

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CARLOS HENRIQUE ANTUNES

AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO EM UM SISTEMA DE  
PLANTIO DIRETO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CALAGEM E APLICAÇÃO  
DE NITROGÊNIO

PONTA GROSSA  
2018

CARLOS HENRIQUE ANTUNES

AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO EM UM SISTEMA DE  
PLANTIO DIRETO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CALAGEM E APLICAÇÃO  
DE NITROGÊNIO

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia- Área de Concentração: Agricultura.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto

Ponta Grossa

2018

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Antunes, Carlos Henrique  
A627      Avaliação da comunidade microbiana do solo em um sistema de plantio direto sob diferentes condições de calagem e aplicação de nitrogênio/ Carlos Henrique Antunes. Ponta Grossa, 2018.  
73f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carolina Weigert Galvão.  
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto.

1. Biomassa microbiana do solo. 2. Microorganismos diazotrofos. 3. Manejo do solo. I. Galvão, Carolina Weigert. II. Etto, Rafael Mazer. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Agronomia. IV. T.

CDD: 631.41



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “Avaliação da comunidade microbiana do solo em um sistema de plantio direto sob diferentes condições de calagem e aplicação de nitrogênio”.

Nome: Carlos Henrique Antunes

Orientador: Carolina Weigert Galvão

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Carolina Weigert Galvão

Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires

Prof.ª Dr.ª Liziane Cristina Campos Brusamarello dos Santos

Data da Realização: 28 de fevereiro de 2018.

Dedico esta dissertação aos meus familiares e amigos, que estiveram sempre presentes na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me conceder o dom da vida.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado

Agradeço aos meus familiares, principalmente aos meus pais, por todo apoio, amor e dedicação comigo em todo esse tempo, sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Agradeço aos mestres LABMOM, Prof. Carolina e Prof. Rafael, por todos os ensinamentos, orientações, puxões de orelha e paciência em todo esse tempo; por terem aceitado a missão e a cruz de me orientar, meu muito obrigado!

À toda equipe LABMOM por toda ajuda e apoio durante minha jornada, seja nas conversas diárias ou ajuda direta no meu trabalho, valeu galera!

Agradeço principalmente a Daiane Barreto, Helyemari, Érica, Fernanda Wiegand, Andressa e William que me ajudaram imensamente durante os meus experimentos, vocês foram fundamentais, muito obrigado de coração!

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela dedicação e ensinamentos durante esses dois anos.

Agradeço a técnica do Laboratório de Fertilidade do Solo, Dirce, a técnica do Laboratório de Matéria orgânica do Solo, Jaque, e a técnica do Laboratório de Farmácia, Luzia, por todo auxílio, companheirismo, dedicação e paciência comigo na realização das análises nos meus experimentos, à vocês toda a minha gratidão!

Agradeço ao Ângelo, ao Fábio, ao Adriano, à Letícia e à Isabela pela ajuda com os dados e informações que foram úteis aos meus resultados.

Ao proprietário da Fazenda Estância dos Pinheiros, Guilherme Soares, por ceder a área para realização do experimento.

Agradeço à Prof. Jesiane por toda sugestão para meu trabalho, sempre disposta a ajudar independente de qualquer coisa; ao Professor Ricardo Ayub por conceder equipamentos para a realização das minhas análises e ao professor Eduardo Caires pelo suporte, meu muito obrigado.

Agradeço aos meus amigos Alana, Marcos, Andressa, Anne, Heloize, Jéssica, Évelin e Fernanda por todo suporte emocional nesse tempo, por muitas vezes terem me ouvido reclamando mas acima de tudo por não terem deixado eu desistir de tudo, meu obrigado do mais fundo do meu coração!

Agradeço à minha primeira orientadora de iniciação científica e amiga, Julianne Milléo, por todo apoio incondicional, por ter me inserido no mundo da iniciação científica e por me mostrar que eu sou capaz, minha gratidão eterna!

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma direta ou indireta contribuíram para que esse trabalho acontecesse.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)



## RESUMO

O aporte de N na forma assimilável pelas plantas ( $\text{NH}_4^+$ ) em diversos ecossistemas é realizado principalmente pelos organismos diazotróficos, e os mesmos vêm sendo pesquisados amplamente em todo o mundo. O N se configura como um dos nutrientes que apresenta grande importância no crescimento e desenvolvimento das plantas devido a sua função estrutural, pois faz parte da molécula de compostos orgânicos, como os aminoácidos e proteínas, sendo ainda ativador de muitas enzimas. Os adubos amoniacais são os mais comumente utilizados como fonte de nitrogênio nas atividades agrícolas. Contudo, a sua utilização acarreta em aumentos significativos da acidificação do solo, provenientes dos processos de nitrificação. O solo é um sistema complexo e as práticas de manejo podem afetar significativamente as comunidades microbianas que realizam muitos processos de suma importância para a produtividade e sustentabilidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto na comunidade microbiana de um solo com a adição de N e calagem sob cobertura na aveia preta em um sistema de plantio direto de longa duração. As coletas de solo foram realizadas em cinco tratamentos distintos, distribuídos aleatoriamente em triplicatas na área experimental: SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+ N (com cobertura de inverno + nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio). Avaliaram-se os atributos químicos do solo, o carbono da massa microbiana, a respiração basal, o quociente metabólico, o NMP dos diazotrofos, o número de nódulos, a massa seca dos nódulos, a massa seca da raiz e parte aérea da soja, bem como utilizou-se a técnica da Biolog Ecoplate para analisar o consumo de fontes de carbono entre os tratamentos, a fim de verificar suas similaridades e diferenças. Constatou-se que as condições químicas como o pH influenciaram diretamente o crescimento e o desenvolvimento da comunidade microbiana em vários parâmetros estudados. Os níveis de carbono da massa microbiana do solo, bem como a respiração basal e o quociente metabólico variaram entre os tratamentos, sendo o tratamento CC+ N o que apresentou um maior distúrbio na biomassa microbiana causado pelo seu manejo. Em relação às bactérias diazotróficas do solo, ficou evidente que a população teve forte influência da aplicação de N e de calcário, se mostrando nula no tratamento CC+C+N, contudo a população de bactérias noduladoras não teve influência negativa nos diferentes tratamentos. Observou-se que houve um consumo diferente pelas comunidades de determinados subgrupos de fontes de carbono. É notável a importância do estudo acerca das características e potenciais das bactérias diazotróficas, a fim de promover um avanço nas tecnologias para maximizar a produtividade de culturas que apresentam grande valor econômico para os produtores.

Palavras-chave: biomassa microbiana do solo, microrganismos diazotrofos, manejo do solo.

## ABSTRACT

The contribution of N in the form assimilable by the plants ( $\text{NH}_4^+$ ) in several ecosystems is carried out mainly by the diazotrophic organisms, and they have been researched widely around the world. N is one of the nutrients that has great importance in the growth and development of plants due to its structural function, since it is part of the molecule of organic compounds, such as amino acids and proteins, being still activator of many enzymes. Ammoniac fertilizers are most commonly used as a source of nitrogen in agricultural activities. However, their use leads to significant increases in soil acidification from nitrification processes. Soil is a complex system and management practices can significantly affect microbial communities that perform many processes of paramount importance for productivity and sustainability. The objective of this work was to evaluate the impact on the microbial community of a soil with the addition of N and liming under cover in black oats in a long - term no - tillage system. Soil samples were collected in five different treatments, randomly distributed in triplicates in the experimental area: SC CC (without winter cover); CC (with winter cover); CC + N (with winter + nitrogen coverage); CC + C (with winter cover + limestone) and CC + C + N (with winter cover + limestone + nitrogen). Soil chemical, microbial mass carbon, basal respiration, metabolic quotient, diazotrophs NMP, number of nodules, nodule dry mass, dry mass of the root and shoot of the soybean were evaluated, as well as using the Biolog Ecoplate technique to analyze the consumption of carbon sources between treatments in order to verify their similarities and differences. It was found that chemical conditions such as pH directly influenced the growth and development of the microbial community in several parameters studied. The carbon levels of the soil microbial mass, as well as the basal respiration and the metabolic quotient varied among the treatments, being the treatment CC + N that presented a greater disturbance in the microbial biomass caused by its handling. In relation to the diazotrophic bacteria of the soil, it was evident that the population had a strong influence of the application of N and limestone, if it was null in the treatment CC + C + N, however the population of nodulating bacteria did not have negative influence in the different treatments. It was observed that there was a different consumption by the communities of for certain subgroups of carbon sources. The importance of the study of the characteristics and potentials of diazotrophic bacteria is remarkable in order to promote an advance in the technologies to maximize the productivity of crops that present great economic value to the producers.

Keywords: soil microbial biomass, diazotroph microorganisms, soil management

## LISTA DE SIGLAS

°C	-	Graus Celsius
µg	-	Micrograma
µL	-	Microlitro
µM	-	Micromolar
Al	-	Alumínio
BCPV	-	Bactérias Promotoras do crescimento vegetal
BMS	-	Biomassa microbiana no solo
C	-	Carbono
Ca	-	Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de Cálcio
Cm	-	Centímetro
CHCl <sub>3</sub>	-	Clorofórmio
CLPP	-	Perfil fisiológico ao nível comunitário do solo
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DGGE	-	Gel de gradiente desnaturante de gene
dH <sub>2</sub> O	-	Água destilada
FBN	-	Fixação Biológica de Nitrogênio
FN	-	Fertilizantes Nitrogenados
G	-	Grama
H	-	Hora
H	-	Índice de diversidade de Shannon
Há	-	Hectare
HCN	-	Cianeto de Hidrogênio
HMU	-	Unidades morfológicas homogêneas
IS	-	Índice de solubilização
K	-	Potássio
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	Sulfato de Potássio
Kg	-	Quilograma
L	-	Litro
LC	-	Lavoura convencional
M	-	Metro
M	-	Molar
MBC	-	Carbono de biomassa microbiana
MBN	-	Nitrogênio de biomassa microbiana
Mg	-	Magnésio
Min	-	Minuto
mL	-	Mililitro
Mm	-	Milímetro

MOS	-	Matéria orgânica de solo
N	-	Nitrogênio
NH <sub>4</sub>	-	Amônia
Nm	-	Nanômetro
NMP	-	Número mais provável
NO <sub>3</sub>	-	Nitrato
PC	-	Preparo convencional
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
PD	-	Plantio Direto
PDC	-	Plantio direto com cisalhamento
PGPR	-	<i>PlantGrowthPromoting Rhizobacteria</i>
PLFA	-	<i>Análise de fosfolípidos de ácidos graxos</i>
PR	-	<i>Paraná</i>
R1	-	Primeiro estágio reprodutivo da cultura
RC	-	Rotação de cultura
rRNA	-	Ácido ribonucleico ribossomal
RNA	-	Ácido ribonucléico
RPM	-	Rotações por minuto
SS	-	Sistema de sucessão
TFSA	-	Terra fina seca ao ar
T	-	Tonelada
TRFLP	-	Terminal restriction fragment lengthpolimorphism
W0	-	Absorbância do branco
WA	-	Absorbância de cada cavidade
WE	-	Índice de desenvolvimento da cor

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Área do experimento. Fazenda Estância dos Pinheiros, Ponta Grossa - PR .....31
- Figura 2.** Esquema de coleta das amostras de solo. O ponto do centro do círculo foi georreferenciado. Os 12 pontos em negrito representam as amostras simples. (FIDALGO et.al, 2005) .....32
- Figura 3.** Placa Biolog Ecoplate contendo 31 fontes de carbono diferentes. Cada fonte de carbono será consumida e o tetrazólio presente em cada poço será reduzido, conferindo diferentes tons de acordo com o consumo da fonte de carbono. ....33
- Figura 4.** Método de fumigação extração. Clorofórmio sendo utilizado para a incubação da amostra de solo por 24 horas.Fonte (Silva et al.,2007).....34
- Figura 5.** Amostras sendo filtradas após agitação com sulfato de potássio para extrair o C da massa microbiana. Fonte (Silva et al.,2007) .....34
- Figura 6.** Ponto estequiométrico da volumetria de oxi-redução. Fonte (Silva et al.,2007) .....35
- Figura 7.** Película formada pelos organismos diazotrofos .....38
- Figura 8.** Valores de NMP encontrados no solo nos diferentes tratamentos. Eixo Y se encontra os valores de NMP (LOG + 1) e no eixo X os diferentes tratamentos : SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+ N (com cobertura de inverno+ nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio). NMP1: solo fresco, logo após a coleta a campo NMP2: TFSA (terra fina seca ao ar) dois meses após a coleta; NMP3: realizada dois meses após a coleta contudo deixando-se o solo úmido incubando em estufa a 28°C por 48h. ....44
- Figura 9.** Índice de desenvolvimento de cor (AWCD). No eixo Y se encontra os valores de AWCD e no eixo X os diferentes horários de medida (0, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação). ....49
- Figura 10.** Valores médios do consumo dos subgrupos das fontes de carbono presentes na placa Biolog Ecoplate nos 5 tratamentos distintos: SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+ N (com cobertura de inverno + nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio) .....49
- Figura 11.** Análise de componentes principais (PCA) gerada com os dados dos parâmetros carbono da massa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e de todos os dados da análise química correlacionados com os dados da BiologEcoplate a 96h de incubação. Os vetores da matriz que tiveram correlação significativa ( $p < 0,05$ ) aparecem com a seta em azul. Pode-se observar a formação

de 3 agrupamentos distintos. Os tratamentos estão nomeados : SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+ N (com cobertura de inverno + nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio) .....52

**Figura 12.** Análise dos componentes principais (PCA) gerada com os dados da BiologEcoplate a 96h de incubação correlacionados com os parâmetros carbono da massa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e de todos os dados da análise química. Os vetores da matriz que tiveram correlação significativa ( $p < 0,05$ ) aparecem com a seta em azul. Podemos observar a formação de 2 agrupamentos distintos. Os tratamentos estão nomeados : SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+ N (com cobertura de inverno + nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio) .....54

**Figura 13.** Análise dos componentes principais (PCA) gerada com os dados dos Carboidratos da BiologEcoplate a 96h de incubação correlacionados com os parâmetros carbono da massa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e de todos os dados da análise química. Os vetores da matriz que tiveram correlação significativa ( $p < 0,05$ ) aparecem com a seta em azul. Podemos observar a formação de 2 agrupamentos distintos. Os tratamentos estão nomeados : : SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+ N (com cobertura de inverno + nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio).....56

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultados de atributos químicos do solo, na camada de 5 a 10 cm, contendo os tratamentos utilizados no estudo .....39
- Tabela 2.** Carbono da massa microbiana (CBM), respiração basal do solo (R) e do quociente metabólico (Q) nos cinco tratamentos envolvendo cobertura de inverno, calagem e adubação nitrogenada. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5%. SC (sem cobertura no inverno) CC (com cobertura de inverno e calagem), CC+ N (com cobertura de inverno e com nitrogênio), CC+C (com cobertura de inverno e com calagem), CC+C+N (com cobertura de inverno, com calagem e com nitrogênio).....41
- Tabela 3.** Valores médios de números de nódulos por planta, massa seca de nódulos (MSN), massa seca das raízes (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA).....46
- Tabela 4.** Substratos utilizados no sistema Biolog Ecoplate e os grupos químicos ao qual eles pertencem de acordo com Choi e Dobbs (1999). .....48

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.2 MANEJO DE ADUBAÇÃO NITROGENADA .....	17
2.3 COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO .....	21
2.4 BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO .....	23
2.5 ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO .....	26
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	30
4.2 AMOSTRAGEM E ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO .....	31
4.4 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA, RESPIRAÇÃO BASAL E QUOCIENTE METABÓLICO .....	33
4.4.1 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DO SOLO.....	35
4.4.2 ANÁLISE DO CARBONO DA MASSA MICROBIANA .....	35
4.5 MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE DIAZOTROFOS (NMP) .....	36
4.6 ANÁLISE DO NÚMERO DE NÓDULOS, MASSA SECA DOS NÓDULOS, RAIZ E PARTE AÉREA DA SOJA.....	38
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
5.1 ALTERAÇÕES QUÍMICAS DO SOLO.....	38
5.2 CARBONO, RESPIRAÇÃO E QUOCIENTE METABOLICO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO.....	40
5.4 ANÁLISE DO NÚMERO DE NÓDULOS, MASSA SECA DOS NÓDULOS, RAIZ E PARTE AÉREA DA SOJA.....	46
5.5 ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA ATRAVÉS DA BIOLOG .....	47
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O solo é um sistema complexo, e as práticas de manejo tendem a afetar significativamente as comunidades microbianas que participam de muitos processos de suma importância para a produtividade e sustentabilidade de diversos modos (Feng et al, 2003).

De acordo com Sá et al. (2000) as práticas de manejo que favorecem o maior aporte de matéria orgânica no solo devem ser adotadas cada vez mais entre os produtores. O plantio direto (PD) é o sistema de manejo que mais tem se destacado no que diz respeito às práticas de conservação do solo e aumento da produtividade, pois esse sistema une técnicas conservacionistas para produzir alimentos sem causar grandes impactos no meio ambiente (Sá et al. 2000).

Conforme Quadros (2012) o manejo e o preparo do solo são práticas decisivas e terão grande influência nas taxas de degradação da matéria orgânica proporcionada pela atividade microbiana. Dentre os fatores e processos que interferem no acúmulo de matéria orgânica do solo podem ser citados a mineralogia, a umidade, o pH, a temperatura e a biologia do solo.

Segundo Silva (2009), a rotação de culturas em plantio direto é um dos principais fatores que determina o aumento na quantidade superficial de matéria orgânica além de promover também a reciclagem de alguns nutrientes. Lambais et al. (2005) relataram que a comunidade microbiana presente no solo é responsável por transformações essenciais nos ciclos biogeoquímicos, reciclando a matéria orgânica, decompondo xenobiontes, fixando  $N_2$  atmosférico entre outras transformações importantes para o meio ambiente.

No Estado do Paraná, uma das culturas mais utilizadas nos sistemas de plantio direto, principalmente nos sistemas de rotação de inverno, é a aveia preta, por ser espécie rústica, bem pouco exigente em fertilidade do solo, e que se adapta bem em todo o Estado (Derpsch; Calegari, 1992). Um dos principais fatores limitantes no crescimento e produção de biomassa da aveia preta é a baixa concentração de nitrogênio no solo (Caires et al., 2015).

Os adubos a base de amônio são os mais comumente utilizados como fonte de nitrogênio nas atividades agrícolas. Contudo, a sua utilização acarreta em

aumentos significativos da acidificação do solo, provenientes dos processos de nitrificação, como já relatados por Sumner e Noble (2003). Nos sistemas convencionais e plantio direto, a fertilização nitrogenada (N) e as rotações de culturas também são fatores que podem modificar a qualidade do solo e a fertilidade, afetando assim a composição da comunidade microbiana.

Diversos estudos apontam que alguns parâmetros microbiológicos podem servir de diagnóstico das alterações causadas decorrentes de diferentes manejos do solo e das culturas em um estágio anterior ao das mudanças nos atributos químicos e físicos. A avaliação do comportamento da comunidade microbiana nos solos é essencial para promover a preservação da sua biomassa, de forma a desenvolver maneiras de identificar alterações ambientais relacionadas a distúrbios, como manejos não sustentáveis de solos agrícolas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 MANEJO DO SOLO**

Segundo Quadros et al. (2012) a matéria orgânica é a principal responsável pela união entre todos os processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem no solo. Ela responsável pelos aumentos crescentes da porosidade do solo, que por sua vez acarreta numa maior infiltração de água bem como da capacidade de retenção de umidade; além disso ela também promove maior diversidade e atividade biológica dos organismos presentes no solo, aumentando a disponibilidade de nutrientes para as plantas e melhorando a fertilidade do solo de maneira eficaz .

O manejo e o preparo do solo serão decisivos e terão grande influência nas taxas de degradação da matéria orgânica proporcionada pela atividade microbiana (Quadros, 2012). De acordo com Torvisk e Ovreas (2002), os microrganismos são os principais decompositores da matéria orgânica presente no solo, interagindo com vários outros organismos presentes no solo, além de regular diversos ciclos biogeoquímicos.

Segundo Hobbs (2007) todas as características físicas, químicas e biológicas do solo são afetadas de acordo com o seu manejo, por exemplo, a remoção completa da vegetação de uma área precedida de plantações tende a aumentar a

erosão e a degradação do solo, determinando profundas mudanças na composição da biota do solo.

Dentre os sistemas de cultivo mais conhecidos e adotados atualmente estão o sistema de plantio convencional e o sistema de plantio, e uma das principais diferenças entre eles diz respeito em como a matéria orgânica do solo (MOS) se encontra distribuída no perfil (Feng et al., 2003).

As práticas de manejo que contribuem para o maior aporte de MOS devem ser vistas como essenciais para a sustentabilidade dos sistemas de cultivo. O plantio direto se configura como um sistema sustentável de manejo de culturas que protege o solo, a água, o ar e toda a biodiversidade, trazendo benefícios a longo e a curto prazo para os produtores e para o meio ambiente (Sá, 2010). Derpsch (2010) relataram que as áreas agrícolas em sistema plantio direto estão aumentando gradativamente em todo o mundo, sendo que nos últimos anos, os Estados Unidos da América, o Brasil e a Argentina converteram cerca de 26, 25 e 20 milhões de hectares do sistema convencional para o sistema plantio direto, respectivamente.

Nos sistemas convencionais e plantio direto, a fertilização nitrogenada (N) e as rotações de culturas também são fatores que podem modificar a qualidade do solo e a fertilidade, afetando assim a composição da comunidade microbiana.

## 2.2 MANEJO DE ADUBAÇÃO NITROGENADA

O nitrogênio (N) se configura como um dos nutrientes que apresenta grande importância no crescimento e no desenvolvimento das plantas devido a sua função estrutural, pois faz parte da molécula de compostos orgânicos, como os aminoácidos, sendo ainda ativador de muitas enzimas (Malavolta, 2006). Vários processos vitais dos vegetais são totalmente dependentes do N, como por exemplo, a síntese de proteínas, absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (Marschner, 1995). Todos os processos relacionados à incorporação do N pelas plantas trazem como benefícios a longo prazo aumentos na folhagem e nos teores de proteínas das plantas utilizadas na alimentação, bem como o rápido crescimento e auxílio aos microrganismos do solo para a decomposição da matéria orgânica (Malavolta, 2006).

No solo, cerca de 98% do N encontra-se na forma orgânica, sendo que 2% apresentam-se sob formas inorgânicas de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e/ou nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )

(Malavolta, 2006), ambos provenientes dos processos de mineralização que ocorrem durante os cultivos por meio de hidrólise enzimática gerada através das atividades bioquímicas provenientes da microbiota do solo (Cordeiro & Hoek, 2007) e/ou através da adoção da prática de aplicação de fertilizantes nitrogenados. O N no solo apresenta influência direta do sistema de manejo ao qual ele será submetido. Portanto deve-se ter cautela para recomendar a dose de N a ser utilizada, sendo que, ao ser subestimada, poderá ocorrer uma grande redução da produtividade e, se superestimada, poderá reduzir a rentabilidade do produtor pelo gasto supérfluo com fertilizantes, prejudicando o meio ambiente, em consequência das perdas de N em decorrência do excesso disponível (Argenta et al. 2003).

Segundo Silva et al. (2009), a rotação de culturas em plantio direto é um dos principais fatores que determina o aumento na quantidade superficial de matéria orgânica além de promover também a reciclagem de alguns nutrientes essenciais em profundidade.

No Estado do Paraná, uma das culturas mais utilizadas em plantio direto, principalmente nos sistemas de rotação de inverno, é a aveia preta. Ela é uma espécie rústica, sendo bem pouco exigente em fertilidade de solo, e tem se adaptado bem nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Mato Grosso do Sul (Derpsch; Calegari, 1992). Ela possui elevada produção de fitomassa bem como apresenta rápido crescimento inicial, além de produzir sementes que geram baixo custo de produção (Silva, 2009).

Um dos principais fatores limitantes no crescimento e produção de biomassa da aveia preta é a baixa concentração de N no solo (Caires et al., 2015). Portanto, quando se decide utilizar a aveia preta como cobertura de inverno, deve-se levar em conta a importância da adubação nitrogenada, pois a mesma irá estimular o crescimento e a atividade radicular, tendo efeitos na produção de fitomassa e na absorção de outros nutrientes (Caires et al., 2015).

Raij (1991) e Sharma (2011) afirmaram que os altos índices de acidez do solo podem estar associados ao manejo da adubação nitrogenada, pois durante a oxidação do  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ , mediada pelas microrganismos nitrificantes, o pH diminui pois há uma maior liberação de  $\text{H}^+$ , que ocupa os locais de trocas dos cátions lixiviados pelo  $\text{NO}_3^-$ . De acordo com Lopes et al. (2007), as altas concentrações de  $\text{Al}^{3+}$  trocáveis presentes no solo ocasionam aumento exponencial do pH. O pH do solo interfere de modo direto na disponibilidade de vários nutrientes no solo, como por

exemplo K, Ca, Mg, P e C (Ciotta et al., 2002; Diehl et al., 2008; Nolla et al., 2006; Teixeira et al., 2003)

Segundo Garbuio et al (2011) a aplicação conjunta de calcário com fertilizantes a base de amônio resulta na neutralização do efeito acidificante além de estimular a nitrificação nos solos ácidos. Os efeitos da aplicação de calagem superficial são positivos, pois segundo Ridley et al (2011) aumentam a possibilidade de movimento descendente de  $\text{Ca}^{2+}$  móvel e  $\text{Mg}^{2+}$ , que acompanham o  $\text{NO}_3^-$ . Dessa forma, a captação de  $\text{NO}_3^-$  pelas plantas aumenta o pH da rizosfera no subsolo, proporcionando melhoras no desenvolvimento das raízes (Tang et al., 2000)

Os resultados nas condições químicas e biológicas das aplicações de calcário nas culturas em solos de plantio direto a longo prazo, em particular nos primeiros centímetros de solo superficial, diferem em suas propriedades em comparação com solos convencionalmente cultivados (Fuentes et al., 2005).

Garbuio et al (2011) avaliaram os efeitos da aplicação de calcário e de resíduos de aveia preta com ou sem adubação nitrogenada em sistema plantio direto. Concluíram que a calagem em superfície aumenta o pH do solo, a biomassa microbiana, a atividade microbiana e a relação bactéria / fungo na superfície do solo (0-5 cm), auxiliando no aumento da síntese de aminoácidos, formação de substâncias húmicas solúveis em água e mineralização e nitrificação de N. Observaram também que a aveia preta pode auxiliar na melhoria da acidez e reabastecendo a matéria orgânica dos solos, reduzindo a erosão a longo prazo.

Estudos realizados por Kirchhof et al. (1997) demonstraram que a densidade de bactérias nitrificantes presentes em solos com aplicações em diferentes doses de N era baixa ou quase nula. Benedetti et al (2006) estudaram a população de bactérias diazotróficas em sistema de plantio direto com o uso de diferentes doses e modo de aplicação do calcário. Verificou-se ao final que a maior ocorrência de bactérias nitrificantes ocorreu nos tratamentos que receberam 100% da quantidade de calcário recomendada, seguido de doses equivalentes a 50% e 25% da recomendada. Observou-se também que no tratamento sem calagem a quantidade de bactérias nitrificantes foi menor.

Em um experimento realizado por Sala et al. (2005) empregando três doses de N (0, 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup>) e três genótipos de trigo (IAC-24, ITD-19 e IAC-355), foi avaliada a ocorrência de microrganismos diazotróficos endofíticos em raízes desinfestadas superficialmente, utilizando-se três meios de cultivo distintos, NFB,

JNFb e LGI-P. De acordo com os resultados, concluiu-se que os genótipos da planta se comportam de modo diferente quanto ao número de microrganismos diazotróficos em relação à adubação nitrogenada, e que houve uma queda na densidade de bactérias diazotróficas na raiz com o aumento na dose de N como fertilizante.

Rufini et al. (2011) avaliaram o efeito do pH do meio de cultivo na eficiência simbiótica de estirpes de *Rhizobium* em um solo com e sem calagem. Utilizaram-se tratamentos com cinco estirpes de *Rhizobium* (UFLA 02-100, UFLA 02-68, UFLA 04-195, UFLA 04-202 e CIAT 899), cultivadas em meio de cultura com diferentes valores de pH (5,0, 6,0 e 6,9), e testemunhas sem inoculação, com ou sem N mineral. Nesse estudo foram avaliados o número e a massa de matéria seca de nódulos, a massa de matéria seca da parte aérea, a eficiência relativa, o teor e acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos, o número de vagens por planta, número de grãos por vagem e o rendimento e a massa de 100 grãos de feijão. Constatou-se ao final que o aumento do pH do solo favoreceu a simbiose entre as bactérias fixadoras de N nodulíferas e o feijoeiro-comum.

Inagaki et al (2016) hipotetizaram que a aplicação combinada de calcário e gesso criaria condições favoráveis para a atividade biológica e resultaria em maior armazenamento de matéria orgânica bem como da produtividade agrônômica. Para isso, avaliaram o impacto a longo prazo (15 anos) da aplicação de calcário e gesso sobre a atividade biológica, os estoques de carbono e a produtividade agrônômica de parcelas sob manejo em plantio direto. Concluíram que a aplicação de calcário e gesso, juntamente com manejo de plantio direto e a entrada de biomassa-C, constitui uma estratégia eficiente para melhorar a atividade biológica, os estoques de C e a produtividade de solos agrícolas.

Estudos realizados por Dobelare (1953) e Siqueira & Franco (1988) apontaram que as bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> se mostram muito intolerantes a acidez, tanto nos meios de cultura quanto no solo; porém existe um grupo de bactérias do gênero *Acetobacter* que demonstra ser capaz de se desenvolver em meios com pH abaixo de 3,0.

Tendo em vista essas perspectivas e resultados, é inegável que abordagens mais profundas e integradas como medições da biomassa microbiana, avaliação da comunidade microbiana, bem como a determinação dos atributos químicos e físicos do solo, podem prever diversos processos e fatores que ocorrem no solo e que podem afetar diretamente na produtividade agrícola de diversas culturas.

## 2.3 COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO

Os microrganismos são as formas de vida mais abundantes do planeta e representam a maior proporção da diversidade genética global estimada (Lambais et al., 2005). Entre esses microrganismos, encontram-se as bactérias e fungos que realizam a degradação completa da matéria orgânica presente no solo, promovendo a ciclagem de diversos elementos importantes para o desenvolvimento das plantas (Lejon et al., 2005).

Segundo Lambais et al. (2005), a comunidade microbiana presente no solo é responsável por transformações essenciais nos ciclos biogeoquímicos, reciclando a matéria orgânica, decompondo xenobiontes, fixando  $N_2$  atmosférico entre outras transformações importantes para o meio ambiente.

Dentre os organismos fixadores de  $N_2$  atmosférico encontram-se as bactérias diazotróficas. Considerando as estratégias que as bactérias diazotróficas adotam para se desenvolverem nos sistemas agrícolas, elas podem ser classificadas em quatro grupos distintos, de acordo com Kaschuk & Hungria (2017): as de vida livre, as rizosféricas, as endofíticas e as simbióticas formadoras de nódulos. Sobre as características desses grupos, Kaschuk e Hungria (2017) relatam o seguinte:

O grupo de vida livre do solo se configura como um papel fundamental na ciclagem da matéria orgânica do solo. Os grupos associativos (que vivem nas raízes) e endofíticas (que vivem em partes da planta interna) estabelecem relações recíprocas com as plantas, geralmente resultando em promoção do crescimento da planta. As bactérias formadoras de nódulos, com ênfase no rizóbio que associam as leguminosas, representam o grupo mais efetivo no fornecimento de N aos sistemas agrícolas.

As bactérias denominadas associativas podem ser classificadas em dois sub-grupos, de acordo com Baldani et al. (1997): as bactérias endofíticas facultativas e bactérias endofíticas obrigatórias. As bactérias endofíticas facultativas podem colonizar tanto o interior das raízes como a rizosfera e, em contrapartida as bactérias endofíticas obrigatórias colonizam o interior das raízes e também a parte aérea de plantas não leguminosas. Segundo Bergamaschi (2006), “a capacidade das bactérias endofíticas em colonizar o interior das plantas representa vantagem em relação às bactérias de vida livre no que diz respeito ao substrato”. Isso pode ser propiciado pelas fontes de carbono mais facilmente disponíveis, reduzindo os

problemas de competição com demais bactérias da rizosfera. Além disso, de acordo com Olivares et al.(1997), essas bactérias se encontram geralmente em locais da planta com baixa disponibilidade de oxigênio, o que propicia a expressão da enzima nitrogenase, a qual converte  $N_2$  em amônia.

Esses microrganismos são denominados também de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV), e além de realizar o processo de FBN, possuem a habilidade de estimular o crescimento vegetal com a produção de hormônios de crescimento como auxinas e giberelinas, promovendo o crescimento radicular dos vegetais (Dobbelaere et.al,1999).

Devido aos avanços nos estudos em biologia molecular e com o desenvolvimento da microscopia eletrônica, tornou-se possível a identificação e caracterização de uma grande diversidade de bactérias diazotróficas em várias diferentes espécies agrícolas, como milho, batata, trigo, arroz, cana-de-açúcar e sorgo (Bent & Chanway, 2002). Inúmeras espécies diazotróficas vivem livres no solo e dentro dos sistemas agrícolas, sendo que as bactérias de vida livre são limitadas pela disponibilidade de fontes de carbono presentes no solo. Esses microrganismos endófitos obrigatórios geralmente não sobrevivem bem no solo e colonizam poucas plantas hospedeiras, de acordo com Baldani et al.(1997). No entanto, essas bactérias apresentam grande potencial na FBN, podendo colonizar diferentes partes da planta e estabelecer dentro de nichos protegidos do oxigênio e de outros fatores, expressando seu máximo potencial de fixação de nitrogênio (Keneddy et al.,1997).

Diversos gêneros são conhecidos como BPCV, dentre eles destacam-se: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, além dos rizóbios que não se encontram nos gêneros supracitados (Reis et al.,2000). Segundo Kuss (2006), os gêneros *Paenibacillus*, *Beijerinckia*, *Azotobacter* e *Klebsiella* são exemplos de habitantes do solo próximo às raízes associadas às plantas por processos ainda desconhecidos que variam em espécies vegetais.

Das bactérias associativas destacam-se várias espécies do gênero *Azospirillum*, que atualmente conta com 14 espécies identificadas (Bashan, 2016). As duas espécies inicialmente classificadas na década de 1970 são as mais estudadas, sendo *A. brasilense* a de maior relevância para estudos nessa área de pesquisa. A distribuição ecológica de *Azospirillum* é extremamente ampla e variada (Döbereiner; Pedrosa, 1987). Bactérias desse gênero têm sido encontradas em



associação com plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (Bashan, 1997). Dentre os gêneros descritos por Baldani et al. (2002) que são capazes de penetrar na planta e colonizar o hospedeiro sistematicamente, encontram-se: *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azoarcus*; são bactérias diazotróficas que podem habitar as partes sistêmicas da planta, como caules, folhas e raízes, tendo também a capacidade de fixar N<sub>2</sub> da atmosfera.

## 2.4 BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO

O solo é um ambiente complexo e sistemático sendo que os fatores químicos, físicos e biológicos determinam o seu desenvolvimento e manutenção ao longo do tempo. Dentre esses fatores, o biológico se configura como um dos mais sensíveis às alterações causadas pelo meio externo, principalmente devido ao manejo adotado para o solo. Segundo Matsuoka et al. (2003), os microrganismos representam uma parte da porção da matéria orgânica presente nos solos, sendo eles os responsáveis pela ciclagem dos nutrientes devido aos processos causados pela decomposição dos resíduos orgânicos, sendo assim mediadores diretos da disponibilidade de nutrientes no solo. A fração viva da matéria orgânica presente no solo que se configura como o principal fator responsável por todos os processos biológicos e bioquímicos que estão em constante alteração devido as condições do meio ambiente, denomina-se biomassa microbiana do solo (BMS) (BALOTA et al., 1998). Ela representa toda parte viva da matéria orgânica, constituída principalmente por bactérias, fungos e microfauna, formando uma extensa comunidade no solo, excluindo-se raízes e animais maiores que  $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ . Estima-se que a comunidade microbiana perfaça um volume de menos de 5 % do espaço poroso do solo (SIQUEIRA et al., 1994).

De acordo com Cattelan & Vidor (1990) a deposição de resíduos orgânicos estimula o aumento populacional bem como acelera o metabolismo da biomassa microbiana do solo, sendo também influenciada diretamente pelo clima, pela disponibilidade de nutrientes minerais e pelo C orgânico do solo. Portanto, os resíduos na superfície do solo, proporcionados por práticas como o plantio direto (PD), aumentam a disponibilidade de substrato, que possibilita situações de maior disponibilidade hídrica bem como melhor regulação da temperatura do solo, o que torna o meio favorável ao adequado desenvolvimento e estabelecimento da BMS.

O pH do solo tem forte influência sobre a decomposição da matéria orgânica, e, conseqüentemente, sobre a comunidade microbiana do solo, que pode apresentar alterações em suas atividades (Persson et al., 1983). De acordo com Baath et al. (1980) com a diminuição do pH do solo, a população de fungos pode aumentar consideravelmente, reduzindo a população de bactérias. Os fungos são responsáveis pela decomposição de 70% da matéria orgânica presente no solo, sendo eles os principais contribuintes em peso para a BMS (Brandão et al., 1992).

Dentre os elementos mais importantes que são caracterizados na BMS encontra-se o carbono. O carbono (C) é um elemento químico de grande importância para os seres vivos, pois participa da composição química de todos os componentes orgânicos e de uma grande parcela dos inorgânicos. Segundo Silva et al. (2010) o potencial metabólico da comunidade microbiana está fortemente associado aos teores de C, encontrando-se totalmente relacionado aos processos de decomposição e liberação de nutrientes no solo provenientes de resíduos orgânicos.

Em um trabalho realizado por Adams & Laughlin (1981), foi relatado que conforme o manejo e o tipo de cultura instalados no solo, os níveis de biomassa microbiana variam, sendo eles maiores em solos não perturbados. De acordo com Bolton Junior et al. (1992) os diferentes tipos e quantidades e compostos de C (provenientes da matéria orgânica) são os principais fatores que interferem diretamente na densidade e na diversidade de microrganismos presentes na rizosfera.

Em estudos realizados por Hungria et al (1997), constatou-se que a biomassa microbiana em solos brasileiros se mostra superior em sistema plantio direto ou em sistema de cultivo mínimo quando comparadas ao sistema convencional de preparo do solo.

Balota et al (2004) chegaram à conclusão de que a rotação de culturas e o cultivo do solo influenciam a dinâmica do C microbiano através de um estudo de rotação de culturas em combinação com sistemas de PD e preparo convencional (PC) realizado em um latossolo, em um experimento estabelecido em 1976 em Londrina, Brasil. As amostras de solo foram coletadas em 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade em agosto de 1997 e 1998. Avaliou-se o carbono de biomassa microbiana (MBC) e o C e N mineralizáveis. O sistema PP aumentou o C total em 45%, a biomassa microbiana em 83% e a razão MBC: C total em 23% a 0-5cm de

profundidade em comparação com o PC. A mineralização de C e N aumentou 74% com PD em comparação com sistemas de PC para a profundidade de 0 a 20 cm. Portanto esses atributos microbianos do solo mostraram ser fortes indicadores do manejo do solo a longo prazo em condições tropicais.

Franchini et al. (2007) identificaram os parâmetros do solo potencialmente úteis para monitorar a qualidade do solo sob sistemas diferentes de gerenciamento de solo e rotação de culturas. Para isso, avaliaram os parâmetros microbiológicos e químicos em um experimento de campo no Estado do Paraná, no sul do Brasil, em resposta ao manejo do solo: PD e lavoura convencional (LC) e rotação de culturas incluindo grãos (soja, milho, trigo, tremoço e aveia). As quantidades de C e N da biomassa microbiana (MB-C e MB-N, respectivamente) foram 80 e 104% maiores no PD do que na LC, respectivamente; no entanto, em geral, esses parâmetros não foram afetados pela rotação das culturas. Os níveis de C e N solúveis foram 37 e 24% maiores no PD do que na LC, respectivamente, sem efeitos da rotação das culturas. Concluiu-se que os parâmetros relacionados à atividade microbiana são mais sensíveis ao manejo do solo e aos efeitos de rotação das culturas do que os estoques totais de C e N, possibilitando assim sua utilização enquanto indicadores da qualidade de solo nos trópicos.

Silva et al (2010) quantificaram a MB-C e MB-N por meio do método de fumigação-extração - em sistemas variados de gerenciamento de solo e rotação de culturas / sucessão no sul do Brasil, correlacionando os resultados com rendimentos de soja e milho. A biomassa microbiana e os rendimentos de grãos foram examinados na camada de 0 a 10 cm em experimentos com PD e PC. Os valores de MB-C e MB-N foram consistentemente superiores a mais de 100% sob PD em comparação com PC e foram associados com maiores rendimentos de grãos. Os resultados dos experimentos sugeriram que MB-C e, em particular, MB-N são importantes indicadores de efeitos de manejo do solo a longo prazo.

Estudos realizados por Insam e Domsch (1988) relataram que as perdas de C são reduzidas conforme a biomassa microbiana se torna mais estável e eficiente. Portanto, menos C será perdido como CO<sub>2</sub> pela respiração e uma boa fração de C se incorporará à biomassa microbiana. Altas taxas de respiração podem indicar distúrbios na produtividade do ecossistema, conforme relatado por Islam e Weil (2000). O quociente metabólico representa a taxa de respiração específica da biomassa microbiana. Valores elevados do quociente metabólico demonstram que a

população microbiana está oxidando C de suas próprias células para a sua manutenção e adaptação ao solo, demonstrando que a população microbiana se encontra em situações estressantes (Anderson; Domsch, 1993; Islam; Weil, 2000).

Solos com pH baixo indicam maiores valores de quociente metabólico, pois há maior necessidade da manutenção da energia da comunidade microbiana devido à esse estresse. Estudos realizados por Odum (1969) e Anderson e Domsch (1990) forte influência do pH nos quocientes metabólicos, e sugeriram o uso do quociente metabólico, como um parâmetro para a determinação de mudanças bioenergéticas de sistemas com estresse ambiental devem ser aplicados somente aos ambientes do solo com valores de pH comparáveis.

Portanto, é de suma importância saber quais os efeitos das práticas de manejo agrícola sobre as comunidades microbianas para entender a dinâmica e fertilidade dentro de cada sistema provenientes de inúmeras funções que esses microrganismos desempenham no solo.

## 2.5 ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO

. As comunidades microbianas podem fornecer diversas informações que são úteis na predição sobre mudanças ambientais. Diversos estudos e técnicas vêm sendo desenvolvidos no sentido de trazer explicações acerca do comportamento da comunidades microbianas frente às alterações nos mais diversos ecossistemas terrestres.

Uma dessas técnicas bioquímicas que vem sendo bastante empregada em análises comunitárias e estudos ecológicos microbianos é a utilização do BiologMicroPlates™. O BiologMicroPlates foi desenvolvido no final da década de 1980, e era composto de 96 poços contendo fontes de C e um tetrazólio corante redox violeta que se tornava púrpura se extraídos microrganismos inoculados do solo que utilizavam essas fontes (Garland 1997). Anos depois, foi desenvolvido o EcoPlate, que é a tecnologia mais atual, a qual contém três poços replicados de 31 fontes de C mais úteis para o perfil fisiológico ao nível comunitário do solo (CLPP) de conjuntos bacterianos heterotróficos capazes de serem metabolicamente ativos (Stefanowicz, 2006).

Diversos estudos têm sido realizados em diversas aplicações da ecologia microbiana e demonstraram a utilidade fundamental da Biolog na detecção de mudanças populacionais no solo, água, composto e resíduos industriais.

Em um estudo comparativo realizado por Xue et al. (2008), utilizando Biolog EcoPlate, eletroforese em gel de gradiente desnaturante do 16S gene rRNA (DGGE) ou análise de fosfolípidos de ácido graxos (PLFA), chegou-se a resultados semelhantes em termos do efeito da mudança de uso da terra no solo na estrutura da comunidade microbiana.

A BMS, a estrutura da comunidade bacteriana (determinada por T-RFLP), a função (determinada por ensaios enzimáticos e ensaios de Biolog) e as propriedades físico-químicas do solo foram investigadas em um sistema de cultivo de trigo sob plantio direto (20 anos) (Bissett et al. (2013). A estrutura da comunidade bacteriana foi correlacionada às variáveis ambientais e atividades enzimáticas do solo. Encontraram-se poucas evidências de grandes efeitos prejudiciais a longo prazo do preparo do solo nas comunidades bacterianas ou suas funções importantes no cultivo de trigo.

Em um experimento realizado por Feigl et al. (2017) utilizou-se o Biolog EcoPlate para investigar os efeitos positivos e negativos da lama vermelha na microflora do solo em dois estudos de caso de melhoria do solo. Com o EcoPlate Biolog foi possível monitorar as mudanças da comunidade microbiana nos solos afetados pela lama vermelha e avaliar a quantidade de lama vermelha e mistura de solo de lama vermelha aplicável para o tratamento do solo nesses casos.

Benizri & Amiaud (2005) examinaram a relação entre a diversidade vegetal e as comunidades microbianas em pastagens fertilizadas versus não fertilizadas. As amostras de solo foram analisadas para medir as impressões metabólicas de microorganismos usando microplacas Biolog. Observou-se que a diversidade funcional das comunidades microbianas do solo pode variar com a época de amostragem e, aparentemente, essas comunidades estão fortemente influenciadas pela composição e fenologia da comunidade vegetal. Concluiu-se que com o aumento da diversidade de espécies vegetais em determinado local, aumenta exsudação de compostos liberados pelas raízes das plantas, fazendo com que ocorra o aumento da diversidade de bactérias presentes no solo. Além disso, uma inversão da distribuição de C e N entre biomassa do solo e de raiz durante o ciclo da vegetação provavelmente induziu uma variação de rizodeposição.

Devido aos avanços na área de sequenciamento de DNA e da bioinformática, inúmeros pesquisadores já tem acesso a ferramentas e técnicas de última geração que podem auxiliar a solucionar inúmeros problemas advindos do ecossistema terrestre, bem como determinar e prever a ocorrência e abundância de diversos microrganismos de interesse agrícola. Para que essa identificação dos microrganismos seja possível, o uso de técnicas, tanto moleculares quanto bioquímicas, já vêm sendo utilizadas há muito tempo, desde o advento do sequenciamento por Sanger em 1977, até as inovações trazidas pela invenção da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kary Mullis em 1983 (Saiki et al., 1988)

Apesar dos inúmeros estudos acerca das comunidades microbianas do solo, sabe-se que o conhecimento da sua diversidade ainda é escasso. Nesse contexto, se tornam necessários estudos que estimulem o desenvolvimento de ferramentas que visem a contribuição para uma agricultura sustentável e de baixo custo para o produtor, promovida pela evolução dos estudos das capacidades biotecnológicas dessas bactérias provenientes do solo. Dessa forma, torna-se imprescindível o isolamento, a caracterização e a identificação desses microrganismos, pois é de extrema importância compreender quais são os seus papéis dentro do ecossistema do solo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o impacto na comunidade microbiana decorrente da cobertura vegetal, da aplicação superficial de calcário e da adição de N em sistema plantio direto;

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a densidade populacional de diazotrofos associativos e simbióticos;
- Avaliar o carbono da massa microbiana, bem como a respiração basal e o quociente metabólico do solo sob diferentes condições de calagem e de adubação nitrogenada;
- Observar a influência da cobertura vegetal, da aplicação superficial de calcário e da adição de N na nodulação e no desenvolvimento da raiz e da parte aérea da soja;
- Verificar a influência da cobertura de inverno em diferentes condições de calagem e adubação nitrogenada no desenvolvimento e na manutenção da comunidade microbiana do solo.
- Estimar a relação entre os atributos químicos e biológicos do solo no desenvolvimento da comunidade microbiana.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O estudo foi realizado em setembro de 2017 no município de Ponta Grossa – PR, na Fazenda Estância dos Pinheiros (Fig.1) (25° 10' S, 50° 05' W), com altitude de 970 m e precipitação pluviométrica anual média de 1.550 mm em uma área com experimento de longa duração sob plantio direto (26 anos). O solo da área experimental foi classificado como Latossolo Vermelho distrófico textura média. Utilizaram-se tratamentos distintos, distribuídos aleatoriamente em triplicatas na área experimental : Sem cobertura de inverno (SC), com cobertura de inverno (CC), com cobertura de inverno + N (CC+N), com cobertura de inverno + calcário + N ( CC + C) e com cobertura de inverno + calcário + N (CC+C+N). No tratamento sem cobertura, as plantas de aveia preta foram dessecadas com glifosato logo após a emergência. Durante a estação de primavera-verão, a área experimental foi cultivada com soja ou milho.

O calcário dolomítico foi aplicado sobre a superfície do solo na dose de 12 t ha<sup>-1</sup>, em maio de 2004. A adubação nitrogenada foi realizada anualmente por meio da aplicação de 180 kg ha<sup>-1</sup> de N, na forma de nitrato de amônio por ocasião do perfilhamento das culturas de outono – inverno (aveia preta ou trigo). A área de cada parcela coletada foi de 41,6 m<sup>2</sup>. Após a instalação do experimento, em 2004, foram cultivados: aveia preta (2004), milho (2004–2005), aveia preta (2005), soja (2005–2006), aveia preta (2006), soja (2006–2007), aveia preta (2007), soja (2007–2008), aveia preta (2008), milho (2008–2009), trigo (2009), soja (2009–2010), trigo (2010), soja (2010–2011), aveia preta (2011), feijão (2011–2012), feijão (2012), trigo (2012), soja (2012–2013), aveia preta (2013) e soja (2013–2014), aveia preta (2014), soja (2014–2015), aveia preta (2015), soja (2015–2016), aveia preta (2016), milho (2016–2017). Nesse estudo, avaliaram-se os parâmetros químicos e biológicos após a semeadura da aveia preta como no ano de 2017.





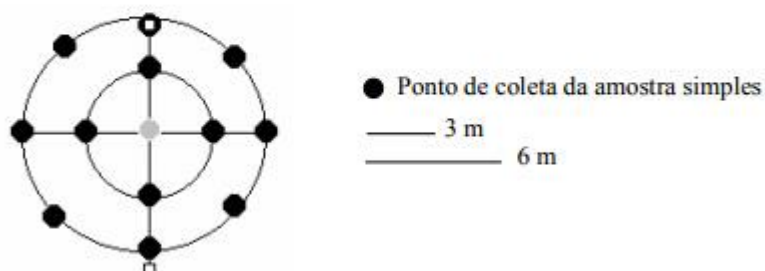
**Figura 1.** Área do experimento. Fazenda Estância dos Pinheiros, Ponta Grossa - PR

#### 4.2 AMOSTRAGEM E ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

Amostras de solo foram coletadas no estágio de florescimento da cultura, até a profundidade de 0,20 m, por meio de trado calador. Foram retiradas 12 subamostras por subparcela para constituir uma amostra composta das camadas de 0–0,05, 0,05–0,10 e 0,10–0,20 m. As amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 40°C. Determinaram-se o pH em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup>, a acidez potencial (H + Al) e os teores de  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  trocáveis, de acordo com os métodos descritos em Pavan et al. (1992). Os dados utilizados para a análise final correspondem a profundidade de 5 a 10 cm, pois é onde há a maior atividade biológica do solo.

#### 4.3 AMOSTRAGEM PARA ANÁLISE DE BIOLOG ECOPLATE

Foram coletadas amostras compostas formadas por 12 subamostras da camada de 0-10 cm, dentro de um círculo de 6 m de diâmetro (Fidalgo et al., 2005).

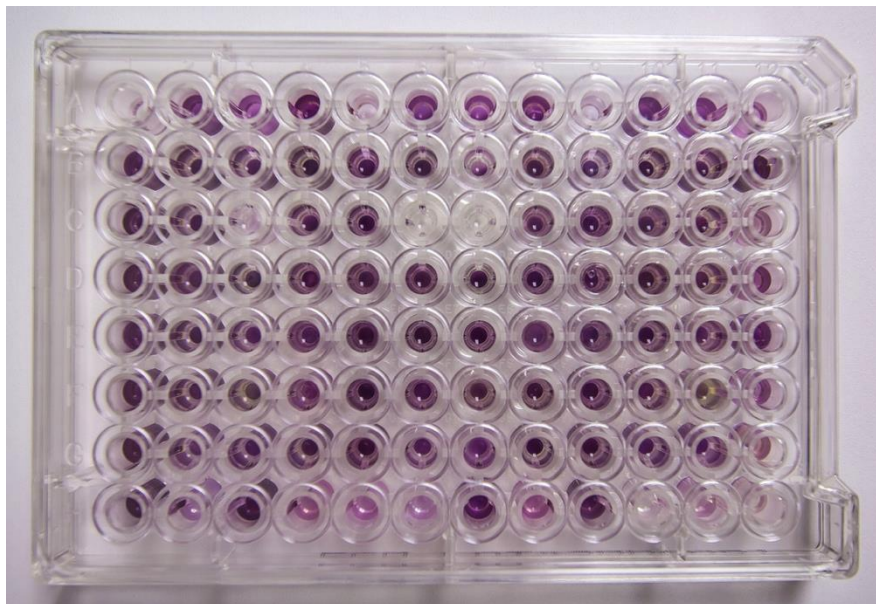


**Figura 2.** Esquema de coleta das amostras de solo. O ponto do centro do círculo foi georreferenciado. Os 12 pontos em negrito representam as amostras simples. ( FIDALGO et.al, 2005)

Para a análise da comunidade microbiana, 200 g de cada triplicata de solo foram coletados. As amostras de solo foram armazenadas em isopor e levadas de imediato ao laboratório. A utilização do substrato a nível comunitário (CLSU) foi determinada usando Biolog EcoPlate (Biolog Inc., Hayward, CA). Este método é baseado no crescimento em placas contendo três repetições de 31 fontes de C para a comunidade do solo análise, além de três controles de água. A atividade metabólica das células bacterianas na comunidade do solo foram avaliadas por redução de um corante de tetrazólio e formação de cor roxa. Amostras de 10 g de cada triplicata de solo fresco foram suspensas (30 min a 300 rpm) em solução salina estéril de 90 ml (NaCl 0,85%). As suspensões foram então sedimentadas durante 10 minutos antes do sobrenadante ser diluído 10 vezes.

A placa foi inoculada com 125 ml da diluição final para cada poço. Na sequência, as placas foram incubadas a 25 ° C e a DO foi medida à 590 nm e 750 nm a intervalos de 24 h durante 5 dias.

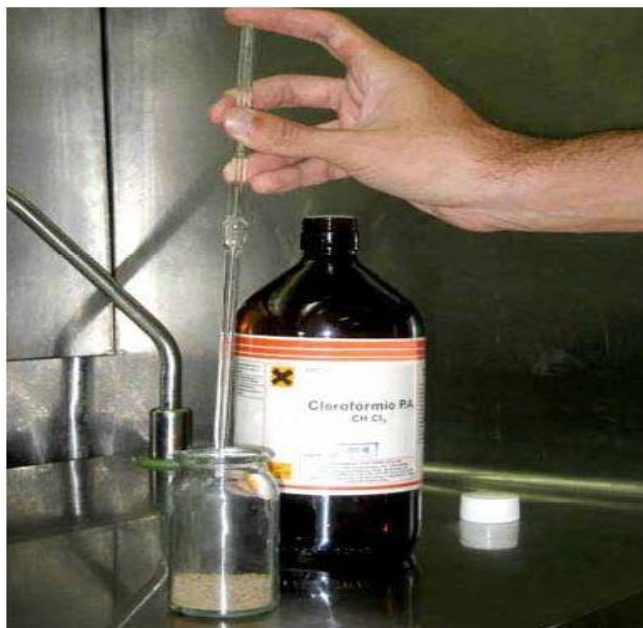
A atividade em cada poço para as placas foi calculada pela DO a 590 nm. (desenvolvimento de cor mais turbidez) menos DO 750 nm (apenas turbidez), depois de corrigir as leituras com a do A1 (controle). Os valores de DO inferiores ao limite de detecção do espectrofotômetro (0,06) foram setados para zero. Posteriormente, os dados foram normalizados dividindo o desenvolvimento de cores de cada um pela soma do desenvolvimento de cores de toda a placa. Assim, após a normalização, a soma de todos os valores de uma placa se igualaram a um, reduzindo a influência de diferenças nas densidades iniciais de inóculo após gerado o CLSU.



**Figura 3.** Placa Biolog Ecoplate contendo 31 fontes de carbono diferentes. Cada fonte de carbono será consumida e o tetrazólio presente em cada poço será reduzido, conferindo diferentes tons de acordo com o consumo da fonte de carbono.

#### 4.4 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA, RESPIRAÇÃO BASAL E QUOCIENTE METABÓLICO

Utilizou-se o método de fumigação-extração modificado de Vance et al. (1987) para a análise de carbono da biomassa microbiana (CBM). Foram pesados 20 g de amostras de solo em frascos do tipo snap-caps com capacidade para 300 mL. As amostras foram fumigadas ou não com clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) isento de álcool, durante a noite (aproximadamente das 16 da tarde de um dia até às 9 da manhã do outro dia).



**Figura 4.** Método de fumigação extração. Clorofórmio sendo utilizado para a incubação da amostra de solo por 24 horas. Fonte (Silva et al.,2007)

O C foi extraído com sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) 0,5 M, adicionando-se 50 mL da solução em cada amostra. Em seguida, as amostras foram colocadas em agitador orbital com movimento circular horizontal por 1 h a 175 rpm. Ao término da agitação as amostras foram centrifugadas por 10 min a 2.500 rpm (raio do rotor = 30 cm) e filtradas em papel qualitativo, para as análises do C.



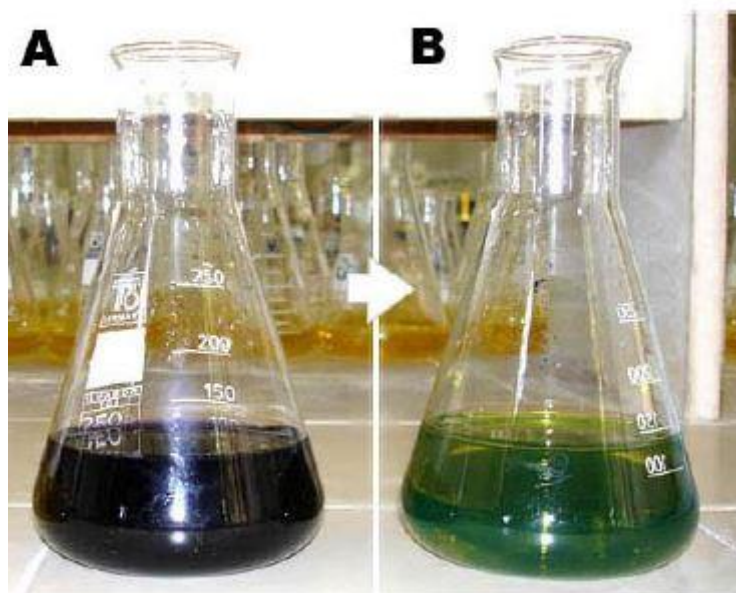
**Figura 5.** Amostras sendo filtradas após agitação com sulfato de potássio para extrair o C da massa microbiana. Fonte (Silva et al.,2007)

#### 4.4.1 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DO SOLO

Foram pesadas amostras de 20 g de solo em frascos de 100 mL e o conjunto foi pesado. Os frascos foram colocados em estufa a 105°C, até que se atingisse a massa constante do solo. Então, os frascos foram pesados novamente para determinar a umidade do solo e, por diferença, a massa seca do solo. Os valores de biomassa microbiana obtidos foram corrigidos pela umidade do solo e expressos em µg de C ou µg de N da biomassa microbiana.g-1 de solo seco.

#### 4.4.2 ANÁLISE DO CARBONO DA MASSA MICROBIANA

Transferiu-se 8 mL do extrato previamente filtrado para um Erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se 2 mL de solução 0,066 M de dicromato de potássio, 10 mL de ácido sulfúrico P.A. e 5 mL de ácido fosfórico P.A., todos com o auxílio de uma pipeta. Esperou-se a mistura esfriar e adicionou-se cerca de 70 mL de água deionizada, esperando-se esfriar novamente. Na sequência, adicionou-se aproximadamente 4 gotas de difenilamina e titulou-se sob agitação magnética com uma solução 0,033 M de sulfato ferroso amoniacal.



**Figura 6.** Ponto estequiométrico da volumetria de oxi-redução. Fonte (Silva et al.,2007)

Ao final da titulação, a coloração da solução mudou de púrpura para verde.

Para a realização da padronização (molaridade exata) da solução de sulfato ferroso amoniacal utilizou-se a seguinte equação : $M1 = [(M2 \cdot V2) \cdot 6] / V1$  , onde: M1

- Molaridade exata padronizada do sulfato ferroso amoniacal; M2 - Molaridade exata do dicromato de potássio (0,066 M); 6 – Razão estequiométrica (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>); V1 - volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra controle (branco); V2 - Volume da alíquota de dicromato de potássio utilizada.

Para proceder-se com o cálculo do teor de C nos extratos, utilizou-se a seguinte equação :  $C \text{ (mg . kg}^{-1}\text{)} = (V_b - V_a) . N . 0,003 . 50 . (8 . P_s)^{-1} . 10^6$ , onde: C = carbono extraído do solo; V<sub>b</sub> (ml) = volume do sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da solução controle (branco); V<sub>a</sub> (ml) = volume gasto na titulação da amostra; N = normalidade exata do (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; P<sub>s</sub> (g) = massa de solo seco.

O cálculo da BMS foi realizado pela fórmula:  $BMS \text{ (mg . kg}^{-1}\text{)} = FC . k_c^{-1}$ , onde: BMS = biomassa de carbono microbiano do solo em mg de C por kg de terra (ou µg.g<sup>-1</sup>); FC = fluxo obtido da diferença entre a quantidade de C (mg.kg<sup>-1</sup>) recuperada no extrato da amostra fumigada e a recuperada na amostra não fumigada; k<sub>c</sub> = fator de correção. O fator de correção (k<sub>C</sub>) em situações que exijam maior exatidão deve ser calculado para cada tipo de solo. Como para os solos do Brasil o fator ainda não foi determinado, utilizou-se o valor 0,33 preconizado por Sparling & West (1988) a fim de expressar a fração do C da BMS recuperada após o processo de fumigação-extração.

#### 4.4.3 RESPIRAÇÃO E QUOCIENTE METABÓLICO

A partir dos valores do C<sub>mic</sub> e do conteúdo de C orgânico (CO), foi calculado o quociente microbiano ou relação C<sub>mic</sub>/CO. A atividade respiratória da biomassa microbiana, ou respiração basal do solo, foi determinada pela quantificação de C-CO<sub>2</sub> produzido a partir de 20 g de solo, incubados por 72 h em sistema fechado, sendo o C-CO<sub>2</sub> capturado em solução de NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup>, a qual foi titulada com HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup>. O quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>) foi calculado de acordo com a razão entre a respiração basal e o C<sub>mic</sub>.

#### 4.5 MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE DIAZOTROFOS (NMP)

O NMP foi realizado a partir de três metodologias diferentes. Na primeira metodologia, amostras de 10 g de terra fina seca ao ar (TFSA) foram pesadas e

aconditionadas em placas de Petri esterilizadas, sendo adicionados 2 mL de H<sub>2</sub>O, e incubadas a 28°C por 48 h. Após o período de incubação, as amostras foram transferidas para frascos e adicionou-se 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%), agitou-se por 20 min, e foram obtidas diluições seriadas até a diluição 10<sup>-6</sup>, sendo 0,1 mL de cada diluição inoculado em 3 mL de cada um dos meios semi sólidos (tabela 01), em triplicatas para cada diluição (DOBEREINER, et al., 1995; MAPA, 2010). Na segundo utilizou-se TFSA, porém não incubou-se as amostras com H<sub>2</sub>O por 48 h como na metodologia anterior, sendo a continuidade da metodologia igual a anterior. Na terceira metodologia utilizou-se o solo fresco, que logo após a coleta foi pesado, procedendo-se às diluições seriadas e posteriores inoculações no meio para o crescimento da película.

Para a contagem de diazotrofos utilizou-se a metodologia descrita por Dobereiner et al. (1995), através do Número Mais Provável (NMP), para bactérias diazotróficas associativas promotoras do crescimento de plantas, endofíticas e rizosféricas, o qual implica que a formação de película característica de organismos diazotróficos associativos atribui caráter positivo ao teste (figura 07), enquanto que a ausência da película aponta para a um caráter negativo a este teste. Para verificar a sua eficácia a última diluição tem que apresentar todas as replicatas negativas, evitando a subestimação do resultado (MAPA, 2010), determinando, assim, a atividade da FBN.

A partir da inoculação, o teste demanda cinco a dez dias para sua conclusão. Para avaliação desse teste utilizou-se a tabela de MacCrady (DOBEREINER et al., 1995), que se baseia na quantidade de triplicatas que formaram películas por diluição (D1, D2 e D3) e atribuindo-se valores para essa quantidade através de uma tabela (ex: 3 frascos positivos da diluição -2, 2 frascos positivos da diluição -3, 1 frasco positivo da diluição -4 = 321, verifica esse valor na tabela= 15,0). Para estimar o valor real de células por grama, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ de células/g de solo/raíz} = n \times d \times f$$

onde **n** é o NMP tabelado, **d** a menor diluição da série empregada e **f** o fator da diluição, de acordo com MAPA (2010).



**Figura 7.** Película formada pelos organismos diazotrofos

#### 4.6 ANÁLISE DO NÚMERO DE NÓDULOS, MASSA SECA DOS NÓDULOS, RAIZ E PARTE AÉREA DA SOJA

Coletou-se 10 plantas de soja cultivar CD 214 RR (semeada em outubro de 2017) de cada repetição dos cinco tratamentos distintos aos 60 dias após a semeadura, por ocasião do florescimento para avaliar os seguintes parâmetros: número de nódulos por planta, massa seca dos nódulos, massa seca da raiz e massa seca da parte aérea. A coleta foi realizada no estágio de florescimento da soja, pois é o estágio de maior demanda de N para a cultura. As plantas foram coletadas com a parte aérea e raiz e utilizadas para as seguintes avaliações: número de nódulos (NN) e produção de massa de matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR). Para a determinação da MSN, da MSPA e da MSR, os nódulos, a parte aérea e as raízes foram acondicionados em sacos de papel e colocados para secar em estufa de ar, a 60°C, até atingir massa constante.

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 ALTERAÇÕES QUÍMICAS DO SOLO

A tabela 1 mostra os resultados médios de atributos químicos do solo, na camada de 5 a 10 cm para os diferentes tratamentos:



**Tabela 1.** Resultados de atributos químicos do solo, na camada de 5 a 10 cm, contendo os tratamentos utilizados no estudo

Tratamentos	pH (CaCl <sub>2</sub> )	Al	Ca	Mg	K	M	V
		mmolc dm <sup>-3</sup>				%	%
SC	4,03 b	21,67 a	7,33 b	5,00 b	0,80 b	62 a	12 bc
CC	4,17 b	12,67 b	9,67 b	6,00 b	1 ab	43 a	15 bc
CC+ N	4,03 b	18,00 ab	6,67 b	4,00 b	0,73 b	61 a	10 c
CC+C	5,77 a	0,00 c	39,33 a	19,66 a	1,20 a	0 b	61 a
CC+C+N	4,97 ab	3,00 c	29,00 a	8,66 b	1,10 ab	6 b	40 ab

m% : saturação por alumínio, v%: saturação por bases

De acordo com os resultados das análises químicas realizadas, pode-se observar que cada tratamento apresentou características distintas. Os tratamentos SC, CC e CC+ N foram os que apresentaram os valores de pH mais baixos (4.03, 4.17 e 4.03, respectivamente). Os tratamentos CC+C foi o que apresentou o valor de pH mais alto (5.77), seguido do tratamento CC+C+N que apresentou um pH de 4,97. Os valores de pH entre os tratamentos diferem por causa das aplicações de calcário e de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Dentro de todos os sistemas agrícolas é comum a prática do uso de fertilizantes amoniacais como fonte de N e de acordo com Raij et al. (1991) e Sharma et al. (2011), a acidez do solo pode ter como origem o manejo da adubação nitrogenada, pois durante a oxidação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, desempenhada através de bactérias nitrificantes, sucede-se a liberação de H<sup>+</sup>, elevando o pH pois há uma maior liberação de H<sup>+</sup>, que ocupa os locais de trocas dos cátions lixiviados pelo NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Um estudo realizado por Caires et al. (2015) demonstrou que a acidificação do solo em sistema plantio direto ocorreu devido a adubação com fertilizante nitrogenado amoniacal, pois houve decréscimo nos teores de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> trocáveis, notavelmente até a profundidade de 0,10 m, e aumento nos teores de Al<sup>3+</sup> trocável até a profundidade de 0,20 m. A prática da calagem já vem sendo reportada há muito tempo como uma forma eficiente de se reduzir a acidez do solo, tanto em sistemas convencionais quanto em sistema plantio direto (Caires et al., 2015; Garbuio et al., 2011). Portanto nos tratamentos em que foi feita aplicação de calcário houve um aumento considerável no pH. Os teores de Al<sup>3+</sup> foram baixos nos

tratamentos com calcário (CC+C e CC+C+N respectivamente) devido o aumento do pH. Segundo Lopes et al. (2007) o aumento no pH do solo, com a calagem favorece as reduções de  $Al^{3+}$  trocável pela precipitação do  $Al^{3+}$  na forma de  $Al(OH)_3$ . Segundo Ridley et al. (2011), os efeitos da calagem são positivos, pois aumenta a possibilidade de movimento descendente de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  que acompanham o  $NO_3^-$ . Dessa forma, a captação de  $NO_3^-$  pelas plantas em profundidade aumenta o pH da rizosfera no subsolo, proporcionando melhoria no desenvolvimento das raízes (Tang et al., 2000). Segundo Caires et al. (2015) o uso de fertilizantes nitrogenados pode ser reduzido em culturas de inverno em áreas de plantio direto onde houve manejo com calcário a fim de reduzir os teores de  $Al^{3+}$  do solo.

Os teores reduzidos de  $Ca^{2+}$  da camada superficial do solo no tratamento CC+ N ( $6,67 \text{ mmolc dm}^{-3}$ ) são devidos à movimentação do  $Ca^{2+}$  decorrente da formação de par iônico com o  $NO_3^-$ , proveniente da adubação nitrogenada. Nos tratamentos sem calcário, os teores reduzidos de  $Ca^{2+}$  ( $7,33$  e  $9,67 \text{ mmolc dm}^{-3}$ , respectivamente) em SC e CC foram decorrentes da alta acidez do solo (Lopes et al. 2007).

O teor de  $Mg^{2+}$  é superior no tratamento CC+C ( $19,66 \text{ mmolc dm}^{-3}$ ), por causa da aplicação de calcário dolomítico (Caires et al., 2015), enquanto o teor mais baixo de  $Mg^{2+}$  trocável com a adubação nitrogenada ocorreu pela movimentação do  $Mg^{2+}$  decorrente da formação de par iônico com o  $NO_3^-$ , no tratamento CC+ N ( $4 \text{ mmolc dm}^{-3}$ ).

O valor de K foi superior no tratamento CC+C ( $1,20 \text{ mmolc dm}^{-3}$ ), intermediário nos tratamentos, CC e CC+C+N ( $1,03$  e  $1,10 \text{ mmolc dm}^{-3}$  respectivamente) e inferior nos tratamentos SC e CC+ N ( $0,80$  e  $0,73 \text{ mmolc dm}^{-3}$  respectivamente). A cobertura de inverno recicla grande quantidade de K e a calagem aumenta a retenção de K no solo por causa da liberação de cargas negativas com o aumento no pH (Caires et al., 2015).

## 5.2 CARBONO, RESPIRAÇÃO E QUOCIENTE METABOLICO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO

Os tratamentos de calagem e adubação nitrogenada influenciaram nos valores do carbono da massa microbiana (CBM), respiração (R) e quociente metabólico (Q) (tabela 2).

**Tabela 2.** Carbono da massa microbiana (CBM), respiração basal do solo (R) e do quociente metabólico (Q) nos cinco tratamentos envolvendo cobertura de inverno, calagem e adubação nitrogenada. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5%. SC (sem cobertura no inverno) CC (com cobertura de inverno e calagem), CC+ N (com cobertura de inverno e com nitrogênio), CC+C (com cobertura de inverno e com calagem), CC+C+N (com cobertura de inverno, com calagem e com nitrogênio)

TRATAMENTO	CMB $\mu\text{g g}^{-1}$	R $\mu\text{g de C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$ $\text{dia}^{-1}$	Q $\mu\text{g de CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ C}$ $\text{microbiano h}^{-1}$
SC	91,37 b	0,47 b	5,19 b
CC	124,51 a	0,54 ab	4,36 b
CC+ N	76,46 b	0,74 a	9,77 a
CC+C	84,29 b	0,33 b	3,99 b
CC+C+N	87,11 b	0,47 b	5,43 b

Os valores médios do CBM variaram de 76,46 a 124,51  $\mu\text{g g}^{-1}$  de solo nos diferentes tratamentos. O maior valor da CBM (124,51  $\mu\text{g g}^{-1}$  de solo) foi observado no tratamento CC. Nos tratamentos SC, CC+ N, CC+C e CC+C+N, os valores para o CBM não apresentaram diferença significativa.

Garbuio et al. (2011) concluíram que a calagem em superfície aumenta o pH do solo, a biomassa microbiana, a atividade microbiana e a relação bactéria / fungo na superfície do solo (0-5 cm), contradizendo o resultado encontrado nesse estudo. Observa-se que houve grande diferença para o tratamento CC em relação aos demais. De acordo com Cattelan & Vidor (1990) a deposição de resíduos orgânicos estimula o aumento populacional bem como acelera o metabolismo da biomassa microbiana do solo, sendo que a mesma também é influenciada diretamente pelo clima, pela disponibilidade de nutrientes minerais e pelo C orgânico do solo. Adams & Laughlin (1981) relataram que, conforme o manejo do solo e o tipo de cultura, os níveis de biomassa microbiana variam, sendo eles maiores em solos não perturbados. Conforme Persson et al. (1983), o pH do solo tem forte influência sobre a decomposição da matéria orgânica, e, conseqüentemente, sobre a comunidade microbiana do solo, a qual pode apresentar alteração na sua atividade. De acordo com Baath et al. (1980), com a diminuição do pH do solo, a população de fungos pode aumentar consideravelmente, reduzindo a população de bactérias. Os fungos são responsáveis pela decomposição de 70% da matéria orgânica presente no solo, sendo eles os principais contribuintes em peso para a biomassa microbiana do solo (Brandão et al., 1992). Balota et al (2004) relataram que a biomassa microbiana do

solo é maior em sistemas de PD (onde há cobertura vegetal) comparados ao PC (onde não há cobertura vegetal). Portanto, no tratamento SC, sem aplicação de calcário e de nitrogênio, observa-se que o pH é o mais baixo entre os tratamentos. Mesmo assim, como esse tratamento onde há cobertura de inverno, a matéria orgânica presente não se torna suficiente para tornar a biomassa microbiana do solo maior em relação aos outros tratamentos.

Os valores da respiração apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (tabela 2). O tratamento CC+ N, se sobressaiu apresentando valor médio de  $0,74 \mu\text{g de C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , seguido pelo tratamento CC, que apresentou valor de respiração de  $0,54 \mu\text{g de C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Os menores valores de respiração foram observados nos tratamentos SC, CC+C e CC+C+N.

A biomassa microbiana geralmente se encontra relacionada positivamente com as taxas de liberação de  $\text{CO}_2$  (Cattelan; Vidor, 1990). Contudo, elevadas taxas de respiração basal podem indicar estresse ambiental, o que justifica o fato do tratamento CC+ N ter apresentado mais alta taxa de respiração basal ( $0,74 \mu\text{g de C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ), provocada pela elevada adição de N que reduz o pH do solo. Os tratamentos SC e CC embora tenham apresentado índices de pH baixos, não receberam aplicação de calcário e nitrogênio. Esses resultados concordam com os resultados obtidos por Insam e Domsch (1988), os quais relataram que as perdas de carbono são reduzidas conforme a biomassa microbiana se torna mais estável e eficiente. Portanto, menos C será perdido como  $\text{CO}_2$  pela respiração e uma fração boa de C se incorporará a biomassa microbiana. Altas taxas de respiração podem indicar distúrbios na produtividade do ecossistema, conforme relatado por Islam e Weil (2000).

O valor do quociente metabólico é resultado da relação entre a respiração basal e a biomassa microbiana, e apresentou um índice alto no tratamento CC+ N, demonstrando que a aplicação de N em altas doses pode interferir na comunidade microbiana alterada pelo quociente metabólico.

No tratamento em que houve aplicação de N sem calcário (CC+ N), o quociente metabólico ( $9,77 \mu\text{g de CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ C microbiano h}^{-1}$ ) foi maior, sendo que nos demais tratamentos as diferenças não foram significativas. Como observado por Anderson & Domsch, (1993) e Islam & Weil, (2000), os valores elevados do quociente metabólico demonstram que a população microbiana está oxidando C de suas próprias células para a sua manutenção e adaptação ao solo, demonstrando

que a mesma se encontra em situações estressantes. Odum (1969) sugere o uso do quociente metabólico, como um parâmetro para a determinação de mudanças bioenergéticas de sistemas com estresse ambiental e que deve ser aplicado somente aos ambientes do solo com valores de pH comparáveis. Segundo Silva (2007), o quociente metabólico pode variar conforme a quantidade de C presente na microbiota do solo versus a respiração basal. Portanto no tratamento em que houve maior aporte de C pela microbiota do solo (CC) o quociente metabólico foi baixo, devido ao fato de apresentar um nível de respiração ideal proporcionado pelas condições do meio. Assim, o C presente no solo está sendo oxidado pela comunidade microbiana de forma eficiente e, portanto, acarretando equilíbrio no quociente, o que indica equilíbrio na comunidade microbiana do solo. Insam e Domsch (1988) relataram que as perdas de C foram reduzidas conforme a biomassa microbiana se tornou mais estável e eficiente.

### 5.3 NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE DIAZOTROFOS

A população de bactérias diazotróficas foi alterada nos diferentes tratamentos. Realizou-se a técnica com 3 metodologias diferentes: a primeira sendo feita com o solo fresco, logo após a coleta a campo (NMP1); a segunda realizada com TFSA (terra fina seca ao ar) dois meses após a coleta (NMP2) e a terceira também feita dois meses após a coleta contudo deixando-se o solo úmido incubando em estufa a 28°C por 48h (NMP3).

De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença entre as metodologias utilizadas para a realização do NMP (NMP1, NMP2 E NMP3). Contudo, entre os tratamentos houve diferenças significativas para os valores de NMP.

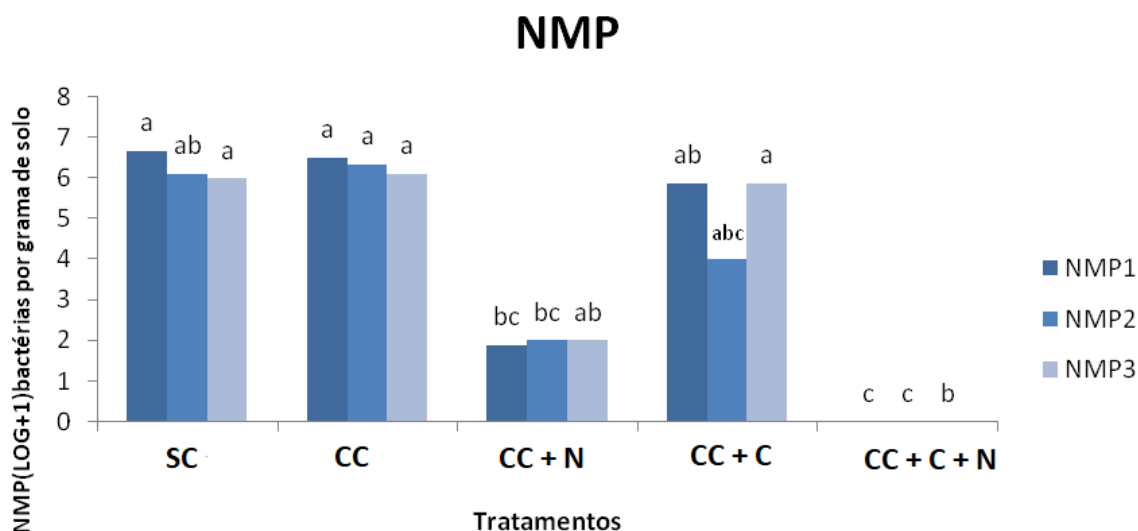


Figura 8. Valores de NMP encontrados no solo nos diferentes tratamentos. Eixo Y se encontra os valores de NMP (LOG + 1) e no eixo X os diferentes tratamentos : SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+ N (com cobertura de inverno+ nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio). NMP1: solo fresco, logo após a coleta a campo NMP2: TFSA (terra fina seca ao ar) dois meses após a coleta; NMP3: realizada dois meses após a coleta contudo deixando-se o solo úmido incubando em estufa a 28°C por 48h.

Na primeira metodologia realizada para o NMP (NMP1), os tratamentos SC e CC mostraram os maiores valores para a densidade de bactérias por grama de solo (6,66 e 6,49 Log+1 bactérias por grama de solo), sendo seguidos pelo tratamento CC+C que apresentou valor de NMP de 5,87 Log+1 bactérias por grama de solo. Os menores valores foram encontrados para os tratamentos CC+ N e CC, os quais apresentaram valores de NMP de 1,86 e 0 Log+1 bactérias por grama de solo, respectivamente.

Para a segunda metodologia realizada para a determinação do NMP, dois meses após a coleta do solo (NMP2), o maior valor para a densidade de bactérias por grama de solo foi no tratamento CC, sendo esse de 6,33 Log+1 bactérias por grama de solo. O tratamento SC apresentou o segundo maior valor de NMP (6,10 Log+1 bactérias por grama de solo), e na sequência ficaram os tratamentos CC+C com um NMP de 4,0 Log+1 bactérias por grama de solo, CC+ N (1,98 Log+1 bactérias por grama de solo) e CC+C+N, com um NMP de 0 Log+1 bactérias por grama de solo.

A terceira metodologia adotada para a realização do NMP, realizada dois meses após a coleta do solo com TSFA e deixando-se o solo incubado por 2 dias antes da realização das diluições, apresentou valores de NMP significativamente

iguais para os tratamentos SC, CC e CC+C, sendo eles de 5,98 Log<sup>+1</sup> , 6,10 Log<sup>+1</sup> e 5,86 Log<sup>+1</sup> bactérias por grama de solo, respectivamente, sendo esses os maiores valores encontrados com o uso dessa metodologia. Os menores valores de NMP foram encontrados para os tratamentos CC+ N e CC+C+N, sendo esses de 1,98 Log<sup>+1</sup> e 0 Log<sup>+1</sup> bactérias por grama de solo.

Observou-se que nas amostras CC+ N e CC+C+N os quais receberam grande quantidade de N, o NMP se mostrou baixo ou nulo em relação aos tratamentos SC, CC e CC+C. Constatou-se que o N aplicado teve efeito negativo sobre a comunidade de bactérias diazotróficas presentes no solo, pois mesmo adotando-se metodologias distintas para a análise do NMP, os resultados mantiveram-se semelhantes. Esses resultados concordam com os encontrados por Sala (2005) que afirma que os genótipos da planta se comportam de modo diferente quanto ao número de microrganismos diazotróficos em relação à adubação nitrogenada, e que há uma queda na densidade de bactérias diazotróficas na raiz com o aumento na dose de N como fertilizante. Kirchhof et al. (1997) demonstraram que a densidade de bactérias diazotróficas presentes em solos com aplicações em doses altas de N era baixa ou quase nula, concordam com os resultados encontrados nesse trabalho, pois, notavelmente, o N aplicado em grande quantidade mostrou um efeito negativo para o desenvolvimento das bactérias diazotróficas.

Resultados obtidos por Benedetti et al (2006) mostraram que a maior ocorrência de bactérias nitrificantes foi nos tratamentos que receberam dosagens de 100% da quantidade recomendada, seguido de doses equivalentes a 50% e 25% da recomendada. Observaram também que no tratamento sem aplicação de N a quantidade de bactérias nitrificadoras foi menor. Estudos realizados por Dobbelaere (1953) e Siqueira & Franco (1988) demonstraram que as bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> são intolerantes à acidez, tanto nos meios de cultura quanto no solo; contudo bactérias do gênero *Acetobacter* são capazes de se desenvolver em meios com pH abaixo de 3,0.

De acordo com Dobbelaere et al. (2003) as bactérias diazotróficas (popularmente chamadas de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>) têm grande capacidade de colonizar e sobreviver em ambientes com baixa disponibilidade de N.

#### 5.4 ANÁLISE DO NÚMERO DE NÓDULOS, MASSA SECA DOS NÓDULOS, RAIZ E PARTE AÉREA DA SOJA

Na tabela 3 pode-se observar os resultados das análises do número de nódulos de soja, bem como da sua massa seca e da massa seca da parte aérea e das raízes.

**Tabela 3.** Valores médios de números de nódulos por planta, massa seca de nódulos (MSN), massa seca das raízes (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA)..

TRATAMENTO	Nº DE NÓDULOS	MSN	MSR	MSPA
SC	26,50 b	0,300 a	2,196 a	8,190 a
CC	25,55 b	0,290 a	2,243 a	8,793 a
CC+ N	35,43 a	0,220 a	1,93 a	7,043 a
CC+C	27,66 b	0,213 a	1,926 a	8,293 a
CC+C+N	32,19 ab	0,253 a	1,713 a	6,876 a

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5%.

Na avaliação do número de nódulos presentes na soja na sua fase de florescimento, foram obtidos valores médios maiores nos tratamentos CC+ N e CC+C+N (35,43 e 32,19 nódulos por planta), sendo que nos tratamentos SC, CC e CC+C os valores médios foram, não apresentaram diferenças significativas.

Nas avaliações de massa seca dos nódulos, massa seca da raiz e da parte aérea, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (tabela 3).

Baldani & Baldani (2005) apontam que a ausência de N pode representar um alto custo da associação para a planta, em condição de baixo nível de N no solo. Isso corrobora com os resultados obtidos nesse trabalho, onde podemos observar que as doses baixas de N nos tratamentos SC, CC e CC+C tiveram efeito negativo na nodulação da soja.

De acordo com Sala et al. (2005), na maioria das vezes, as respostas positivas à inoculação estão relacionadas com a localização das bactérias diazotróficas associativas, que ao contrário dos microrganismos diazotróficos rizosféricos, não precisam competir com os microrganismos do solo por fontes de C, além de poderem colonizar o interior da planta, conferindo um habitat com maior proteção e estabilidade.

Câmara et al. (2014) relata que o teor de matéria orgânica do solo e a de calagem podem afetar a quantidade de N presente no solo, resultando em ausência de resposta tanto para a inoculação das sementes quanto para a adubação mineral nitrogenada. Com a progressão do consumo de N, a nodulação ativa se estabelece,



tornando-se visível às vésperas ou durante o florescimento. Solos muito ácidos, mal corrigidos ou com problemas de excesso de calagem apresentam problemas de deficiência nutricional, principalmente de micronutrientes, refletindo-se diretamente em perda de eficiência da FBN ( Câmara et al., 2014).

Rufini et al. (2011) constataram em seu estudo que o aumento do pH do solo favoreceu a simbiose entre as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas e o feijoeiro-comum, em oposição aos resultados encontrados nesse estudo, onde no tratamento com menor pH (CC+ N) observou-se maior número de nódulos por planta. Sala et al. (2005) relata que as bactérias diazotróficas associativas ao contrário dos microrganismos diazotróficos rizosféricos, não precisam competir com os microrganismos do solo por fontes de C, além de poderem colonizar o interior da planta, conferindo um habitat com maior proteção e estabilidade. Portanto, apesar do baixo pH presente nesse tratamento, as bactérias associativas formadoras de nódulos conseguem se desenvolver de forma eficaz devido à proteção conferida pelos nódulo.

De acordo com Hungria (2011) vários experimentos já foram conduzidos a fim de avaliar o efeito da adubação nitrogenada no rendimento da soja, mostrando que aplicações de N em doses elevadas em diferentes estádios de desenvolvimento apresentaram decréscimos na nodulação, sem acarretar em benefícios ao rendimento da cultura, tanto em plantio convencional, como em plantio direto.

## 5.5 ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA ATRAVÉS DA BIOLOG

A atividade fisiológica das amostras na placa *Biolog* é representada pelo metabolismo heterotrófico médio (média do desenvolvimento de cor do poço-AWCD), calculados a partir dos valores de absorvância das placas *Biolog EcoPlate* inoculados com solos dos cinco tratamentos distintos : SC, CC, CC+ N, CC+C e CC+C+N. Os desvios padrões são representativos de três replicatas.

As fontes de carbono presentes no sistema *Biolog Ecoplate*, foram agrupadas de acordo com seus grupos químicos: Ácido Carboxílicos, Carboidratos, Aminoácidos, Polímeros, Compostos Fenólicos e Aminas (Tabela 4) (Choi e Dobbs,1999).

**Tabela 4.** Substratos utilizados no sistema Biolog Ecoplate e os grupos químicos ao qual eles pertencem de acordo com Choi e Dobbs (1999).

Número	Substrato	Grupo
1	Acido Pirúvico Metil Éster	Acido Carboxílico
2	Tween 40	Polímeros
3	Tween 80	Polímeros
4	$\alpha$ -Ciclodextrina	Polímeros
5	Glicogênio	Polímeros
6	D-Cellobiose	Carboidrato
7	$\alpha$ -D-Lactose	Carboidrato
8	$\beta$ -Metil-D-Glicose	Carboidrato
9	D-Xilose	Carboidrato
10	I-Eritritol	Carboidrato
11	D-Manitol	Carboidrato
12	N-Acetil-D-Glucosamina	Carboidrato
13	Ácido D-Glucosaminico	Ácido Carboxílico
14	Glicose-1-Fosfato	Carboidrato
15	D,L- $\alpha$ -GlicerolFosfato	Carboidrato
16	Ácido D-Galactônico $\gamma$ -Lactona	Carboidrato
17	ÁcidoGalacturônico	ÁcidoCarboxílico
18	Ácido 2-Hidroxibenzóico	CompostoFenólico
19	Ácido 4-Hidroxibenzóico	CompostoFenólico
20	Ácido $\gamma$ -Hidróbúterico	ÁcidoCarboxílico
21	Ácidoltacônico	ÁcidoCarboxílico
22	Ácido $\alpha$ -Cetobúterico	ÁcidoCarboxílico
23	Ácido D-Málico	ÁcidoCarboxílico
24	L-Arginina	Aminoácido
25	L-Asparagina	Aminoácido
26	L-Serina	Aminoácido
27	L-Fenilalanina	Aminoácido
28	L-Treonina	Aminoácido
29	ÁcidoGlicil-L-Glutâmico	Aminoácido
30	Feniletilamina	Amina
31	Putrescina	Amina

A partir de 96h (figura 14), momento em que não houve mais diferenças significativas no número de poços ativos com e sem atividade fisiológica das microplacas amostradas, utilizou-se os dados para a realização de um teste de média para cada uma das fontes de C, feita a partir das nove réplicas presentes nas três placas das repetições (figura 15).

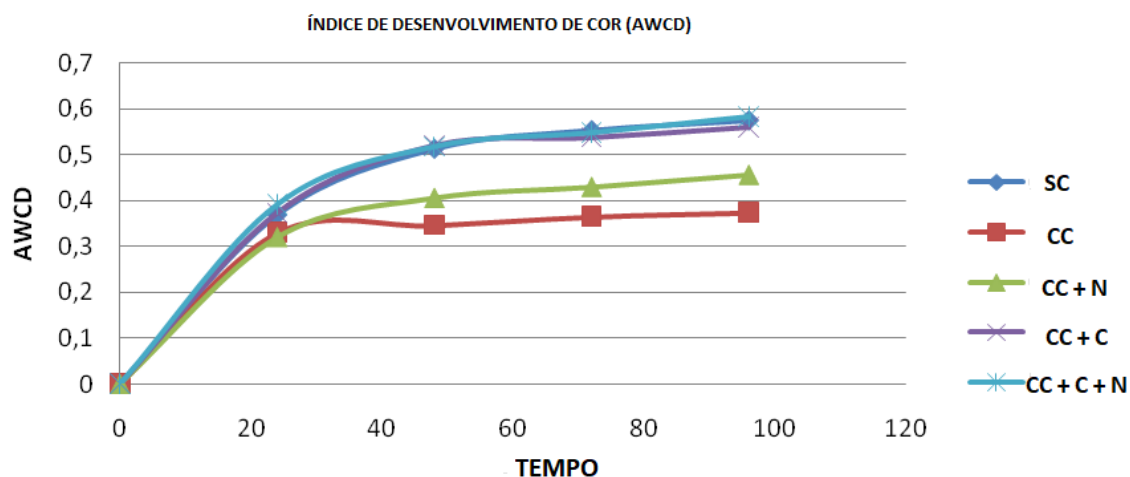


Figura 9. Índice de desenvolvimento de cor (AWCD). No eixo Y se encontra os valores de AWCD e no eixo X os diferentes horários de medida (0, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação).

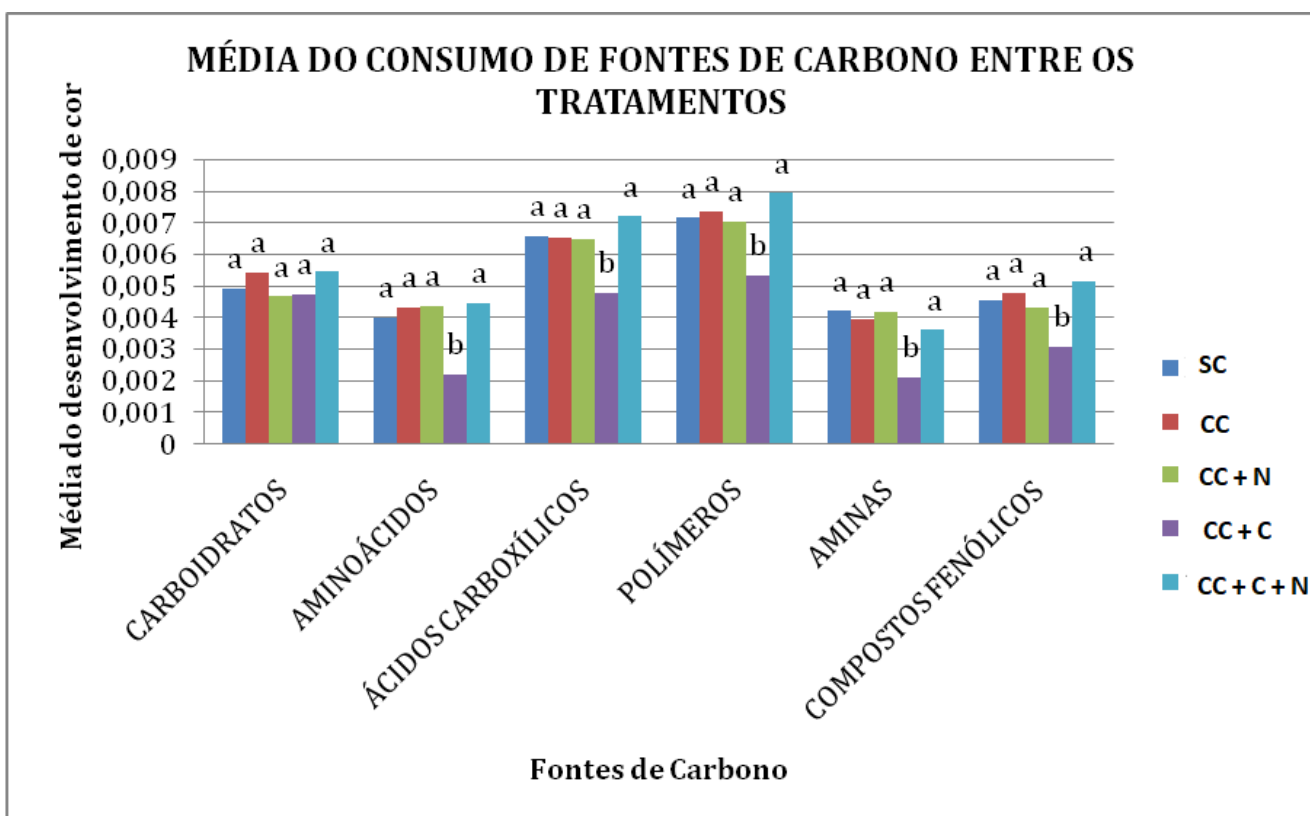


Figura 10. Valores médios do consumo dos subgrupos das fontes de carbono presentes na placa Biolog Ecoplate nos 5 tratamentos distintos: SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+N (com cobertura de inverno + nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio)

As fontes de ácidos carboxílicos e polímeros apresentaram médias finais de AWCD superiores que compõe o sistema *Biolog Ecoplate*, seguido dos carboidratos,

compostos fenólicos, aminoácidos e aminas. Para os carboidratos, os valores de AWCD entre os tratamentos não mostraram diferenças significativas entre o consumo desse subgrupo. Os mesmos valores dos tratamentos SC, CC, CC+ N e CC+C+N se mostraram iguais e superiores estatisticamente ao tratamento CC+C para os demais subgrupos: polímeros, ácidos carboxílicos, aminoácidos, aminas e compostos fenólicos (figura 15).

Quando analisadas as fontes que tiveram maior consumo entre os tratamentos, encontraram-se as maiores médias de consumo para o tratamento SC : Ácido  $\gamma$ -Hidroxibutírico, Ácido D-Málico, L-Fenilalanina e Tween 40; tratamento CC: L-Arginina e D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato; tratamento CC+ N:  $\alpha$ -D-Lactose e Tween 80; tratamento CC+C: Ácido D-Galactônico  $\gamma$ -Lactona e L-Treonina e para o tratamento CC+C+N : Ácido Pirúvico Metil Éster, L- Asparagina e L-Serina (figura 15).

Para o grupo dos carboidratos não houve diferenças significativas entre os tratamentos para o consumo desse subgrupo (figura 15). Contudo, o tratamento CC+C para os demais subgrupos polímeros, ácidos carboxílicos, aminoácidos, aminas e compostos fenólicos apresentou uma diferença significativa. O tratamento em questão (CC+C) apresentou um alto pH devido à adição de calcário, e não recebeu adição de N, sendo esse um fato que pode ter gerado tal consumo diferenciado para os subgrupos das fontes de C. Segundo Quadros (2012) o manejo e o preparo do solo serão decisivos e terão grande influência nas taxas de degradação da matéria orgânica proporcionada pela atividade microbiana. Conforme Benizri & Amiaud (2005) com o aumento da diversidade de espécies vegetais em determinado local, ocorre maior exsudação de compostos liberados pelas raízes das plantas, fazendo com que aumente a diversidade de bactérias presente nesse solo. Como a área experimental se encontra em rotação de culturas, tal afirmação se torna justificável, pois a comunidade bacteriana presente nesse solo é reflexo dos anos de construção desse solo através dos diferentes manejos adotados.

De acordo com o manejo adotado, proporcionando aumento no pH com a calagem e/ou aumento da acidez devido à falta de aplicação de calcário, sendo a mesma causada também por altas doses de N aplicadas, ocorre uma mudança no comportamento da microbiota do solo, que está associada fortemente aos compostos produzidos pelas raízes e pelos resíduos das plantas. Os diferentes tipos e quantidades desses compostos são os principais fatores que interferem

diretamente na densidade e na diversidade de microrganismos presentes na rizosfera (Bolton Junior et al., 1992). No presente trabalho, esses fatores, provavelmente, causaram impactos diferentes na diversidade metabólica da população microbiana para os diferentes tratamentos.

A estimulação de microrganismos capazes de utilizar diferentes fontes de C como Ácido  $\gamma$ -Hidroxibutírico, Ácido D-Málico, L-Fenilalanina, Tween 40, L-Arginina, D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato,  $\alpha$ -D-Lactose, Tween 80; Ácido D-Galactônico  $\gamma$ -Lactona, L-Treonina, Ácido Pirúvico Metil Éster, L-Asparagina e L-Serina, nos tratamentos avaliados, é um fator que indica que resíduos de aveia preta presente na área de estudo como cobertura vegetal pode ter liberado compostos dessa natureza em sua rizosfera, de acordo com Gömöryová et al. (2009), e que o tratamento SC teve a influência na sua microbiota pelo fato de não apresentar cobertura no solo. De acordo com Benizri & Amiaud (2008), a diversidade funcional das comunidades microbianas do solo também pode variar com a época de amostragem e, aparentemente, essas comunidades nos diferentes tratamentos, com cobertura de aveia preta, presença e/ou ausência de calagem e de N em cobertura, foram fortemente influenciadas pela composição e fenologia da comunidade vegetal.

Diversos estudos foram realizados em diversas aplicações da ecologia microbiana e demonstraram que houve grande utilidade da técnica Biolog EcoPlate na detecção de mudanças populacionais no solo (Xue, 2005; Feng, 2017; Bisset, 2013). Portanto, técnicas bioquímicas como esta podem ser adotadas como forma de avaliar mudanças na estrutura e funcionamento da comunidade bacteriana do solo.

## 5.6 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

No tempo de 96h, momento em que não houve mais diferenças significativas no número de poços ativos com e sem atividade fisiológica das microplacas amostradas realizou-se uma análise de componentes principais (PCA), através do programa estatístico RStudio (2015). Juntamente com dos parâmetros C da massa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e de todos os atributos da análise química, realizou-se a PCA a fim de se observar a similaridade entre os tratamentos a partir da correlação entre essas variáveis.

De acordo com a análise dos componentes principais (PCA) que foi gerada ordenando os dados da matriz da Biolog e depois realizando-se a análise de correlação com inserção dos vetores da matriz dos parâmetros C da massa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e de todos os atributos químicos do solo, pode-se observar os vetores da matriz que tiveram correlação significativa ( $p < 0,05$ ) com a matriz de Biolog (figura 16).

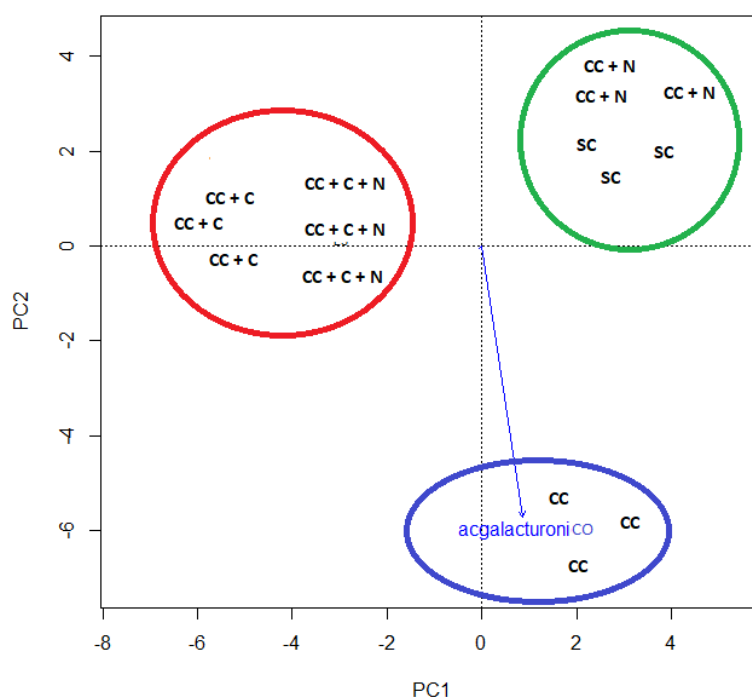


Figura 11. Análise de componentes principais (PCA) gerada com os dados dos parâmetros carbono da massa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e de todos os dados da análise química correlacionados com os dados da BiologEcoplate a 96h de incubação. Os vetores da matriz que tiveram correlação significativa ( $p < 0,05$ ) aparecem com a seta em azul. Pode-se observar a formação de 3 agrupamentos distintos. Os tratamentos estão nomeados : SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+ N (com cobertura de inverno + nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio)

Foram separados 3 grupos distintos, contudo o ácido galacturônico mostrou ter uma correlação positiva com o tratamento CC (sem aplicação de calcário e sem aplicação de nitrogênio) que se agrupou na posição sul no PC1. O tratamento em questão foi o tratamento que apresentou a maior massa microbiana, e o aporte de C pela massa microbiana ocorre em ambientes com alta disponibilidade do mesmo, decorrente dos resíduos das plantas de cobertura. Nesse tratamento não houve

interferência na comunidade microbiana causada pela aplicação de insumos, então a mesma manteve-se estável, sem ser alterada pela adição de N e de calcário. Como nesse tratamento houve cobertura vegetal, o aporte da matéria orgânica no solo foi grande e constante, devido ao manejo do solo em plantio direto. Um dos principais componentes que forma a lamela média das células de vegetais superiores são as substâncias pécticas, que são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular compostas de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster (Leninger, 2000). O fato do vetor de ácido galacturônico se encontrar com intensidade positiva para esse tratamento decorre de uma intensa incorporação de matéria orgânica nesse meio devido aos resíduos das plantas durante o inverno. O comportamento funcional da microbiota do solo é influenciado pela atividade rizosférica, a qual determina a quantidade e a composição dos exsudatos disponibilizados para os microrganismos (GARLAND, 1996).

De acordo com a PCA que foi gerada ordenando os dados da matriz dos parâmetros C da massa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e de todos os atributos químicos do solo e depois realizando-se a análise de correlação com inserção dos vetores da Biolog, pode-se observar os vetores da Biolog que tiveram correlação significativa ( $p < 0,05$ ) com a matriz dos demais parâmetros (figura 17).

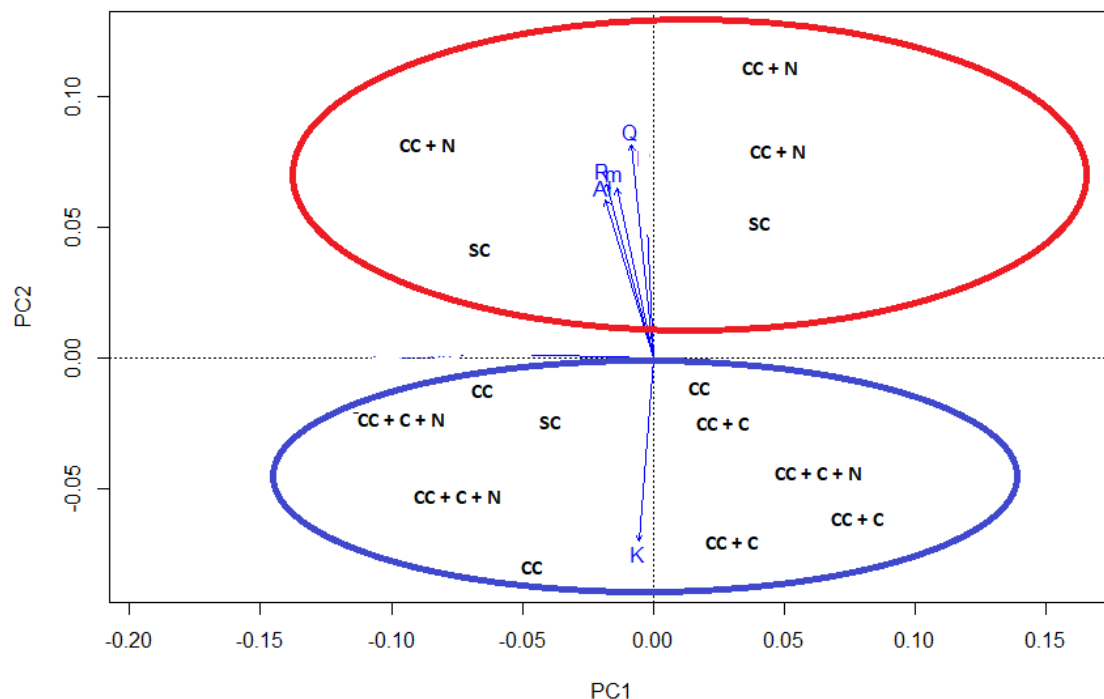


Figura 12. Análise dos componentes principais (PCA) gerada com os dados da BiologEcoplate a 96h de incubação correlacionados com os parâmetros carbono da massa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e de todos os dados da análise química. Os vetores da matriz que tiveram correlação significativa ( $p < 0,05$ ) aparecem com a seta em azul. Podemos observar a formação de 2 agrupamentos distintos. Os tratamentos estão nomeados: SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+ N (com cobertura de inverno + nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio)

Dois agrupamentos opostos foram formados, um ao norte e outro ao sul dos quadrantes (figura 17). Nota-se que houve correlação positiva dos tratamentos SC e CC+ N com os atributos alumínio, m%, respiração, quociente, que se encontram nos quadrantes superior, enquanto os tratamentos CC, CC+C e CC+C+N formaram um grupo na parte inferior, correlacionando-se positivamente com o potássio. As comunidades microbianas nos tratamentos SC e CC+ N apresentaram características distintas em relação aos demais tratamentos. O tratamento SC não tinha cobertura vegetal durante o inverno, e apresentou pH relativamente baixo, que contribui para que os níveis de  $Al^{3+}$  sejam mais altos. O tratamento CC+ N tinha cobertura vegetal, contudo devido à alta dose N o pH do solo foi baixo, o que favoreceu os altos níveis de  $Al^{3+}$  no solo. No entanto, seu quociente metabólico foi extremamente alto, que pode ser um indicador do estresse da comunidade microbiana nesse solo, ao contrário do tratamento SC, que apresentou o  $q_0$  em um nível mais baixo e estável. O metabolismo das fontes de C nesses tratamentos



diferiu acentuadamente em relação aos outros devido à diversidade e quantidade da microbiota do solo. Essas variações manifestam-se em diferentes velocidades de ataque, degradação e mineralização, produzindo substâncias intermediárias diversas. Os produtos finais do processo de decomposição são o  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (e mais  $\text{CH}_4$ , em anaerobiose) e minerais; os produtos intermediários são extremamente variáveis; desde ácidos orgânicos, aldeídos, álcoois, açúcares, mais ou menos complexos, que passam a fazer parte da matéria orgânica como um componente do solo (Bayer & Mielniczuk, 1999). Os tratamentos CC, CC+C e CC+C+N apresentavam cobertura vegetal, e apesar de apresentarem níveis de pH diferentes, mostram um aporte maior de K em relação aos demais tratamentos. A cobertura de inverno recicla grande quantidade de K e a calagem aumenta a retenção de K no solo por causa da liberação de cargas negativas com o aumento no pH (Caires et al., 2015). Cabe ressaltar que os níveis de  $\text{Al}^{+3}$  nesses tratamentos foram mais baixos relação aos tratamentos SC e CC+ N.

De acordo com a PCA que foi gerada ordenando os dados matriz de carboidratos e depois realizando-se a análise de correlação com inserção dos vetores dos parâmetros C da massa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e de todos os atributos químicos, pode-se observar os vetores dos carboidratos que tiveram correlação significativa ( $p < 0,05$ ) com a matriz dos demais parâmetros (figura 18):

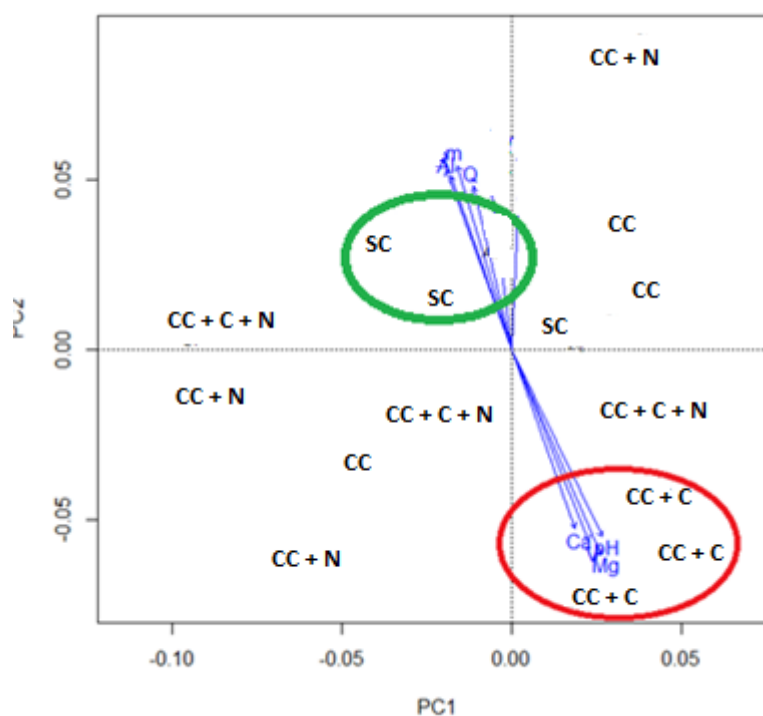


Figura 13. Análise dos componentes principais (PCA) gerada com os dados dos Carboidratos da Biolog Ecoplate a 96h de incubação correlacionados com os parâmetros carbono da massa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e de todos os dados da análise química. Os vetores da matriz que tiveram correlação significativa ( $p < 0,05$ ) aparecem com a seta em azul. Podemos observar a formação de 2 agrupamentos distintos. Os tratamentos estão nomeados : : SC (sem cobertura de inverno); CC (com cobertura de inverno); CC+ N (com cobertura de inverno + nitrogênio); CC+C (com cobertura de inverno + calcário) e CC+C+N (com cobertura de inverno + calcário + nitrogênio).

Observou-se que há a formação de dois grupos distintos em quadrantes opostos (figura 18). O tratamento SC se correlacionou positivamente com os parâmetros alumínio, quociente e m%, ao passo que o tratamento CC+C se encontra correlacionado positivamente com os parâmetros cálcio, magnésio e pH. O tratamento SC apresentou um quociente metabólico baixo e esse quociente expressa a quantidade de CO<sub>2</sub> liberado pela quantidade de C da biomassa em função do tempo, sendo essa a taxa de respiração específica da biomassa microbiana. Altos valores do qCO<sub>2</sub> significam que a população microbiana está oxidando C de suas próprias células (respiração de manutenção dos microrganismos vivos) para a sua manutenção e adaptação ao solo. Portanto, o tratamento em questão estava em equilíbrio metabólico. O valor de m% (que expressa quanto por cento da CTC efetiva está ocupada pela acidez trocável ou Al trocável) é um dos mais altos para esse tratamento, já que a quantidade de Al<sup>+3</sup>

presente no solo é alta. O pH mais alto presente no tratamento CC+C proporcionado pela aplicação do calcário, segundo Ridley et al. (2011) os efeitos da prática de calagem são positivos, pois aumentam a possibilidade de movimento descendente de  $\text{Ca}^{2+}$  móvel e  $\text{Mg}^{2+}$ , que acompanham o  $\text{NO}_3^-$ . Dessa forma, a captação de  $\text{NO}_3^-$  pelas plantas aumenta o pH da rizosfera no subsolo, proporcionando melhoria no desenvolvimento das raízes. A estimulação de microrganismos rizosféricos capazes de utilizar os carboidratos nos tratamentos avaliados indica que a aveia estabelecida na área experimental pode liberar compostos desse tipo em sua rizosfera (Gömöryová et al., 2009). Portanto, o agrupamento desses dois tratamentos em grupos distintos mostra que essas duas comunidades se comportam de forma distinta devido à esses fatores químicos que tiveram correlação com o consumo dos carboidratos liberados pela rizosfera da aveia.

Dessa forma, pode-se concluir que a cobertura vegetal tem grande influência sobre a estrutura da comunidade microbiana do solo, tanto na diversidade metabólica, quanto no seu comportamento. Em um sistema em que não há cobertura no solo, sem adição de N e sem aplicação de calcário (SC), o pH é relativamente baixo, o que torna o solo saturado por  $\text{Al}^{+3}$ . Isso irá influenciar no comportamento da comunidade microbiana. Os índices de C da biomassa microbiana, bem como a respiração basal e quociente metabólico demonstraram que o solo do estudo se encontra em equilíbrio, por não apresentar nenhuma perturbação causada por agentes externos. A comunidade de bactérias diazotróficas foi alta, mesmo em pH seja baixo, indicando que há elas conseguem sobreviver nessa faixa de pH. O mesmo foi observado para a presença de bactérias diazotróficas noduladoras, pois mesmo em baixos valores de pH nodularam as raízes de soja.

Para os tratamentos com cobertura vegetal, notaram-se diferenças peculiares. No tratamento CC, o pH foi baixo devido ao fato de não ter sido feita nenhuma aplicação de calcário para a correção da acidez presente nesse solo. Os resíduos de cobertura tiveram influência positiva no desenvolvimento da biomassa microbiana, proporcionando valor alto para o C da biomassa microbiana do solo. Os níveis da respiração basal do solo, bem como o valor do quociente metabólico indicaram que esse tratamento, mesmo com uma alta acidez, apresentou equilíbrio na biomassa microbiana. A quantidade de diazotrofos rizosféricos e/ou de vida livre presentes no

solo, bem como de diazotrofos noduladores foi alta, apesar das condições químicas causadas pela acidez elevada do solo.

Quando a aplicação de N no solo ocorreu numa quantidade elevada, sem correção da acidez pela mesma (tratamento CC+ N) ocorreram alguns distúrbios na comunidade microbiana. A alta acidez ocasiona a dificuldade na absorção de alguns nutrientes, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+}$  e K, devido aos teores elevados de  $\text{Al}^{+3}$ . O número de diazotrofos rizosféricos e/ou de vida livre presentes no solo diminuiu significativamente, porém o número de diazotrofos noduladores se manteve elevado, demonstrando que apesar do efeito negativo sobre os diazotrofos rizosféricos e/ou de vida livre, os noduladores conseguiram se adaptar às condições de acidez. Os índices de respiração basal, bem como de quociente metabólico indicaram que houve uma perturbação na microbiota, provavelmente causada pela adição de altas doses de N no solo.

No tratamento CC+C, em que houve aplicação de uma quantidade elevada de calcário sem adição de N, o comportamento da microbiota do solo foi diferente. O pH do solo foi maior em relação aos tratamentos sem calagem, e dessa forma, houve maior mobilidade de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+}$  e K presentes no solo, e menor interferência do  $\text{Al}^{+3}$ . Contudo, a população de diazotrofos presentes no solo diminuiu e houve eficiente nodulação da soja. Os índices de CBM, bem como de respiração e quociente demonstraram que o tratamento apresentou estabilidade da biomassa microbiana.

Com a aplicação de elevada dose de calcário e de nitrogênio (tratamento CC+C+N), houve aumento no pH ocasionado pela calagem, maior disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+}$  e K presentes no solo, contudo ocorreu um efeito negativo na comunidade de diazotrofos. Na Quando altas doses de calcário e N foram aplicadas, a população de diazotróficas foi nula. Contudo, ao se avaliar a nodulação da soja, observou-se boa eficiência de simbiose entre as bactérias noduladoras e a planta de soja. Portanto, recomenda-se a realização da técnica de NMP testando outros meios para se observar o crescimento dessas bactérias diazotróficas. Em relação ao CBM, respiração basal e quociente metabólico, observou-se que apesar das altas doses de N aplicado, bem como de calcário, a comunidade microbiana não apresentou alterações significativas em seu metabolismo, mantendo-se estável.

Em relação ao consumo das fontes de C pelas comunidades microbianas presentes nos diferentes tratamentos, pode-se observar que houve uma peculiaridade no consumo de diferentes substratos. Cada comunidade avaliada

consumiu determinadas fontes devido às condições químicas e biológicas do solo, que favoreceram o consumo de tais fontes por elas. Todas as fontes de todos os subgrupos avaliados (Aminoácidos, Ácidos carboxílicos, Aminas, Polímeros, Compostos fenólicos e Carboidratos) foram consumidas, porém cada comunidade apresentou um consumo diferente dos seus subgrupos em relação às demais comunidades.

Estudos posteriores devem ser realizados no sentido de identificar molecularmente as comunidades microbianas presentes em solos com diferentes manejos de calagem e de adubação nitrogenada para avaliar o comportamento de taxons bacterianos específicos diante de tais condições.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nesse trabalho mostraram que a comunidade microbiana do solo apresenta comportamentos diferentes de acordo com os diferentes manejos de adubação nitrogenada amoniacal, de calagem e cobertura do solo.

Em um sistema sem cobertura do solo (SC) no inverno e sem aplicação de nitrogênio e de calcário, ocorre acidificação do solo ocasionada pelo acúmulo de  $Al^{+3}$ , e redução nos teores de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  trocáveis. Contudo, o número de bactérias diazotróficas nessa condições se mostra grande, o que pode justificar o fato de ser um ambiente favorável a bactérias que se desenvolvam em baixo pH. O aporte de carbono na massa microbiana, respiração basal do solo bem como o quociente metabólico demonstraram que o solo se encontrou em equilíbrio metabólico, fato evidenciado por ser um tratamento sem adição de insumos. Para as mesmas condições de nitrogênio e calcário aplicados, porém com cobertura de solo, as quantidades no carbono da massa microbiana foram mais elevadas, justificado pelo fato da cobertura vegetal nesse sistema aportar matéria orgânica para ser incorporada ao solo pela comunidade microbiana.

No tratamento com aplicação de calcário e sem nitrogênio (CC+C), o pH do solo foi maior do que nos tratamentos sem calagem, havendo uma boa decomposição da cobertura vegetal, favorecida pela comunidade microbiana, fato comprovado pelo quociente metabólico baixo.

A aplicação de nitrogênio em altas quantidades nos tratamentos sem e com calagem mostrou ter um efeito negativo na comunidade de bactérias diazotróficas rizosféricas, embora não tenha interferido na nodulação das bactérias simbiotes. Para o tratamento com adição de nitrogênio a ausência de calagem teve efeito direto no quociente metabólico, que se mostrou alto, indicando que houve uma perturbação no sistema, dependendo maior manutenção da energia da comunidade microbiana.

A atividade apresentada pelas comunidades bacterianas no consumo dos subgrupos de carbono foi similar, diferindo apenas o tratamento com calagem, que apresentou um consumo menor para os subgrupos. A diferença apresentada pelas comunidades foi entre as médias dos substratos que foram consumidos por cada tratamento. Portanto, de acordo com o manejo de aplicação de N e de calcário, bem

como da presença de cobertura vegetal, ocorre variação no comportamento, bem como no consumo das fontes de carbono fornecidas pela matéria orgânica presente no solo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS T. MCM. & LAUGHLIN R. J. The effects of agronomy on the carbon and nitrogen contained in the soil biomass. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge , 1981. 319–327

ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F.; FOSTHOFER, E.L.; STRIEDER, M.L.; SUHRE, E.; TEICHMANN, L.L. Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta por meio do clorofilômetro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.109-119, 2003.

BÄÄTH, E.; BERG, B.; LOHM, U.; LUNDGREN, B.; LUNDKVIST, H.; ROSSWALL, T.; SÖDERSTRÖM, B.; WIRÉN, A. Effects of experimental acidification and liming on soil organisms and decomposition in a Scots pine forest. **Pedobiologia**, v. 20, p. 85-100, 1980.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALBANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of 66 [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillumrubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. . **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996a.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n. 5/6, p.911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (org) **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, Caxias do Sul, 433p.; 2002.



BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, Eurípedes Malavolta, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 549-579. 2005.

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, n. 4, p. 641-649, 1998

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plantrelationships: environmental and physiological advances (1990 - 1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, n.1, p.7-11, 1998.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênese, 1999. p. 9-26.

BENEDETTI, E. EFEITO DA APLICAÇÃO DE CALCÁRIO NA OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS NITRIFICADORAS EM SISTEMA DE PLANTIO DIRETO. **Cadernos de Agroecologia**, v. 1, n. 1, nov. 2006.

BENT, E.; CHANWAY, C. P. Potential for misidentification of a spore – forming *Paenibacillus polymyxa* isolate as an endophyte by using culture-based methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p.4650 – 4652, 2002.

BENIZRI, E.; AMIAUD, B. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.2055-2064, 2005.

BERGAMASCHI, C. . **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - Rs, 2006

BISSETT, A. ; RICHARDSON, A. E.; BAKER, G. Bacterial community response to tillage and nutrient additions in a long-term wheat cropping experiment. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 58, p.281-292, mar. 2013

BITTENCOURT, M. V. L. Impactos da agricultura no meio-ambiente: Principais tendências e desafios (Parte 1). **Economia & Tecnologia**, ano 05, v. 18, 2009.  
Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 2 - Safra 2014/15, n. 12 – Décimo segundo levantamento. Brasília, p. 1-134, set. 2015.

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

BOLTON JUNIOR, H.; FREDRICKSON, J.K.; ELLIOT, L.F. Microbial ecology of the rhizosphere. In: METTING JUNIOR, F.B. (Ed.). **Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management**. New York: Marcel Dekker, 1992. p.27-63.

BROOKES, P. C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, v. 19, p. 269-279, 1995.

CÂMARA, G.M.S. Fixação biológica do nitrogênio em soja. Informações Agronômicas nº147. Gil Miguel de Sousa Câmara. Ed. Piracicaba; 2014.

CAIRES, E.f.; HALISKI, A.; BINI, SCHARR,D. Surface liming and nitrogen fertilization for crop grain production under no-till management in Brazil. **European Journal of Agronomy**, v. 66, p.41-53, maio 2015.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em funções de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, n. 2, p. 133-142, 1990.

CHOI K.-H., DOBBS F.C. Comparison of two kinds of Biologmicroplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. **Journal of Microbiology**. 1999. 36: 203–213.

CIOTTA, M. N.; C. BAYER, C.; ERNANI, P. R.; FONTOURA, S. M. V.; ALBUQUERQUE, J. A.; WOBETO, C. Acidificação de um Latossolo sob Plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.1055-1064, 2002.

CORDEIRO, L.A.M.; HOEK, J.B.V.D. Nitrogênio na cultura do milho sob sistema plantio direto. **Revista Factuciência**, v.13, p.27-54, 2007.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. Carbono, nitrogênio e fósforo na biomassa microbiana do solo. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do Solo**: ecossistemas tropicais: subtropicais. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 263-276.

DERPSCH, R.; CALEGARI, A. **Plantas para adubação verde de inverno**. Londrina: IAPAR, 1992. 80 p. (IAPAR. Circular, 73)

DERPSCH, R.; FRIEDRICH, T.; KASSAM, A.; HONGWEN, L. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. **Internacional Journal of Agricultural and Biological Engineering**. 2010, 3, 1–25.

DIEHL, R. C.; MIYAZAWA, M.; TAKAHASHI, H. W. Compostos orgânicos hidrossolúveis de resíduos vegetais e seus efeitos nos atributos químicos do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.2653-2659, Viçosa, 2008.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; TRYIS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and

mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 212, p. 155-164, 1999

DÖBEREINER J. Azotobacterem solos ácidos. *BollInstEcolExpAgríc.* 1953. 11:1–36  
 DÖBEREINER, J., RUSCHEL, A.P. 1958. Uma nova espécie de *Beijerinckia*.  
**Revista de Biologia**: 261- 272.

DÖBEREINER, J., DAY, J.M. 1975. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: **Newton, W.E.; Nyman, C.J. (ed.) Nitrogen fixation**. Washington State University, Washington, USA. p.518-538.

DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Madison: **Science Tech**, 1987. 155 p. (Brock/ Springer Contemporary Bioscience Series).

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília : EMBRAPA - SPI : Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.) **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.1-42.

FIERER, N.; STRICKLAND, M.S.; LIPTZIN, D.; BRADFORD, M.A.; CLEVELAND, C.C. Global patterns in belowground communities. **Ecollogy Letters**. 2009.

FEIGL, Viktória; UJACZKI, Éva; VASZITA, Emese. Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the BiologEcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. **Science Of The Total Environment**, v. 595, p.903-911, out. 2017.

FENG, Y.; MOTTA, A.c.; REEVES, D.w..Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 35, n. 12, p.1693-1703, 2003

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 and Tillage Research*, v. 92, n. 1-2, p.18-29, 2007

FUENTES, Juan P.; BEZDICEK, David F.; FLURY, Markus. Microbial activity affected by lime in a long-term no-till soil. **Soil And Tillage Research**, [s.l.], v. 88, n. 1-2, p.123-131, jul. 2006

GARBUIO, Fernando J.; JONES, Davey L.; ALLEONI, Luís R. F.. Carbon and Nitrogen Dynamics in an Oxisol as Affected by Liming and Crop Residues under No-Till. **Soil Science Society Of America Journal**, v. 75, n. 5, p.1723-1729, 2011

GÖMÖRYOVÁ, E.; HRIVNÁK, R.; JANIŠOVÁ, M.; UJHÁZY, K.; GÖMÖRY, D. Changes of the functional diversity of soil microbial community during the colonization of abandoned grassland by a forest. **Applied Soil Ecology**, v.43, p.191-199, 2009.

HOBBS, P.R.; SAYRE, K.; GUPTA, R.The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. 2007, 363, 543–555

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. **Importância do sistema de semeadura na população microbiana do solo**. Comunicado Técnico/Embrapa-Soja, Londrina, Paraná, no 56, 1997, p.1-9.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja. Circular Técnica.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Planta and Soil**, v.331, n.1-2, p.413-425, 2010.

INAGAKI, Thiago Massao; SÁ, João Carlos de Moraes; CAIRES, Eduardo Fávero. Lime and gypsum application increases biological activity, carbon pools, and agronomic productivity in highly weathered soil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. v. 231, p.156-165, set. 2016

INSAM, H.; DOMSCH, K. H. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. **Microbial Ecology**, v. 15, n. 4, p. 177-188, 1988.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 79, n. 1, p. 9-16, 2000.

JENKINSON, D. S.; POLWSON, D. S. The effect of biocidal treatment on metabolism in soil. V. A method of measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 209-213, 1976.

KENNEDY I. R.; TCHAN, Y.T. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. **Plant and Soil**, v.141, p.93-118, 1992.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. 2006. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2006.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

LOPES, A.S & GUILHERME L.R.G. Fertilidade do solo e produtividade agrícola. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.; CANTARUTTI, R.B.;

NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG; Sociedade de Ciência do Solo, p.2-61, 2007.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Ceres, 2006. 631p.

MAPA. Ministério da Agricultura. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995. 889p.

MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 3, p. 425-433, 2003

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

MOREIRA, F. M. de S.; et al.; Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**. 2010

NOLLA, Antonio; ANGHINONI, Ibanor. Atividade e especiação química na solução afetadas pela adição de fósforo em latossolo sob plantio direto em diferentes condições de acidez. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Porto Alegre, v. 30, n. 6, p.955-963, 2006.

ODUM E. The strategy of ecosystem development. **Science**. 1969.

OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, New York, v.135, n.4, p.723-737, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M. DE et al. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56, 2014.

PERSSON, H. The distribution and productivity of fine roots in boreal forest. **Plant Soil**, v. 71, p. 87-101, 1983.

QUADROS, P. D. ; ZHALNINA, K. DAVIS-RICHARDSON, A. The Effect of Tillage System and Crop Rotation on Soil Microbial Diversity and Composition in a Subtropical Acrisol. **Diversity**, v. 4, n. 4, p.375-395, 2012.

R Core Team (2015). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAIJ, B. van; CAMARGO, P. A.; MASCARENHAS, H. A .A.; HIROCE, R.; FEITOSA, C. T.; NERY, C.; LAUN, C. R. P. Efeitos de níveis de calagem na produção de soja em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.1, p.28-31, 1977.

REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Ecologia, isolamento e identificação de bactérias diazotróficas. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. cap. 10. p. 257-279.

RIDLEY, A.M., WHITE, R.E., HELYER, K.R., MORRISON, G.R., HENG, L.K., FISHER, R. Nitrate leaching loss under annual and perennial pastures with and without lime on a duplex (texture contrast) soil in humid South-Eastern Australia. **European Journal of Soil Science**. 2001. 52, 237–252.

RUFINI, M. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Lavras, v. 46, n. 1, p.81-88, 2011



SÁ, J. C. M.; CERRI, C. C. ; DICK, W. A. ; LAL, R. . Plantio direto: recupera a matéria orgânica do solo e reduz a emissão de CO<sub>2</sub> para a atmosfera. **Revista Plantio Direto**, v. 51, p. 23-25, 2000

SALA, V. M. R. **Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo**. R. Bras. Ci. Solo, 29:345-352, 2005.

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.487-491, 1988.

SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D.; PENIDO, E.G.C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen fixing species from Brazilian soils and grass roots. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, p.451-456, 1984.

SILVA, E. E. da; AZEVEDO, P. H. S. de; DE-POLLI, H. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (BMS-C). Embrapa Agrobiologia - Comunicado Técnico, 2007. <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/625010>>. Acesso em 12 de dezembro de 2017

SILVA, M. A. G da; PORTO, S. M. A ; MANNIGEL, A. R. Manejo da adubação nitrogenada e influência no crescimento da aveia preta e na produtividade do milho em plantio direto. **Acta Scientiarum Agronomy**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.275-281, 2009. Universidade Estadual de Maringá.

SILVA, A. P.; BABUJIA, L. C.; FRANCHINI, J. C.; SOUZA, R. A.; HUNGRIA, M. Microbial biomass under various soil- and cropmanagement systems in short and long-term experiments in Brazil. *Field Crops Research*, v. 119, n. 1, p. 20-26, 2010.

SILVEIRA, E. L. **Identificação de comunidades bacterianas de solo por seqüenciamento do gene 16S rRNA**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia.

Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias E Veterinárias. Jaboticabal/SP. 2004.

SHARMA, A.D.; SHARMA, H.; LIGHTFOOT, D.A. The genetic control of tolerance to aluminum toxicity in the ‘Essex’ by ‘Forrest’ recombinant inbred line population. **Theoretical and Applied Genetics**, v.122, p.687–694, 2011.

SIQUEIRA, J. O. & FRANCO, A. A. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Brasília: **Ministério da Educação**, Lavras.1988. 236p.

STEFANOWICZ, A.M.. The biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. **Polish Journal of Environment Study**. 2006.p 669–676.

SUMNER, M.E., NOBLE, A.D. Soil acidification: the world story. In: Rengel, Z. (Ed.), **Handbook of Soil Acidity**. Dekker, New York, 2003. pp. 1–28.

TANG, C., RAPHAEL, C., RENGEL, Z., BOWDEN, J.W. Understanding subsoil acidification: effect of nitrogen transformation and nitrate leaching. **Australian Journal Soil Research**. 2000.

TARRAND, J.J., KRIEG, N.R., DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology**, 1978.

TEIXEIRA, I.R. Variação dos valores de pH e dos teores de carbono orgânico, cobre, manganês, zinco e ferro em profundidade em Argissolo Vermelho-Amarelo, sob diferentes sistemas de preparo de solo. **Bragantia**, v. 62, n. 1, p.119-126, 2003

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, New York, v. 5, p. 240-245, 2002.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C. & JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**. 1987

Wang, Y.; Tu, C.; Cheng, L.; Li, C.; Gentry, L.F.; Hoyt, G.D.; Zhang, X.; Hu, S. Long-term impact of farming practices on soil organic carbon and nitrogen pools and microbial biomass and activity. **Soil. Till. Res.** 2011, 117, 8–16.

XUE, Dong; YAO, Huai-ying; GE, De-yong. Soil Microbial Community Structure in Diverse Land Use Systems: A Comparative Study Using Biolog, DGGE, and PLFA Analyses. **Pedosphere**, v. 18, n. 5