúngica. Este estudo confirmou que o sistema de PD favoreceu a CBM em relação ao PC, mesmo que as diferenças da densidade de solo sejam consideradas na sua determinação. O CBM, NBM e atividade metabólica dos microrganismos acompanham a distribuição da MOS no perfil e decrescem com a profundidade do solo. Os aspectos qualitativos devem ser melhor estudados, pois têm significado inerente na explicação de muitos processos, sendo a principal lacuna do presente trabalho.

Palavras-chave: Biomassa microbiana do solo. Carbono do solo. Matéria orgânica do solo. Plantio direto. Respiração basal microbiana. Quociente metabólico microbiano.

BABUJIA, Leticia Carlos. **Bioindicators of soil quality evaluated depths under different tillage and conventional.** 2010 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Quantitative and qualitative studies of the microbiota show the changes in an agroecosystem, because of the management systems. Several studies have concluded that no-tillage (NT) is the agricultural management system that best preserves the quality of soil in relation to the PC. However, in most studies related to management system calculations are expressed in terms of soil mass (e.g. mg kg^{-1} soil), without adjusting the values with the correct soil density. As the managements of PD and PC alter the density, it is possible that there are differences in the metabolic activity and survival of microorganisms with soil depth. Therefore, only by comparing the depths, one could verify the impact caused by the ground systems of PD and PC. The experiment was conducted at Embrapa Soja in Londrina (PR) in Oxysoil (Latosolo Vermelho Eutroférico) established in the summer of 1988/89. In January 2009 samples were collected between the lines, in seven depths 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 and 50-60 cm under conventional tillage (PC) and no-tillage (NT) plots cultivated under succession soy and wheat. The experimental design consisted of randomized blocks, with four replications. We studied the following variables: physical, chemical attributes, total C and total N, microbial biomass-C (MB-C) and N (MB-N), metabolic quotient ($q\text{CO}_2$), microbial quotient ($q\text{MIC}$), basal respiration (BR) and substrate-induced (BRI), enzyme analysis and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for analysis of bacterial and fungal. This study confirmed that the NT system favored the CBM for the CT, even if the differences in the density of soil are considered in their determination. The MBC, MBN and metabolic activity of microorganisms accompanying the distribution of SOM in the profile and decrease with soil depth. The qualitative aspects should be better studied, because they have inherent meaning in the explanation of many processes and is the major weakness of this work.

Keywords: Metabolic quotient. Microbial basal respiration. Soil carbon. Soil microbial biomass. Soil organic matter. Solo. No-tillage.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Equações utilizadas nos cálculos dos métodos de FE e FI.....	46
Tabela 2 – Sequência de primers para amplificação do DNA de bactérias e fungos.....	51
Tabela 3 – Análise química de um solo Latossolo Vermelho Eutroférico, de Londrina após 20 anos sob Plantio Direto (PD) e Convencional (PC).....	57
Tabela 4 – Carbono e nitrogênio orgânico (CT e NT), biomassa microbiana (CBM) e (NBM) e quociente microbiano (qCO_2) em um Latossolo Vermelho Eutroférico de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC).....	61
Tabela 5 – Respiração basal (RB), respiração basal induzida (RBI), quociente metabólico (qCO_2) e β -Glicosidase em um Latossolo Vermelho Eutroférico de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC).....	64

Anexo A

Tabela 1 – Caracterização química de um Latossolo Vermelho Eutroférico, em Londrina, PR após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC).....	93
Tabela 2 – Carbono e nitrogênio (CT e NT), biomassa microbiana (CBM) e (NBM) e quociente microbiano ($qMic$) em um Latossolo Vermelho Eutroférico de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC).....	97
Tabela 3 – Respiração basal (RB), respiração basal induzida (RB(i)), quociente metabólico (qCO_2) e quociente metabólico ($qCO_2(i)$) em um Latossolo Vermelho Eutroférico de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC).....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de solos compactados e não compactado	24
Figura 2 – Esquema demonstrando a mobilidade do fragmento de DNA em relação ao gradiente desnaturante	34
Figura 3 – Reação completa da análise de nitrogênio da biomassa microbiana, formação do complexo azul de indofenol.....	43
Figura 4 – Esquema da formação do gradiente no gel, a partir das soluções de menor e maior concentração	52
Figura 5 – Comparação da densidade do solo em diferentes profundidades sob PD e PC	54
Figura 6 – Dendrograma obtido a partir da análise de DGGE, amplificado com os primers universais para o gene 16S ribossomal. Análise realizada utilizou o programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e índice de tolerância de 5%.....	66
Figura 7 – Dendrograma obtido a partir da análise de DGGE, amplificado com os primers universais para o gene 18S ribossomal. Análise realizada utilizou o programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e índice de tolerância de 5%.....	67
 Anexo A	
Figura 1 – Densidade aparente do solo em um Latossolo Vermelho Eutroférico de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC)	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

BMS	Biomassa Microbiana do Solo	C	Carbono
NBM	Nitrogênio da biomassa microbiana	N	Nitrogênio
CBM	Carbono da biomassa microbiana	P	Fósforo
F	Fumigada	K	Potássio
NF	Não fumigada	Ca	Cálcio
PD	Plantio direto	Mg	Magnésio
PC	Plantio convencional	mg	Miligramma
MOS	Matéria orgânica do solo	g	Gramma
FI	Fumigação incubação	kg	Quilograma
FE	Fumigação extração	t	Tempo (horas ou dia)
D.O	Densidade óptica	s	Segundos
M	Molar	min	Minutos
N	Normal	h	Horas
CTC	Capacidade de troca catiônica	μL	Microlitro
TFSA	Terra fina seca ao ar	mL	Mililitro
Vb	Volume (mL) HCl branco	L	Litro
Va	Volume (mL) HCl amostra	nm	Nanômetro
K	Constante, KN para N e KC para C.	m³	Metro cúbico
SS	Solo Seco	m	Metro
UA	Umidade da amostra		
UD	Umidade desejada		
Su	Solo úmido		
Ps	Peso seco 1g solo úmido		
Fc	Fator de conversão (1mL NaOH 0,5M = 11 mg CO ₂)		

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	USO E MANEJO DE SOLOS AGRÍCOLAS	18
2.2	QUALIDADE DO SOLO X DIVERSIDADE MICROBIANA	20
2.3	INDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO	21
2.3.1	Indicadores Químicos	22
2.3.2	Indicadores Físicos	23
2.3.3	Indicadores Biológicos	25
2.3.3.1	Biomassa microbiana do solo	26
2.3.3.2	Respiração basal (RB)	27
2.3.3.3	Quociente metabólico (qCO_2)	28
2.3.3.4	Quociente microbiano ($qMic$)	29
2.3.3.5	Análise enzimática	29
2.4	ANÁLISE MOLECULAR DA DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO	30
2.4.1	Análise da Comunidade Microbiana Via Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)	32
2.4.1.1	Princípio do método	33
3	JUSTIFICATIVA	35
4	OBJETIVOS	36
5	MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1	DESENHO EXPERIMENTAL	37
5.2	ANÁLISE FÍSICA	37
5.3	ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO	38
5.3.1	pH e Acidez Potencial	38
5.3.2	Macronutrientes	38
5.3.2.1	Análise de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} , por extração em solução de KCl 1M	38
5.3.2.2	Análise de P e K^+ , por extração em solução de Mehlich	39

5.3.3	Carbono Total.....	39
5.3.4	Preparo de Soluções	40
5.4	AVALIAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA PELO MÉTODO FUMIGAÇÃO- EXTRAÇÃO (FE).....	41
5.4.1	Extração.....	41
5.4.2	Análise do Carbono	42
5.4.2.1	Preparo de soluções.....	42
5.4.3	Análise do Nitrogênio	44
5.4.3.1	Preparo das soluções	44
5.5	AVALIAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA PELO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO- INCUBAÇÃO (FI).....	44
5.5.1	Preparo das Amostras.....	45
5.5.2	Quantificação de C-CO ₂ por Titulação.....	46
5.6	CÁLCULOS	46
5.7	ANÁLISE ENZIMÁTICA B-GLICOSIDASE.....	47
5.7.1	Preparo de Soluções	
5.8	ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)	47
5.8.2	Extração do DNA Total do Solo	47
5.8.2.1	Teste da extração do DNA total do solo	48
5.8.3	Amplificação do 16S rDNA (bactérias) e 18S rDNA (fungos) para DGGE.....	49
5.8.3.1	Comunidade bacteriana (com base no 16S rDNA).....	49
5.8.3.2	Comunidade fúngica (com base no 18S rDNA)	50
5.8.3.3	Teste de amplificação dos fragmentos de 16S e 18S rDNA.....	51
5.8.4	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	51
5.8.4.1	DGGE da comunidade bacteriana.....	52
5.8.4.2	DGGE da comunidade fúngica.....	53
5.9	ANÁLISE DE DADOS	53
5.9.1	Análise Estatística	53
5.9.2	Análise Qualitativa	53
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1	ALTERAÇÕES DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS NO PD E PC EM DIFERENTES PROFUNDIDADES DE SOLO.....	54

6.2 ALTERAÇÕES DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS NO PD E PC EM DIFERENTES PROFUNDIDADES DE SOLO.....	55
6.3 EFEITOS DO MANEJO DE SOLO NA BIOMASSA MICROBIANA.....	58
6.4 ATIVIDADE MICROBIANA E EFICIÊNCIA NO USO DO CARBONO DO SOLO	62
6.5 EFEITO DO MANEJO DE SOLO NA ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS	65
6.5.1 Comunidade Bacteriana	66
6.5.2 Comunidade Fúngica.....	67
CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	83
ANEXO A – Artigo: Quantificação e atividade da biomassa microbiana do solo em diferentes profundidades após duas décadas de cultivo sob os sistemas de plantio direto e plantio convencional no paraná	84
ANEXO B – Normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.....	105

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas agrárias devem desenvolver práticas agrícolas que proporcionem alta produtividade das culturas e considerem a sustentabilidade ambiental. O manejo inadequado do solo resulta em perda de matéria orgânica do solo (MOS), deterioração das propriedades físicas, químicas e biológicas (sobretudo da microbiota do solo) e, conseqüentemente, reduzem a produtividade e a sustentabilidade da produção. O balanço dos fatores físicos, químicos e biológicos do solo, este último constituído por uma enorme diversidade de macro e microrganismos, é essencial para o bom funcionamento dos ecossistemas agrícolas. Os macro e microrganismos do solo realizam funções essenciais para o bom funcionamento do mesmo, tais como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, associações simbióticas com as raízes das plantas, controle biológico de patógenos, degradação de substâncias tóxicas, solubilização de minerais e contribuem para a estruturação e agregação, entre outros (Kennedy e Doran, 2002; Nogueira et al., 2006; Kaschuk et al., 2010). Essas funções estão diretamente relacionadas à qualidade do solo que, por sua vez, está associada à sustentabilidade agrícola, com reduzido impacto ambiental.

Na última década, houve um crescimento acentuado na busca por critérios objetivos de avaliação da qualidade do solo, indo além das análises químicas e físicas tradicionais. Um bom indicador de qualidade do solo é aquele que infere medidas qualitativas e quantitativas nos processos ecológicos e nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, imediatamente após qualquer mudança do ambiente. Neste aspecto, diversos estudos têm evidenciado que avaliações microbiológicas são fundamentais para a avaliação da qualidade do solo e da sustentabilidade dos sistemas agrícolas, (Kaschuk et al., 2010). Segundo Pankhurst e colaboradores (1998), os bioindicadores mais eficazes são: biomassa microbiana do solo (BMS), respiração basal (RB), quociente metabólico (qCO_2), atividade enzimática, análises qualitativas da comunidade microbiana, entre outros. A avaliação ambiental, através do monitoramento microbiano é relacionada diretamente à reação natural dos organismos vivos aos estímulos que ocorrem no ambiente (Lima, 2001). Assim, a microbiota do solo (ou BMS) é um ótimo indicador de mudanças ambientais, possibilitando detectar alterações provocadas por diferentes manejos do solo e das culturas em um estágio anterior ao das mudanças nos atributos químicos e físicos (Balota et al., 1998, 2003, 2004; Franchini et al., 2007; Hungria et al., 2009; Kaschuk et al., 2010). Além disso, parâmetros relacionados à

atividade bioquímica e metabólica dos microrganismos podem ser utilizados como indicadores de qualidade do solo (Mendes et al., 2003; Chaer e Tótola, 2007).

Além da BMS e da atividade metabólica, a diversidade microbiana possui características interessantes como indicadores de qualidade do solo, pois representa um reservatório de recursos genéticos para o avanço da biotecnologia, por exemplo, na busca por biocatalisadores de interesse industrial. No solo, diferentes microrganismos produzem diferentes moléculas, produtos do metabolismo primário, secundário e, também, várias enzimas para ativação e degradação dessas moléculas. A biotecnologia pode obter benefícios econômicos com a caracterização e organização da diversidade microbiana do solo e a manipulação de propriedades biológicas (Hunter-Cevera, 1998). De acordo com Oliveira e Manfio (2006), o estudo da diversidade microbiana é uma ferramenta altamente eficiente para a descoberta de novas enzimas para o mercado tecnológico.

Contudo, é extremamente importante desenvolver metodologias rápidas e eficientes para avaliar e monitorar a comunidade microbiana do solo, a sua composição, diversidade, biomassa e seu impacto sobre a produtividade das plantas. É importante estabelecer critérios para a utilização desses dados como indicadores do estado da qualidade do solo. Como exemplo, a redução da diversidade microbiana pode ser um importante indicador da perda de qualidade do solo, porque maior diversidade revela o equilíbrio entre os diversos organismos e domínios funcionais no solo (Lavelle, 2000; Mazzola, 2004). Além disso, Kaschuk et al. (2010) argumentam que é preciso avançar no entendimento das relações entre BMS, diversidade e funcionalidade dos microrganismos do solo para maximizar os benefícios da qualidade do solo para a produtividade agrícola e a sustentabilidade ambiental.

Este trabalho relaciona parâmetros químicos, físicos e microbiológicos do solo a fim de identificar as relações entre qualidade do solo e BMS, diversidade e funcionalidade de microrganismos em diferentes profundidades de solos, cultivados sob os sistemas de manejo do solo conhecidos como plantio direto (PD) e plantio convencional (PC). Mais especificamente, os seguintes parâmetros foram avaliados: densidade do solo, carbono orgânico total (CT), macro e micronutrientes do solo, RB, BMS (medidos pelo conteúdo de carbono e nitrogênio, respectivamente, CBM e NBM), $q\text{CO}_2$, atividade enzimática e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) de bactérias e fungos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 USO E MANEJO DE SOLOS AGRÍCOLAS

A sustentabilidade da produtividade agrícola requer o uso otimizado dos fatores de produção e recursos naturais. Como exemplo, o solo da floresta encontra-se coberto pela vegetação nativa que o protege da erosão, mantendo-o em equilíbrio com os fatores de sua formação e sua degradação. Da mesma maneira, o manejo correto dos resíduos agrícolas é essencial para a atividade biológica, para o potencial produtivo, e para a melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Conforme Gliessman (2001), a agricultura sustentável é aquela que permite colher biomassa de um sistema sem afetá-lo, de forma que ele possa renovar-se por si só. Entretanto, se não houver um monitoramento adequado da qualidade do solo, alterações negativas nas características do solo podem levar à queda da produção e, conseqüentemente, à degradação do ecossistema agrícola (Siqueira et al., 1994). Portanto, para atingir a sustentabilidade da produtividade, é preciso adotar práticas agrícolas racionais que preservem os recursos naturais.

A agricultura é constantemente inovada e tem sofrido variações extremas, desde a prática nômade com queima de palhada, arado e intenso preparo mecânico da terra, até a correção química do solo e o melhoramento genético das culturas. Recentemente, o plantio direto (PD) sobre a palhada, um sistema conservacionista caracterizado pelo não revolvimento do solo, se tornou o sistema de manejo do solo mais difundido no Brasil, e já cobre cerca de 70% da área cultivada com culturas anuais no país (Embrapa, 2009). O PD contrasta com o plantio convencional (PC) que revolve o solo através de aração e gradagem antes do plantio, acelerando os processos de erosão hídrica e degradando o solo pela perda da sua qualidade estrutural. Além disso, o PC é de pouca vantagem para o produtor rural porque leva ao consumo elevado de combustíveis e uso intenso de mão-de-obra para o preparo da terra. O PD, consome cerca de 50% a 80% menos combustível nas operações de preparo do solo e reduz em 30% a 50% os custos com mão-de-obra, em comparação com o PC, diminuindo significativamente os custos de produção por hectare (Derpsch et al., 1991; Hungria et al., 1997; Lal, 1993). A atual ratificação do Protocolo de Kyoto, assume que os países desenvolvidos devem reduzir as emissões de gases causadores do efeito estufa, e

futuramente os produtores rurais que adotarem o PD, além de evitar as emissões de toneladas de gases de efeito estufa, teriam uma renda adicional (Roscoe et al., 2006a). Ademais, considerando os efeitos benéficos do manejo, o PD permite o sequestro de CO₂ em torno de 0,5 a 0,8 toneladas de CO₂ por hectare, devido à diminuição da queima de combustíveis fósseis e ao aumento no aporte de resíduos vegetais para o solo. (Leite, 2009).

Com relação à qualidade do solo, estudos têm mostrado que a adoção do sistema de PD afeta as propriedades físicas (Peixoto et al., 2006), químicas (Ekenler e Tabatabai, 2003) e biológicas (Matsuoka et al., 2003; Franchini et al., 2007; Hungria et al. 2009) do solo, na maioria das vezes, trazendo modificações favoráveis para a sustentabilidade da produção (Brady e Weil, 2002; Kaschuk et al., 2010). O PD, além de favorecer propriedades químicas para o crescimento e atividade da microbiota do solo, como teores adequados dos macro e micronutrientes, pH, CTC, entre outros (Franchini et al., 1999), leva ao maior acúmulo de MOS em comparação com o sistema PC de preparo de solo (Bayer et al, 2002; Franchini et al, 2000, 2007; Scalea, 2004). O incremento no conteúdo de MOS proporciona melhor estruturação e resistência à erosão, além de representar um reservatório importante de nutrientes para as plantas e microrganismos (Paul e Clark, 1996). O PD também favorece a formação dos macroagregados, melhorando a infiltração de água e a aeração do solo (Castro-Filho et al., 1998, 2002; Franchini et al., 2000). Por isso, o PD proporciona menores oscilações térmicas e desagregação do solo, mantém a umidade do solo elevada (Derpsch et al., 1991; Lal, 1993; Hungria et al., 1997) e suporta melhor as atividades biológicas. Além disso, no PD, o carbono presente no interior dos agregados permanece preservado, resultando que a sua liberação para os microrganismos do solo é realizada de forma equilibrada diminuindo as perdas de nutrientes por lixiviação e volatilização (Mendes et al., 2003).

Um fato interessante é que as respostas do solo para os dois sistemas de preparo tendem a ser diferentes em profundidade. Solos submetidos ao PD acumulam mais MOS e nutrientes superficialmente, o que resulta em melhor desenvolvimento microbiano nos primeiros centímetros de profundidade e desenvolvido microbiano reduzido nas camadas mais profundas (Doran, 1980). No PC, através da aração do solo, o revolvimento é normalmente feito até uma profundidade aproximada de 20 cm e, com isso, ocorre a incorporação de resíduos e uma distribuição homogênea da população microbiana (Cattelan e Vidor, 1990). Uma característica marcante no PC é que o carbono presente no interior dos agregados se torna rapidamente disponível para os microrganismos do solo como fonte de energia (Mendes

et al., 2003), incrementando a atividade microbiana e a liberação de CO₂ na atmosfera, muitas vezes de maneira menos eficiente do que no PD (Pereira et al., 2007; Hungria et al., 2009).

Baixos conteúdos de matéria orgânica em geral representam a principal causa do adensamento do solo nas camadas mais profundas no PC, dificultando a penetração das raízes, em consequência do aumento de resistência do solo (Bruce et al., 1999; Costa et al., 2006). De modo semelhante, o não revolvimento do solo e o uso de máquina pesadas no PD resultam em consolidação da superfície, um processo que precisa ser melhor estudado, pois existe diferença na estrutura quando se compara diferentes tipos de solos, cultivos e tempo de condução do sistema (Vieira, 1985; Eltz et al., 1989). Contudo, apesar do PD promover um aumento na densidade do solo nas camadas superficiais, esse sistema ainda é uma alternativa interessante, pois os teores de MOS nessas áreas podem alcançar e até ultrapassar quantitativamente os valores dos ecossistemas naturais (Séguy e Bouzinac, 2001).

Em geral, o PD é considerado um sistema eficiente para alcançar a agricultura sustentável em condições tropicais e subtropicais, devido à melhoria da qualidade física, química e biológica do solo e ao sequestro de carbono (Kladivko, 2001). Por outro lado, o PC é normalmente acelerador dos processos de erosão, pois exige um intenso revolvimento mecânico do solo, ocasionando a sua degradação, pela perda da qualidade estrutural, aumento da erosão hídrica, maior oscilação térmica, alto consumo de combustível e gasto de mão-de-obra.

2.2 QUALIDADE DO SOLO X DIVERSIDADE MICROBIANA

A qualidade do solo é definida como a capacidade de manter a produtividade biológica, qualidade ambiental, promover a saúde de plantas e animais, podendo influenciar na produtividade e sustentabilidade global do agroecossistema. O seu estudo é importante para fornecer informações sobre o manejo do solo e assegurar a melhor utilização desse recurso. Um solo equilibrado proporciona condições de desenvolvimento adequado para as plantas expressarem todo o seu potencial produtivo (Doran e Parkin, 1994).

Os microrganismos do solo realizam funções importantes, tais como: a fixação de nitrogênio atmosférico, a decomposição de MOS, a degradação de toxinas, a ciclagem de nutrientes (aumentando a disponibilidade de nitratos, sulfatos, fosfatos e metais

essenciais à diversidade biológica existente, bem como às plantas), entre outros. Dessa forma, direta ou indiretamente, eles sustentam a população mundial e mantêm o equilíbrio dos ecossistemas (Vargas e Hungria, 1997; Kaschuk et al., 2010). Devido à grande diversidade genética, a microbiota ocupa todos os nichos terrestres, adaptando-se às mais diversas alterações ambientais. Entretanto, a comunidade microbiana do solo é sensivelmente influenciada pelas características físicas (umidade, aeração, temperatura), químicas (disponibilidade de nutrientes) e biológicas (atividade da meso e macrofauna) do solo e essas, por sua vez, podem ser alteradas devido à intensidade de revolvimento e à cobertura vegetal, através da deposição dos resíduos das culturas anteriores (Hungria et al., 2009). Portanto, considerando a influência conjunta de todos os fatores que regulam as atividades biogeoquímicas do solo, a microbiota é um indicador sensível para avaliar as mudanças no solo resultantes de diferentes práticas e sistemas de manejo (Loreau et al., 2001; Hofman et al., 2003; Kaschuk et al., 2010).

A quantificação biológica do solo é possível através de avaliações da atividade enzimática, taxa de respiração, diversidade e carbono e nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM, respectivamente), as quais se enquadram em quase todos os critérios para bioindicadores de qualidade do solo (Kennedy e Papendick, 1993; Pankhurst et al., 1998). Entretanto, a utilização de todos esses indicadores microbiológicos descritos como uma avaliação ambiental é algumas vezes inviável por limitações de tempo, mão-de-obra e custo. Dessa forma, há estudos para a definição de um número mínimo de indicadores (Souza et al., 2008b). Os critérios para a escolha das variáveis mais adequadas devem estar relacionados à capacidade do bioindicador em refletir sensivelmente os processos que ocorrem no ecossistema e que integram propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Doran e Parkin, 1994; Stenberg, 1999; Souza et al., 2008a, 2008b; Kaschuk et al., 2010).

2.3 INDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO

A avaliação da qualidade do solo é feita através do monitoramento de indicadores físicos, químicos e biológicos, os quais são modificados com os diferentes sistemas de manejo de solo. Islam e Weil (2000) dividiram os indicadores do solo em três grandes grupos:

- a. *Permanentes*: estes são intrínsecos ao solo: profundidade, camadas restritivas, textura, mineralogia.
- b. *Temporários*: cujas alterações ocorrem em curto espaço de tempo, ou que são modificados pelas práticas de cultivo: umidade do solo, densidade, pH, disponibilidade de nutrientes.
- c. *Intermediários*: agregação, biomassa microbiana do solo (BMS), quociente metabólico microbiano (qCO_2), carbono orgânico total (CT) entre outros. Esses indicadores são de maior relevância, por possuírem grande influência sobre a capacidade do solo em desempenhar suas funções essenciais.

Determinar a boa qualidade do solo em áreas agrícolas utilizando um único parâmetro não é uma tarefa fácil, porque é praticamente impossível determinar valores de referência absolutos e confiáveis para cada um dos parâmetros (Lal, 1999; Kaschuk et al., 2010). Portanto, as estratégias de avaliação que consideram a necessidade de um conjunto numeroso de atributos químicos, físicos e biológicos do solo são as que resultam em um índice mais confiável para avaliar a qualidade do solo (Larson e Pierce, 1991; Doran e Parkin, 1994), muito embora sejam necessários estudos para a definição de um número mínimo de indicadores (Souza et al., 2008b).

2.3.1 Indicadores Químicos

Os valores de referência para indicadores químicos de fertilidade estão bem definidos para cada elemento e tipo de solo. Por outro lado, enquanto que a base de informações disponíveis sobre os dados biológicos ainda é pequena, visto que tais parâmetros podem variar conforme o tipo de solo, sistemas de manejo e condições climáticas (Santana e Bahia-Filho, 1999).

A caracterização química é determinada por variáveis que indicam o comportamento do solo, como pH e C, ou elementos essenciais às plantas, tais como o nitrogênio (N), o fósforo (P), o potássio (K), o cálcio (Ca), o magnésio (Mg) e

micronutrientes. Através da análise desses nutrientes, é possível fazer as correções necessárias para permitir o crescimento adequado das plantas.

Apesar do C não ser um nutriente da planta, ele é um importante componente da MOS. Baixos valores de MOS podem afetar a produtividade das plantas em razão do efeito da MOS na fertilidade através da capacidade de troca de cátions (CTC) do solo, do seu poder de tamponamento frente à presença de compostos muitas vezes tóxicos às plantas, da liberação de micronutrientes após a sua decomposição, e da sua capacidade de retenção da umidade no solo. Portanto, solos com altos valores de MOS são mais desejáveis. O CBM representa, em geral, de 2 a 5% do teor de CT (Jenkinson e Ladd, 1981; Smith e Paul, 1990).

O N é um dos nutrientes requeridos em maior quantidade pelas plantas. O N do solo está disponível para as plantas nas formas nítrica (NO_3^-) e amoniacal (NH_4^+). O N é facilmente transportado pelo fluxo de massa do solo e prontamente absorvido pelas plantas, de forma que a capacidade de mineralização do N é proporcional à produtividade das culturas. Contudo, se a taxa de mineralização for muito rápida, o N também pode ser perdido para o ambiente, por lixiviação, denitrificação e volatilização.

2.3.2 Indicadores Físicos

O solo é formado por substrato proveniente de rochas intemperizadas, MOS, ar e água (Figura 1). A fração sólida sofre variações muito lentas, mas as frações nos interstícios da matriz do solo, preenchidos por ar e água, se alteram com facilidade e rapidez. A estabilidade estrutural do solo aumenta com a atividade biológica e está associada diretamente com o conteúdo de matéria orgânica (Walker, 1996). A água no solo é retida pela superfície dos sólidos basicamente por interações elétricas e forças capilares, que estão restritas, basicamente, às camadas superficiais (Libardi, 2000). Um dos atributos mais importantes é o conteúdo da água no solo, uma vez que participa de processos importantes bioquímicos, crescimento das plantas, reciclagem de vários elementos químicos, entre outros. A baixa disponibilidade de água, por exemplo, quando a transpiração é maior que absorção, estressa as plantas e ocasiona redução do crescimento e da fotossíntese, entre outros (Benet e Sullivan, 1981; Berkowitz, 1998).

As propriedades físicas do solo, como profundidade e densidade são de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento das plantas. As características físicas do solo são interdependentes e a modificação de uma delas normalmente resulta na modificação das demais (Vieira, 1985). Uma das principais causas da degradação do solo resulta de sua compactação com aumento na densidade aparente do solo (Camargo e Alleoni, 1997).

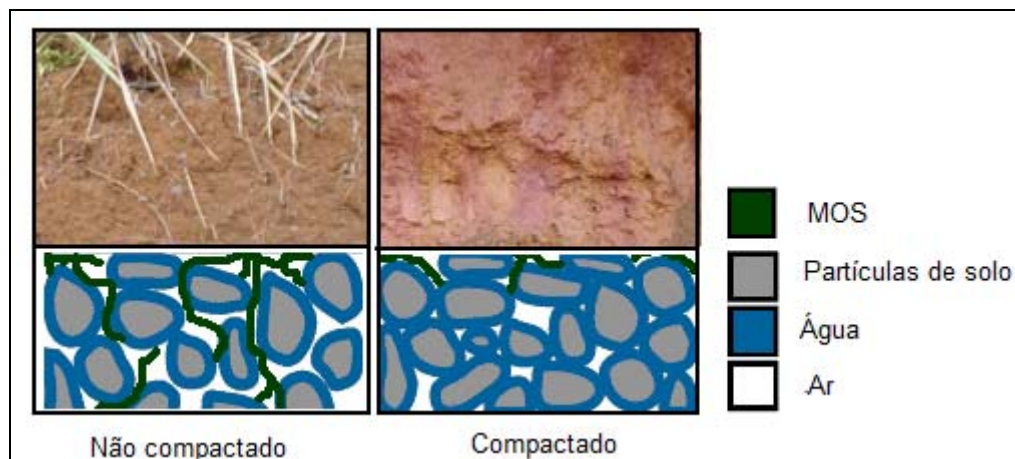


Figura 1 – Estrutura de solos compactado e não compactado.

A compactação é um conceito complexo e de difícil descrição, pois há variação natural entre os diferentes tipos de solo. É definida como uma alteração no arranjo das partículas constituintes do solo, aumentando a concentração de massa. Ademais, a compactação está relacionada ao decréscimo do volume de solos não saturados através de uma pressão externa quando há tráfego de máquinas agrícolas, equipamentos ou animais (Camargo e Alleoni, 1997; Lima, 2004). A compactação é totalmente dependente da umidade, textura, teor de MOS, quantidade e distribuição de massa vegetal presente no solo. Entretanto, não há um índice de compactação bem estabelecido para as diferentes culturas e tipos de solo. Schafer et al. (1992) afirmaram que as pesquisas devem estabelecer uma relação entre compactação e sua influência com os fatores produtivos, de modo a estabelecer uma maneira de relacionar um grau de compactação em níveis de produção e conservação dos recursos naturais.

2.3.3 Indicadores Biológicos

Consideram-se como bioindicadores do solo, as propriedades biológicas que indicam o estado do ecossistema e que podem ser utilizados no biomonitoramento da qualidade do solo (Doran e 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 indicando que alterações na microbiota podem preceder às mudanças nas propriedades químicas e físicas, sendo, portanto indicadores valiosos dos impactos positivos ou negativos no solo (Stenberg, 1999; Balota et al., 1998; Franchini et al., 2007; Hungria et al., 2009; Kaschuk et al., 2010). Entretanto, embora os microrganismos possam ser utilizados como bioindicadores sensíveis da qualidade do solo, existe uma relação desses com outros atributos do solo e nenhum indicador individual poderá quantificar todos os aspectos da qualidade do solo.

Além disso, existem dificuldades na busca por correlações entre indicadores biológicos e a indicação se um solo é bom ou não, representando um obstáculo a ser transposto nas avaliações de qualidade do solo (Tótola e Chaer, 2002). Mesmo que os indicadores microbiológicos, tais como CMB, NMB, qCO_2 , atividade enzimática, entre outros, possam identificar as alterações devido ao manejo do solo e permitir a adoção antecipada de medidas corretivas quando necessários (Chaer e Tótola, 2007), eles serão mais acurados se forem relacionados conjuntamente com outros atributos independentes (Brookes et al., 1995).

Embora menos estudada, a diversidade microbiana é tão importante quanto à diversidade de plantas e animais, podendo estar relacionada a um efeito “tampão” do solo contra estresses ambientais naturais ou provocados pelo homem (Hungria et al., 2002; Kaschuk et al., 2010). Técnicas moleculares têm permitido identificar que o número de espécies microbianas presentes no solo é muito superior ao estimado pelas técnicas tradicionais de cultivo em placa (Ward et al, 1990; 1993). Recentemente, Roesch e colaboradores (2007) encontraram, em 1 g de solo de floresta 53.533 sequências diferentes do DNA de bactérias, além disso, os resultados obtidos sugeriram que o manejo do solo pode influenciar a diversidade bacteriana. Entretanto, faltam informações para que se possa utilizar a diversidade como parâmetro indicativo das condições do ambiente. As deficiências começam na própria identificação das espécies microbianas, continuando com o pouco

conhecimento existente sobre a estrutura da microbiota do solo e sobre como avaliar essa diversidade para comprovar que o tipo de manejo pode ou não interferir na sustentabilidade do agroecossistema (Rosseló-Mora e Amann, 2001). Frequentemente, um bioindicador é definido como a presença ou ausência de certa espécie microbiana em dada área associada a determinada condição ambiental. Contudo, as características ideais na definição de indicadores biológicos para o monitoramento da qualidade do solo incluem que esses devam ser exatos, fáceis, econômicos e, precisamente avaliados para se obter respostas sobre diferentes tipos e condições de solo; sensíveis ao estresse e serem avaliados cientificamente, garantindo a precisão dos resultados.

2.3.3.1 Biomassa microbiana do solo

A biomassa microbiana do solo (BMS) é definida como todo componente microbiano vivo, composto por organismos menores que $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ (fungos, arqueobactérias, bactérias e microfauna) (Jenkinson e Ladd, 1981; Kaschuk et al., 2010). A BMS possui relações estreitas com a produtividade das plantas, taxa de amonificação, decomposição de resíduos vegetais e a biomassa dos níveis tróficos superiores (Wardle e Hungria, 1994; Franchini et al., 2007; Souza et al., 2008a, 2008b; Hungria et al., 2009), e é fortemente influenciada por variações sazonais relacionadas à umidade e à temperatura, pela adição de resíduos vegetais ao solo, entre outros (Wadle e Hungria, 1994). A BMS também 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 do BMS pode fornecer informações sobre seus aspectos quantitativos, o que permite fazer uma avaliação mais adequada da qualidade de um solo (Cattelan e Vidor, 1990; Kaschuk et al., 2010).

A determinação da BMS permite avaliar de maneira imediata a qualidade do solo através da análise de nutrientes contidos nas células microbianas, como C e N. Representa um indicativo da qualidade do solo responsável por quase toda atividade biológica e representando, em média, de 2 a 5% de C orgânico e de 1 a 5% do N total do solo (Jenkinson e Ladd, 1981; Smith e Paul, 1990).

Os métodos mais utilizados para se estimar a BMS são a fumigação-incubação (FI) (Jenkinson e Powelson, 1976b) e a fumigação-extração (FE) (Vance et al.

1987), os quais medem o conteúdo de carbono da biomassa microbiana (CBM). O método FI baseia-se no fato de que, quando o solo é submetido à fumigação e posteriormente reinoculado com uma subamostra viva do mesmo solo, ocorre um aumento na taxa de CO₂ proveniente da ação dos microrganismos reinoculados que utilizam os constituintes da biomassa morta. O CBM é calculado pela diferença entre as quantidades de CO₂ liberadas durante a incubação do solo fumigado com clorofórmio e o solo não-fumigado, dividida pela fração do carbono da biomassa mineralizada (K_c) em forma de CO₂ (Anderson e Domsch, 1978). O método FE é uma posterior modificação do método FI, proposta por Vance et al. (1987), visando facilitar a análise no laboratório. Esse método também envolve a eliminação da microflora do solo pelo clorofórmio e quantifica o C e o N liberados pela morte dos microrganismos através da extração química (Vance et al., 1987). Apesar das diferenças técnicas, estudos conduzidos no Brasil indicam que ambos FI e FE são eficazes para a determinação da CBM (Balota et al., 1998; D'Andrea et al., 2002; Franchini et al. 2007; Brandão-Júnior et al., 2008).

A determinação de CBM fornece apenas uma análise quantitativa e não discrimina a composição ou estrutura da microbiota do solo. É de extrema importância agregar informações sobre atividade e diversidade da BMS permitindo, assim, uma avaliação mais adequada da qualidade de um solo (Zilli et al. 2003; Araujo et al, 2007, 2008). Essas análises complementares permitiriam que informações sobre a diversidade microbiana dos solos fossem complementadas, indicando se a perda de que BMS também reflete em perda de diversidade genética ou funcional (Kaschuk et al., 2010).

2.3.3.2 Respiração basal (RB)

A avaliação da respiração basal (RB) é baseada em um método tradicional, que determina a produção de CO₂ proveniente da degradação de compostos orgânicos durante a atividade metabólica de uma população microbiana do solo (Lopes, 2001). A determinação desse parâmetro é simples, mas a sua interpretação pode ser complicada, se não houver um conhecimento prévio do ecossistema estudado.

Na verdade, a atividade respiratória (ou RB) dos organismos do solo é considerada um atributo positivo para a qualidade do solo sendo, dessa forma, um indicador sensível da decomposição de resíduos e de distúrbios no ecossistema (Paul et al., 1999). Uma

alta taxa de RB pode ser interpretada como um sinal de rápida decomposição de resíduos orgânicos disponibilizando nutrientes para as plantas. Entretanto, uma alta atividade respiratória também pode ser resultante da intensa decomposição da matéria orgânica estável, a fração húmica. Sendo assim, altas taxas de RB podem levar ao deterioramento dos processos químicos e físicos, como a agregação do solo, a CTC e a capacidade de retenção de água, ocasionando perda de nutrientes. Por isso, altas taxas de RB podem indicar tanto um distúrbio ecológico, como um alto nível de produtividade do ecossistema (Islam e Weil, 2000).

2.3.3.3 Quociente metabólico (qCO_2)

Essa variável foi proposta por Anderson e Domsch (1985). O qCO_2 expressa a quantidade de moléculas de CO_2 produzidas para a incorporação de um átomo de C à biomassa microbiana, e representa a relação entre a RB e o CBM (C_{Resp}/C_{BMS}). Esse parâmetro pode ser altamente influenciado por diversos fatores no solo, como teor de umidade, temperatura, estrutura e disponibilidade de nutrientes.

Klumpp e colaboradores (2003) recomendam a utilização do qCO_2 como indicador de impacto em solos. Segundo esses autores, esse parâmetro mostrou-se mais adequado do que a BMS, apresentando 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 incorporar C aos tecidos microbianos. É interessante que condições desfavoráveis (por exemplo, metais pesados, limitações de nutrientes, baixo pH) e fatores de perturbação (cultivo, queimada, etc.) induzem à redução da eficiência microbiana (Wardle e Hungria, 1994; Kaschuk et al., 2010). Em geral, um baixo qCO_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 e Obo, 1994).

2.3.3.4 Quociente microbiano (q_{Mic})

O quociente microbiano (q_{Mic}) representa a relação entre o CBM e o CT do solo (C_{mic}/C_{org}) e expressa a quantidade de carbono imobilizado na biomassa, indicando todo acúmulo ou perda de C no solo. Quanto mais elevado o valor do q_{Mic} , maior a ciclagem de nutrientes, portanto, maior a eficiência das comunidades microbianas em utilizar o C da MOS mineralizável, imobilizando-o em sua biomassa. Quando a biomassa está sob algum fator de estresse, a capacidade de utilização do C é menor, o acúmulo é maior e há um decréscimo do q_{Mic} (Anderson e Domsch, 1989).

Sparling (1992) recomenda a utilização do quociente microbiano como indicador muito sensível às mudanças na dinâmica da MOS, em solos submetidos a diferentes manejos.

2.3.3.5 Análise enzimática

Os microrganismos representam as principais fontes de enzimas do solo. Estudos sobre a atividade enzimática têm mostrado que esse parâmetro pode ser excelente indicador da qualidade do solo, pois as enzimas desempenham funções essenciais nos ecossistemas. Como as enzimas atuam nas reações metabólicas extracelulares resultantes da decomposição da MOS, elas servem como indicadores da disponibilidade de nutrientes (Quilchano e Maranón, 2002). As enzimas também podem ser relevantes por apresentar alto potencial biotecnológico, com aplicações nas áreas industrial e ambiental (Nielsen e Winding, 2002).

A atividade enzimática é diretamente sensível às características físicas e químicas do solo, quantidade e qualidade da matéria orgânica e variações climáticas (Pennanen et al., 1999; Rezende et al., 2001). A maioria dos estudos de análise enzimática foi desenvolvida em solos agrícolas (Aon et al., 2001), com poucos estudos conduzidos em solos sob florestas, onde a atividade das enzimas microbianas é mais fortemente influenciada por fatores edáficos e climáticos (Mamilov e Dilly, 2002).

Algumas características são observadas na escolha das enzimas utilizadas como indicadores de qualidade, dando preferência às que apresentam maior sensibilidade ao manejo do solo, simplicidade na análise, importância na ciclagem de nutrientes e decomposição da MOS. Na ciclagem de nutrientes, as enzimas de interesse são as que catalisam a hidrólise de constituintes da MOS, como a amilase (E.C 3.2.1.1) e a celulase (E.C. 3.2.1.4). Algumas das enzimas mais comumente utilizadas são aquelas ligadas ao ciclo do C, como a celulase e a β -glicosidase (E.C 3.2.1.21), mas também aquelas associadas ao ciclo do N, [urease (E.C. 3.5.1.5) e amilase (E.C. 3.5.1.4)], do P [fosfatases (E.C. 3.1.3.1)] e do S [arilsulfase (E.C. 3.1.6.1)] (Tabatabai, 1994). A β -glicosidase é uma enzima que atua no processo final de decomposição da celulose pela hidrolisação dos resíduos de celobiose (Tabatabai, 1994). Alterações em sua atividade apontam variações na qualidade do solo. Entre os indicadores avaliados no trabalho de Chaer e Tótola (2007), a atividade da enzima β -glicosidase ficou entre aos indicadores mais sensíveis ao manejo do solo.

As análises enzimáticas têm detectado alterações em solos pelo sistema de manejo utilizado, pela rotação de culturas, entre outras influências antrópicas, com maior antecedência do que indicadores químicos e físicos (Matsuoka et al., 2003; Chaer e Tótola, 2007). Entretanto, avaliações de atributos biológicos ou bioquímicos do solo ainda não são realizadas na rotina dos laboratórios de análise brasileiros, situação esta que poderá ser modificada nos próximos anos.

2.4 ANÁLISE MOLECULAR DA DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO

A ecologia microbiana é o estudo das relações entre microrganismos e sua interação com o ambiente e, em termos moleculares, é caracterizada através da análise de moléculas representativas de organismos, ou processos por eles desencadeados. As técnicas moleculares mais utilizadas em estudos que envolvem a diversidade microbiana são as caracterizações fenotípicas e genotípicas. A caracterização fenotípica se deve à mudanças em meios de cultivo específicos, velocidade de crescimento, morfologia das colônias, entre outros. Mas a descoberta de novos microrganismos se deve as caracterizações genotípicas, através da aplicação de métodos moleculares sem a tradicional necessidade de cultivo, com o

advento das técnicas de reação em cadeia polimerase (PCR) (Saiki et al., 1988) e sequenciamento de DNA (Sanger et al., 1977).

A dificuldade encontrada em estudos de ecologia microbiana sobre análise de amostras ambientais deve-se ao fato de que apenas uma pequena fração dos microrganismos pode ser cultivada através de técnicas tradicionais. Os testes bioquímicos e fenotípicos tradicionais, que auxiliam na identificação das espécies, dependem do cultivo de células bacterianas, normalmente realizado a partir de suspensões de células diluídas serialmente, que são plaqueadas em meio sólido para obter colônias isoladas (Prosser, 2002). A principal consequência dessa dificuldade em cultivar a maioria dos microrganismos é que apenas um baixo número de espécies microbianas foram formalmente descritas até hoje (Pace et al., 1986).

A perspectiva de detecção de uma vasta diversidade de microrganismos não-cultiváveis no solo tem estimulado o desenvolvimento de técnicas que permitam o estudo dessas comunidades microbianas não cultiváveis. Métodos independentes de cultivo tendem a substituir os dependentes para a realização da comparação da composição, diversidade e estrutura das comunidades microbianas. O desenvolvimento de metodologias de extração de DNA do solo também contribuiu para o desenvolvimento da ecologia microbiana molecular. Nos estudos iniciais, a extração de DNA do solo era feita em três dias e necessitava de 60-90 g de solo; hoje, requer menos de 0,5 g da amostra e a extração pode ser feita em menos de 30 min, e com melhor qualidade (Ogram, 2000).

Com o avanço da biologia molecular, a diversidade microbiana passou a ser realizada de forma mais detalhada (Ranjard et al. 2000). Em termos moleculares, a diversidade é caracterizada pelo número de diferentes tipos de sequências de DNA encontradas no ambiente (Liesack et al., 1997). Do ponto de vista prático, a extraordinária atividade microbiana, a sua notável diversidade metabólica e a adaptabilidade genética representam uma fonte importante de recursos genéticos no avanço biotecnológico para o desenvolvimento sustentável (Hugenholtz e Pace, 1996; Kurtböke et al. 2004).

Atualmente, a maioria das técnicas moleculares é baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR), como exemplo a amplificação da região ribossomal conservada de bactérias com *primers* universais que codificam a região cromossomal do 16S rRNA (Woese et al., 1990; Muyzer et al., 1993; Watanabe et al., 2001; Baker et al., 2003). Outras estratégias em estudo de caracterização genética são a clonagem e sequenciamento, e a análise através de gel de eletroforese com gradiente desnaturante (DGGE). Na técnica de DGGE, por

exemplo sequências específicas são distinguidas por diferentes perfis de eletroforese. Cada perfil representa uma comunidade microbiana distinta, incluindo microrganismos que não podem ser cultiváveis tradicionalmente (Ranjard et al., 2000).

É claro que apesar das ferramentas moleculares contribuírem para estudos da biodiversidade, técnicas tradicionais de enriquecimento e cultivo também são essenciais para o conhecimento das capacidades metabólicas e das características fenotípicas dos microrganismos. Dessa forma, o mais adequado para avaliar a diversidade real do ambiente em estudo é uma abordagem polifásica por meio de várias técnicas (Muyzer e Smalla, 1998).

2.4.1 Análise da Comunidade Microbiana via Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE permite distinguir produtos de PCR (da região 16S rRNA, por exemplo) de acordo com as sequências de pares de bases. É uma ferramenta molecular bem estabelecida, rápida e econômica, que permite avaliar a complexidade da comunidade microbiana e acompanhar as mudanças na comunidade com o passar do tempo (Muyzer, 1999; Kennedy e Clipson, 2003). Os genes ribossomais 16S e 18S, encontrados em bactérias e fungos, respectivamente, são os mais utilizados no DGGE para a avaliação de relações filogenéticas. Essa técnica, aliada à bioinformática e às análises estatísticas, é uma ferramenta promissora para a caracterização de como as comunidades microbianas se organizam em diferentes ambientes (Lambais et al., 2005).

A vantagem do DGGE e de outros métodos independentes de cultura reside no poder de detectar indivíduos que são perdidos quando se utilizam técnicas tradicionais de plaqueamento em meio de cultura. Outra vantagem é que esses métodos permitem a análise simultânea de várias amostras, o que permite monitorar a dinâmica complexa da comunidade microbiana e suas flutuações sazonais, ou após perturbações ambientais (Muyzer, 1999; Souza et al., 2008a, 2008b). Entretanto, da mesma forma que outros métodos analíticos, apresentam limitações intrínsecas. No DGGE, uma banda detectada no gel pode representar mais de um genótipo, com sequências divergentes, mas com teores de G + C iguais. Portanto, não é possível estabelecer uma relação direta entre a quantidade de bandas detectadas por DGGE e o número de espécies ou os grupos taxonômicos presentes na amostra. Para a

identificação das espécies, é necessário fazer a excisão do amplicon do gel, reamplificar o DNA e sequenciá-lo (Muyzer e Smalla, 1998; Lambais et al., 2005).

2.4.1.1 Princípio do método

Primeiramente, procede-se à extração de DNA total do solo e amplificação com *primers* específicos da região 16S rRNA (bactérias) ou 18S rRNA (fungos). Os fragmentos de DNA amplificados por esses *primers* são aplicados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante de uréia e formamida. Os fragmentos de DNA com o mesmo tamanho e sequências de ácidos nucleicos diferentes apresentam padrão de desnaturação diferente. Quando o DNA é submetido à eletroforese em condições crescentes de desnaturação, os fragmentos permanecem em dupla fita, até que eles atinjam as condições necessárias para a desnaturação. Em um dos *primers* da reação de PCR, anexa-se um grampo CG de 30 a 50 nucleotídeos para formar uma ligação tripla extremamente forte, com alta resistência à desnaturação, que dificulta a dissociação da fita dupla do DNA em fita simples. Conforme vê-se na figura 2, 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 et al., 1997; 1998). Dado as sequências de até 500 pares de base de comprimento, a técnica de DGGE permite detectar até 95% de todas as substituições em uma única base (nucleotídeo) (Myers et al., 1985).

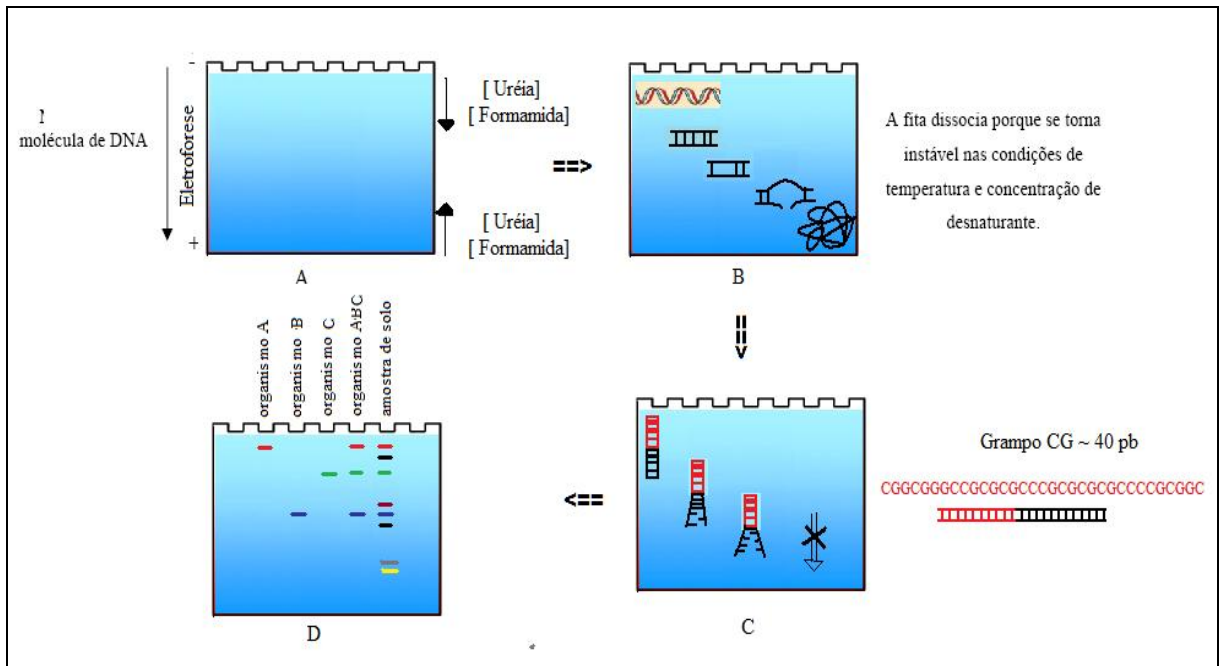


Figura 2 – Esquema demonstrando a mobilidade do fragmento de DNA em relação ao gradiente desnaturante.

3 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos têm concluído que o PD é o sistema de manejo agrícola que melhor preserva a qualidade do solo, em comparação com o PC, acumulando maior MOS e BMS. Entretanto, na maioria desses estudos, a BMS é expressa em termos de massa de BMS por massa de solo (por exemplo, mg CBM kg⁻¹) sem, na verdade, corrigir os valores de BMS de acordo com a densidade de solo. Como consequência as diferenças entre manejos considerando a densidade do solo. Há poucos estudos que consideram a densidade, portanto, é possível que as tão difundidas diferenças de BMS entre PD e PC sejam reduzidas ou até mesmo anuladas, se os valores de BMS forem devidamente corrigidos pela densidade do solo.

Da mesma maneira, os estudos de atividade enzimática e diversidade microbiana em diferentes manejos de solo em geral têm considerado apenas a camada superficial do solo. Como os manejos de PD e PC alteram a densidade do solo, é possível que ocorram diferenças importantes na atividade metabólica e na sobrevivência dos microrganismos (por exemplo, por diferenças na aeração, umidade) com a profundidade do solo. Somente pela comparação de diversas profundidades seria possível, portanto, verificar o impacto real causado ao solo pelos sistemas de PD e PC.

4 OBJETIVOS

- 1 Verificar diferenças nas propriedades físicas e químicas em diferentes profundidades em um solo do Paraná submetido aos sistemas de manejo PD e PC há 20 anos.
- 2 Comparar parâmetros quantitativos (CBM e NBM) qualitativos (DGGE) de populações microbianas em diferentes profundidades em solo do Paraná submetido aos sistemas de manejo PD e PC há 20 anos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi estabelecido na área experimental da Embrapa Soja (Londrina, PR) no verão de 1988/89, com delineamento de blocos ao acaso e quatro repetições. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico, o qual contém 71% de argila, 16% de silte e 12% de areia. As unidades experimentais medem 7,5 x 30 m, ou seja, 225 m².

Esse estudo comparou o sistema de cultivo de plantio direto (PD) e convencional (PC) em uma sucessão de culturas, que intercala soja e trigo nos períodos de verão e inverno, respectivamente. A coleta foi realizada em 14/01/2009, quando a soja estava no estágio R2 (florescimento pleno). As amostras foram coletadas na entrelinhas de cultivo nas profundidades 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 e 50-60 cm. Em cada unidade experimental e profundidade foram coletadas cinco amostras, que foram homogeneizadas, dando origem a uma amostra composta. As amostras foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos dentro de uma caixa de isopor. No laboratório, foram armazenadas em refrigerador a, aproximadamente, 4°C, por no máximo 10 dias. Aproximadamente 20 g da amostra foram mantidas a -80°C para posterior análise qualitativa da diversidade microbiana.

5.2 ANÁLISE FÍSICA

Introduziram-se cilindros de 5 cm de diâmetro e 5 cm de altura no solo (3 cilindros por profundidade). Com o auxílio de uma pá de corte, retirou-se o solo que envolvia o cilindro, e retirou-se o cilindro do perfil. O solo foi removido do cilindro e levado à estufa sob temperatura de 105-110°C por 48 h. A determinação da densidade aparente foi calculada com base na divisão da massa do solo seco (g) pelo volume do cilindro (cm³), e dessa forma, expressa em g cm⁻³(Embrapa, 1979).

5.3 ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

As amostras de solo destinadas à caracterização química foram secas em estufa ventilada a 50°C [daqui em diante, passam a ser chamadas terra fina seca ao ar (TFSA)], desagregadas e peneiradas em malha de 2 mm. Procedeu-se à quantificação do pH, H + Al, Al³⁺, P, C, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺, conforme análises de rotina (Embrapa, 1979).

5.3.1 pH e Acidez Potencial

Submostras de 8 g de TFSA foram suspensas em 20 mL de CaCl₂.2H₂O 0,01 M, sob agitação, a 220 rpm durante 30 min. Procedeu-se, então, a leitura de pH da amostra no potenciômetro (Jenway modelo 3510). Para a determinação da acidez potencial (Al + H) utilizou-se o método de análise baseado no poder tampão da solução SMP. (A sigla SMP se refere a Shoemaker, Mac lean e Pratt, criadores do método). Subamostras de 8 g de TSFA foram suspensas em tubos contendo 20 mL de solução SMP. As suspensões foram agitadas a 220 rpm por 15 min e deixadas em repouso por uma noite. No dia seguinte, as suspensões foram novamente agitadas por 5 min e, após 20 min de repouso, submetidas à leitura em potenciômetro.

5.3.2 Macronutrientes

5.3.2.1 Análise de Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺, por extração em solução de KCl 1M

Amostras de 5 g de TSFA foram suspensas em 50 mL de KCl 1 M. As suspensões foram agitadas a 200 rpm por 15 min, deixadas em repouso por uma noite para decantação do solo e obtenção do extrato (sobrenadante transparente).

Para a análise de Ca e Mg trocável, pipetaram-se 200 μL do extrato, adicionaram-se 9,8 mL de La_2O 0,1% e, então, procedeu-se à leitura por absorção atômica (Varian, modelo Spectr AA-800). Para a análise de Al^{3+} trocável, pipetaram-se 15 mL do extrato, adicionaram-se 20 mL de água destilada e, então, procedeu-se à leitura por titulação com NaOH 0,015 M, em presença de azul de bromotimol 0,2%.

5.3.2.2 Análise de P e K^+ , por extração em solução de Mehlich

Amostras de 5 g de TSFA foram suspensas em 50 mL de solução Mehlich. A seguir, as suspensões foram agitadas à 200 rpm por 10 min, deixadas em repouso por uma noite para decantação do solo e obtenção do extrato (sobrenadante transparente).

Para a análise de P, pipetaram-se 5 mL do extrato, adicionaram-se 10 mL da solução molibdica diluída e 0,2 mL de ácido ascórbico 1%. Após 30 min de repouso, o P foi determinado através do complexo fosfomolibdico em espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm. O K^+ foi dosado no extrato por fotometria de chama (Micronal B 462).

5.3.3 Carbono Total

O teor de C total foi determinado pela metodologia de Raij et al. (2001), cuja determinação de matéria orgânica consiste em sua oxidação através da redução do $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em meio ácido.

Para a análise de C total, pesou-se 1 g de TFSA em tubos de reação, adicionaram-se 10 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1M e 10 mL de H_2SO_4 comercial e, após o resfriamento da reação, adicionaram-se 50 mL de água destilada. A seguir, os tubos foram agitados manualmente e deixados em repouso por uma noite. No dia seguinte, procedeu-se à quantificação no espectrofotômetro com comprimento de onda de 630 nm.

5.3.4 Preparo de Soluções

- **CaCl₂.2H₂O 0,01 M:** dissolveram-se 1,47 g de CaCl₂.2H₂O em 1 L de água destilada.
- **Solução de SMP:** adicionaram-se sequencialmente na seguinte ordem (por L de solução): 424,8 g de CaCl₂.2H₂O, 24 g de K₂CrO₄, 16 g de Ca(H₃CCOO)₂, 20 mL de C₆H₁₅NO₃ e 14,58 g de C₆H₅NO₃. O C₆H₅NO₃ teve que ser dissolvido em água deionizada aquecida e, depois de resfriado, foi misturado à solução dos outros reagentes.
- **KCl 1 M:** dissolveram-se 75,56 g de KCl em 1 L de água destilada.
- **La₂O 10%:** dissolveram-se 117,3 g de La₂O em 150 mL de ácido nítrico concentrado. Após esfriamento, completou-se com água destilada o volume de 1 L.
- **La₂O 0,1%:** diluíram-se 10 mL da solução de La₂O 10% em água destilada até o volume de 1 L.
- **NaOH 0,015 M:** dissolveu-se 0,6 g de NaOH em 1 L de água destilada.
- **C₂₇H₂₈Br₂O₅S 0,4%:** dissolveu-se 0,4 g do C₂₇H₂₈Br₂O₅S em 2 mL de NaOH 0,1 M e deixou-se a solução em repouso. No dia seguinte, completou-se com água destilada para o volume de 100 mL.
- **Solução de Mehlich:** adicionaram-se 4,14 mL de HCl concentrado e 7 mL de H₂SO₄ concentrado em cada L de solução.
- **Molibdica concentrada:**
Solução 1: dissolveram-se 20 g de Bi₂O₂(CO₃) em, aproximadamente, 250 mL de água destilada. À essa solução, adicionaram-se lentamente 150 mL de H₂SO₄ concentrado. Solução 2: Dissolveram-se 20 g de ((NH₄)₆Mo₇)₂₄.4H₂O em 200 mL de água deionizada. Misturaram-se as duas soluções, e completou-se o volume para 1 L.
- **Molibdica diluída:** diluíram-se 300 mL da solução molibdica concentrada com água destilada até completar 1 L de solução.
- **C₆H₈O₆ 1%:** dissolveu-se 0,5g de ácido ascórbico em 50 mL de água destilada.

5.4 AVALIAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA PELO MÉTODO FUMIGAÇÃO-EXTRAÇÃO (FE)

Utilizou-se o método de fumigação-extração modificado de Vance et al. (1987) para a análise de carbono da biomassa microbiana (CBM), e o NBM, pelo método proposto por Brookes et al. (1985).

5.4.1 Extração

Pesaram-se 20 g de solo em frascos de vidro (300 mL) para amostras não fumigadas e fumigadas. Para a determinação da umidade, foram pesados 10 g de solo e colocados em estufa por um período de 16 h à temperatura de 105°C (Tabela 1). As amostras fumigadas foram colocadas em uma caixa de vácuo retangular, no escuro, com capacidade para 80 amostras (28 x 36 x 71; altura x largura x comprimento em cm) por 16 h. Para a fumigação, foi colocado um recipiente contendo 50 mL de clorofórmio em cada vértice do interior da caixa. Enquanto as amostras fumigadas estavam sendo incubadas no escuro, as não fumigadas, permaneceram, também na ausência de luz pelo mesmo período das amostras fumigadas. No dia seguinte, as amostras foram deixadas sobre a bancada para eliminação do clorofórmio (cerca de 2 h), e então, suspensas em 50 mL da solução extratora (K_2SO_4 0,5 M). As suspensões foram agitadas em uma mesa agitadora orbital (Tecnal, TE-145) a 175 rpm por 60 min. Posteriormente, foram transferidas para tubos plásticos de centrífuga (100 mL), marca Hettich, e centrifugadas a 3000 g por 10 min. Os sobrenadante foram filtrados em papel qualitativo Whatman® n° 42.

A determinação do CBM foi realizada através de metodologias colorimétricas, conforme descrito no item 5.4.2 e estimada pela diferença de C entre as amostras fumigadas e não-fumigadas, utilizando um K_C de 0,38 para o C (Vance et al., 1987). Nas amostras fumigadas, procedeu-se a determinação do C intra e extracelular pois o clorofórmio rompe a parede celular dos microrganismos. Já nas amostras não fumigadas, fez-se apenas a quantificação do C extracelular. A determinação do NBM foi realizada através de metodologias colorimétricas, conforme descrito no item 2.4.3 e estimado pela diferença de N entre as amostras fumigadas e não-fumigadas, utilizando um K_N de 0,54 (Brookes et al.,

1985). Os valores de biomassa microbiana obtidos foram corrigidos para a umidade e densidade do solo e expressos em g C-BM m⁻³ de solo seco ou g N-BM m⁻³ de solo seco.

5.4.2 Análise do Carbono

O CBM foi determinado por oxidação do C orgânico por KMnO₄ (permanganato de potássio) segundo Bartlett e Ross (1988).

Como o Latossolo Vermelho Eutroférico tem alto teor de matéria orgânica fez-se necessário diluir o extrato. Diluiu-se 0,5 mL do extrato em 0,5 mL da solução extratora. A diluição foi homogeneizada e, nela, adicionaram-se 1 mL da solução de KMnO₄ e 1 mL de H₂SO₄ concentrado. Preparou-se uma curva padrão utilizando ácido oxálico nas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80 e 120 µg mL⁻¹ de C e esperou-se o tempo de reação, isto é, no mínimo 16 h. O teor de C nos extratos foi determinado colorimetricamente no comprimento de onda de 495 nm.

5.4.2.1 Preparo de soluções

- **Solução de permanganato Mn(III):** adicionaram-se na seguinte ordem: 75 mL de Na₄P₂O₇ (pirofosfato) 0,1 M, 12 mL de H₂SO₄ 0,5 M, 5 mL de KMnO₄ (permanganato) 0,1 M e 20 mL de MnSO₄ (sulfato de manganês) 0,1 M . Homogeneizaram-se imediatamente sob agitação, e completou-se o volume para 250 mL. A solução foi preparada no dia.

5.4.3 Análise do Nitrogênio

Após a filtragem, aliquotaram-se 20 mL das amostras filtradas em tubos de digestão, adicionaram-se 0,5 g de catalisador CuSO₄ : K₂SO₄ (10:1) e 1,5 mL de H₂SO₄ concentrado. As amostras permaneceram na estufa a 105 °C por 16 h, até que o volume fosse

reduzido de 21,5 mL para, aproximadamente, 1,5 mL. Então, as amostras foram transferidas para o bloco digestor, sendo então digeridas por um período de aproximadamente 3 h a 350°C até obtenção da coloração verde clara (Feije e Anger, 1972).

Após a digestão, as amostras foram diluídas duas vezes sucessivamente: primeiro adicionando-se 29 mL de H₂O destilada até completar um volume de 30 mL e, depois, transferindo-se 1 mL desta diluição para tubos de ensaio e completando-se com mais 9 mL de H₂O destilada (diluição total = 300 vezes). Da segunda diluição alíquotaram-se 2 mL, que foram transferidos para tubos de ensaio, onde ainda, foram adicionados 7 mL da solução A, 1 mL da solução B e 1 mL da solução C. Procedeu-se à homogeneização da reação no vórtex. A curva padrão de N foi preparada a partir de uma solução estoque de (NH₄)₂SO₄ considerando as concentrações de 0, 2, 4 e 8 µg mL⁻¹. Após 2 h de repouso, procedeu-se à determinação do N em espectrofotômetro (Fento, 600 plus) no comprimento de onda de 630 nm.

Os compostos de N orgânico, quando digeridos com H₂SO₄, transformam-se em NH₄⁺ e quando reagem com NaOCl (solução C) e C₆H₅OH (solução B), em meio alcalino (solução A), formam uma solução de coloração azul, “azul de indofenol”, determinado por densidade ótica (D.O₆₃₀), conforme a reação que pode ser visualizada na figura 3.

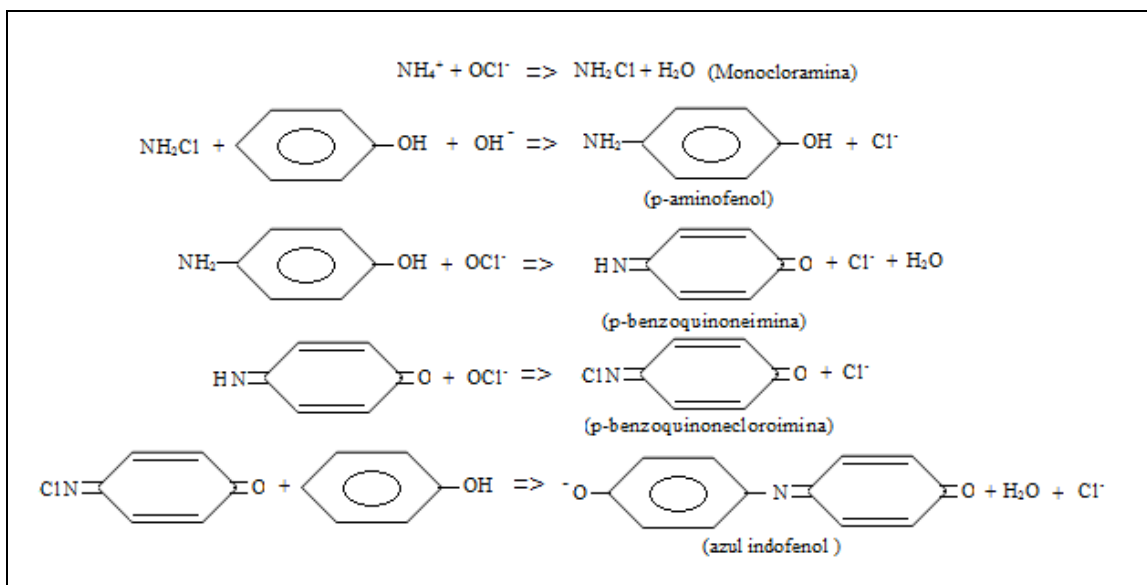


Figura 3 – Reação completa da análise de nitrogênio, quando há a formação do complexo azul de indofenol.

5.4.3.1 Preparo das soluções:

- **Solução Na₂-EDTA pH=10:** Dissolveram-se 12,7 g de Na₂-EDTA em 900 mL de água destilada, corrigiu-se o pH=10,0 e completou-se o volume para 1 L com água destilada.
- **Solução A:** Pesaram 5,0 g de NaOH, adicionaram-se 30 mL da solução de Na₂-EDTA pH 10 e completou-se o volume para 2 L com água destilada.
- **Solução B:** Dissolveram-se 10 g de C₆H₅OH, 0,05 g de Na₂[Fe(CN)₅NO].2 H₂O em água destilada, e completou-se o volume para 1 L.
- **Solução C:** Dissolveram-se 5,0 g de NaOH, 9,4 g de Na₂HPO₄.12 H₂O, 31,8 g de Na₃PO₄.12 H₂O em 20,0 mL de NaOCl ~5% e, então, completou-se com água destilada para o volume de 1 L.

5.5 AVALIAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA PELO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO-INCUBAÇÃO (FI)

Foram pesadas 100 g de solo para as amostras não fumigadas e induzidas. A umidade de cada amostra foi corrigida para 30% da capacidade de campo, mediante adição e homogeneização com água destilada (Tabela 1). As amostras foram então incubadas sem vácuo em local escuro à temperatura ambiente por 7 dias. A incubação foi feita em frascos vedados com vaselina contendo, além do recipiente com solo, um recipiente com 50 mL de NaOH 0,5 M e outro com 20 mL de água destilada.

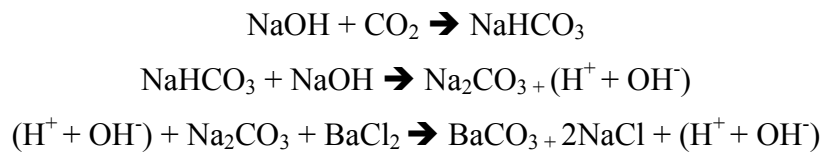
5.5.1 Preparo das Amostras

Amostras não fumigadas: frascos contendo as amostras que não foram fumigadas permaneceram em repouso no escuro por 16 h, à temperatura ambiente.

Amostras induzidas com substrato: outras amostras não fumigadas permaneceram em repouso por um período de 16 h, em temperatura ambiente. No dia seguinte, foram incubadas depois da adição e homogeneização de 1 g de açúcar.

5.5.2 Quantificação de C-CO₂ por Titulação

Depois da incubação, adicionou-se 1 mL de BaCl₂ saturado à cada recipiente de NaOH 0,5 M (a qual teria absorvido o CO₂ liberado durante a incubação) para precipitação de BaCO₃. Dessa solução, alíquotaram-se 5 mL em um erlenmeyer e adicionaram-se 20 mL de água destilada. Procedeu-se à quantificação do C-CO₂ liberado pelos microrganismos por titulação com HCl 0,2 M. As reações do método são as seguintes:



Todo CO₂ ligado ao NaOH precipita na forma de BaCO₃, e a hidroxila livre é titulada por HCl, havendo a quantificação do CO₂ emanado das amostras incubadas.

5.6 CÁLCULOS

Tabela 1. Equações utilizadas nos cálculos dos métodos de FE e FI.

Biomassa microbiana (FE)		
Parâmetro	Equação	Unidades
UA	$UA = ((Su-Ss)/Ss) * 100$	%
CBM	$(A) CBM = 2 \times ((b \times ABS) + c)$	mg C L ⁻¹ solo seco
	$CBM = A \times (50/Ss)$	mg C kg ⁻¹ solo seco
NBM	$(A) N-BM = ABS * y$	mg N L ⁻¹ solo seco
	$N-BM = (A * 30 * 10) / ((Ss * 20) / 50)$	mg N kg ⁻¹ solo seco
BMS	$BMS = (F - NF) / K$	mg C kg ⁻¹ solo seco mg N kg ⁻¹ solo seco
Biomassa microbiana (FI)		
Correção UD	$Correção = (Su * (UD - UA)) / 100$	mL
qCO₂	$qCO_2 = \text{Respiração (FI)} / CBM (FE)$	mg C-CO ₂ kg ⁻¹ solo h ⁻¹
RB	$CO_2 (mg) Ss/t = ((Vb - Va \times Fc) / Ps)$	mg C-CO ₂ kg ⁻¹ solo h ⁻¹

UA: Umidade da amostra; **Su:** Solo úmido; **CBM:** Carbono da biomassa microbiana; **NBM:** Nitrogênio da biomassa microbiana; **F:** Fumigada; **NF:** Não fumigada; **UD:** Umidade desejada; **t:** Tempo de incubação em horas ou dias; **Va:** volume da amostra; **Vb:** Volume do branco; **Ps:** Peso seco em 1 g de solo úmido; **k:** K_N para NBM e k_C para CBM; **Fc:** Fator de conversão (1 mL NaOH 0,5M = 11 mg de CO₂).

5.7 ANÁLISE ENZIMÁTICA B-GLICOSIDASE

A atividade da β-glicosidase foi determinada segundo, a metodologia de Tabatabai (1994), modificada apenas em relação à adição de tolueno. O substrato utilizado para essa enzima é o *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (PNG 0,05M). Colocou-se 1 g de solo em um erlenmeyer de 50 mL e, em seguida, suspendeu-se o solo com 4 mL da solução MUB pH 6,0 e 1 mL de PNG 0,05 M. As suspensões foram vedadas com rolhas de borracha e incubadas a 37°C por um período de 1 h. Após a incubação, foram adicionados 1 mL de CaCl₂ 0,05 M e 4 mL de Tris-hidroximetil-amino-metano (THAM) pH 12. Em seguida, as

suspensões foram filtradas e a intensidade da coloração amarela foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. A concentração do *p*-nitrofenol formado na reação foi determinada em função da curva padrão nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 mg *p*-nitrofenol mL⁻¹, multiplicando-se o resultado pela diluição (três). No final, os valores da atividade enzimática foram multiplicados pela densidade do solo, e expressos em mg de *p*-nitrofenol m⁻³ solo seco h⁻¹.

5.7.1 Preparo de Soluções

- **Tampão MUB estoque:** dissolver 12,1 g de tris hidroximetil aminometano (THAM); 11,6 g de ácido maleico; 14 g de ácido cítrico e 6,3g de H₃BO₄ em 448 mL de NaOH 1M e diluir a solução para 1 L com água destilada. Estocar em geladeira a 4°C.
- **Tampão MUB pH 6,0:** em 200 mL de solução estoque MUB, adicionar HCl até atingir pH 6,0. Completar o volume para 1 L.
- ***p*-nitrofenol-β-D-glicosídeo (PNG) 0,05M:** dissolver 0,754 g de PNG em 40 mL de MUB pH 6,0. Após a dissolução completar o volume para 50 mL com MUB pH 6,0 e estocar em geladeira por no máximo 4 dias.
- **CaCl₂ 0,05M:** dissolver 5,55 g de CaCl₂ em 700 mL de água destilada, completar o volume para 1 L.
- **Tampão THAM pH 12,0:** dissolver 12,2 g de THAM em 800 mL de água, ajustar o pH desejado e completar o volume para 1 L.

5.8 ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)

5.8.2 Extração do DNA Total do Solo

As quatro amostras de solo de cada um dos tratamentos foram agrupadas em cada profundidade em razão do número limitado de 20 amostras que se analisam em cada gel

de DGGE. A extração de DNA total do solo foi realizada com o *kit* comercial “MoBio UltraClean Soil”.

Primeiramente, adicionaram-se 250 mg de solo em microtubos do *kit* os “*bead beater*” contendo solução de extração e pérolas minúsculas de vidro, que rompem as células sob forte agitação. A essas amostras, adicionaram-se 60 µL de solução S1, misturando por inversão três vezes. A solução S1 contém SDS, que lisa as células através do rompimento de lipídeos associados à membrana celular de vários organismos. Então, adicionaram-se 200 µL de solução IRS, que precipita materiais orgânicos e inorgânicos, incluindo ácidos húmicos, restos celulares e proteínas. As amostras foram agitadas a 10.000 g por 10 min, centrifugadas por 30 s, e os seus sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos. Aos sobrenadantes, acrescentaram-se 250 µL de solução S2 para precipitar o restante dos compostos celulares. As amostras foram agitadas no vórtex por 5 s, incubadas a 4°C por 5 min e centrifugadas a 10000 g por 1 min. A seguir, 450 µL do sobrenadante mais 900 µL de solução salina S3 foram colocados em novos tubos e agitados em vórtex por 5 s. Novamente, alíquotaram-se 700 µL em colunas com filtros, que foram centrifugadas a 10.000 g por 1 min. O líquido que ficou no fundo do tubo foi descartado, e ao DNA aderido ao filtro, foram adicionados 300 µL de solução S4, que contém etanol para remover sais residuais e outros contaminantes, mas permite que o DNA continue ligado à membrana. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por duas vezes (uma vez por 30 s e outra vez por 1 min) e o líquido que passou foi descartado, para remover o excesso da solução adicionada, pois o etanol pode interferir nas análises de DNA como PCR e eletroforese. A mini-coluna foi transferida para um novo micro tubo. O DNA retido no filtro foi eluído em 50 µL de TE 10:1 mM. O conjunto foi centrifugado por 30 s e o líquido que passou, contendo o DNA, foi estocado a -20°C.

5.8.2.1 Teste da extração do DNA total do solo

Alíquotas de 2 µL do DNA extraído mais 2 µL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50 % de glicerol) foram carregados em gel de agarose 1%. A eletroforese foi conduzida a 100 V em uma cuba HORIZON 11-14 (GIBCO Horizontal Gel Electrophoresis) contendo tampão TBE 1X (Tris 89 mM; borato 89 mM; EDTA 2,5 mM; pH 8,3) durante 30 min. As bandas de DNA foram coradas em solução de brometo de etídio por 3

min e visualizados sob luz UV. O gel foi fotografado em fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (BIO-RAD).

5.8.3 Amplificação do 16S rDNA (bactérias) e 18S rDNA (fungos) para DGGE.

5.8.3.1 Comunidade bacteriana (com base no 16S rDNA)

Primeiramente, o gene da subunidade ribossomal 16S rDNA das bactérias foi amplificada com os oligonucleotídeos iniciadores, ou “*primers*” fD1 e rD1 (ver detalhes na tabela 2), gerando fragmentos de mais ou menos 1500 pb. Para isso, aliquotaram-se em tubos de reação: 36,6 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 de *primer* fD1 (10 pmoles), 1,5 µL de *primer* rD1 (10 pmoles), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U) e 1 µL de DNA (aproximadamente 30 ng). A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador MJ Research, modelo PTC-200, realizando-se, na sequência dada, os seguintes passos: 95°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 15 s (15 ciclos); 93°C por 45 s (1 ciclo); 55°C por 45 s (1 ciclo); e 72°C por 2 min (1 ciclo). Finalmente, as amplificações permaneceram a 4°C até serem retiradas do termociclador. Antes de proceder à segunda etapa, os produtos foram testados em gel de agarose, conforme descrito no item 5.8.2.1.

Na segunda etapa, os produtos obtidos foram amplificados com os primers F e R, os quais contêm grampos CG, e que amplificam aproximadamente 433 pb (ver detalhes tabela 2). As reações de PCR foram realizadas com a seguinte mistura: 13 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 (20 mM tris-HCl (pH 8,4), 1,0 µL de *primer* F (10 pmoles), 1,0 µL de *primer* R (10 pmoles), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U) e 1 µL do produto obtido na primeira reação com os *primers* 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); 94°C por 1 min, 58°C por 2 min, 72°C por 2 min (2 ciclos); 94°C por 1 min, 57°C por 2 min, 72°C por 2 min (2 ciclos); 94°C por 1 min, 56°C por 2 min, 72°C por 2 min (2 ciclos); 94°C por 1 min, 55°C por 2 min, 72°C por 2 min (20 ciclos); e 72°C

por 10 min (1 ciclo). Finalmente, as amplificações permaneceram a 4°C até serem retiradas do termociclador.

5.8.3.2 Comunidade fúngica (com base no 18S rDNA)

O gene da subunidade ribossomal 18S rDNA foi amplificado com os *primers* EF4f e EF3r (Tabela 2), gerando fragmentos de, aproximadamente, 1.500 pb. As reações foram realizadas com 29,65 µL de água deionizada, 6,6 µL de dNTP 1,5 mM, 3,75 µL de MgCl₂ 50 mM, 5 µL de tampão 10 X (20 mM tris-HCl, pH 8,4), 1,0 µL de *primer* EF4f (10 pmoles), 1,0 µL de *primer* EF3r (10 pmoles), 1 µL de Taq DNA polimerase (5U) e 2 µL do DNA (aproximadamente 30 ng). As amplificações ocorreram em termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-200, através dos seguintes passos: 94°C por 3 min (1 ciclo), 94°C por 1 min, 51°C por 1 min, 72°C por 1 min (25 ciclos); e 72°C a 10 min (1 ciclo). Finalmente, as amplificações permaneceram a 4°C até serem retiradas do termociclador.

Os produtos da reação de PCR com os *primers* EF4f e EF3r foram diluídos 2000 vezes e submetidos à uma segunda reação (“*nested*” PCR) para produzir fragmentos de 530 pb. A diluição foi necessária para garantir a formação de bandas mais específicas. A reação de PCR foi realizada com 29,65 µL de água deionizada, 6,6 µL de dNTP 1,5 mM, 3,75 µL MgCl₂ 50 mM, 5 µL de tampão 10X (20 mM tris-HCl, pH 8,4), 1,0 µL de *primer* EF4f (10 pmoles), 1,0 µL de *primer* NS3r (10 pmoles), 1 µL de Taq DNA polimerase (5U) e 2 µL da primeira reação de PCR diluída. As amplificações ocorreram em termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-200, utilizando-se os seguintes passos: 94°C por 4 min (1 ciclo); 94°C por 1 min; 60°C por 1 min, 72°C por 1 min (10 ciclos); 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min (15 ciclos); e 72 °C por 5 min (1 ciclo). Finalmente, as amplificações permaneceram a 4°C até serem retiradas do termociclador.

5.8.3.3 Teste de amplificação dos fragmentos de 16S e 18S rDNA

Alíquotas de 2 µL dos produtos da amplificação de fragmentos de 16S e 18S rDNA, junto com 2 µL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol), foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% (16S rDNA) ou 1,0% (18S rDNA). O peso molecular dos fragmentos foi comparado com o marcador molecular *low DNA mass ladder*. A eletroforese das amplificações referentes ao 16S rDNA foi realizada a 75 V em uma cuba HORIZON 58 (GIBCO Horizontal Gel Electrophoresis) com tampão TBE 1X (Tris 89 mM, borato 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3) durante 1 hora. A eletroforese dos fragmentos amplificados a partir do 18S rDNA foi realizada a 100 V em uma cuba HORIZON 11-14 (GIBCO Horizontal Gel Electrophoresis) em tampão TBE 1X por 1 h. Os produtos das amplificações foram corados em solução de brometo de etídio durante 3 min e visualizados sob luz UV. O gel foi fotografado em fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (BIO-RAD).

Tabela 2 – Sequência de *primers* para amplificação do DNA de bactérias e fungos.

<i>Primers</i>	Sequência	Referência
Comunidade Bacteriana/ 16S rDNA		
FD1	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'	Weisburg et al. (1991)
RD1	5'- AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'	Weisburg et al. (1991)
F	5'-GCCCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGCGGGGCA CGG GGGGAACGCGAAGAACCT TAC-3'	Nubel et al. (1996)
R	5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3'	Nubel et al. (1996)
Comunidade Fúngica/ 18S rDNA		
EF4f	5'-GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG-3'	Smit et al. (1999)
EF3r	5'-TCC TCT AAA TGA CCA GTT TG-3'	Smit et al. (1999)
NS3r	5'- CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCGCCCC CCGCCCCGGCTGCTGGCACCAGACTTG -3'	White et al. (1990)

5.8.4 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

O DGGE requer o preparo de duas soluções: uma desnaturante, chamada “solução 100%”, contendo uréia 7 M e formamida a 40% e outra, chamada “solução 0%”, sem qualquer agente desnaturante. A concentração de poliacrilamida deve ser padronizada

entre 6% e 10%, dependendo da comunidade microbiana a ser analisada. O gradiente de desnaturação é formado pelo bombeamento simultâneo e coordenado das soluções menos concentrada para mais concentrada conforme mostrado na figura 5.

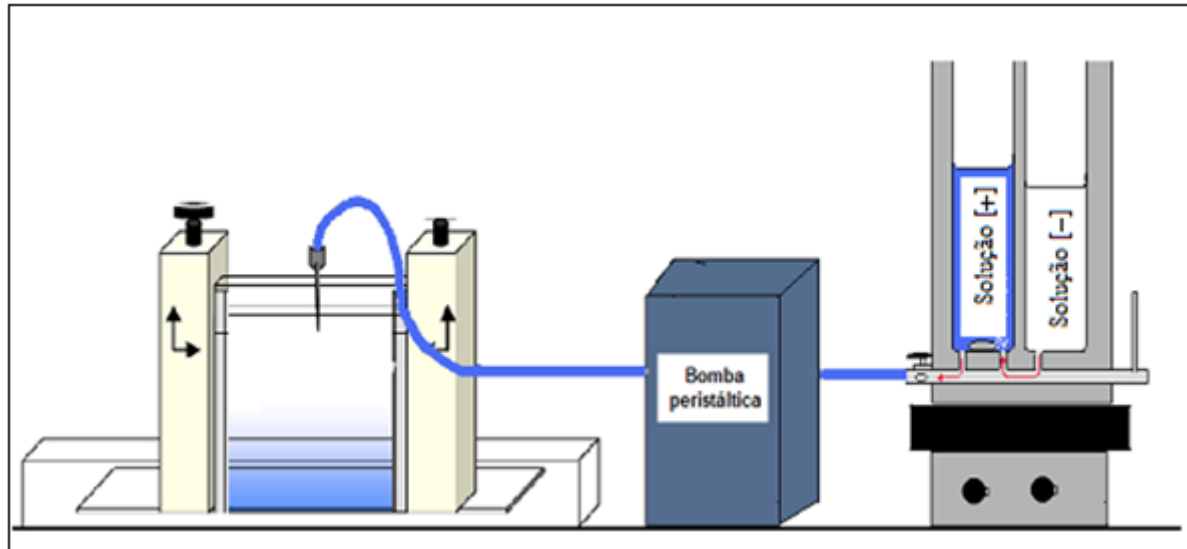


Figura 4 – Esquema demonstrando a preparação do gel de DGGE. O suporte contendo a solução de maior gradiente é homogeneizado com a ajuda de um agitador magnético. Entre os tubos há uma válvula e quando aberta permite a passagem da solução menos concentrada para mais concentrada.

5.8.4.1 DGGE da comunidade bacteriana

Preparou-se um gel de poliacrilamida a 6%, com gradiente desnaturante 35% a 60% (uréia-formamida) formado a partir das soluções 100% e 0%. Ao gel, foram aplicados 20 uL do produto da segunda PCR da região 16S rDNA e 10 uL 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 (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA, pH 8,3), a 200 V e 60°C, por 16 h. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 3 min, e visualizados sob luz UV.

5.8.4.2 DGGE da comunidade fúngica:

Preparou-se um gel de poliacrilamida a 10%, com gradiente desnaturante 30% a 55% (uréia-formamida) formado a partir das soluções 100% e 0%. Ao gel, foram aplicados 20 μ L do produto de PCR e 10 μ L do tampão de carregamento (ver acima). O gel foi submetido à eletroforese no sistema vertical indicado anteriormente, com tampão 1 X de TAE, voltagem constante de 85 V, e 55°C por 17 h. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 3 min, e visualizados sob luz UV.

5.9 ANÁLISE DE DADOS

5.9.1 Análise Estatística

A análise de variância dos dados das variáveis, profundidades e sistema de manejo foi realizada por regressão polinomial pelo programa SANEST (Zonta et al., 1987) utilizando o teste F a 5% para significância estatística. As profundidades foram tratadas como variáveis independentes, considerando-se os pontos médios no intervalo de profundidade de cada amostra: 2,5 cm (intervalo de 0-5 cm), 7,5 cm (5-10 cm), 15 cm (10-20 cm), 25 cm (20-30 cm), 35 cm (30-40 cm), 45 cm (40-50 cm) e 55 cm (50-60 cm). As diferenças das médias foram testadas com o teste de tukey ao nível de 5% de significância.

5.9.2 Análise Qualitativa

O *DGGE* foi analisado pelo programa Bionumerics, com algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e índice de tolerância de 5%, para facilitar a diferenciação da microbiota nas profundidades. Esse programa analisa as diferenças de forma mais objetiva, podendo comparar em porcentagem a similaridade entre as profundidades.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ALTERAÇÕES DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS NO PD E PC EM DIFERENTES PROFUNDIDADES DE SOLO.

Diversos estudos têm concluído que o PD é um sistema de manejo agrícola mais adequado à sustentabilidade da biota do solo, em comparação com o PC, entretanto, na maioria das análises químicas e microbiológicas os valores não são corrigidos para a densidade do solo. Como os manejos de PD e PC diferem quanto aos efeitos sobre a densidade do solo, é possível que ocorram diferenças significativas na atividade metabólica e na sobrevivência dos microrganismos com a profundidade do solo. Portanto, somente pela correção da densidade do solo e da comparação da somatória das profundidades seria possível verificar o impacto real causado ao solo pelos sistemas de PD e PC.

Neste estudo, o PD resultou em uma densidade maior que a do PC particularmente até os 35 cm de profundidade (Figura 5). O PC favoreceu maior adensamento do solo nas camadas mais profundas. Esses resultados estão de acordo com os dados de Fernandes et al. (1983), que observaram na camada de 0 - 10 cm redução aparente da densidade no sistema de PC quando comparando ao PD, enquanto que na camada de 10 - 20 cm a densidade do PD foi inferior em relação ao PC.

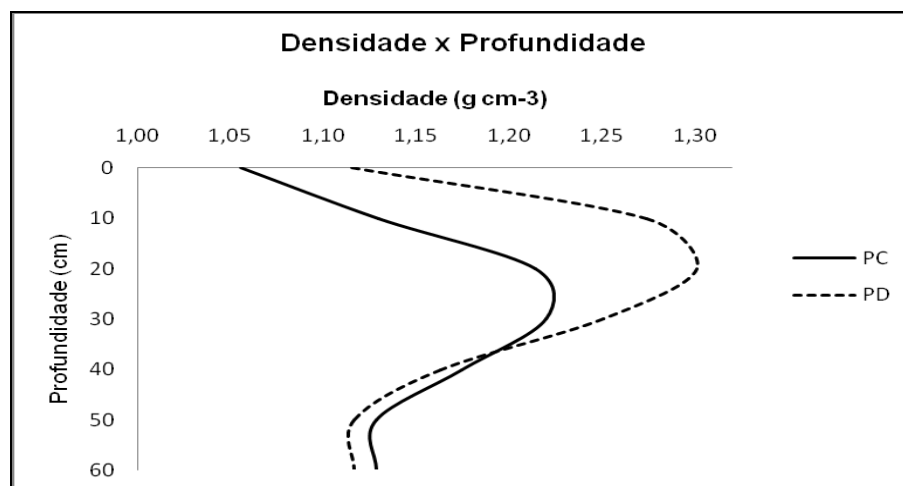


Figura 5 – Densidade aparente do solo em diferentes profundidades sob os sistemas de manejo plantio direto (PD) e plantio convencional (PC).

Isso mostra que o sistema de PD promoveu um aumento na densidade do solo até os 30 cm de profundidade pelo não revolvimento e pela pressão exercida no solo pelas operações de manejo durante os cultivos. Tormena et al. (1998) realizaram um estudo em diferentes profundidades (0-20, 20-35 e 35-60 cm), e sistemas de manejo, como PD, arado de disco e aivecas. O tráfego de máquinas agrícolas foi controlado, de forma que pelo menos uma de suas rodas passassem sempre pelo mesmo local. Os autores chegaram à conclusão de que o tráfego foi o principal fator nas alterações físicas do solo.

6.2 ALTERAÇÕES DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS NO PD E PC EM DIFERENTES PROFUNDIDADES DE SOLO.

Neste estudo, as diferenças de pH do solo entre o PD e PC não foram significativas, mas foram observadas diferenças em profundidade (Tabela 3). Na verdade, já é esperado que o pH das camadas superficiais sejam mais elevados que nas camadas mais profundas (Malavolta, 1980). Entretanto neste estudo as diferenças de pH só foram observadas no PD, onde não houve revolvimento do solo, o que ocorre pela distribuição superficial do calcário, sem sua distribuição nas camadas mais profundas.

As análises de pH avaliadas foram o pH em CaCl_2 , que mede acidez ativa (H^+ presente na solução do solo) e pH em SMP, que mede acidez potencial ($\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$ trocável). Embora os dois sistemas tenham recebido os mesmos tratos culturais e doses semelhantes de fertilizantes ao longo dos 20 anos do experimento, o PC resultou em acidez potencial mais elevada do que o PD. É provável que o PD tenha mantido a umidade do solo por mais tempo, o que facilitou a dissolução do calcário, neutralizando acidez do solo.

O pH atua diretamente na disponibilidade dos nutrientes presentes no solo e, assim, pequenas diferenças na acidez do solo entre o PD e PC podem interferir nas diferentes concentrações de macro e micronutrientes. O PD promove o aumento da CTC através do decréscimo de oxidação da MOS, beneficiando a adsorção dos cátions trocáveis (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}), conseqüentemente há um aumento nos teores de P, Ca, Mg e K no solo (Pavan, 1997). Neste estudo, diferenças significativas foram observadas para o P e o K.

Podemos observar que o PD acumulou mais P do que o PC (Tabela 3). Entretanto, a capacidade de adsorção do P pode ser influenciada pelo teor de argila, de

colóides amorfos e matéria orgânica (Novais e Smyth, 1999). Como a matéria orgânica possui característica ambivalente, esta, tem o potencial de adsorver o (PO_4^{2-}) e, bloquear os sítios de adsorção da argila (Sanyal e De Datta, 1991). Como a decomposição da MOS é mais rápida no PC, há pouca interferência na adsorção do íon (PO_4^{2-}) , entretanto há uma baixa concentração de P disponível no solo. Já no PD a decomposição da MOS é mais lenta, os sítios de adsorção da argila são bloqueados havendo uma concentração maior de P disponível.

Tabela 3 – Análise de química em um Latossolo Vermelho Eutroférico, de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC)

Profundidade	pH				P				K				Ca				Mg							
	CaCl ₂		SMP		mg dm ⁻³		mg dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³									
Cm	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC								
0 – 5	5,59	ab A	5,43	ns A	4,10	ab A	3,77	ns A	64.25	a A	16.68	a B	0,73	a A	0,34	a B	7,60	ns A	7,46	ns A	2,48	a A	1,33	ns B
5 – 10	5,70	a A	5,24	B	3,55	b A	4,04	A	44.51	b A	17.84	a B	0,76	a A	0,20	abc B	7,44	A	6,85	A	1,78	ab A	1,25	A
10 – 20	5,14	cd A	5,41	A	4,75	a A	3,74	B	10.87	c A	15.68	a A	0,53	bc A	0,30	ab B	7,07	A	6,45	A	1,13	b A	1,20	A
20 – 30	5,50	abc A	5,38	A	4,19	ab A	3,90	A	2.77	c A	5.52	b A	0,63	ab A	0,15	bc B	9,53	A	7,23	A	1,50	b A	1,43	A
30 – 40	5,08	d A	5,45	A	4,75	a A	3,66	B	2.66	c A	3.62	b A	0,38	cd A	0,23	abc B	7,42	A	6,41	A	1,21	b A	1,35	A
40 – 50	5,31	abcd A	5,21	A	4,25	ab A	3,64	B	2.36	c A	2.84	b A	0,49	bc A	0,11	c B	7,66	A	6,37	A	1,75	ab A	1,60	A
50 – 60	5,21	bcd A	5,26	A	4,11	ab A	3,65	A	1.96	c A	2.06	b A	0,22	d A	0,16	bc A	6,42	A	5,42	A	1,18	b A	0,92	A
<i>p</i> manejo	0,729		0,008		>0,001		>0,001		0,185		0,219													
C.V (%)	1,69		2,80		8,05		7,78		11,60		18,76													
<i>p</i> profundidade	0,034		0,142		>0,001		>0,001		0,209		0,008													
<i>p</i> man. x prof.	>0,001		0,003		>0,001		>0,001		0,925		0,086													
C.V (%)	3,40		9,05		19,67		20,18		24,48		30,72													

Médias de quatro repetições e, quando seguidas de mesma letra não se diferem entre si pelo teste de Tukey a ($p < 0,05$). Letras minúsculas são referentes à profundidade. Letras maiúsculas para cada parâmetro na linha são referentes ao manejo em cada profundidade.

ns: não significativo.

Sisti et al (2004) também observaram que o PD apresentou uma concentração de P maior até 20 cm de profundidade quando comparado ao PC, devido à menor adsorção de P em solos de acidez elevada.

A concentração de Ca e Mg no solo não diferiram entre os sistemas de manejo (Tabela 3); entretanto, os fatores que influenciaram a disponibilidade de ambos os nutrientes sejam os mesmos (Coelho, 1973), houve diferença no comportamento e migração de Ca e Mg. O Mg é fornecido sob a forma de íons Mg^{+2} apresenta, no solo, teores menores do que o Ca porque é mais solúvel e sujeito, então, às perdas por lixiviação. Houve uma maior concentração de Mg nas camadas de 0-10 cm no PD, mas no PC esse elemento ficou homogêneo em todas as profundidades, devido as maiores taxas de lixiviação de Mg e a distribuição uniforme da matéria orgânica e nutrientes nesse sistema. O Ca ficou bem distribuído em todo o perfil do solo em ambos os sistemas de manejo.

6.3 EFEITOS DO MANEJO DE SOLO NA BIOMASSA MICROBIANA.

Conforme esperado, os teores de CT apresentaram diferenças significativas entre as profundidades e com o manejo do solo (Tabela 4). Os menores valores de CT foram observados no PC. Esses resultados podem ser explicados pela rápida decomposição de resíduos orgânicos depositados no solo sob PC que, por ser uma prática intensa de cultivo acelera o processo de decomposição da MOS. O PD apresentou um teor de $42,35 \text{ kg m}^{-3}$ na camada superficial, em comparação ao PC que resultou em $32,93 \text{ kg m}^{-3}$. Pelo fato do solo não ser revolvido no sistema de PD, há menor interferência na taxa de decomposição da MOS, o que favorece sua manutenção e acúmulo, contribuindo para um aumento do estoque de C (Roscoe et al., 2006b). Tendências semelhantes foram observadas por alguns autores (Marchiori Junior e Melo, 1999; Balota, 1998; Bossuyt et al, 2002; Conceição et al, 2005; Galegari et al, 2008).

O teor acumulado de N total no perfil do solo foi de $1,27 \text{ kg m}^{-3}$ no PD e $1,17 \text{ kg m}^{-3}$ no PC. As maiores concentrações de N total no PD foram observadas na profundidade de 0 a 20 cm, sendo em média essa diferença superior a 70%, comparado ao PC. Em ambos os sistemas as menores concentrações de N total foram observadas nas maiores profundidades (Tabela 4).

De acordo com Wiethölter et al (2000), a maior parte do N presente no solo se apresenta ligado a compostos orgânicos, portanto, alterações na MOS alteram diretamente a concentração do N no solo. De fato, os teores de NT realmente decresceram gradativamente com a profundidade em ambos os sistemas de manejo, seguindo a distribuição da MOS presente em todo perfil do solo.

Os valores de CBM corrigidos pela densidade do solo diferiram entre si nas diferentes profundidades, mostrando valores mais elevados na superfície em ambos os sistemas de manejo. O PD obteve maiores valores de CBM até os 40 cm de profundidade, mas no intervalo de 40-60 cm o PC apresenta maior concentração de CBM, devido a incorporação da matéria orgânica ao solo (Tabela 4). Entretanto, quando se compara a somatória de todas as profundidades nos dois sistemas de manejo, o PD apresenta uma concentração de $294,15 \text{ g m}^{-3}$, em relação ao PC com $219,90 \text{ g m}^{-3}$. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Zamora et al. (2005) que também obtiveram maiores concentrações de CBM no PD.

Sendo assim, mesmo com a correção para densidade do solo observaram-se diferenças de CBM entre as profundidades e os manejos de solo (Tabela 4). O PD apresenta valores de CBM superior a 82% na camada de 0-5 cm, quando comparada ao PC. Alvarez et al. (1995) observaram que, através do PD, ocorreu um aumento de CBM de quase três vezes em relação às parcelas sob PC. De modo semelhante, Hungria et al. 2009 observaram no sistema de PD concentrações de CBM superior a 74% na camada de 0-10 cm, comparado ao PC.

Embora a concentração de NBM do PD seja superior à do PC até os 30 cm de profundidade, o PC apresenta na camada de 30-60 cm valores superiores ao PD (Tabela 4). Quando se compara o estoque do NBM em todo o perfil, o maior valor foi encontrado em PD ($15,89 \text{ g m}^{-3}$), em comparação ao PC ($13,42 \text{ g m}^{-3}$). Esse efeito se deve a diversos fatores, como o N presente na MOS, no N derivado da decomposição dos restos culturais e do N derivado da aplicação de fertilizantes nitrogenados no solo.

Os sistemas estudados apresentaram diferenças no q_{Mic} (razão entre CBM e CT) em diferentes sistemas de manejo e profundidades. O PD apresentou maior q_{Mic} até os 40 cm de profundidade, mas no intervalo de 40-60 cm os valores não se diferem estatisticamente (Tabela 4), indicando que quanto maior o teor de C maior a eficiência das comunidades microbianas em utilizar o C mineralizado da MOS. Segundo Sparling (1992), o q_{Mic} pode ser um indicador muito sensível das mudanças na dinâmica da MOS, principalmente quando o solo é submetido a diferentes práticas de manejo.

Nesse estudo, o CT foi superior no PD em todas as profundidades. Já o NT, o CBM e o NBM foram superiores no PD até os 40 cm de profundidade, e inferiores na camada de 40-60 cm. Pode-se supor que o sistema de PD está limitado pelo N nas camadas mais profundas, ocorrendo uma intensa atividade microbiana nas camadas superficiais, evitando qualquer lixiviação de N mineralizado, como também pode estar relacionado ao longo tempo de experimento com a rotação soja-trigo.

Tabela 4 – Carbono e nitrogênio (CT e NT), biomassa microbiana (CBM) e (NBM) e quociente microbiano (qMic) em um Latossolo Vermelho Eutroférico de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC)

Profundidade cm	CT			NT			CBM			NBM			qMic																	
	kg C m ⁻³ solo						g C m ⁻³ solo						%																	
	PD	PC		PD	PC		PD	PC		PD	PC		PD	PC																
0 - 5	42,35	ab	A	32,93	a	B	2,85	a	A	2,09	bc	B	1061	a	A	582	a	B	66,54	a	A	36,48	a	B	3,10	a	A	1,87	ns	B
5 - 10	46,17	a	A	35,27	a	B	3,26	a	A	2,30	ab	B	800	b	A	570	ab	B	43,64	b	A	33,62	ab	A	1,95	bc	A	1,86	A	
10 - 20	39,32	b	A	36,23	a	A	3,01	a	A	2,63	a	A	638	bc	A	390	bc	B	37,66	bc	A	31,28	ab	A	2,12	ab	A	1,32	B	
20 - 30	29,94	c	A	34,50	a	A	2,01	b	A	2,20	ab	A	500	cd	A	327	c	B	34,53	bc	A	25,76	ab	A	1,95	bc	A	1,12	B	
30 - 40	26,07	c	A	24,61	b	A	1,77	bc	A	1,61	cd	A	382	de	A	336	c	A	22,72	cd	A	20,06	abc	A	1,74	bc	A	1,31	A	
40 - 50	24,26	c	A	22,57	b	A	1,48	c	A	1,57	d	A	270	e	A	296	c	A	10,96	de	A	16,80	bc	A	1,25	bc	A	1,50	A	
50 - 60	23,66	c	A	24,61	b	A	1,42	c	A	1,60	d	A	221	e	A	272	c	A	-2,12	e	A	5,25	c	A	1,03	c	A	1,57	A	
Total (0,6 m² solo)	18,71			17,66			1,27			1,17			294,15			219,90			15,89		13,42			1,06			0,87			
<i>p</i> manejo	0,101						0,107						0,003						0,094					0,033						
C.V (%)	5,76						7,52						5,50						10,86					8,43						
<i>p</i> profundidade	>0,001						>0,001						>0,001						>0,001					>0,001						
<i>p</i> manejo x prof.	>0,001						>0,001						>0,001						0,003					0,004						
C.V (%)	9,69						10,44						17,60						32,34					26,60						

Médias de quatro repetições e, quando seguidas de mesma letra não se diferem entre si pelo teste de Tukey a ($p < 0,05$). Letras minúsculas são referentes à profundidade. Letras maiúsculas para cada parâmetro na linha são referentes ao manejo em cada profundidade.

ns: não significativo.

6.4 ATIVIDADE MICROBIANA E EFICIÊNCIA NO USO DO CARBONO DO SOLO

Ao avaliar a RB nos dois sistemas de manejo, o PD apresentou taxa de respiração mais elevada do que o PC (Tabela 5), confirmando uma maior atividade microbiana. Entretanto, as taxas de RB nas camadas mais profundas mostram baixa atividade microbiana em ambos os sistemas. Balota et al. (1995); Mendes et al. (1999) e Vargas e Scholles (2000), observaram que no sistema de PC, a liberação de CO₂ tende a ser uniforme no intervalo de 0-20 cm, e para o PD os maiores valores de CO₂ se concentraram na camada superficial. Vargas e Scholles (2000) observaram que as diferenças nas atividades do perfil do solo refletem a distribuição dos resíduos vegetais, bem como da MOS. Portanto é desejável que o solo apresente uma alta atividade microbiana, uma vez que pode significar alta transformação de resíduos orgânicos em nutrientes para as plantas (Tu et al, 2006).

Conforme esperado, a adição do substrato (glicose) provocou um grande incremento na liberação de CO₂ em todas as profundidades e nos dois sistemas de manejo, pois os microrganismos ativos respondem imediatamente à adição de glicose (Wardle, 1994). Através da relação RBI/RB podemos perceber que nas camadas superficiais (0-30 cm) os microrganismos no PC possuem uma atividade maior quando se adiciona glicose ao solo (quando comparado com sua atividade sem adição de glicose), devido ao grande aumento de C disponível para os microrganismos, aumentando desse modo sua atividade respiratória.

A adição de açúcar pode ser extremamente útil para medir a biomassa microbiana potencial e a atividade metabólica, que varia de acordo com o estado da microbiota do solo, a disponibilidade de nutrientes e fatores abióticos (Anderson, 1978). Entretanto, segundo Vargas e Scholles (2000), os microrganismos são sensíveis aos fatores bióticos e abióticos. Por esse motivo, mesmo com amostras ambientais a quantificação da produção de CO₂ em laboratório dificulta a avaliação do que realmente acontece no ambiente natural. Por exemplo, no momento da coleta há alterações estruturais no solo que alteram a atividade biológica da microbiota, e que poderão proporcionar acentuadas variações nos resultados (Fortes Neto et al, 2007).

Os valores de qCO₂ não se diferiram entre os sistemas de manejo até a profundidade de 40-50 cm. As camadas superficiais resultaram em valores mais baixos e houve um aumento gradativo do qCO₂ até 30 cm de profundidade, voltando a decair dos 30 a 60 cm. O qCO₂(i) revelou o mesmo comportamento que o sistema não induzido. Tanto para o PC quanto para o PD (Tabela 5). É possível que as diferenças de qCO₂ nas camadas

superficiais, se devam a sua exposição direta aos agentes climáticos e às técnicas de cultivo, apresentando valores menores em relação às camadas mais profundas que não sofreram ação antrópica. As diferenças observadas nas diferentes profundidades refletem as condições ambientais às quais a biomassa microbiana está submetida, ou mesmo as diferenças na estrutura genética dessas populações ou na funcionalidade das mesmas.

Entretanto, é preciso ter cautela quando se interpreta o qCO_2 , uma vez que um alto valor pode tanto inferir estresse, quanto maior oferta de substrato para respiração, ou mesmo, um ecossistema imaturo (Nielson e Winding, 2002).

O manejo do solo pode selecionar uma população microbiana mais eficiente, eliminando uma quantidade menor de C através da respiração, pois quanto maior a quantidade de C absorvida pelo microrganismo, maior a liberação de C do solo, conseqüentemente há um decréscimo dos teores deste elemento no solo (Insam et al., 1991). Essa característica da comunidade microbiana pode ser muito importante na manutenção dos teores de C do solo (Insam, 1990).

Na tabela 5, observa-se que quanto maior a profundidade, menor a atividade enzimática da β -glicosidase. Quando se compara os dois sistemas de manejo, o PD apresenta maior atividade apenas na camada superficial. Porém, na camada de 5 - 60 cm o PC possui valores mais elevados. Da mesma maneira, Böhme et al. (2005), observaram que não houve uma correlação entre a atividade da β -glicosidase com o CBM, devido as diferentes formas que a enzima esta presente no solo, tanto na forma livre (enzima extracelular) como adsorvida na MOS.

Neste trabalho houve uma correlação entre a atividade enzimática e o CBM apenas na camada superficial; portanto o aumento da atividade da β -glicosidase não foi proporcional ao teor de biomassa microbiana. Segundo Mac Donald (1986), apenas uma pequena proporção da biomassa microbiana (15 a 30%), apresenta atividade biológica, o restante está na forma inativa ou latente.

Tabela 5 – Respiração basal (RB), respiração basal induzida (RB(i)), quociente metabólico (qCO₂), quociente metabólico induzido (qCO₂ (i)) e β-Glicosidase em um Latossolo Vermelho Eutroférico de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC).

Profundidade (cm)	RB		RB(i)		qCO ₂		qCO ₂ (i)		β-Glicosidase	
	(mg C m ⁻³ solo d ⁻¹)				(mg C m ⁻³ solo h ⁻¹)				(mg de p-nitrofenol m ⁻³ solo d ⁻¹)	
	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC
0 – 5	751 a A	466 a B	3178 a A	2570 a B	0,72 a A	0,85 a A	3,04 a B	4,72 a A	267,69 a A	105,72 a B
5 – 10	688 ab A	429 ab B	3255 ab A	2410 a B	1,10 a A	0,87 ab A	5,22 b A	4,94 a A	140,70 b A	149,71 a A
10 - 20	606 bc A	435 ab B	2556 ab A	2294 a B	1,28 a A	1,37 ab A	5,28 b B	7,20 b A	95,94 c B	143,26 a A
20 - 30	488 cd A	388 abc B	2056 bc A	1455 a B	1,53 ab A	1,44 ab A	5,19 b A	5,23 a A	36,95 d A	59,76 b A
30 - 40	384 de A	351 abc A	1462 bc A	1262 b A	1,17 ab A	1,31 ab A	4,63 ab A	4,70 bc A	26,59 d A	39,78 bc A
40 - 50	294 de A	266 bc A	1102 bc A	1180 b A	1,22 ab A	1,02 b A	4,64 ab A	4,54 bc A	19,14 d A	26,96 bc A
50 - 60	296 e A	304 c B	1018 a A	832 c A	1,57 c A	1,04 b B	4,07 ab A	2,86 c B	17,07 d A	19,97 c A
<i>p</i> manejo	0,009		>0,001		0,205		0,353		0,605	
C.V (%)	7,73		1,36		7,26		7,50		6,15	
<i>p</i> profundidade	>0,001		>0,001		>0,001		>0,001		>0,001	
<i>p</i> manejo x prof.	>0,001		>0,001		0,066		0,003		>0,001	
C.V (%)	14,14		9,24		19,78		16,50		12,58	

Médias de quatro repetições e, quando seguidas de mesma letra não se diferem entre si pelo teste de Tukey a ($p < 0,05$). Letras minúsculas são referentes à profundidade. Letras maiúsculas para cada parâmetro na linha são referentes ao manejo em cada profundidade.

Ralte et al. (2005) observaram que a atividade enzimática diminuiu significativamente da superfície para as camadas mais profundas, e eles atribuíram essa correlação aos teores de nutrientes e biomassa microbiana, que tendem a diminuir com a profundidade. Para Melloni (2007), os sistemas de manejo que propiciam a maior diversidade e quantidade de resíduos orgânicos, favorecem o desenvolvimento microbiano e promovem o aumento da atividade enzimática. A MOS, além de influenciar diretamente a atividade enzimática fornece substrato para sua ação e também mantém as enzimas na forma ativa.

6.5 EFEITO DO MANEJO DE SOLO NA ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS

Durante o processo de extração de DNA total do solo, não foi possível a visualização de bandas em gel de agarose das amostras provenientes das camadas mais profundas que 30 cm. Indicando que a concentração de DNA nessas camadas é mais baixa do que nas camadas superficiais. Foram feitas várias lavagens no DNA para precipitação de proteínas e ácidos húmicos. Já que estes são responsáveis por interferências nas reações de PCR e na eletroforese. A extração foi repetida com o dobro da massa especificada no protocolo e mesmo assim não houve visualização de banda no gel de agarose. As amostras foram quantificadas através de um micro-espectrofotômetro (NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000, Unisciense) e apresentaram baixa concentração de DNA, o que inviabilizou esse tipo de análise. Portanto, a análise de DGGE só foi possível nas camadas de 0-5, 5-10, 10-20 e 20-30 cm.

Entretanto, é importante destacar que nessa análise algumas bandas estiveram presentes em quase todas as amostras, indicando que, provavelmente, certas espécies representam os microrganismos dominantes e mais resilientes do solo. Tem-se sempre dito que é preciso preservar a diversidade microbiana para preservar as funções bioquímicas do solo. Por outro lado, não existe consenso de que, à medida que se diminui a diversidade microbiana de um ecossistema, os processos bioquímicos são inibidos (Griffiths et al, 2001; Setala e McLean, 2004). A função bioquímica de uma determinada espécie extinta pode ser desnecessária para o meio, mas sua perda pode ser compensada pela presença de outros microrganismos que contribuem para a manutenção dos processos bioquímicos (Kennedy, 2003; Zilli et al., 2003).

6.5.1 Comunidade Bacteriana

De acordo com o DGGE, quatro comunidades bacterianas dominaram o PC, e apenas três dominaram o PD (Figura 6). Entretanto, o fato do PD ter apresentado um número menor de bandas não necessariamente indica que o PD suporta uma menor diversidade bacteriana. Na verdade, uma banda pode ser formada por mais de uma espécie bacteriana, e seria necessário fazer o sequenciamento genômico dessas bandas para determinar conclusivamente as diferenças de diversidade bacteriana entre os sistemas de manejo. Neste contexto, bibliotecas genômicas a partir da PCR dos fragmentos de DNA ribossomais seriam de grande utilidade.

No PD, a análise do dendrograma mostra uma similaridade de 70% na profundidade de 20-30 cm em relação às demais; esses valores sugerem uma alta diversidade na estrutura da comunidade microbiana no perfil, sendo todas as profundidades dominadas por três comunidades. Considerando-se a hipótese de que a maior diversidade está relacionada à maior funcionalidade, pode-se assumir que, quanto maior a similaridade entre as profundidades analisadas, maior seria a capacidade de adaptação da população microbiana no solo.

No PC há similaridade de 20% na profundidade de 0-5 cm em relação às demais profundidades. A comunidade bacteriana mostrou uma elevada alteração microbiana com o aumento da profundidade, com predomínio de quatro comunidades distintas em todas as profundidades.

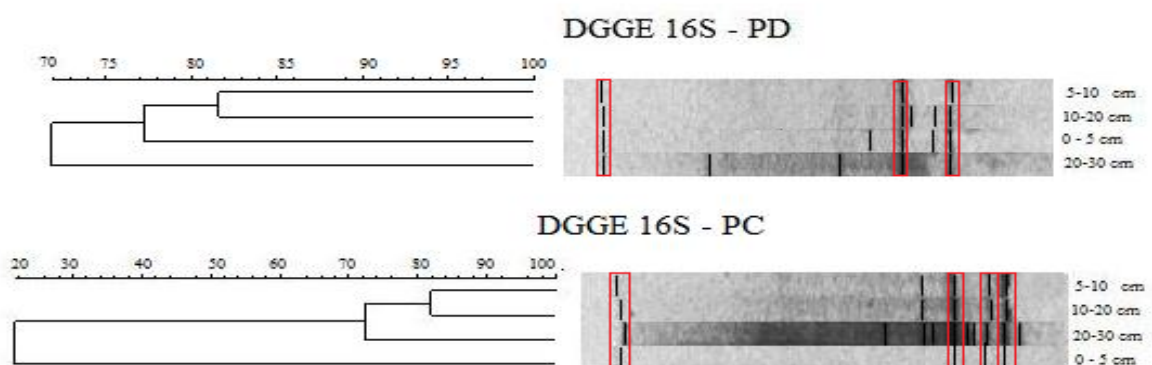


Figura 6 – Dendrograma obtido a partir da análise de DGGE, amplificado com os *primers* universais para o gene 16S ribossomal. Análise realizada utilizou o programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e índice de tolerância de 5%.

6.5.2 Comunidade Fúngica

O DGGE revelou que a diversidade de fungos no solo estudado é maior que a diversidade de bactérias, provavelmente devido às condições específicas desse ecossistema. Essa resposta pode ser devido à acidez do solo, que inibe o crescimento de algumas bactérias e conduz ao predomínio de populações fúngicas (Frostergard e Baath, 1996).

No PD, o dendrograma mostrou uma similaridade de 55% na profundidade de 20-30 cm, com relação às demais. Esses valores sugerem uma moderada alteração na estrutura da comunidade microbiana no perfil, sendo todas as profundidades dominadas por três comunidades.

No PC, as profundidades de 0-5 e 10-20 cm quando comparados as profundidades de 5-10 e 20-30 cm apresentaram uma similaridade de 52%. Essa alteração moderada pode ser explicada pelo maior revolvimento do solo nesse sistema de manejo que proporcionou uma distribuição mais uniforme da comunidade fúngica.

Ao analisar as bandas, observaram-se dois grupos dominantes de fungos em ambos os manejos de solo. Tais grupos poderiam ser espécies resilientes do solo, mas seria necessário um estudo mais detalhado para afirmar conclusivamente.

O presente estudo evidencia claras diferenças entre as estruturas das comunidades bacterianas e fúngicas nas diferentes profundidades sob PD e PC. Portanto, mesmo que os índices de diversidade sejam similares, a composição microbiana é distinta.

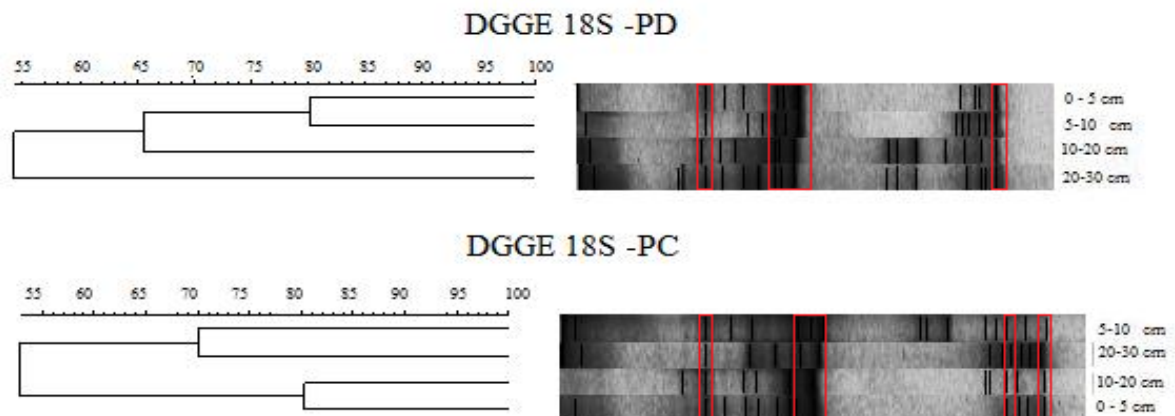


Figura 7 – Dendrograma obtido a partir da análise de DGGE, amplificado com os *primers* universais para o gene 18S ribossomal. Análise realizada utilizou o programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e índice de tolerância de 5%.

Para uma análise mais detalhada, seria necessário fazer biblioteca dos genes ribossomais 16S e 18S, através da clonagem gênica, para identificação e abundância dos microrganismos no ambiente estudado, e suas principais atividades bioquímicas em seus ecossistemas.

A técnica de DGGE vem sendo utilizada em vários estudos de ecologia microbiana, mas é importante considerar algumas limitações da técnica. Por exemplo, algumas comunidades microbianas não podem ser identificadas, sendo observadas no gel apenas as mais abundantes (Smit et al, 1999). Outra limitação é que o mesmo fungo ou bactéria pode gerar múltiplas bandas no gel, portanto, o DGGE pode ser mais adequado quando o objetivo é conduzir um estudo comparativo de áreas distintas (Muyzer et al, 1993), como analisado no presente estudo.

CONCLUSÕES

Os atributos microbiológicos mostram-se mais sensíveis ao manejo e profundidade do solo em relação aos parâmetros químicos e físicos.

Este estudo confirmou que o sistema de PD favoreceu a CBM em relação ao PC, mesmo que as diferenças da densidade de solo sejam consideradas na sua determinação.

O CBM, o NBM e a atividade metabólica dos microrganismos acompanham a distribuição da MOS no perfil e decrescem com a profundidade do solo.

Os aspectos qualitativos da microbiota devem ser melhor estudados, pois a técnica do DGGE não ofereceu resultados conclusivos sobre a dinâmica das estruturas genéticas das comunidades microbianas do solo.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, R.; DÍAZ, R.A.; BARBERO, N.; SANTA-NATOGLIA, O.J.; BLOTTA, L. Soil organic carbon, microbial biomass and CO₂-C production from three tillage systems. **Soil & Tillage Research**, v.33, p.17-28, 1995.
- ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.10, p.215-221, 1978.
- 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. Ratio of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.21, p.471-479, 1989.
- AON, M.A.; CABELLO, M.N.; SARENA, D.E.; COLANERI, A.C.; FRANCO, M.G.; BURGOS, J.L.; CORTASSA, S.I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, v.18, n.3, p.239-254, 2001.
- 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.
- ARAUJO, R.; GOEDERT, J.W.; LACERDA, M.P.C. Qualidade de um solo sob diferentes usos e sob cerrado nativo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1099-1108, 2007.
- BAKER, G.C.; SMITH, J.J.; COWAN, D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal Microbiological Methods**, v.55, p.541-555, 2003.
- BALOTA, E.L., COLOZZI-FILHO, A., ANDRADE, D.S., HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.641-649, 1998.
- BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazil oxisol. **Soil & Tillage Research**, v.70, p.137-145, 2004.
- BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.15-20, 2003.
- 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.
- BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L.; ERNANI, P.R. Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil. **Plant and Soil**, v.238, p.133-140, 2002.
- BENET, J.M.; SULLIVAN, C.Y. Effect of water stress preconditioning on net photosynthetic rate of grain sorghum. **Photosynthetica**, v.15, n.3, p.330-337, 1981.

- BERKOWITZ, G.A. Water and salt stress. In: RAGHAVENDRA, A.S (Ed.). **Photosynthesis: a comprehensive treatise**. Cambridge: University Press, 1998. p.226-237.
- BÖHME, L.; LANGER, U.; BÖHME, F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v.109, p.141-152, 2005.
- BOSSUYT, H.; SIX, J.; HENDRIX, P.F. Aggregate-Protected carbon in no-tillage and conventional tillage agroecosystems using carbon-14 labeled plant residue. **Soil Science Society of America Journal**, v.66, p.1965-1973, 2002.
- BRADY, N.C.; WEIL, R.R.; **The nature and properties of soils**. 13th ed. Upper Saddle River, NJ, U.S.A: Pearson Education Inc, 2002. 960 p.
- BRANDÃO-JUNIOR, O. HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; ESPINDOLA, C.R. Comparação entre métodos de fumigação-extração e fumigação-incubação para determinação do carbono da biomassa microbiana em um Latossolo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.5, p.641-649, 2008.
- BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, v.19, p.269-279, 1995.
- BROOKES, P.C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.17, p.837-842, 1985.
- BRUCE, J.P.; FROME, M.; HAITES, E.; JANZEN, H.; LAL, R. Carbon sequestration in soils. **Journal of Soil and Water Conservation**, v.54, n.1, p.382-389, 1999.
- GALEGARI, A.; HARGROVE, W.L.; RHEINHEIMER, D.S.; RALISCH, R.; TESSIERE, D.; TOURDONNET, S.; MARIA DE FATIMA GUIMARÃES, M.F. Impact of Long-Term No-Tillage and Cropping System Management on Soil Organic Carbon in an Oxisol: A Model for Sustainability. **Agronomy Journal**, v.100, p.1013-1019, 2008.
- CAMARGO, O.A.; ALLEONI, L.R.F. **Compactação do solo e o desenvolvimento das plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1997. 132 p.
- CASTRO FILHO, C.; LOURENÇO, A.; GUIMARÃES, M.F.; FONSECA, I.C.B. Aggregate stability under different soil management systems in a red latosol in the state of Parana, Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.65, n.1, p.45-51. 2002.
- CASTRO FILHO, C.; MUZILLI, O.; PODANOSCHI, A.L. Estabilidade dos agregados e sua relação com o teor de carbono orgânico num Latossolo Roxo Distrófico, em função de sistemas de plantio, rotações de culturas e métodos de preparo das amostras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.527-538, 1998.
- CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, p.125-132, 1990.
- CHAER, G.M.; TÓTOLA, M.R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1381-1396, 2007.

COELHO, F. S. **Fertilidade do solo**. 2ª Ed. Campinas, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 1973.

CONCEIÇÃO, P.C.; AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J. SPAGNOLLO, E. Qualidade do solo em sistemas de manejo avaliada pela dinâmica da matéria orgânica e atributos relacionados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.777-788, 2005.

COSTA, E.A.; GOEDERT, W.J.; SOUSA, D.M.G. Qualidade de solo submetido a sistemas de cultivo com preparo convencional e plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.7, p.1185-1191, jul. 2006.

DA ROS, C.O.; SECCO, D.; FLORIN, J.E.; PETRERE, C.; CADORE, M.A.; PASA, L. Manejo do solo a partir de campo nativo: Efeito sobre a forma e estabilidade da estrutura ao final de cinco anos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, p.241-247, 1997.

D'ANDREA, A.F.; SILVA, M.L.N.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O.; CARNEIRO, M.A.C. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no sul do estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.913-923, 2002.

DERPSCH, R.; ROTH, C.H.; SIDIRAS, N.; KOPKE, U. **Controle da erosão no Paraná, Brasil: sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo**. Eschborn, Germany, Londrina, Brasil: GTZ-IAPAR, 1991. 272p.

DORAN, J.W., PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F., STEWART, B.A. (Ed). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Soil Science Society of America, v.35, p.3-21, 1994.

DORAN, J.W. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage, **Soil Science Society of America**. v.44, p.765-771, 1980.

EKENLER, M.; TABATABAI, M.A. Tillage and residue management effects on β -glucosaminidase activity in soils, **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, p.871-874, 2003.

ELTZ, F.L.F., PEIXOTO, R.T.G., JASPER, F. Efeitos de sistemas de preparo do solo nas propriedades físicas e químicas de um latossolo bruno álico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.13, p.259-267, 1989.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Brasil é referência mundial em plantio direto**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/NTicias/2008/fevereiro/2a-semana/brasil-e-referencia-mundial-em-plantio-direto/?searchterm=plantio%20direto>>. Acesso em 8 de dezembro de 2009.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Serviço Nacional de Levantamento e Conservação do Solo. **Manual de métodos de análises dos solos**. Rio de Janeiro: Embrapa, 1979.

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

FERNANDES, B.; GALLOWAY, H.M.; BRONSON, R.D. Efeito de três sistemas de preparo de solo na densidade aparente, na porosidade total e na distribuição dos poros em dois solos. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.7, n.3, p.329-333, 1983.

FORTES NETO, P.; FERNANDES, S.A.P.; JAHNEL, M.C. Microbiota do solo como indicadora da poluição do solo e do ambiente. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Eds.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007, p.259-274.

FRANCHINI, J.C.; BORKERT, C.M.; FERREIRA, M.M.; GAUDÊNCIO, C.A. Alterações na fertilidade do solo em sistemas de rotação de culturas em semeadura direta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.459-467, 2000.

FRANCHINI, J.C.; CRISPINO, C.C.; SOUZA, R.A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.92, p.18-29, 2007.

FRANCHINI, J.C.; MALAVOLTA, E.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A. Alterações químicas em solos ácidos após a aplicação de resíduos vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.533-542, 1999.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: Ed. Universidade / UFRGS, 2001. 653p.

GRIFFITHS, B.S.; RITZ, K.; BARDGETT, R.D.; COOK, R.; CHRISTENSEN, S.; EKELUND, F.; SORESEN, S.J.; BAATH, E.; BLOEM, J.; DE RUITER, P.C.; DOLFING, J.; NICOLARDOT, B. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. **Oikos**, v.19, p.279-294, 2001.

HOFMAN, J.; BEZCHLEBOVÁ, J.; DUŠEK, L.; DOLEŽAL, L.; HOLOUBEK, I.; ANDEL, P.; ANSORGOVÁ, A. ALÝ, S. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. **Environment International**, v. 28, n.8, p.771-778, 2003.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N.R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.190-197, 1996.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. **Importância do sistema de semeadura direta na população microbiana do solo**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1997. 9p. (EMBRAPA-CNPSO. Comunicado Técnico, 56).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; FRANCHINI, J.C.; CHUEIRE, L.M.O.; MENDES, I.C.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; LOUREIRO, M.F. Microbial quantitative and qualitative changes in soils under different crops and tillage management systems in Brazil. In: INTERNATIONAL TECHNICAL WORKSHOP ON BIOLOGICAL MANAGEMENT OF SOIL ECOSYSTEMS FOR SUSTAINABLE AGRICULTURE. Program, abstracts and related documents. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2002, 76p.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R.A. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. **Applied Soil Ecology**. v.42, n.3, p.288-296, 2009.

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, n.3, p.278-285, 1998.

INSAM, H. Are the soil microbial biomass and basal respiration governed by the climatic regime? **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.525-532, 1990.

INSAM, H.; MITCHELL, C.C.; DORMAAR, J.F. Relationship of soil microbial biomass and activity with fertilization practice and crop yield of three ultisols. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p.459-464, 1991.

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.

JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soils: measurement and turnover. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N., (Eds). **Soil Biochemistry**, New York: M. Dekker, 1981. v.5, p.415-471.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocide treatment on metabolism in soil. I. Fumigation with chloroform. **Soil Biology & Biochemistry**, v.8, p.167-177, 1976a.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocide treatment on metabolism in soil. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v.8, p.209-213, 1976b.

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.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environmental**, v.170, p.145-156, 2003.

KENNEDY, A.C.; CLIPSON, N. Fingerprinting the fungal community, **Mycologist**, v.17, p.158-164, 2003.

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

KENNEDY, A.C; PAPENDICK, R.I.; Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, v.50, n.3, p.243-248, 1993.

KLADIVKO, E.J. Tillage systems and soil ecology. **Soil & Tillage Research**, v.61, p.61-76, 2001.

KLUMPP, A.; HINTEMANN, T.; LIMA, J.S.; KANDELER, E. 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.

KURTBÖKE, D.I.; SWINGS, J.; STORMS, V. Microbial genetic resources and biodiscovery. In KURTBÖKE, I.; SWINGS, J. (Ed.), **Microbial genetic resources and biodiscovery**, UK: WFCC Publications. 2004.

LAL, R. **Métodos para avaliação do uso sustentável dos recursos solo e água nos trópicos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 97p. (Documentos 03).

LAL, R. Role of no-till farming in sustainable agriculture in tropics. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO SOBRE PLANTIO DIRETO NA PEQUENA PROPRIEDADE, 1, 1993, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: IAPAR, 1993. p.29-62.

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. (Orgs). **Tópicos em ciências do solo**. v.4. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2005. p.43-84.

LARSON, W.E.; PIERCE, F.J. **Conservation and enhancement of soil quality**. In: INTERNATIONAL BOARD FOR SOIL RESEARCH AND MANAGEMENT, v.2, n.12, 1991.

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

LEITE, L.F. **Plantio direto é mais eficaz no sequestro de carbono**, 2009. Disponível em:<http://www.suino.com.br/MeioambienteNTicia.aspx?codigoNT=rwkj//x68zg=&title=PLANTIO+DIRETO+E+O+MAIS+EFICAZ+NO+SEQUESTRO+DE+CARBONO>. Acesso em: 16 de novembro de 2009.

LECKIE, S.E.; PRESCOTT, C.E.; GRAYSTON, S.J.; NEUFELD, J.D.; MOHN, W.W. Comparation of chloroform fumigation-extraction, phospholipids fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.529-532, 2004.

LIBARDI, P.L. **Dinâmica da água no solo**. 2^a. ed., Piracicaba. 2000. 509p.

LIESACK, W.; JANSSEN, P.H.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY N.L.; STACKEBRANDT, E. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (Ed), **Modern soil microbiology**, New York: Marcel Dekker. 1997, p.375-439.

LIMA, C.L.R. **Compressibilidade de solos versus intensidade de tráfego em um pomar de laranja e pisoteio animal em pastagem irrigada**. Dissertação (Doutorado em Agronomia). 70p. – Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2004.

LIMA, J.S. Processos biológicos e o biomonitoramento: aspectos bioquímicos e morfológicos. In: MAIA, N.B.; MARTOS, H.L.; BARRELA, W. **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. 1 ed. São Paulo: EDUC, 2001 p. 95-115.

LOPES, E. **Diversidade metabólica em solo tratado com biossólidos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Solos e Nutrição de Plantas, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2001. 77p.

LOREAU, M.; NAEEM, S.; INCHAUSTI, P.; BENGTSSON, J.; GRIME, J.P.; HECTOR, A.; HOOPER, D.U.; HUSTON, M.A.; RAFFAELLI, D.; SCHMID, B.; TILMAN, D.;

WARDLE, D.A. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. **Science**, v. 294, p.804-808, 2001.

Mac DONALD, R.M. Extraction of microorganisms from soil. **Biological Agriculture and Horticulture**, v.3, p.361-365, 1986.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: ed. Agronômica Ceres, 1980. 251p.

MAMILOV, A.S.; DILLY, O.M. Soil microbial ecophysiology as affected by short-term variations in environmental conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.34, n.9, p.1.283-1.290, 2002.

MARCHIORI JÚNIOR, M.; MELO, W.J. Carbono, carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.257-263, 1999.

MATSUOKA, M.; MENDES, I.C.; LOUREIRO, M.F.; Microbial biomass and enzyme activities in soils under native vegetation and under annual and perennial cropping systems at the Primavera do Leste region – Mato Grosso State. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.425-433, 2003.

MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.35-59, 2004.

MELLONI, R. Quantificação microbiana da qualidade do solo. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Eds.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico. 2007, p.193-217.

MENDES, I.C.; CARNEIRO, R.G.; CARVALHO, A.M.; VIVALDI, L.; VARGAS, M.A.T. **Biomassa C e atividade microbiana em solos de cerrado sob plantio direto e plantio convencional**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999. 5p.

MENDES, I.C.; SOUZA, L.V.; RESCK, D.V.S.; GOMES, A.C. Propriedades biológicas em agregados de um LE sob plantio convencional e direto no Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.435-443, 2003.

MUYZER, G. DGGE/TGGE: a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, n.1, p.317-32, 1999.

MUYZER, G.; BRINKHOFF, T.; NUBEL, U.; SANTEGOEDS, C.; SCHAFER, H.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUJIN, F.D. (Eds.). **Molecular ecology manual**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1997, p.1-27.

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

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.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.13, p-3131-3145, 1985.

MYERS, R.T.; ZAK, D.R.; WHITE, D.C.; PEACOCK, A. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems. **Soil Science Society of American Journal**, v.65, p.359-367, 2001.

NIELSEN, M.N.; WINDING, A. **Microorganisms as indicators of soil health**. National Environmental Research Institute: Denmark, 2002. 84p. (Technical Report, 388).

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAM, M.P.; RAMPAZZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. 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.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399p.

NUBEL, U.; ENGELN B.; FELSKA A.; SNAIDR J.; WIESHUBER A.; AMANN R.I.; LUDWIG W.; BACKHAUS H. 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.

OGRAM, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32, p.1499-1504, 2000.

OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P. Molecular approaches for the screening of novel enzymes. In: JEAN-LOUIS REYMOND. (Org.). **Enzyme assays: high-throughput screening, genetic selection and fingerprinting**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2006, p. 221-238.

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, v.9, p.1–55, 1986.

PANKHURST, C.E.; ROGERS, S.L.; GUPTA, V.V.S.R. Microbial parameters for monitoring soil pollution. In: LYNCH, J.M.; WISEMAN, A. (Ed.). **Environmental biomonitoring: The biotechnology interface**, 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1998, p.46-69.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. Carbon cycling and soil organic matter. In: PAUL, E.A.; CLARK, F.E. (Ed.). **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic, 1996. p.130-155.

PAUL, E.A.; HARRIS, D.; COLLINS, H.P.; SCHULTHESS, U.; ROBERTSON, G.P. Evolution of CO₂ and soil carbon dynamics in biologically managed, row-crop agroecosystems. **Applied Soil Ecology**, v.11, p.53-65, 1999.

PAVAN, M.A. Ciclagem de nutrientes e mobilidade de íons no solo sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, v.41, p.8-12, 1997.

PENNANEN, T.; LISKI, J.; BÁÁTH, E.; KITUNEN, V.; UOTILA, J.; WESTMAN, C. J.; FRITZE, H. Structure of the microbial communities in coniferous forest soils in relation to site fertility and stand development stage. **Microbial Ecology**, v.38, n.2, p.168-179, 1999.

PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.C.; MADARI, B.; MACHADO, P.L.O.A.; RUMJANEK, N.G.; van ELSAS, J.D.; SELDIN, L. & ROSADO, A.S. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in Brazilian Cerrados. **Soil & Tillage Research**, v.90, p.16-28, 2006.

PEREIRA, A.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L.M.O.; CAMPO R.J.; TORRES E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1397-1412, 2007.

PROSSER, J.I. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. **Plant and Soil**, v.244, p.9-17, 2002.

QUILCHANO, C.; MARANÓN, T. Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, n.2, p.102-107, 2002.

RAIJ, B.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. (Eds.). **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285p.

RALTE, V.; PANDEY, H.N.; BARIK, S.K.; TRIPATHI, R.S.; PRABHU, S.D. Changes in microbial biomass and activity in relation to shifting cultivation and horticultural practices in subtropical evergreen forest ecosystem of north-east India. **Acta Oecologica**, Montrouge, v.28, n.2, p.163-172, 2005.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, v.51, n.3, p.167-177, 2000.

REZENDE, J.L.P.; GARCIA, Q.S.; CTTI, M.R.M.M.L. Laboratory decomposition of *Dalbergia nigra* All. ex. Benth and *Eucalyptus grandis* W.Hill ex. Maiden leaves in forest and eucalypt plantation soils. **Acta Botanica Brasilica**, v.15, n.3, p.305-312, 2001.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **International Society for Microbial Ecology**, v.1, p.283-290, 2007.

ROSCOE, R. Sequestro de carbono no sistema plantio direto: Possibilidades de contabilização. In: ROSCOE R.; MERCANTE, F.M.; SALTON, J.C. (Org.). **Dinâmica da**

matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas - modelagem matemática e métodos auxiliares. 1ª Ed. Dourados: Embrapa, 2006a. p.43-61.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F.M.; MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B.; dos SANTOS, J.C.F.; HUNGRIA, M. 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. 1ª Ed. Dourados: Embrapa, 2006b. p.163-198.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.39–67, 2001.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-, 1988.

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.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANYAL, S.K.; De DATTA, S.K. Chemistry of phosphorus transformations in soil. **Advances in Soil Science**, v.16, p.1-120, 1991.

SANTANA, D.P.; BAHIA-FILHO, A.F.C. Indicadores de qualidade do solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27, 1999, Brasília. Ciência do Solo e Qualidade de Vida. **Resumos**. Brasília: Embrapa Cerrados, UnB, 1999. CDROM.

SCALEA, M. Plantio direto: inovações técnicas. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, n. 83, p.38-40, 2004.

SCHAFER, R.L.; JOHNSON, C.E.; KOOLEN, A.J. GUPTA, S.C.; HORN, R. Future research needs in soil compaction. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v.36, n.6, p.1761-1770, 1992.

SÉGUY, L.; BOUZINAC, S. Direct seeding on plant covers: sustainable cultivation of our planet's soils. In: CONGRESS ON CONSERVATION AGRICULTURE: A WORLDWIDE CHALLENGE, 1. 2001, Madri. **Proceedings...** Madri: FAO/ECAI, 2001. p.85-92.

SETALA, H.; McLEAN, M.A. Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. **Oecologia**, v.139, p.98-107, 2004.

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.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA CNPAF. 1994. 142p. (Embrapa CNPAF. Documento, 45).

SISTI, C.P.J.; SANTOS, H.P.; KOHHANN, R.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in Southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.76, p.39-58, 2004.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; VAN ELSAS J.D.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis, **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2614–2621, 1999.

SMITH, J.L.; PAUL, E.A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: BOLLAG, J.; STOTZKY, D.G. (Ed.). **Soil Biochemistry**. New York: M. Dekker, v.6, p.357-396, 1990.

SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CHUEIRE, L.M.O.; BARCELLOS, F.G.; CAMPO, R.J. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.1, p.71-82, 2008a.

SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; MACIEL, C.D.; CAMPO R.J.; ZAIA, D.A.M. 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, 2008b.

SPARLING, G.P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Australian Journal of Soil Research**, v.30, p.195-207, 1992.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v.49, p.1-24, 1999.

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.

TORMENA, C.A.; SILVA, A.P.; LIBARDI, P.L. Caracterização do intervalo hídrico ótimo de um Latossolo Roxo sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.573-581, 1998.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V., V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M., (Ed). **Tópicos em ciência do solo**. v.2. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Viçosa, MG, 2002. p.195-276.

TU, C.; RISTAINO, J. B.; HU, S. Soil microbial biomass and activity in organic tomato farming systems: effects of organic inputs and straw mulching. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p. 247-255, 2006.

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

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

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., (Ed.). **Biologia dos solos de cerrados**. Planaltina: Embrapa CPAC, 1997. p.297-360.

VIEIRA, M.J. Comportamento físico do solo em plantio direto. In: FANCELLY, A.L.; TORRADO, P.V.; MACHADO, J. (Coord.) **Atualização em plantio direto**. Campinas: Fundação Cargil, 1985, p.163-179.

WALKER, R. Land use dynamics in the Brazilian Amazon. An overview. **Ecological Economics**, v.18, p.67-70, 1996.

WARD, D.M.; BATESON, M.M.; WELLER, R.; RUFF-ROBERTS, A.L. Ribossomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. **Advances in Microbial Ecology**, v.12, p.219-286, 1993.

WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v.345, p.63-65, 1990.

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

WARDLE, D.A. Metodologia para quantificação da biomassa microbiana do solo. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Eds.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994, 542p. (Embrapa CNPAF. Documentos, 46).

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primer to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **Journal of Microbiology Methods**, v.44, p.253-262, 2001.

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

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

WIETHÖLTER, S. Manejo da fertilidade do solo no sistema plantio direto: Experiência nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, (Fertbio 2000), Santa Maria, RS. **Anais...** Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. 35p. (CD-ROM).

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: Proposals for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p.4576-4579, 1990.

ZAMORA, F.; MOGOLLÓN, J.P.; RODRÍGUES, N. Câmbios em la biomassa microbiana y la actividad enzimática inducidos por la rotacións de cultivos em un suelo bajo producción de hortalizas em el estado Falcón. **Multiciencias**, v.5, n.1, p.62-70, 2005.

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.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST** Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: DMEC / IFM / UFPel, 1987. 138p.

ANEXOS

ANEXO A

ARTIGO

**QUANTIFICAÇÃO E ATIVIDADE DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO EM
DIFERENTES PROFUNDIDADES APÓS DUAS DÉCADAS DE CULTIVO SOB OS
SISTEMAS DE PLANTIO DIRETO E PLANTIO CONVENCIONAL NO PARANÁ**

Letícia Carlos Babujia, Julio Cezar Franchini e Mariangela Hungria

Pesquisa Agropecuária Brasileira

QUANTIFICAÇÃO E ATIVIDADE DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO EM DIFERENTES PROFUNDIDADES APÓS DUAS DÉCADAS DE CULTIVO SOB OS SISTEMAS DE PLANTIO DIRETO E PLANTIO CONVENCIONAL NO PARANÁ

Letícia Carlos Babujia¹, Julio Cezar Franchini² e Mariangela Hungria²

Resumo

Diversos estudos têm concluído que o sistema de manejo do solo conhecido como plantio direto (PD) é superior ao sistema de plantio convencional (PC) para preservar a qualidade do solo, resultado de melhorias nas propriedades químicas, físicas e biológicas. Entretanto, na maioria desses estudos relacionados aos sistemas de manejo os cálculos são expressos em termos de massa de solo, sem corrigir os valores para a densidade; além disso, as avaliações são realizadas considerando apenas as camadas superficiais. Somente pela comparação dos dois sistemas após a correção das densidades e considerando maiores profundidades seria possível, portanto, verificar o impacto real causado ao solo pelos sistemas de PD e PC. As análises deste estudo foram realizadas em ensaio conduzido na Embrapa Soja, em Londrina (PR), em um Latossolo Vermelho Eutroférico. No florescimento pleno da soja, no 20º ano do ensaio, amostras foram coletadas nas entrelinhas, em sete profundidades, de 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 e 50-60 cm, sob PC e PD, em parcelas de sucessão com soja (verão) e trigo (inverno). O delineamento experimental do ensaio foi em blocos ao acaso, com quatro repetições. Considerando-se a camada de 0-60 cm e corrigindo-se as diferenças na densidade do solo, o PD, em comparação com o PC, favoreceu fortemente o acúmulo de C e N orgânico totais no solo e de C e N da biomassa microbiana do solo, confirmando as vantagens do sistema conservacionista.

Termos para indexação: Biomassa microbiana do solo. Carbono do solo. Matéria orgânica do solo. Plantio direto. Respiração basal microbiana. quociente metabólico microbiano.

Abstract

Several studies have concluded that the no-tillage (NT) is the agricultural management system that best preserves the quality of soil in relation to the conventional tillage (CT), as a result of improvement in physical, chemical and biological soil properties. However, in most of these

¹ Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Caixa Postal 6001, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, CEP 86055-990 Londrina, PR. E-mail: leticiacb_@hotmail.com

² Embrapa Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. E-mail: franchini@cnpso.embrapa.br; hungria@cnpso.embrapa.br. Autor para correspondência: telefone: (+55)4333716206 fax: (+55)4333716100

studies the values are expressed in terms of soil mass, without adjusting the values to soil bulk density; furthermore, evaluations are almost always performed considering only the superficial layers. Therefore, only by comparing the depths and adjusting the values to soil bulk density, one could verify the real impact caused by the NT and CT systems. The analyses of this study were performed in an experiment performed at Embrapa Soja, in Londrina (PR), in a Latossolo Vermelho Eutroférico (Rhodic Eutrudox, USA classification). At full flowering of soybean, in the 20th year of the experiment, soil samples were collected between the lines, at seven depths, of 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 and 50-60 cm, under CT and NT plots cultivated under succession with soybean (summer) and wheat (winter) crops. Considering the 0-60 cm layer and correcting the values by soil bulk density, when compared to the CT, the NT greatly favored the accumulation of total soil C and N and of the microbial biomass of C and N, confirming the advantages of the conservation system.

Index terms: Metabolic quotient. Microbial basal respiration. Soil carbon. Soil microbial biomass. Soil organic matter. Solo. No-tillage.

Introdução

As pesquisas agrárias devem desenvolver práticas agrícolas que proporcionem alta produtividade das culturas e considerem a sustentabilidade ambiental. O manejo inadequado do solo resulta em perda de matéria orgânica do solo (MOS) e deterioração das propriedades físicas, químicas e biológicas, reduzindo a produtividade e a sustentabilidade agrícola. O balanço dos fatores físicos, químicos e biológicos do solo é, portanto, essencial para o bom funcionamento dos ecossistemas agrícolas. Os macro e microrganismos do solo realizam funções essenciais para o bom funcionamento do mesmo, tais como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, associações simbióticas com as raízes das plantas, controle biológico de patógenos, degradação de substâncias tóxicas, solubilização de minerais, agregação do solo, entre outras (Doran & Parkin, 1994; Kennedy & Doran, 2002; Nogueira et al., 2006; Kaschuk et al., 2010). Essas funções estão diretamente relacionadas à qualidade do solo que, por sua vez, está associada à sustentabilidade agrícola e redução no impacto ambiental. Desse modo, particularmente na última década, houve um crescimento acentuado na busca por critérios objetivos de avaliação da qualidade do solo e, dentre os parâmetros químicos, físicos e biológicos estudados, as avaliações da biomassa microbiana do solo (BMS) têm comprovado representar um ótimo indicador de mudanças ambientais, possibilitando detectar alterações provocadas por diferentes manejos do solo e das culturas em um estágio anterior ao das mudanças nos atributos químicos e físicos (Balota et al., 1998, 2003, 2004; Franchini et al., 2007; Hungria et al., 2009; Kaschuk et al., 2010).

O sistema de semeadura conhecido como plantio direto (PD) sobre a palhada, favorece a conservação do solo pelo não revolvimento do mesmo, estando por isso em plena difusão no Brasil, onde já cobre cerca de 70% da área cultivada com culturas anuais (Embrapa, 2009). O PD contrasta com o plantio convencional (PC), que revolve do solo através de aração e gradagem antes do plantio, acelerando os processos de erosão hídrica e degradando o solo pela perda da sua qualidade estrutural. Vários trabalhos têm comprovado as vantagens do PD sobre o PC, com ênfase na menor erosão do solo pela água e pelo vento, condições mais favoráveis de temperatura e umidade do solo, manutenção de propriedades físicas, favorecimento da macro e microbiota do solo, além das vantagens econômicas pelo menor desgaste das máquinas e benefícios sociais, exigindo menos trabalho humano, entre outras vantagens (Derpsch et al., 1991; Hungria et al., 1997; Lal, 1993; Lal et al., 2007). Nos últimos anos, também crescem as menções às vantagens do PD na mitigação de gases com efeito estufa, no mercado de créditos de carbono (Lal et al., 2007).

Uma limitação nas avaliações comparativas de C e da microbiota em solos sob PD e PC consiste em que os valores são em sua maioria expressos em termos de massa de solo (por exemplo, mg kg^{-1} de solo), sem corrigir para a densidade correta do solo. Outra limitação, recentemente enfatizada por Baker et al. (2007) consiste em que as avaliações consideram apenas as camadas superficiais do solo, de 0-30 cm, levantando o debate de que não haveria vantagens em termos de ganho de C se profundidades maiores forem consideradas. Finalmente, também há dúvidas sobre as comparações do PD e PC sem considerar diferenças importantes na densidade do solo entre os sistemas.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a contribuição do PD, em relação ao PC, em um ensaio de 20 anos conduzido no Paraná, considerando camadas de solo até a profundidade de 60 cm e estimando os valores com base na massa e no volume de solo.

Material e Métodos

1 Desenho experimental e amostragem do solo

O experimento foi estabelecido na área experimental da Embrapa Soja (Londrina, PR), no verão de 1988/89, com delineamento de blocos ao acaso e quatro repetições. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico (classificação americana, Rhodic Eutrudox), o qual contém 71% de argila, 16% de silte e 12% de areia. As

unidades experimentais medem 7,5 x 30 m (225 m²). Este estudo comparou os sistemas de semeadura em plantio direto (PD) e plantio convencional (PC) em uma sucessão de culturas, que intercala soja [*Glycine max* (L.) Merr] e trigo (*Triticum aestivum* L.) nos períodos de verão e inverno, respectivamente.

A coleta foi realizada em 14/01/2009, quando a soja estava no estágio R2 (florescimento pleno). As amostras foram coletadas na entrelinhas de cultivo nas profundidades 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 e 50-60 cm. Em cada parcela e profundidade foram coletadas cinco amostras, que foram homogeneizadas, dando origem a uma amostra composta. No laboratório, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas novamente, retirando-se restos de raízes e resíduos vegetais que porventura estivessem no solo. As amostras foram, então, peneiradas (4 mm, 5 mesh) e armazenadas em saco plástico, na geladeira, a 4°C por, no máximo, 10 dias, dando origem a uma amostra composta.

2 Análise física e química do solo

Para a avaliação da densidade aparente do solo, introduziram-se cilindros de 5 cm de diâmetro e 5 cm de altura no solo (três cilindros por profundidade). Com o auxílio de uma pá de corte, retirou-se o solo que envolvia o cilindro, e retirou-se o cilindro do perfil. O solo foi removido do cilindro e levado à estufa sob temperatura de 105-110°C por 48 h. A determinação da densidade aparente foi calculada com base na divisão da massa do solo seco (g) pelo volume do cilindro (cm³), e dessa forma, expressa em g cm⁻³ (Embrapa, 1979).

As amostras de solo destinadas à caracterização química foram secas em estufa ventilada a 50°C [terra fina seca ao ar (TFSA)], desagregadas e peneiradas em malha de 2 mm. Procedeu-se à quantificação do pH, H⁺, Al, Al³⁺, P, C, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺, conforme análises de rotina (Embrapa, 1979). O Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ foram analisados após extração em solução de KCl 1M, os dois primeiros por absorção atômica (Varian, modelo Spectr AA-800) e o Al³⁺ trocável por titulação. O P e o K⁺ foram determinados por extração em solução de Mehlich, sendo o P determinado através do complexo fosfomolibdico em espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm e o K⁺ dosado no extrato por fotometria de chama (Micronal B 462).

O teor de C total foi determinado pela metodologia de Raij et al. (2001), cuja determinação de matéria orgânica consiste em sua oxidação através da redução do K₂Cr₂O₇ em meio ácido, com quantificação no espectrofotômetro com comprimento de onda

de 630 nm. O teor de N total foi avaliado após a digestão por Kjeldahl e leitura colorimétrica, segundo (Feije & Anger, 1972).

3 Análise microbiana do solo

3.1 Avaliação da biomassa microbiana (BM) pelo método fumigação-extração (FE)

Para todas as análises microbiológicas foram utilizadas as amostras mantidas a 4°C. Para a avaliação do C da BM utilizou-se o método de fumigação-extração modificado de Vance et al. (1987), segundo descrito por Hungria et al. (2009). Para a análise do N da BM foi utilizado método proposto por Brookes et al. (1985), com pequenas modificações, conforme descrito por Hungria et al. (2009). Após a incubação e extração, a determinação do C foi realizada conforme descrito para a análise de C do solo e estimada pela diferença de C entre as amostras fumigadas e não-fumigadas, utilizando um K_C de 0,38 para o C (Vance et al., 1987). Após a incubação e extração a determinação do N foi realizada através de metodologias colorimétricas, como descrito para o N total do solo e estimada pela diferença de N entre as amostras fumigadas e não-fumigadas, utilizando um K_N de 0,54 (Brookes et al., 1985).

3.2 Avaliação da respiração basal (RB), respiração induzida (Ri) e quociente metabólico (qCO_2)

Foram pesadas 100 g de solo para as avaliações de amostras não fumigadas, induzidas ou não com glicose. A umidade de cada amostra foi corrigida para 30% da capacidade de campo, mediante adição e homogeneização com água destilada. Os tratamentos foram referentes a amostras não fumigadas, incubadas em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), no escuro, por 8 dias (respiração basal, RB) e a amostras não fumigadas, com adição e homogeneização com 1 g de açúcar, seguida por incubação por 8 dias (respiração induzida, Ri). A incubação foi feita em frascos vedados com vaselina contendo, além do recipiente com solo, um recipiente com 50 mL de NaOH 0,5 M e outro com 20 mL de água destilada. Depois da incubação, adicionou-se 1 mL de BaCl₂ saturado à cada recipiente de NaOH 0,5 M para precipitação de BaCO₃, seguida de avaliação por titulação.

O quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) representa a quantidade de CO_2 liberada por unidade de biomassa microbiana em um determinado tempo. Para a obtenção do $q\text{CO}_2$ foi feita a divisão da RB pela BM-C.

4 Análise estatística

A análise de variância dos dados das variáveis, profundidades e sistema de manejo foi realizada por regressão polinomial pelo programa SANEST (Zonta et al., 1987), utilizando o teste F a 5% para significância estatística. As profundidades foram tratadas como variáveis independentes, considerando-se os pontos médios no intervalo de profundidade de cada amostra: 2,5 cm (intervalo de 0-5 cm), 7,5 cm (5-10 cm), 15 cm (10-20 cm), 25 cm (20-30 cm), 35 cm (30-40 cm), 45 cm (40-50 cm) e 55 cm (50-60 cm). As diferenças das médias foram testadas com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

1 Atributos físicos e químicos no PD e PC em diferentes profundidades de solo.

Diversos estudos têm concluído que o PD é um sistema de manejo do solo mais adequado à sustentabilidade da biota do solo, em comparação com o PC, entretanto, na maioria das análises químicas e microbiológicas os valores não são corrigidos para a densidade do solo, bem como não são realizadas amostragens em profundidades superiores a 20 ou 30 cm. No primeiro caso, como os manejos de PD e PC diferem quanto aos efeitos sobre a densidade do solo, é possível que ocorram diferenças significativas na atividade metabólica e na sobrevivência dos microrganismos com a profundidade do solo. As limitações em relação à profundidade foram, recentemente, salientadas em discussão iniciada por Baker et al. (2007). Consequentemente, somente pela correção da densidade do solo e pela comparação da somatória das profundidades seria possível verificar o impacto real causado ao solo pelos sistemas de PD e PC.

Neste estudo, o PD resultou em uma densidade maior que a do PC particularmente até os 30 cm de profundidade, enquanto que o PC favoreceu o maior adensamento do solo nas camadas mais profundas (Figura 1). Esses resultados estão de acordo com os dados de Fernandes et al. (1983), que observaram que, na camada de 0-10 cm, houve redução aparente na densidade do solo no sistema de PC, quando comparando ao PD,

enquanto que na camada de 10–20 cm a densidade do PD foi menor do que no PC. Segundo Tormena et al. (1998), o tráfego de máquinas representa o principal fator nas alterações físicas do solo. Embora a maior densidade possa ser considerada uma característica desfavorável, deve-se salientar que o PD favorece fortemente outros atributos físicos, como a estrutura do solo, com ênfase nos índices de estabilidade dos agregados (Castro Filho et al., 2002; Mendes et al., 2003).

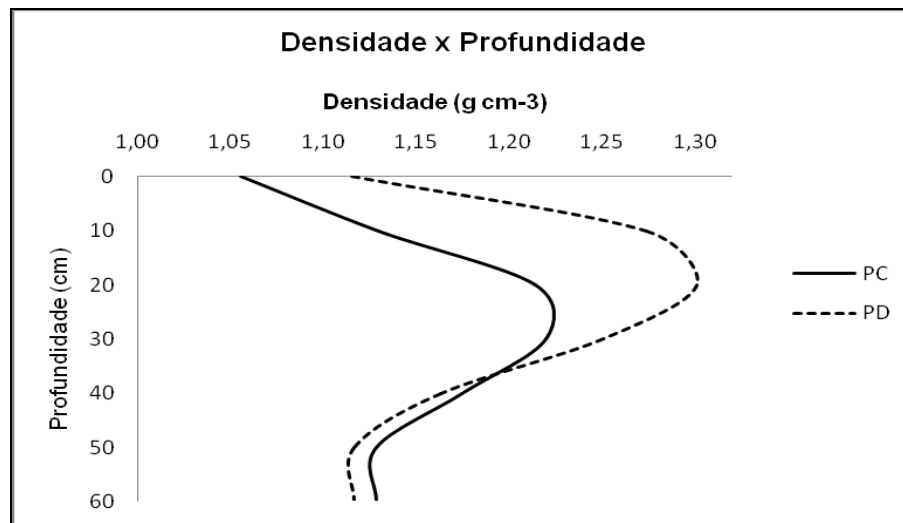


Figura 1 – Densidade aparente do solo em um Latossolo Vermelho Eutroférico de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC).

Em geral, as diferenças de pH entre os sistemas PD e PC não foram significativas (Tabela 1). As diferenças de pH só foram observadas no PD em profundidade, o que pode ser atribuído, primeiro, à distribuição superficial do calcário, sem seu deslocamento para as camadas mais profundas. Como segundo fator, é provável que o PD tenha mantido a umidade do solo por mais tempo, o que facilitou a dissolução do calcário, neutralizando acidez do solo nas camadas superficiais. Almeida et al. (2005), por exemplo, também verificaram valores mais elevados de pH no PD.

O pH atua diretamente na disponibilidade dos nutrientes presentes no solo e, assim, pequenas diferenças na acidez do solo entre o PD e PC podem interferir nas diferentes concentrações de macro e micronutrientes. O PD também promove o aumento da CTC através do decréscimo de oxidação da MOS, beneficiando a adsorção dos cátions trocáveis (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}), conseqüentemente, há um aumento nos teores de P, Ca, Mg e K no solo (Pavan, 1997), conforme foi também observado neste estudo (Tabela 1). Sisti et al (2004) também

observaram que o PD apresentou uma concentração de P maior até 20 cm de profundidade quando comparado ao PC, devido à menor adsorção de P em solos de acidez elevada.

As concentrações de Ca e Mg no solo não diferiram entre os sistemas de manejo (Tabela 1). O Ca ficou bem distribuído em todo o perfil do solo em ambos os sistemas de manejo, mas houve uma maior concentração de Mg nas camadas de 0-10 cm do PD, provavelmente porque as taxas de lixiviação de Mg foram maiores neste sistema.

Tabela 1 – Caracterização química de um Latossolo Vermelho Eutroférico, em Londrina, PR após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC)

Profundidade cm	pH				P				K				Ca				Mg							
	CaCl ₂		SMP		mg dm ⁻³				cmolcdm ⁻³															
	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC								
0 – 5	5,59	ab A	5,43	ns A	4,10	ab A	3,77	ns A	64.25	a A	16.68	a B	0,73	a A	0,34	a B	7,60	ns A	7,46	ns A	2,48	a A	1,33	ns B
5 – 10	5,70	a A	5,24	B	3,55	b A	4,04	A	44.51	b A	17.84	a B	0,76	a A	0,20	abc B	7,44	A	6,85	A	1,78	ab A	1,25	A
10 – 20	5,14	cd A	5,41	A	4,75	a A	3,74	B	10.87	c A	15.68	a A	0,53	bc A	0,30	ab B	7,07	A	6,45	A	1,13	b A	1,20	A
20 – 30	5,50	abc A	5,38	A	4,19	ab A	3,90	A	2.77	c A	5.52	b A	0,63	ab A	0,15	bc B	9,53	A	7,23	A	1,50	b A	1,43	A
30 – 40	5,08	d A	5,45	A	4,75	a A	3,66	B	2.66	c A	3.62	b A	0,38	cd A	0,23	abc B	7,42	A	6,41	A	1,21	b A	1,35	A
40 – 50	5,31	abcd A	5,21	A	4,25	ab A	3,64	B	2.36	c A	2.84	b A	0,49	bc A	0,11	c B	7,66	A	6,37	A	1,75	ab A	1,60	A
50 – 60	5,21	bcd A	5,26	A	4,11	ab A	3,65	A	1.96	c A	2.06	b A	0,22	d A	0,16	bc A	6,42	A	5,42	A	1,18	b A	0,92	A
<i>p</i> manejo	0,729		0,008		>0,001		>0,001		0,185		0,219													
C.V (%)	1,69		2,80		8,05		7,78		11,60		18,76													
<i>p</i> profundidade	0,034		0,142		>0,001		>0,001		0,209		0,008													
<i>p</i> man. x prof.	>0,001		0,003		>0,001		>0,001		0,925		0,086													
C.V (%)	3,40		9,05		19,67		20,18		24,48		30,72													

Médias de quatro repetições e, quando seguidas de mesma letra não se diferem entre si pelo teste de Tukey a ($p < 0,05$). Letras minúsculas são referentes à profundidade. Letras maiúsculas para cada parâmetro na linha são referentes ao manejo em cada profundidade. Ns: não significativo.

2 C e N orgânico totais e biomassa microbiana do solo

Os teores de C orgânico total (CT) apresentaram diferenças significativas entre as profundidades e com o manejo do solo (Tabela 2). Os menores valores de CT foram observados no PC, sendo baixos tanto na camada superficial (0-5 cm, $23,25 \text{ kg m}^{-3}$) 50% inferiores aos observados no PD, e o mesmo comportamento continuou a ser observado nas camadas mais profundas, até 50-60 cm. Esses resultados podem ser explicados pela rápida decomposição de resíduos orgânicos depositados no solo sob PC e pela adoção de práticas mais intensas de cultivo no solo, que aceleram o processo de decomposição da MOS, enquanto que, pelo não revolvimento no PD, há menor interferência na taxa de decomposição da MOS, favorecendo sua manutenção e acúmulo, garantindo um fluxo contínuo de matéria e energia, contribuindo para aumento do estoque de C (Roscoe et al., 2006). Resultados semelhantes foram observados por outros autores (Bayer et al., 2002; Bossuyt et al., 2002; Conceição et al., 2005; Calegari et al., 2008), embora, em geral, as avaliações tenham sido feitas apenas nas camadas superficiais.

Os teores acumulados de N total no perfil do solo foi de $1,23 \text{ kg m}^{-3}$ no PD e $1,17 \text{ kg m}^{-3}$ no PC. As maiores concentrações de N total no PD foram observadas na profundidade de 0 a 20 cm, sendo em média essa diferença superior a 70%, comparado ao PC. Em ambos os sistemas as menores concentrações de N total foram observadas nas maiores profundidades (Tabela 2). Incremento no NT no PD também foram observadas em outros estudos (Franchini et al., 2007).

Os valores de CBM corrigidos pela densidade do solo diferiram entre si nas diferentes profundidades, mostrando valores mais elevados na superfície em ambos os sistemas de manejo. O PD apresentou maiores valores nos teores de CBM até os 40 cm de profundidade, sendo superior ao PC em 82% na camada de 0-5 cm; contudo, no intervalo de 40-60 cm os valores foram superiores no PC (Tabela 2). Entretanto, quando se compara a somatória de todas as profundidades nos dois sistemas de manejo, o PD apresenta uma concentração de $294,15 \text{ g m}^{-3}$, superior ao PC, com $219,90 \text{ g m}^{-3}$. Esses resultados corroboram outros estudos que indicam favorecimento do CBM no PD, mas que em geral avaliaram apenas as camadas superficiais de solo, ou que não fizeram as correções considerando a densidade do solo (Alvarez et al., 1995; Balota et al., 1998, 2003, 2004; Zamora et al., 2005; Franchini et al., 2007; Hungria et al. 2009).

Embora a concentração de NBM do PD fosse superior à do PC até os 30 cm de profundidade, ela foi maior no PC na camada de 30-60 cm (Tabela 2). Além disso, na

comparação do estoque total de NBM em todo o perfil, o PC apresentou $12,70 \text{ g m}^{-3}$, e o PD apresentou um teor superior, de $15,89 \text{ g m}^{-3}$. Esse efeito pode ser atribuído a diversos fatores, como o N derivado da decomposição do sistema radicular e restos culturais do plantio atual.

Segundo Sparling (1992), o q_{Mic} (razão entre CBM e CT) pode ser um indicador muito sensível das mudanças na dinâmica da MOS, principalmente quando o solo é submetido a diferentes práticas de manejo. Neste estudo, os sistemas apresentaram diferenças no q_{Mic} entre os sistemas de manejo e entre as profundidades. O PD apresentou maior q_{Mic} até os 40 cm de profundidade, mas no intervalo de 40-60 cm o PC superou o PD (Tabela 2). O q_{Mic} é um indicador de que a biomassa está ou não sob algum fator de estresse e não consegue utilizar o C disponível no solo. Por isso, menores valores de q_{Mic} indicam menor capacidade de utilização de C (Anderson & Domsch, 1989).

Considerando o conjunto de resultados obtidos, o CT foi superior no PD em todas as profundidades. Contudo, o NT, CBM e NBM foram maiores no PD até os 40 cm de profundidade, e inferiores na camada de 40-60 cm. Pode-se supor que o sistema de PD esteja limitado pelo N nas camadas mais profundas, por ocorrer uma intensa atividade microbiana nas camadas superficiais, evitando qualquer lixiviação de N mineralizado. Outra forte hipótese está relacionada ao longo tempo de experimento com a rotação soja-trigo, com aporte mínimo de fertilizante nitrogenado para o trigo, podendo ter ocorrido um decréscimo no estoque de N, pela maior retirada pelas plantas, com rendimento sempre superior no PD em comparação ao PC (dados não mostrados).

Ao avaliar a RB nos dois sistemas de manejo, o PD apresentou taxa de respiração mais elevada do que o PC (Tabela 3), confirmando uma maior atividade microbiana. Já nas camadas mais profundas foi constatada baixa atividade microbiana com a profundidade em ambos os sistemas. Balota et al. (1998), Mendes et al. (1999) e Vargas & Scholles (2000) observaram que, no sistema de PC, a liberação de CO_2 tende a ser uniforme no intervalo de 0-20 cm e, para o PD, os maiores valores de CO_2 se concentram na camada superficial. Ainda segundo Vargas & Scholles (2000), as diferenças nas atividades do perfil do solo refletem a distribuição dos resíduos vegetais, bem como da MOS.

Conforme esperado, a adição do substrato (glicose) provocou um grande incremento na liberação de CO_2 (respiração basal induzida, RBI) em todas as profundidades e nos dois sistemas de manejo. De acordo com Wardle (1994), os microrganismos ativos respondem imediatamente à adição de glicose. Através da relação RBI/RB pode-se observar que, nas camadas superficiais (0-30 cm), os microrganismos no PC foram mais estimulados pela adição de glicose, indicando que, aparentemente, apresentavam maior limitação de C,

devido aos baixos resíduos de carbono disponíveis nesse sistema de manejo. Já nas camadas de 30-60 cm, a relação RBI/RB foi superior no PD, pois a incorporação de restos culturais faz com que a limitação de C seja maior no PD.

Tabela 2 – Carbono e nitrogênio (CT e NT), biomassa microbiana (CBM) e (NBM) e quociente microbiano (qMic) em um Latossolo Vermelho Eutroférico de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC).

Profundidade cm	CT		NT		CBM		NBM		qMic	
	kg C m ⁻³ solo				g C m ⁻³ solo				%	
	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC
0 - 5	42,35 ab A	32,93 a B	2,85 a A	2,09 bc B	1061 a A	582 a B	66,54 a A	36,48 a B	3,10 a A	1,87 ns B
5 - 10	46,17 a A	35,27 a B	3,26 a A	2,30 ab B	800 b A	570 ab B	43,64 b A	33,62 ab A	1,95 bc A	1,86 A
10 - 20	39,32 b A	36,23 a A	3,01 a A	2,63 a A	638 bc A	390 bc B	37,66 bc A	31,28 ab A	2,12 ab A	1,32 B
20 - 30	29,94 c A	34,50 a A	2,01 b A	2,20 ab A	500 cd A	327 c B	34,53 bc A	25,76 ab A	1,95 bc A	1,12 B
30 - 40	26,07 c A	24,61 b A	1,77 bc A	1,61 cd A	382 de A	336 c A	22,72 cd A	20,06 abc A	1,74 bc A	1,31 A
40 - 50	24,26 c A	22,57 b A	1,48 c A	1,57 d A	270 e A	296 c A	10,96 de A	16,80 bc A	1,25 bc A	1,50 A
50 - 60	23,66 c A	24,61 b A	1,42 c A	1,60 d A	221 e A	272 c A	-2,12 e A	5,25 c A	1,03 c A	1,57 A
Total (0,6 m² solo)	18,71	17,66	1,27	1,17	294,15	219,80	15,88	13,42	1,06	0,87
p manejo	0,101		0,107		0,003		0,094		0,033	
C.V (%)	5,76		7,52		5,50		10,86		8,43	
p profundidade	>0,001		>0,001		>0,001		>0,001		>0,001	
p manejo x prof.	>0,001		>0,001		>0,001		0,003		0,004	
C.V (%)	9,69		10,44		17,60		32,34		26,60	

Médias de quatro repetições e, quando seguidas de mesma letra não se diferem entre si pelo teste de Tukey a ($p < 0,05$). Letras minúsculas são referentes à profundidade. Letras maiúsculas para cada parâmetro na linha são referentes ao manejo em cada profundidade. ns: não significativo.

O $q\text{CO}_2$ não diferiu entre os sistemas de manejo, mas houve diferença estatística entre as profundidades. As camadas superficiais resultaram em valores mais baixos e houve um aumento gradativo do $q\text{CO}_2$ até 30 cm de profundidade, voltando a decair dos 30 a 60 cm de profundidade. O $q\text{CO}_2(i)$ revelou o mesmo comportamento que o sistema não induzido. Tanto para o PC quanto para o PD, os valores mais discrepantes foram observados entre 5-30 cm de profundidade (Tabela 3). É possível que as diferenças de $q\text{CO}_2$ em profundidade reflitam as condições ambientais às quais a biomassa microbiana está submetida, ou mesmo diferenças na estrutura genética dessas populações, ou na funcionalidade das mesmas. Entretanto, é preciso ter cautela quando se interpreta o $q\text{CO}_2$, uma vez que um alto valor pode tanto inferir estresse, quanto maior oferta de substrato para respiração, ou mesmo um ecossistema imaturo (Nielsen & Winding, 2002). A importância de avaliar o $q\text{CO}_2$ reside em que o manejo do solo pode selecionar uma população microbiana mais eficiente, eliminando uma quantidade menor de C através da respiração, o que pode ser muito importante na manutenção ou incremento dos estoques de C do solo (Insam, 1990; Insam et al., 1991; Balota et al., 1998; Franchini et al., 2007; Hungria et al., 2009).

Trabalhos anteriores conduzidos por nosso grupo de pesquisa confirmaram que os atributos microbiológicos foram mais sensíveis ao manejo e profundidade do solo em relação aos parâmetros químicos e físicos e que o PD favoreceu os parâmetros microbiológicos em relação ao PC (Balota et al., 1998; Franchini et al., 2007; Pereira et al., 2007; Hungria et al., 2009). Uma limitação nesses estudos poderia residir em que as avaliações foram feitas apenas nas camadas superficiais do solo e, exceto pelo estudo de Franchini et al. (2007), sem correção para as diferenças na densidade do solo. Contudo, os resultados aqui mostrados confirmam as vantagens do PD quando todo o perfil do solo, até a profundidade de 60 cm e corrigido pela densidade do solo, foi considerado.

Tabela 3 – Respiração basal (RB), respiração basal induzida (RB(i)), quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) e quociente metabólico ($q\text{CO}_2(i)$) em um Latossolo Vermelho Eutroférico de Londrina após 20 anos sob os sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC)

Profundidade (cm)	RB (mg C m ⁻³ solo d ⁻¹)		RB(i) (mg C m ⁻³ solo d ⁻¹)		$q\text{CO}_2$ (mg C m ⁻³ solo d ⁻¹)		$q\text{CO}_2(i)$ (mg C m ⁻³ solo d ⁻¹)	
	PD	PC	PD	PC	PD	PC	PD	PC
0 – 5	751 a A	466 a B	3178 a A	2570 a B	0,72 a A	0,85 a A	3,04 a A	4,72 a B
5 – 10	688 ab A	429 ab B	3255 ab A	2410 a B	1,10 a A	0,87 ab A	5,22 b A	4,94 a A
10 - 20	606 bc A	435 ab B	2556 ab A	2294 a B	1,28 a A	1,37 ab A	5,28 b A	7,20 b B
20 - 30	488 cd A	388 abc B	2056 bc A	1455 a B	1,53 ab A	1,44 ab A	5,19 b A	5,23 a A
30 - 40	384 de A	351 abc A	1462 bc A	1262 b A	1,17 ab A	1,31 ab A	4,63 ab A	4,70 bc A
40 - 50	294 de A	266 bc A	1102 bc A	1180 b A	1,22 ab A	1,02 b A	4,64 ab A	4,54 bc A
50 - 60	296 e A	304 c B	1018 a A	832 c A	1,57 c A	1,04 b B	4,07 ab A	2,86 c B
<i>p</i> manejo	0,009		>0,001		0,205		0,353	
C.V (%)	7,73		1,36		7,26		7,50	
<i>p</i> profundidade	>0,001		>0,001		>0,001		>0,001	
<i>p</i> manejo x prof.	>0,001		>0,001		0,066		0,003	
C.V (%)	14,14		9,24		19,78		16,50	

Médias de quatro repetições e, quando seguidas de mesma letra não se diferem entre si pelo teste de Tukey a ($p < 0,05$). Letras minúsculas são referentes à profundidade. Letras maiúsculas para cada parâmetro na linha são referentes ao manejo em cada profundidade. ns: não significativo.

Conclusões

Considerando a camada de 0-60 cm e corrigindo as diferenças na densidade do solo, o sistema de plantio direto, em comparação com o plantio convencional, favoreceu o acúmulo de C e N orgânico totais no solo e de C e N da biomassa microbiana do solo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.A.A.; BERTOL, I.; LEITE, D.; AMARAL, A.J.; ZOLTAN JUNIOR, W.A. Propriedades químicas de um Cambissolo húmico sob preparo convencional e semeadura direta após seis anos de cultivo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.3, p.437-445, 2005.
- ALVAREZ, R.; DÍAZ, R.A.; BARBERO, N.; SANTA-NATOGLIA, O.J.; BLOTTA, L. Soil organic carbon, microbial biomass and CO₂-C production from three tillage systems. **Soil & Tillage Research**, v.33, p.17-28, 1995.
- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Ratio of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.21, p.471-479, 1989.
- BAKER, J.M.; OCHSNER, T.E.; VENTEREA, R.T.; GRIFFIS, T.J. Tillage and soil carbon sequestration-What do we really know? **Agriculture Ecosystems & Environment**, v.118, p.1-5, 2007.
- BALOTA, E.L., COLOZZI-FILHO, A., ANDRADE, D.S., HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.641-649, 1998.
- BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazil oxisol. **Soil & Tillage Research**, v.70, p.137-145, 2004.
- BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.15-20, 2003.
- BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L.; ERNANI, P.R. Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil. **Plant and Soil**, v.238, p.133-140, 2002.
- BOSSUYT, H.; SIX, J.; HENDRIX, P.F. Aggregate-protected carbon in no-tillage and conventional tillage agroecosystems using carbon-14 labeled plant residue. **Soil Science Society of America Journal**, v.66, p.1965-1973, 2002.
- BROOKES, P.C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.17, p.837-842, 1985.
- CALEGARI, A.; HARGROVEB, W.L.; RHEINHEIMERC, D.S.; RALISCHD, R.; TESSIERE, D.; TOURDONNETF, S.; MARIA DE FATIMA GUIMARÃES, M.F. Impact of long-term no-tillage and cropping system management on soil organic carbon in an oxisol: a model for sustainability. **Agronomy Journal**, v.100, p.1013-1019, 2008.
- CASTRO FILHO, C.; LOURENÇO, A.; GUIMARÃES, M.F.; FONSECA, I.C.B. Aggregate stability under different soil management systems in a red latosol in the state of Parana, Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.65, n.1, p.45-51. 2002.

CONCEIÇÃO, P.C.; AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J. SPAGNOLLO, E. Qualidade do solo em sistemas de manejo avaliada pela dinâmica da matéria orgânica e atributos relacionados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.777-788, 2005.

DERPSCH, R.; ROTH, C.H.; SIDIRAS, N.; KOPKE, U. **Controle da erosão no Paraná, Brasil**: sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo. Eschborn, Germany, Londrina, Brasil: GTZ-IAPAR, 1991. 272p.

DORAN, J.W., PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F., STEWART, B.A. (Ed). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Soil Science Society of America, v.35, p.3-21, 1994.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Brasil é referência mundial em plantio direto**. Disponível em:<<http://www.embrapa.br/imprensa/NTicias/2008/fevereiro/2a-semana/brasil-e-referencia-mundial-em-plantio-direto/?searchterm=plantio%20direto>. Acesso em 8 de dezembro de 2009.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Serviço Nacional de Levantamento e Conservação do Solo. **Manual de métodos de análises dos solos**. Rio de Janeiro: Embrapa, 1979.

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

FERNANDES, B.; GALLOWAY, H.M.; BRONSON, R.D. Efeito de três sistemas de preparo de solo na densidade aparente, na porosidade total e na distribuição dos poros em dois solos. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.7, n.3, p.329-333, 1983.

FRANCHINI, J.C.; CRISPINO, C.C.; SOUZA, R.A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.92, p.18-29, 2007.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R.A. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. **Applied Soil Ecology**. v.42, n.3, p.288-296, 2009.

INSAM, H. Are the soil microbial biomass and basal respiration governed by the climatic regime? **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.525-532, 1990.

INSAM, H.; MITCHELL, C.C.; DORMAAR, J.F. Relationship of soil microbial biomass and activity with fertilization practice and crop yield of three ultisols. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p.459-464, 1991.

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.

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

LAL, R. Role of no-till farming in sustainable agriculture in tropics. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO SOBRE PLANTIO DIRETO NA PEQUENA PROPRIEDADE, 1, 1993, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: IAPAR, 1993. p.29-62.

LAL, R.; REICOSKY, D.C.; HANSON, J.D. Evolution of the plow over 10,000 years and the rationale for no-till farming. **Soil & Tillage Research**, v.93, p.1-12, 2007.

MENDES, I.C.; CARNEIRO, R.G.; CARVALHO, A.M.; VIVALDI, L.; VARGAS, M.A.T. **Biomassa C e atividade microbiana em solos de cerrado sob plantio direto e plantio convencional**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999. 5p.

MENDES, I.C.; SOUZA, L.V.; RESCK, D.V.S.; GOMES, A.C. Propriedades biológicas em agregados de um LE sob plantio convencional e direto no Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.435-443, 2003.

NIELSEN, M.N.; WINDING, A. **Microorganisms as indicators of soil health**. National Environmental Research Institute: Denmark, 2002. 84p. (Technical Report, 388).

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAM, M.P.; RAMPAZZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. 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.

PEREIRA, A.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L.M.O.; CAMPO R.J.; TORRES E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1397-1412, 2007.

RAIJ, B.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. (Eds.). **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285p.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F.M.; MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B.; dos SANTOS, J.C.F.; HUNGRIA, M. 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**. 1ª Ed. Dourados: Embrapa, 2006. p.163-198.

SISTI, C.P.J.; SANTOS, H.P.; KOHHANN, R.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in Southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.76, p.39-58, 2004.

SPARLING, G.P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Australian Journal of Soil Research**, v.30, p.195-207, 1992.

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

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

WARDLE, D.A. Metodologia para quantificação da biomassa microbiana do solo. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Eds.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994, 542p. (Embrapa CNPAF. Documentos, 46).

ZAMORA, F.; MOGOLLÓN, J.P.; RODRÍGUES, N. Câmbios em la biomassa microbiana y la actividad enzimática inducidos por la rotacións de cultivos em un suelo bajo producción de hortalizas em el estado Falcón. **Multiciencias**, v.5, n.1, p.62-70, 2005.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST** Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: DMEC / IFM / UFPel, 1987. 138p.

ANEXO B

NORMAS DA REVISTA

*Pesquisa Agropecuária Brasileira***INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA PAB**

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico para publicação. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

A Comissão Editorial faz análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como: escopo; apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; resultados com contribuição significativa; discussão dos fatos observados frente aos descritos na literatura; qualidade das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassar a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério só é aplicado aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

Os trabalhos devem ser encaminhados por via eletrônica para: pab@sct.embrapa.br

A mensagem que encaminha o trabalho para publicação deve conter:

Título do trabalho.

Nome completo do(s) autor(es).

Formação acadêmica e grau acadêmico do(s) autor(es).

Endereço institucional completo e endereço eletrônico do(s) autor(es).

Indicação do autor correspondente.

Acima de quatro autores, informar a contribuição de cada um no trabalho.

Destaque sobre o aspecto inédito do trabalho.

Indicação da área técnica do trabalho.

Declaração da não-submissão do trabalho à publicação em outro periódico.

Cada autor deve enviar uma mensagem eletrônica, expressando sua concordância com a submissão do trabalho.

O texto deve ser digitado no editor de texto Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, margens de 2,5 cm, com páginas e linhas numeradas.

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

Artigos em português – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

Artigos em inglês – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

Artigos em espanhol – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Material y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

Título

- * Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- * Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- * Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- * Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- * As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura. * Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

Nomes dos autores

Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à respectiva chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- * São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- * Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- * Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- * O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- * Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- * Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos empregados na pesquisa, os resultados e a conclusão.

O objetivo deve estar separado da descrição de material e métodos.

Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.

- * O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- * A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- * Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.

Não devem conter palavras que componham o título.

Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

Introdução

- * A palavra Introdução deve ser centralizada na página e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- * Deve ocupar, no máximo, duas páginas.
- * Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- * O último parágrafo deve expressar o objetivo, de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- * A expressão Material e Métodos deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- * Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- * Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.

Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.

Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.

- * Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- * Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- * Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- * Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

- * Pode conter tabelas e figuras.

Resultados e Discussão

- * A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Resultados e Discussão devem ser grafados com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Deve ocupar quatro páginas, no máximo.

Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.

As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.

- * Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos frente aos apresentados por outros autores.
- * Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- * Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- * As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- * Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- * As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- * O termo Conclusões deve ser centralizado na página e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo, e elaboradas com base no objetivo do trabalho.

Não podem consistir no resumo dos resultados.

Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.

Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

A palavra Agradecimentos deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).

- * Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- * A palavra Referências deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- * Devem ser normalizadas de acordo com as normas vigentes da ABNT.
- * Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.

Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
 Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
 Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
 Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
 Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BASTISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

Teses e dissertações

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 -Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em:
 <<http://www.cpao.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=DOC&num=66&ano=2004>>. Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- * Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.
- * A autocitação deve ser evitada.

Redação das citações dentro de parênteses

Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.

Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

Redação das citações fora de parênteses

- * Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

Fórmulas, expressões, símbolos ou equações matemáticas, escritas no editor de equações do programa Word, devem ser enviadas também em arquivos separados, no programa Corel Draw, gravadas com extensão CDR.

No texto, devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

- * Não devem apresentar letras em itálico ou negrito.

Tabelas

- * As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após referências.
- * Devem ser auto-explicativas.

- * Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- * Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- * O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- * No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo; a coluna indicadora é alinhada esquerda.

* Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

* Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares.

Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

* As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

Notas de rodapé das tabelas

* Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ^{ns} (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- * São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- * Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- * O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- * Devem ser auto-explicativas.
- * A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- * Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- * Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- * O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.
- * As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- * Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- * Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- * As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- * Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- * Devem ser gravadas no programa Word ou Excel, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- * Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- * No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- * Não usar negrito nas figuras.
- * As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- * Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

NOTAS CIENTÍFICAS

- * Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

APRESENTAÇÃO DE NOTAS CIENTÍFICAS

- * A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.

As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

Resumo com 100 palavras, no máximo.

Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.

deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

NOVAS CULTIVARES

- * Novas Cultivares são breves comunicações de cultivares que, depois de testadas e avaliadas pelo Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA), foram superiores às já utilizadas e serão incluídas na recomendação oficial.

APRESENTAÇÃO DE NOVAS CULTIVARES

Deve conter: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, título em inglês, Abstract, Introdução, Características da Cultivar, Referências, tabelas e figuras. As normas de apresentação de Novas Cultivares são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

Resumo com 100 palavras, no máximo.

Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.

Deve apresentar, no máximo, 15 referências e quatro ilustrações (tabelas e figuras).

A introdução deve apresentar breve histórico do melhoramento da cultura, indicando as instituições envolvidas e as técnicas de cultivo desenvolvidas para superar determinado problema.

A expressão Características da Cultivar deve ser digitada em negrito, no centro da página.

Características da Cultivar deve conter os seguintes dados: características da planta, reação a doenças, produtividade de vagens e sementes, rendimento de grãos, classificação comercial, qualidade nutricional e qualidade industrial, sempre comparado com as cultivares testemunhas.

OUTRAS INFORMAÇÕES

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.
- **Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: pab@sct.embrapa.br ou pelos correios: Embrapa Informação Tecnológica, Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB, Caixa Postal 040315, CEP 70770-901 Brasília, DF.**