

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS**

Diana Marcela Morales Londoño

**RESPOSTAS DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO A  
SUCESSIVAS APLICAÇÕES DE URÉIA E DEJETOS SUÍNOS EM  
SOLO SOB PLANTIO DIRETO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Agroecossistemas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto  
Fonsêca Sousa Soares

Florianópolis  
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

M828r Morales Londoño, Diana Marcela

Respostas da comunidade microbiana do solo a sucessivas aplicações de uréia e dejetos suínos em solo sob plantio direto [dissertação] / Diana Marcela Morales Londoño ; orientador, Paulo Emilio Lovato. - Florianópolis, SC, 2012. 65 p.: grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

Inclui referências

1. Agricultura. 2. Agroecossistemas. 3. Plantio direto. 4. Biomassa. 5. Suíno - Esterco. I. Lovato, Paulo Emilio. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. III. Título.

CDU 631

**DIANA MARCELA MORALES LONDOÑO**

**RESPOSTAS DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO A  
SUCESSIVAS APLICAÇÕES DE URÉIA E DEJETOS SUÍNOS EM  
SOLO SOB PLANTIO DIRETO**

Dissertação aprovada em 27 de fevereiro de 2012, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em  
Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de  
Santa Catarina.

Prof. Dr. Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho  
Coordenador do PGA

Orientador: Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato  
(Universidade Federal Santa Catarina)

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Cláudio Roberto F. S. Soares  
Presidente da Banca

Dr. Sandro José Giacomini  
Membro externo (UFSC)

Prof. Dr. Gustavo Brunetto  
Membro (UFSC)

Prof. Dr. Admir José Giachini  
Membro (UFSC)

Florianópolis, 24 de Fevereiro de 2012.



## **Agradecimentos**

À Universidade Federal Santa Catarina e ao programa de Pós-graduação em Agroecossistemas pelo espaço de formação.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo para o mestrado.

Ao professor Jucinei Jose Comin e ao laboratório de Aguas, solos e tecidos vegetais pelo apoio financeiro.

Aos professores Paulo Emílio Lovato e Cláudio Roberto F. S. Soares pela orientação e pelo apoio.

A Chico, o técnico do laboratório, e às bolsistas, especialmente a Michele, Bruna, Barbara, Clara e Patrícia pela colaboração na realização das análises.

Aos amigos, e à família pela alegria, a paciência e os bons momentos!



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de aplicações sucessivas de dejetos suínos sobre a atividade microbiana do solo. O experimento foi conduzido em Argissolo Vermelho Amarelo, o desenho experimental foi o de blocos inteiramente casualizados, com três repetições. Os tratamentos consistiram da aplicação de uréia (U), dejetos suínos líquidos (DL) e cama sobreposta (CS), houve também uma testemunha (T) sem adubação. Todos os tratamentos foram aplicados em duas doses: 120 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (dose 1) e 240 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (dose 2) para os DL e a U; 90 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (dose 1) e 180 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (dose 2) para a CS. Avaliou-se o carbono da biomassa microbiana (CBM), a respiração basal (RB), o quociente metabólico ( $qCO_2$ ), a atividade enzimática ( $\beta$ -glucosidase, fosfatase, arilsulfatase e DAF), o pH, os teores de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) e a fração biodisponível de Cu e Zn no solo. A aplicação de U provocou a diminuição do CBM e da RB. De forma contrária, os solos adubados com CS apresentaram aumentos em essas variáveis, além de promover o acúmulo de COT e NT, enquanto os DL não provocaram mudanças em nenhuma dessas variáveis. Houve acúmulo de Cu e Zn nos solos adubados com CS e DL; porém, a nove anos de adubação, não há efeitos desses elementos, sobre a atividade dos microrganismos do solo.

**Palavras-chave:** dejetos suínos, biomassa microbiana, respiração basal, quociente metabólico.

## ABSTRACT

This study evaluated the effect of successive applications of pig manure on the microbial soil activity. The experiment was conducted in Hapludalf. The experimental design was a randomized complete block design with three replications. The treatments consisted of the application of urea (U), pig slurry (PS) and deep litter (DL), and a control without fertilization. All treatments were applied in two doses: 120 kg N ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> (dose 1) and 240 kg N ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> (dose 2) for PS and U; 90 kg N ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> (dose 1) and 180 kg N ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> (dose 2) for DL. This research evaluated the microbial biomass carbon (MBC), basal respiration (BR), the metabolic quotient ( $q\text{CO}_2$ ) and the enzymatic activity ( $\beta$ -glucosidase, phosphatase, arylsulphatase and FDA), the pH, total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN) and bio-available fraction of Cu and Zn in the soil. The applications of U decreased the MBC and BR. So contrary, soils fertilized with DL showed increases in these variables and promote the accumulation of TOC and TN, while PS did not cause changes in any variable. There was accumulation of Cu and Zn in soils fertilized with DL and PS, but nine years of fertilization showed no effects of these elements on the microbial soil activity.

**Key words:** pig slurry, microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- (A) Carbono da biomassa microbiana (CBM) em solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, sem adubação (T) e adubado com ureia (U), dejetos líquidos (DL) e cama sobreposta (CS) em duas doses de nitrogênio. (B) Valores médios do CBM em diferentes épocas de coleta. .... 23
- Figura 2 - Respiração basal microbiana no período de Out/10 a Out/2011, em solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, sem adubação (T) e adubado com ureia (U), dejetos líquidos (DL) e cama sobreposta (CS) em duas doses de nitrogênio. .... 25
- Figura 3 - Atividade enzimática da B-glucosidase, fosfatase, arilsulfatase e DAF em três épocas de coleta. .... 27
- Figura 4 - Médias mensais de temperatura do ar e de precipitação registrados na estação meteorológica mais próxima ao município de Braço do Norte (Estação Urussanga)..... 41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Percentagem de matéria orgânica, teores de N, P e K nos dejetos líquidos (DL) e na cama sobreposta (CS), quantidade de DL e CS, N, P e K aplicados cada ano e total acumulado durante os nove anos de duração do experimento..... 17
- Tabela 2 - . Teor total de Cu e Zn na camada de 0-15 cm na área experimental no ano de 2008..... 18
- Tabela 3 - Carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (NT) e pH do solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, sem adubação (testemunha) e adubado com uréia, dejetos líquidos suínos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio. .... 21
- Tabela 4 - Comparação de médias iniciais e atuais (2002 -2011) de carbono orgânico total do solo (COT). .... 22
- Tabela 5 - Quociente metabólico ( $qCO_2$ ) de solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, sem adubação (testemunha) e com adubações sucessivas de uréia, dejetos líquidos suínos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio. .... 26
- Tabela 6 - Teores de Cu (extrator HCl) de solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, submetido a sucessivas adubações com uréia, dejetos líquidos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio. .... 29
- Tabela 7 - Teores de Cu (extrator EDTA) de solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, submetido a sucessivas adubações com uréia, dejetos líquidos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio. .... 30
- Tabela 8 - Teores de Zn (extrator HCl) de solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, submetido a sucessivas adubações com uréia, dejetos líquidos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio. .... 31
- Tabela 9 - Teores de Zn (extrator EDTA) de solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, submetido a sucessivas adubações com uréia, dejetos líquidos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio. .... 32

Tabela 10 - Correlação de Pearson entre os atributos químicos e biológicos do solo em experimento de nove anos, com aplicação de duas doses de uréia e dejetos suínos em forma líquida e em cama sobreposta... 34

## Conteúdo

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1	OS DEJETOS SUÍNOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	5
2.2	IMPACTOS AMBIENTAIS DECORRENTES DO USO DE DEJETOS SUÍNOS. 7	
2.3	COMPORTAMENTO DO CU E O ZN NO SOLO .....	8
2.4	A MICROBIOTA E AS TRANSFORMAÇÕES DO SOLO NOS AGROECOSISTEMAS .....	10
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1	DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO.....	15
3.2	COLETA E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS DE SOLO.....	18
3.3	ANÁLISES QUÍMICAS DO SOLO.....	18
3.4	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS .....	19
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	20
4	RESULTADOS .....	21
4.1	PH, CARBONO ORGÂNICO E NITROGÊNIO TOTAL.....	21
4.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS MICRORGANISMOS DO SOLO.....	22
4.3	TEORES DE CU E ZN NO SOLO .....	28
4.4	CORRELAÇÕES ENTRE ATRIBUTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO SOLO.....	33
5	DISCUSSÃO .....	35
5.1	PH, CARBONO ORGÂNICO E NITROGÊNIO TOTAL.....	35
5.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	37
5.3	TEORES DE COBRE E ZINCO.....	44
5.4	CORRELAÇÕES ENTRE ATRIBUTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO SOLO.....	46
6	CONCLUSÕES .....	47
7	REFERÊNCIAS .....	48
8	Anexo 1 .....	60

Métodos utilizados para avaliação da atividade microbiana do solo... 60



## 1 INTRODUÇÃO

A produção global de carne suína está incrementando rapidamente, com um crescimento anual de 2,6 % constituindo-se como uma das atividades econômicas que ainda encontra-se em expansão principalmente nos países subtropicais. O Brasil é o quarto país produtor de carne suína no ranking mundial, com um rebanho de 35 milhões de cabeças, das quais 7,8 milhões estão alojadas no estado de Santa Catarina (IBGE, 2009). A base da expansão da suinocultura no mundo é a produção confinada na qual, grandes quantidades de dejetos são geradas diariamente em áreas relativamente pequenas, convertendo-se em um problema ambiental (ZHANG, et al., 2011).

O uso de dejetos suínos como fertilizante orgânico é aceito como um método que promove a reciclagem de nutrientes, melhora a estrutura e aumenta a fertilidade do solo (PLAZA, et al., 2002), porém, o manejo inadequado desses resíduos pode causar eutrofização das águas, devido ao escoamento das formas lábeis de nitrogênio (N) e fósforo (P), que são incorporados ao solo mediante a aplicação dos dejetos (WAGNER, e WOLF, 1999). Por outro lado, existe uma crescente preocupação por outros elementos contidos nos esterco dos animais, entre os quais se destacam os elementos-traço como Cu e Zn, que embora sejam micronutrientes essenciais para o desenvolvimento de plantas e animais, podem atingir níveis tóxicos, chegando a ser perigosos para a saúde humana (KABATA-PENDIAS, 2011). O Cu e o Zn são fornecidos aos suínos como promotores de crescimento; porém, em razão de serem pouco assimiláveis, uma alta proporção do fornecido, fica nas excretas do animal, podendo acarretar em acúmulo desses elementos no solo (DOURMAD e JONDREVILLE, 2007).

A identificação dos efeitos ecotoxicológicos baseada na concentração total dos elementos traço leva a superestimações, dado que a toxidez é causada somente pelas frações biodisponíveis desses elementos no solo (BHATTACHARYYA et al., 2008). Existem procedimentos de extração de elementos traço que avaliam aquelas frações, dentre as mais usadas, estão as que utilizam como solução extratora agentes complexantes, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e o ácido dietileno triamino penta-acético (DTPA), ou ácidos fortes em baixas concentrações como o ácido clorídrico (HCl) e a solução Mehlich I, composta de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl + 0,0125 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (AMARAL SOBRINHO et al., 2009).

O Cu e o Zn causam danos na membrana celular e inibem a atividade enzimática dos microrganismos, uma vez que reagem com moléculas no sítio ativo das enzimas, impedem o envelhecimento das proteínas ou reagem com o complexo enzima substrato impedindo a reação enzimática (HARRISON et al., 2007), sendo que o acúmulo de Cu e Zn decorrente da aplicação de dejetos suínos pode estar causando efeitos negativos sobre a comunidade microbiana do solo.

Os processos desempenhados pelos organismos edáficos são importantes para o funcionamento dos ecossistemas, já que é no solo aonde ocorrem as principais transformações da matéria orgânica e a ciclagem dos nutrientes. As características biológicas do solo podem indicar os efeitos positivos ou negativos das diferentes práticas agrícolas devido a que são mais dinâmicas e sensíveis que os parâmetros físicos e químicos do solo. Essas características apresentam rápida resposta às mudanças no ambiente e refletem a influência conjunta dos fatores que regulam a degradação da matéria orgânica e a transformação dos nutrientes (BROOKES, 1995).

As situações de estresse desencadeiam respostas fisiológicas dos microrganismos que se refletem no desempenho da comunidade microbiana do solo, por exemplo, na velocidade de crescimento ou a eficiência no uso dos recursos. Esses efeitos fisiológicos podem ser avaliados por meio de variáveis como a biomassa microbiana, a respiração basal, o quociente metabólico e a atividade enzimática, uma vez que elas refletem processos metabólicos envolvidos no crescimento e na reprodução desses organismos (ANDERSON, DOMSCH, 2010).

A biomassa microbiana é a massa total de microrganismos em um determinado volume de solo, está conformada principalmente por fungos e bactérias que são os responsáveis por quase toda a atividade biológica nesse ambiente. Mudanças na biomassa microbiana observam-se em escala de dias, enquanto mudanças na matéria orgânica do solo podem demorar décadas para acontecer (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; SILVA e MENDONÇA, 2007). Devido a esse fato, a biomassa microbiana é amplamente utilizada para avaliar o impacto de diferentes fontes de estresse sobre os microrganismos; no entanto, pelo caráter amplo do tipo de informação que aporta, aconselha-se a avaliação de outras variáveis que auxiliem a interpretação do estatus metabólico dos microrganismos do solo.

Por outro lado, a respiração basal dos microrganismos, medida pela quantidade de CO<sub>2</sub> produzido pela biomassa microbiana, sem adição de substrato, é um indicador da atividade biológica amplamente utilizado, uma vez que reflete os processos de catabolismo dos organismos aeróbios e por tanto a decomposição da matéria orgânica e a disponibilização e imobilização dos nutrientes no solo (PARKIN et al., 1996). Geralmente,



considera-se que altos valores de respiração basal indicam uma maior atividade metabólica dos microrganismos uma vez que o fluxo de  $\text{CO}_2$  correlaciona-se com a intensidade dos processos catabólicos; porém valores altos de respiração basal dos microrganismos também podem indicar a perda de matéria orgânica do solo, principalmente em situações onde o balanço de C é negativo (PARKIN et al., 1996)

A razão entre a biomassa microbiana e a respiração basal é denominada como quociente metabólico ou razão de respiração específica e é um índice utilizado para avaliar a eficiência dos microrganismos na conversão dos substratos a biomassa microbiana, valores altos de  $q\text{CO}_2$  significam menor eficiência no crescimento da comunidade microbiana uma vez que o C perdido na forma de  $\text{CO}_2$  não é fixado em novos tecidos celulares, o contrário ocorre com os valores baixos, para os quais a interpretação proposta implica um maior aproveitamento na conversão dos substratos em massa celular (ANDERSON e DOMSCH, 1985).

As enzimas são proteínas que cumprem funções catalíticas nos seres vivos. No solo participam da ciclagem dos nutrientes e são sintetizadas principalmente pelos microrganismos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A atividade enzimática dos microrganismos do solo é responsiva a mudanças no sistema de manejo do solo incluindo os efeitos produzidos pelo manejo dos resíduos de colheita, aplicação de fertilizantes, compactação do solo, preparo (aração e gradagem) e rotação de culturas, pelo qual se considera que a avaliação da atividade enzimática pode refletir os efeitos positivos e negativos que essas práticas causam sobre o solo (DICK, 1997). Poucos estudos avaliaram a atividade enzimática dos microrganismos do solo sob aplicações de dejetos suínos, pelo que ainda precisa-se de maior volume de informação para tentar deduzir os padrões de comportamento na resposta enzimática a adição de dejetos suínos (ver: BALOTA, et al., 2011, LALANDE et al., 2000; PLAZA et al., 2004). Porém, duas conclusões podem ser feitas a partir dos estudos disponíveis: a primeira é que a atividade enzimática parece aumentar com a aplicação dos dejetos suínos, no entanto, a doses elevadas tende a decrescer; a segunda é que todos os autores relataram a diminuição na atividade da fosfatase nos solos adubados com os dejetos. Ao parecer esse fato está relacionado com a inibição daquela enzima pelos altos teores de fósforo inorgânico presentes nos dejetos líquidos.

Diversos estudos têm demonstrado incrementos na biomassa e na atividade microbiana em solos adubados com dejetos suínos (GUERRERO et al., 2007; LALANDE et al., 2000; PLAZA, et al., 2004; PLAZA, et al., 2007); porém, alguns avaliaram periodicamente a resposta em curto prazo de uma única aplicação, enquanto outros fizeram uma única avaliação dos

efeitos, em longo prazo, depois de vários anos de aplicações sucessivas. Em contraste, o presente trabalho pretendeu avaliar as mudanças na resposta dos microrganismos durante um ano de aplicações, o que é importante para entender o impacto ambiental dessa prática, bem como para aprofundar o conhecimento sobre as respostas da microbiota do solo à aplicação de substratos com diferentes características de degradação.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta dos microrganismos do solo a sucessivas aplicações de uréia e dejetos suínos em solo sob plantio direto.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A produção global de carne suína está incrementando rapidamente, com um crescimento anual de 2,6%. A China é o maior produtor e consumidor de suínos no mundo aonde, no ano de 2009, o inventário de animais chegou aos 463 milhões de suínos, quadruplicando a quantidade da União Europeia e produzindo sete vezes mais que os Estados Unidos. O Brasil é o quarto produtor mundial de suínos, com um rebanho de 35 milhões de cabeças (ZHANG, et al., 2011).

No estado de Santa Catarina a suinocultura é a segunda atividade de maior importância econômica, com uma produção de 7,8 milhões de cabeças, constituindo-se como o maior produtor de carne suína do Brasil (IBGE, 2009). A região Oeste, que representa trinta por cento da área total deste estado, concentra oitenta por cento do plantel de suínos, seguida pela região Sul, na qual se observam densidades médias municipais de até sete suínos por hectare (CEPA, 2005).

A base da expansão da suinocultura no mundo é a produção confinada que tende a diminuir o número de produtores em razão da exigência de maiores investimentos e especialização (HADLICH e SCHEIBE, 2007). De fato, o crescimento dessa atividade concentra-se nas granjas com maior número de animais, por exemplo, 90% da produção do estado em 2009, concentrava-se em nove por cento dos suinocultores (IBGE, 2009). Essa concentração espacial tem implicações de caráter ambiental por causa das grandes quantidades de dejetos geradas diariamente nas unidades produtivas, ao que se soma o mau manejo dos mesmos que pode torná-los material poluente da atmosfera, da água e do solo. Nas áreas de produção de suínos, os altos níveis de aplicação dos dejetos provocam um desbalanço entre a entrada e a saída dos nutrientes do sistema solo- planta, levando o solo a seu limite de retenção e ultrapassando as necessidades nutricionais das culturas, chegando a converter-se em potenciais poluentes (GATIBONI et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

### 2.1 Os dejetos suínos: características gerais

A utilização dos dejetos na fertilização de culturas é uma prática amplamente difundida, já que contêm matéria orgânica e nutrientes como

nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio que são aproveitáveis pelas plantas. Estima-se que 50 a 60% do N contido nos dejetos encontra-se na forma mineral, solúvel e, portanto, prontamente disponível, enquanto o fósforo apresenta-se principalmente em formas orgânicas (SCHERER, et al. 1996; EGHBALL, et al. 2002). Os dejetos de animais, quando aplicados ao solo, podem ajudar na estabilização dos agregados, melhorar a estrutura, prevenir a erosão e melhorar a retenção de água. A aplicação de dejetos suínos induz mudanças nas características físicas, químicas e biológicas do solo. Solos adubados com dejetos suínos tendem a aumentar o pH e a CTC, além disso, experimentam reduções nos teores de oxigênio, criando microssítios de anaerobiose, que favorecem processos de desnitrificação, também tendem a formar crostas superficiais e a sofrer o selamento dos microporos (PLAZA, et al., 2002).

A composição química dos dejetos varia segundo a idade dos animais, as condições de armazenamento, as características climáticas e a forma na qual são aplicados ao solo. Também está determinada pela formulação nutricional das rações que são ricas em nitrogênio, fósforo e potássio e elevadas em micronutrientes como zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn). Estima-se que 92 a 96% do zinco, 72 a 80% do Cu e 60 a 70% do N ingerido pelos animais sejam excretados em suas fezes e urina (OLIVEIRA. 2000)

O sistema de criação também influencia as características dos dejetos suínos, por exemplo, o sistema de criação em piso, seja ripado ou de cimento, preconiza o uso da água como veículo para conduzir as fezes, urina, sobras de alimento e poeira que ficam no chão, até esterqueiras ou lagoas onde esse material fica armazenado, razão pela qual apresenta um baixo teor de matéria seca. Na região Oeste de Santa Catarina, amostras coletadas em esterqueiras, apresentaram grande variação no teor de nutrientes, alguns deles tão diluídos, que se encontravam em quantidades abaixo das desejadas para seu uso como fertilizante (SCHERER, 2000). Isso faz com que os volumes produzidos geralmente excedam a capacidade de armazenamento e, pela sua natureza líquida, há grandes dificuldades para transportar e distribuir os dejetos a outras regiões de produção agrícola, nas quais esse material possa ser usado para adubação (BARTELS, 2001; HADLICH e SCHEIBE, 2007). Nas esterqueiras, segundo a instrução normativa (IN11) da Fundação do Meio Ambiente. SC (FATMA), os dejetos deveriam permanecer de 120 a 180 dias, com o objetivo de garantir a transformação dos compostos nitrogenados, a adsorção do fósforo e a diminuição da carga de microrganismos patogênicos, mediante processos de fermentação (FATMA, 2006). Tal normativa geralmente não é cumprida porque as esterqueiras não são

suficientemente grandes para garantir esse tempo de retenção.

Já no sistema de cama sobreposta, os animais são criados sobre uma cama de, pelo menos, cinquenta centímetros de espessura que pode ser feita com maravalha, casca de arroz, serragem ou sabugo de milho triturado. Neste sistema os dejetos ficam sobre a cama e vão se decompondo por vias aeróbias, pelo revolvimento que os próprios suínos fazem do material quando se movimentam pelo galpão (BARTELS, 2001). Esse sistema de criação minimiza o gasto de água e facilita o manejo dos dejetos, uma vez que aumenta o conteúdo de matéria seca do produto final e o processo de decomposição diminui seu volume (AMARAL, et al., 2002). Entretanto, alguns fatores impedem a maior difusão do sistema de cama sobreposta, principalmente o menor desempenho dos animais na estação quente. Isso ocorre porque o processo de decomposição aeróbia da cama libera calor, elevando a temperatura do local e desencadeando respostas de estresse térmico nos suínos (AMARAL, et al., 2002; HIGARASHI, et al. 2006).

Além de ter diferenças no teor de matéria seca dos dejetos, o sistema de manejo também influencia o tipo de microrganismos presentes nos dejetos uma vez que estes passam por processos de decomposição diferentes, antes de serem aplicados ao solo. Em razão de serem ricos em nutrientes os dejetos suínos são substratos altamente colonizados por microrganismos. Estudos das populações de microrganismos cultiváveis no dejetos líquido mostraram comunidades tipicamente compostas por anaeróbios facultativos e obrigatórios, dominadas por grupos de bactérias fermentativas dentre as quais se contavam os gêneros *Eubacterium*, *Clostridium* e *Lactobacillus* e grupos de enterobactérias patogênicas como *Salmonella* e *Escherichia coli*. (HARRIS et al., 2011). Por outro lado, dado que a decomposição da cama sobreposta é principalmente aeróbica e que no momento da aplicação ao solo, esse material está parcialmente humificado, devem ser os fungos os microrganismos dominantes. De fato, estudos avaliando as populações de microrganismos presentes no composto de dejetos suínos apresentam aqueles microrganismos como o grupo dominante na fase de maturação do composto (TIQUIA, 2002).

## **2.2 Impactos ambientais decorrentes do uso de dejetos suínos**

Existe uma preocupação generalizada pelas quantidades de nitrogênio e fósforo originadas nos dejetos suínos que estão causando impactos ambientais, principalmente pela eutrofização das fontes de água (WAGNER e WOLF, 1999). A aplicação de grandes quantidades de dejetos

suínos ao solo, como a observada nas áreas de produção em confinamento, podem gerar excessos de nitratos, salinização, presença de compostos xenobióticos (como agrotóxicos e produtos farmacêuticos), patógenos e emissões de gás efeito estufa (PLAZA et al, 2004). Por exemplo, na região sul de Santa Catarina, a suinocultura está catalogada como uma das principais fontes de poluição na bacia hidrográfica do rio Tubarão, onde estudos demonstraram que rios desta bacia estavam fora dos padrões de qualidade para consumo humano, desde sua nascente, comprometendo seu uso para consumo, irrigação, aquicultura e pesca (HADLICH e SCHEIBE, 2007).

Além disso, há uma crescente preocupação diante da possibilidade de contaminação do solo e da água por causa de outros elementos contidos nos esterco dos animais, entre os quais se destacam os elementos traço como Cu, Zn e Mn. Muito embora sejam micronutrientes essenciais aos organismos vivos, em quantidades elevadas eles apresentam potencial de toxicidade (MEURER, et al. 2000).

### **2.3 Comportamento do Cu e o Zn no solo**

No solo, os elementos traço estão associados a diferentes componentes orgânicos e inorgânicos. O seu comportamento é controlado por reações físico-químicas tais como precipitação e dissolução de solutos, adsorção e dessorção das partículas do solo e oxirredução (KABATA-PENDIAS, 2011). A força de ligação dos elementos traço aos componentes do solo depende do tipo e do teor do elemento, da quantidade de aluminossilicatos e de óxidos de ferro, alumínio e manganês presentes na fração argilosa. A matéria orgânica pode reduzir a disponibilidade dos elementos traço pela formação de complexos insolúveis, ou pode torná-los mais biodisponíveis, devido à formação de quelatos solúveis (AMARAL SOBRINHO et al., 2009). O pH do solo e o tempo de contato do elemento traço com sítios de ligação também são fatores que vão influenciar na capacidade do solo para reter esses elementos. No caso do Cu, por exemplo, a biodisponibilidade parece estar mais influenciada pelos teores de matéria orgânica do solo, dado que esse elemento apresenta uma alta afinidade para formar ligações com os colóides orgânicos do solo (KABATA-PENDIAS, 2011). Por outro lado, o fator mais importante na regulação da disponibilidade do Zn, parece ser o pH, sendo que, na medida em que o pH aumenta, o Zn torna-se menos disponível. Isso ocorre porque os aumentos no pH elevam a quantidade de cargas negativas do solo, e portanto, a

capacidade de adsorção de cátions como o Zn.

O Cu e o Zn estão presentes em toda a pedosfera, em concentrações naturais que dependem do tipo de rocha matriz e dos processos de intemperização. Quando são adicionados ao solo mediante práticas como adubação com dejetos suínos, esses elementos são rapidamente retidos, mas logo depois se redistribuem no solo mediante reações de menor velocidade (HAN, et al. 2001; GIROTTO, 2010). Contudo, há uma tendência geral a se acumularem pela sua alta reatividade com a matéria orgânica e com os argilo-minerais. Assim, do teor total de elementos traço no solo, somente as formas solúveis, trocáveis e fracamente adsorvidas compõem a fração biodisponível, aquela prontamente aproveitável pelas plantas e microrganismos. Existem procedimentos de extração de elementos traço contidos em solos que buscam avaliar as frações disponíveis aos organismos vivos. Dentre os extratores mais usados com esse objetivo estão agentes complexantes, como o EDTA e DTPA e ácidos fortes em baixas concentrações como HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> ou a solução Mehlich I, composta de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl + 0,0125 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (AMARAL SOBRINHO et al., 2009).

Os elementos traço podem causar dano celular aos microrganismos do solo. Esses elementos podem ligar-se às proteínas substituindo o lugar de outros íons inorgânicos, modificando a estrutura proteica e alterando sua função biológica. Por outro lado, eles podem reagir com os grupos tíois e dissulfetos presentes em algumas moléculas orgânicas, principalmente proteínas, alterando ou às vezes até inibindo sua função biológica. O grupo dos tíois está frequentemente envolvido na ligação de proteínas carreadoras ao substrato e, ao ocorrer a ligação com os elementos traço, sua função transportadora pode ser danificada. A destruição de certos grupos tiol também pode afetar o enovelamento das enzimas, causando danos nos sítios de ligação dos cofatores, o que pode provocar a inativação enzimática. Outros elementos traço podem participar em certas reações catalíticas, conhecidas como reações tipo Fenton, que produzem espécies reativas de oxigênio, que colocam a célula em um estado de estresse oxidativo. Altos níveis de espécies reativas de oxigênio podem causar danos no ADN, nos lipídios e nas proteínas, através de uma variedade de rotas bioquímicas. Os elementos traço também podem alcançar o citossol, entrando na célula mediante ligação com moléculas carreadoras e, uma vez no interior celular, podem interferir com o metabolismo da cadeia transportadora de elétrons (HARRISON et al., 2007)

## **2.4 A microbiota e as transformações do solo nos agroecossistemas**

Os microrganismos do solo transformam a matéria orgânica, e, uma das consequências mais importantes dessa atividade é a ciclagem dos nutrientes. A abundância e diversidade da comunidade de microrganismos do solo é influenciada pela quantidade e qualidade da matéria orgânica e pelas condições físicas (textura, aeração e umidade) e químicas (pH, CTC, nutrientes, relação C/N) do solo (SILVA FILHO e SILVA, 2002). Nos agroecossistemas a estrutura biótica do solo está determinada pelo sistema de manejo, pelas espécies cultivadas e pelo regime de fertilização (STEINBERGER e SHORE, 2009). Assim, mudanças em qualquer uma dessas práticas, vão ocasionar diferentes respostas nos microrganismos do solo, possibilitando que a avaliação da microbiota aponte os impactos positivos ou negativos das práticas agropecuárias. As situações de estresse desencadeiam respostas fisiológicas dos microrganismos que se refletem no desempenho da comunidade microbiana do solo. As mudanças no solo, no nível de comunidade podem ser avaliadas por meio de variáveis como a biomassa microbiana, a respiração basal, o quociente metabólico e a atividade enzimática (STEINBERGER e SHORE, 2009; ANDERSON e DOMSCH, 2010).

### **2.4.1 A biomassa microbiana**

A biomassa microbiana, a massa total de microrganismos em um determinado volume de solo, é definida por alguns autores como o componente vivo da matéria orgânica e está constituída principalmente por fungos e bactérias. Essa biomassa é responsável por quase toda a atividade biológica no solo por ser a principal fonte de enzimas que catalisam as transformações bioquímicas que ali acontecem (MOREIRA e SIQUEIRA 2006). Mudanças da biomassa microbiana observam-se em escala de dias, enquanto mudanças na matéria orgânica do solo podem demorar décadas para acontecer (SILVA e MENDONÇA, 2007). Estudos avaliando a biomassa microbiana em solos adubados com dejetos suínos, mostraram incrementos no teor de carbono da biomassa microbiana em relação aos solos sem adubação (SAVIOZZI et al., 1997; PLAZA et al., 2004). Tais mudanças podem ser explicadas por vários fatores que ocorrem de maneira concomitante. Um deles pode ser a adição de microrganismos via dejetos que contribuem para o aumento do carbono da biomassa microbiana. Além disso, a adição de compostos lábeis, aqueles de baixo peso molecular e fácil transporte através da membrana celular, incrementam a quantidade de



recursos disponíveis ou parcialmente aproveitáveis pelos microrganismos, que podem aumentar em quantidade devido a condição favorável que o dejetos cria temporalmente. Entretanto, com o passar do tempo, esta fonte vai sendo esgotada, e a comunidade de microrganismos vai mudando, sendo selecionadas aquelas espécies capazes de decompor materiais mais complexos ou recalcitrantes (McGUIRE e TRESEDER, 2010).

#### **2.4.2 A respiração basal**

A respiração basal dos microrganismos, medida pelo  $\text{CO}_2$  produzido pela biomassa microbiana, é um indicador da atividade biológica amplamente utilizado, uma vez que reflete o processo de decomposição da matéria orgânica, e portanto a disponibilização e imobilização dos nutrientes do solo (PARKIN et al., 1996). A decomposição aeróbica dos resíduos orgânicos acontece em reações bioquímicas de oxirredução, mediante as quais os microrganismos obtêm energia utilizando parte do C do substrato nas reações catabólicas enquanto há liberação de  $\text{CO}_2$ . A evolução do  $\text{CO}_2$  como medição da respiração, representa então uma medida da decomposição total. Vários fatores como temperatura, umidade, profundidade do solo, aeração e tipo de populações microbianas determinam o fluxo de  $\text{CO}_2$ , e, portanto a atividade microbiana. Vários autores relataram o aumento do fluxo de  $\text{CO}_2$ , e da atividade microbiana, nos primeiros dias após a aplicação de dejetos suínos, ocorrendo decréscimos posteriores, tendendo a valores próximos dos registrados nos solos sem adubação (PLAZA et al., 2007; GUERRERO et al., 2007). Por outro lado, alguns autores encontraram aumentos na liberação de  $\text{CO}_2$  com o incremento nas doses de dejetos suínos, sendo que as maiores doses apresentaram valores superiores ao controle depois da estabilização, indicando efeitos residuais possivelmente ocasionados pelos dejetos. (VIEIRA et al., 2004).

Geralmente, considera-se que altos valores de respiração basal indicam uma maior atividade metabólica dos microrganismos uma vez que o fluxo de  $\text{CO}_2$  correlaciona-se com a intensidade dos processos catabólicos. Contudo, altos valores de respiração basal dos microrganismos também podem indicar a perda de matéria orgânica do solo, principalmente em situações em que as entradas de C ao solo (por resíduos de plantas ou outras fontes de matéria orgânica) sejam menores do que as saídas, representadas nos processos respiratórios de raízes, microrganismos e fauna do solo, o que constitui uma situação não desejável porque a decomposição

da matéria orgânica estável é desfavorável para vários processos como a agregação, a capacidade de troca de cátions e a retenção da água. Assim, a informação obtida por meio da medição da respiração basal deve ser interpretada junto a outros parâmetros que auxiliem o entendimento dos processos que acontecem no solo (PARKIN et al., 1996).

### 2.4.3 O quociente metabólico

O quociente metabólico ou relação específica de respiração ( $qCO_2$ ) é a razão entre a respiração e a biomassa microbiana. Foi proposto por Anderson e Domch (1990), como um índice para expressar a eficiência dos microrganismos na conversão de um substrato em tecido celular. Altos valores de  $qCO_2$  indicam menor eficiência no uso do C, ou seja, maiores perdas de  $CO_2$  e menor velocidade de crescimento das populações microbianas (ANDERSON e DOMCH, 1990; SPARLING, 1997; ANDERSON e DOMCH, 2010). O  $qCO_2$  é utilizado para avaliar efeitos ambientais sobre a microbiota do solo uma vez que condições de estresse causam decréscimos na eficiência com a que os microrganismos aproveitam os substratos (ISLAM e WEIL, 2000). No entanto, o  $qCO_2$  pode ser afetado por mudanças na estrutura das comunidades microbianas, por disponibilização e imobilização de substratos e por diferentes condições ambientais (SPARLING, 1997). Diferentes autores utilizaram este índice na avaliação dos efeitos que a adubação com materiais orgânicos tem sobre os microrganismos do solo, (LEITA et al., 1999; PLAZA, C. et al., 2004; ASSIS et al., 2007; PLAZA, CÉSAR et al., 2007; GE et al., 2009). No caso dos solos recebendo dejetos, os valores de  $qCO_2$  medidos por diferentes pesquisadores são contraditórios (ver por exemplo LEITA et al., 1999 e PLAZA et al., 2004) não permitindo encontrar padrões de comportamento e sugerindo que o sistema de manejo desses solos tem uma maior influência no  $qCO_2$  do que o regime de fertilização como fator isolado (ISLAM e WEIL, 2000).

### 2.4.4 A atividade enzimática

As enzimas são proteínas que cumprem funções catalíticas nos seres vivos. No ambiente do solo, participam da ciclagem dos nutrientes e são sintetizadas principalmente pelos microrganismos do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Do ponto de vista do lugar onde atuam, as enzimas são

classificadas em intracelulares e extracelulares; aquelas cumprem funções catalíticas no interior da célula, enquanto estas são excretadas à matriz do solo (LAAD, 1978). As enzimas extracelulares geralmente são hidrolases que degradam os compostos orgânicos em partículas de menor tamanho, que possam ser assimiláveis pela célula (ALLISON et al., 2011)

Algumas enzimas extracelulares podem ficar no ambiente do solo, e isto acontece principalmente por dois mecanismos: por adsorção às partículas de solo, como as argilas, que possuem cargas superficiais nas quais ficam aderidas por ligações iônicas; ou por copolimerização com substâncias orgânicas como as huminas, das quais ficam aderidas por ligações covalentes. Dessa maneira, na matriz do solo podem existir enzimas que conservam sua estrutura e função biológica, ainda ficando fora do controle celular e podendo agir no rompimento inicial de macromoléculas orgânicas (LAAD, 1978).

A produção de enzimas envolve “custos e benefícios” para os microrganismos que as produzem, que dependem das condições ambientais, do tipo de enzima e do substrato que metabolizam. O maior benefício para os microrganismos é a liberação de monômeros orgânicos ou nutrientes minerais que podem ser assimilados. Os custos incluem a energia metabólica para sua produção e excreção, uma vez que nesse processo é investido cerca de 15% do C e N catabolizados na célula (ALLISON et al., 2011). Esse alto custo energético faz com que a produção de enzimas extracelulares tenha implicações no nível do ecossistema, uma vez que ela só será incentivada em situações nas quais a quebra de substâncias complexas seja a única fonte de nutrientes. Esse padrão de comportamento sugere que a liberação de nutrientes a partir de fontes orgânicas complexas diminui na presença de nutrientes em formas mais simples (BURNS, 1978; ALLISON et al., 2011; ARNOSTI, 2003).

A atividade enzimática dos microrganismos mostrou ser sensível a mudanças no sistema de manejo do solo incluindo efeitos produzidos pelo manejo dos resíduos de colheita, aplicação de fertilizantes, compactação do solo, preparo (aração e gradagem) e rotação de culturas, e por isso considera-se que a atividade enzimática tem potencial informativo sobre os efeitos positivos e negativos que essas práticas têm sobre o solo (DICK et al., 1996).

Como as enzimas estão presentes no solo em baixas concentrações, sua quantificação é feita através da medição de sua atividade, que é avaliada a través da quebra de um substrato específico, em condições controladas de pH e temperatura (TABATABAI, 1994). No solo, as enzimas mais avaliadas, são aquelas envolvidas no ciclo do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, por serem estes os principais constituintes da matéria

orgânica. A  $\beta$ -Glucosidase é uma enzima envolvida no ciclo do carbono e atua na hidrólise da celobiose e de oligossacarídeos liberando glicose como produto final (DAS e VARMA, 2011). O grupo de enzimas que atua na mineralização do fósforo é denominado de fosfatases, e segundo o seu pH ótimo de ação, são classificadas em ácidas (pH 6,5) e alcalinas (pH 11). Estas enzimas são induzíveis, o que quer dizer que são sintetizadas em condições de baixa disponibilidade de fósforo inorgânico no solo (ALLISON et al., 2011). Por outro lado, as sulfatases atuam no ciclo do enxofre, e dentre elas a mais importante é a arilsulfatase que hidrolisa os sulfatos orgânicos em solos com baixa concentração de enxofre (DAS e VARMA, 2011). A hidrólise do diacetato de fluoresceína é usada para estimar a atividade enzimática total do solo, uma vez que essa substância é metabolizada por proteases, lipases e esterases do solo, todas elas, envolvidas na decomposição da matéria orgânica (SCHNURER e ROSSWALL, 1982).

Em estudo avaliando a atividade da arilsulfatase e da fosfatase em solos manejados sob plantio direto ou plantio convencional e recebendo dejetos líquidos de suínos, Balota (2011) observou maior atividade enzimática no solo de plantio direto, registrando um intervalo de valores entre 171 e 387  $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$  para atividade da fosfatase ácida, enquanto os valores para arilsulfatase variaram entre 14,9 e 33,4  $\mu\text{g}$  de PNP  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Poucos estudos avaliaram a atividade enzimática dos microrganismos do solo sob aplicações de dejetos suínos, por isso ainda é necessário um maior volume de informação para tentar deduzir os padrões de comportamento na resposta enzimática à adição deste material orgânico.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Descrição do experimento

A pesquisa foi conduzida em um experimento de longa duração, intitulado “*Desempenho da adubação com dejetos suínos na produtividade de milho e aveia preta sob plantio direto sem agrotóxicos e a qualidade do solo*” o qual foi implantado no ano de 2002, em uma propriedade suinícola no município de Braço do Norte, SC (28°14’20,7”S e 49°13’55,5”W a 300 m de altitude). O clima da região é classificado como subtropical úmido (Cfa). No período experimental (Outubro 2010-Outubro 2011) a temperatura média mensal oscilou entre 14 e 26 °C e a precipitação entre 2 e 18 mm, sendo que os meses mais chuvosos e quentes foram janeiro e fevereiro.

O solo da área experimental foi classificado como um Argissolo Vermelho Amarelo (EMBRAPA, 2006); com textura superficial arenosa. Antes da instalação do experimento, avaliaram-se os atributos físicos e químicos na camada de 0 a 10 cm, obtendo os seguintes resultados: areia 330 g kg<sup>-1</sup>; matéria orgânica 33 g kg<sup>-1</sup>; pH em água 5,1; acidez potencial 5,5 (pelo índice SMP); P disponível 19,3 mg dm<sup>-3</sup> (extraído por Mehlich-1); Al trocável 0,8 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup> (extraído por KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>); Ca trocável 3,1 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; (extraído por KCl 1 mol L<sup>-1</sup>) e Mg trocável 0,8 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup> (extraído por KCl 1 mol Kg<sup>-1</sup>). No ano de 2002 foi aplicado calcário dolomítico (PRNT 87,5%) na quantidade equivalente a 6,0 Mg ha<sup>-1</sup> de calcário PRNT 100% para elevar o valor de pH do solo até 6,0

A área experimental apresenta relevo com declividade de 20 cm m<sup>-1</sup>, contém 21 parcelas não irrigadas, de 27 m<sup>2</sup> cada uma, as quais foram submetidas à aplicação de dejetos suínos ou uréia para adubar uma sucessão de milho e aveia em sistema de plantio direto sem uso de herbicidas. Durante todos os anos, o milho foi plantado em outubro, colhido em março e, após a colheita, os resíduos vegetais foram deixados sobre o solo. A aveia foi plantada em maio e, antes da semeadura do milho, cortada e deixada sobre o solo.

O delineamento experimental consistiu-se de blocos completamente casualizados com três repetições. Os tratamentos foram: testemunha (T) sem adubação, cama sobreposta (CS), dejetos líquidos de suíno (DL) e

uréia (U). Todos os tratamentos foram aplicados em duas doses: 120 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (dose 1) e 240 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (dose 2) para os DL e a U; 90 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (dose 1) e 180 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (dose 2) para a CS; quantidades que correspondem à recomendação de N e ao seu dobro, para a sucessão milho-aveia e para a cultura de milho respectivamente. Aquelas quantidades foram aplicadas durante quase todos os anos, a exceção de 2002, 2003, e 2010, como mostrado na tabela 1.

Os DL são uma mistura de fezes, urina, água de lavagem das instalações e sobras de alimento. Os DL e a U foram aplicados na superfície das parcelas, sem incorporá-los ao solo, em quatro ocasiões durante cada ano, três durante o ciclo da cultura do milho (Nov, Dez, Jan) e uma durante o ciclo da aveia (Ago). A quantidade a ser aplicada foi definida pela estimativa de MS e da concentração de nutrientes A CS, constituída por maravalha, sobras de comida e dejetos suínos parcialmente decompostos, foi aplicada anualmente na superfície das parcelas, sem incorporá-la, antes da semeadura do milho, no mês de outubro. O cálculo da quantidade de CS aplicada foi realizado com base na mineralização de 50% do N amoniacal contido no resíduo.

Tabela 1 - Percentagem de matéria orgânica, teores de N, P e K nos dejetos líquidos (DL) e na cama sobreposta (CS), quantidade de DL e CS, N, P e K aplicados cada ano e total acumulado durante os nove anos de duração do experimento

Fonte	Ano	MS	Teor de nutrientes no dejetos			Quantidade aplicada	Quantidade de nutriente adicionada ao solo		
			N	P	K		N	P	K
		%	kg m <sup>-3</sup>			m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup>	kg ha <sup>-1</sup>		
DL 120	2002-2003	2,9	2,8	1,0	1,2	20,0	45	18	25
	2003-2004	3,0	2,8	1,0	1,3	24,4	55	23	30
	2004-2005	1,6	1,9	0,6	0,9	78,5	120	45	74
	2005-2006	2,5	2,5	0,9	1,2	59,5	120	48	68
	2006-2007	2,3	2,4	0,8	1,1	63,3	120	47	69
	2007-2008	2,1	2,2	0,8	1,1	67,0	119	46	70
	2008-2009	0,2	0,9	0,2	0,6	176,0	120	26	101
	2009-2010	3,3	3,0	1,1	1,3	49,5	120	50	65
	2010-2011	3,5	2,9	1,8	1,8	52,3	120	86	96
			Total			590,5	939	303	502
DL 240	2002-2011		Total			1181,0	1878	606	1003
		%	kg Mg <sup>-1</sup>			Mg ha <sup>-1</sup>	kg ha <sup>-1</sup>		
CS 90	2002-2003	69	2,6	2,0	2,6	13,0	140	141	232
	2003-2004	38	1,4	1,1	1,4	44,1	144	145	238
	2004-2005	44	1,6	1,2	1,6	20,9	90	91	149
	2005-2006	41	1,5	1,2	1,5	23,7	90	91	149
	2006-2007	39	1,5	1,1	1,5	25,6	90	88	145
	2007-2008	61	2,3	1,7	2,2	10,7	90	89	146
	2008-2009	70	2,6	2,0	2,6	8,1	89	89	148
	2009-2010	45	1,7	1,3	1,7	20,0	90	91	149
	2010-2011	50	1,3	1,1	2,0	36,6	120	145	372
			Total			202,7	943	970	1730
CS 180	2002-2011		Total			405,4	1886	1940	3460

Em 2008 foram calculados os teores de cobre e zinco no solo, segundo o método de extração apresentado por Tedesco et al (1995), obtendo os resultados relatados na tabela 2.

Tabela 2 - . Teor total de Cu e Zn na camada de 0-15 cm na área experimental no ano de 2008.

Tratamentos	Cu*	Zn*
	mg dm <sup>-3</sup>	
Testemunha	2,02	8,17
Uréia 120	1,25	7,16
Uréia 240	0,84	7,92
Dejeto líquido 120	4,12	13,54
Dejeto líquido 240	6,66	20,69
Cama sobreposta 90	15,82	30,19
Cama sobreposta 180	26,04	74,48

\* Dados tomados de Dortzbach, (2009).

### 3.2 Coleta e acondicionamento das amostras de solo

Amostras de solo foram coletadas a cada 60 dias no período compreendido entre outubro de 2010 e outubro de 2011, em um total de sete amostragens. As coletas foram realizadas antes da aplicação dos dejetos e cada amostra de solo foi composta de 15 subamostras tomadas ao acaso com trado calador na camada de 0 - 10 cm. As amostras foram embaladas em sacos plásticos e transportadas em recipientes com gelo. Parte das amostras foram secas ao ar e destinadas para a realização das análises químicas e a outra parte foi armazenada em sacos plásticos a 4 °C até a realização das análises microbiológicas.

### 3.3 Análises químicas do solo

Os teores de nitrogênio total do solo (NT) e carbono orgânico total (COT) foram determinados segundo metodologia proposta por Tedesco et al (1995), sendo estas realizadas somente para as coletas de out/10 e out/11. O pH em água do solo (água:solo 1:1) foi medido ao final do período experimental, segundo o método descrito por Tedesco et al (1995).

O Cu e o Zn foram extraídos com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (solução:solo 4:1) segundo o método de Tedesco et al (1995), e com EDTA 0,01 mol L<sup>-1</sup> (solução:solo 40:1) segundo o método proposto por Chaignon et al (2009).



Com cada um dos extratores, o solo foi agitado, (30 minutos no caso do HCl e 120 minutos no caso do EDTA). Depois foi centrifugado a 2600 rpm durante 5 minutos é deixado em repouso 24 horas. Uma alíquota do extrato foi lida em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer Analyst 300).

### 3.4 Análises microbiológicas e bioquímicas

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi determinado pelo método de fumigação – extração (VANCE et al., 1987), nos primeiros 15 dias após a amostragem. Antes das análises, o solo foi incubado à temperatura ambiente e com umidade em torno de 60% do volume total de poros. O carbono da biomassa microbiana das amostras fumigadas e não fumigadas foi determinado por oxidação de dicromato de potássio segundo o método de Vance et al (1987). Para determinar a respiração basal, três amostras de solo foram acondicionadas em recipientes com capacidade para 500 mL, hermeticamente fechados, contendo 20 mL de NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup>. Após um período de incubação de seis dias, o NaOH residual foi titulado com HCl 0,2 mol L<sup>-1</sup> (JENKINSON e POWLSON, 1976) sendo o resultado expresso em  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g solo seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . O quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) foi calculado pela razão entre a respiração basal e a biomassa microbiana sendo este expresso em  $\mu\text{g de C-CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ CBM h}^{-1}$ .

A atividade enzimática das enzimas  $\beta$ -Glucosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e a hidrólise do diacetato de fluoresceína foram medidas para as coletas de out/10, abr/11 e out/11, por meio da quantificação do *p*-nitrofenol liberado após a hidrólise do substrato correspondente. No caso da  $\beta$ -glucosidase, 1,0 grama de solo foi suspenso em *p*-nitrofenil  $\beta$ -D glicopiranosídeo em solução tampão universal modificada (MUB pH 6,0), com incubação a 37 °C durante uma hora, e em seguida a hidrólises foi inibida mediante a adição de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. A mistura foi filtrada e a absorbância do extrato foi medida a 410 nm. Para a fosfatase ácida, 1,0 grama de solo foi misturado com paranitrofenil fosfato em solução tampão universal modificada (MUB pH 6,5) e incubado a 37 °C durante uma hora, e a hidrólises foi inibida mediante adição de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,5 mol L<sup>-1</sup> e NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Essa mistura foi filtrada e a absorbância do extrato foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 410nm. Para a aril-sulfatase, 1,0 grama de solo foi misturado com paranitrofenil sulfato em solução tampão de acetato, com incubação a 37 °C durante uma hora. A reação de hidrólise foi interrompida pela adição de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> e NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>. A mistura foi filtrada e a absorbância do extrato foi

medida em espectrofotômetro a 410 nm (ALEFF e NANNIPIERI, 1995). A hidrólise do diacetato de fluoresceína foi calculada segundo Dick et al. (1996). Brevemente, 1 g de solo foi incubado a 37 °C em agitação, durante duas horas, com 12,5 mL de solução de diacetato de fluoresceína 4,8 mmol L<sup>-1</sup> e 32,5 mL de solução tampão de fosfato de sódio 60 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,6; depois do qual foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado e a absorbância do extrato foi medida a 490 nm. Os resultados foram expressados em mg Fluoresceína (F) g solo seco<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. No anexo 1 são apresentados os protocolos seguidos em cada um dos métodos relatados.

### **3.5 Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos a análise de variância com parcela subdividida, sendo que os tratamentos de adubação corresponderam a parcela principal e as diferentes épocas de coleta corresponderam as sub-parcelas. Quando os efeitos foram significativos, as médias foram separadas pelo teste Skott-Knott com um nível de significância de 5%. Para a análise de variância os dados do  $q\text{CO}_2$  foram transformados usando-se a raiz quadrada. Para os dados de pH usou-se a análise de variância e as médias foram separadas pelo teste de Skott-Knott com um nível de significância de 5%. Correlações de Pearson foram realizadas entre os dados químicos y biológicos. A média dos valores de COT para cada tratamento de adubação foi comparada com o valor medido no início do experimento utilizando o teste t de Student. As análises foram feitas com o auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2000).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 pH, carbono orgânico e nitrogênio total

O pH do solo foi menor nos tratamentos com U nas duas doses e com DL<sub>240</sub>, apresentando um valor médio de 4,9. Os solos recebendo DL<sub>120</sub>, CS nas duas doses e o solo sem adubação (T), apresentaram valores de pH semelhantes entre si, com um valor médio de 5,7 (Tabela 3)

O carbono orgânico total apresentou diferenças significativas entre os tipos de adubo, com o maior teor de carbono sendo observado no solo tratado com CS<sub>180</sub> (51,7 g C kg<sup>-1</sup> solo), seguido pelo solo tratado com CS<sub>90</sub> (44,2 g C kg<sup>-1</sup> solo), sendo estes 58 e 35% superiores a testemunha. Não houve efeito dos tratamentos DL e U sobre os teores de COT do solo, obtendo-se valores médios de 33g C kg<sup>-1</sup> solo. Os teores de N total seguiram o mesmo padrão de comportamento do COT, sendo mais altos nas parcelas com CS em relação a todos os demais tratamentos. Não houve efeito das épocas avaliadas sobre os teores de COT e NT, assim como também não houve interação dos fatores época de coleta e tratamento de adubação (Tabela 3).

Tabela 3 - Carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (NT) e pH do solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, sem adubação (testemunha) e adubado com uréia, dejetos líquidos suínos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio.

Tratamentos	COT    NT		pH
	g kg <sup>-1</sup>		
Testemunha	32,7 <sup>c</sup>	0,94 <sup>b</sup>	5,4 <sup>a</sup>
Uréia <sub>120</sub>	31,5 <sup>c</sup>	0,86 <sup>b</sup>	4,8 <sup>b</sup>
Uréia <sub>240</sub>	32,2 <sup>c</sup>	0,91 <sup>b</sup>	4,8 <sup>b</sup>
Dejetos líquidos <sub>120</sub>	33,1 <sup>c</sup>	1,00 <sup>b</sup>	5,6 <sup>a</sup>
Dejetos líquidos <sub>240</sub>	36,2 <sup>c</sup>	1,20 <sup>b</sup>	5,1 <sup>b</sup>
Cama sobreposta <sub>90</sub>	44,2 <sup>b</sup>	1,60 <sup>a</sup>	5,7 <sup>a</sup>
Cama sobreposta <sub>180</sub>	51,7 <sup>a</sup>	1,70 <sup>a</sup>	6,1 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente pelo teste Skott-Knott 5%.

Os tratamentos com DL<sub>240</sub> e com CS nas duas doses produziram incrementos de 10, 30 e 60% em relação ao teor de carbono orgânico total do solo no início do experimento (33 g kg solo<sup>-1</sup>) (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação de médias iniciais e atuais (2002 -2011) de carbono orgânico total do solo (COT).

Tratamentos	COT <sup>1</sup>	COT <sup>2</sup>	Valor t
	2002	2011	
g kg <sup>-1</sup>			
Testemunha	33	32,7	-1,27
Uréia <sub>120</sub>	33	31,5	-1,55
Uréia <sub>240</sub>	33	32,2	-0,75
Dejetos líquidos <sub>120</sub>	33	33,1	0,12
Dejetos líquidos <sub>240</sub>	33	36,2	5,69 *
Cama sobreposta <sub>90</sub>	33	44,2	3,61 *
Cama sobreposta <sub>180</sub>	33	51,7	4,52 *

1 Valor médio obtido no ano de 2002, antes da instalação do experimento.

2 Valor médio obtido no presente trabalho (n=6)

\*(p<0,05)

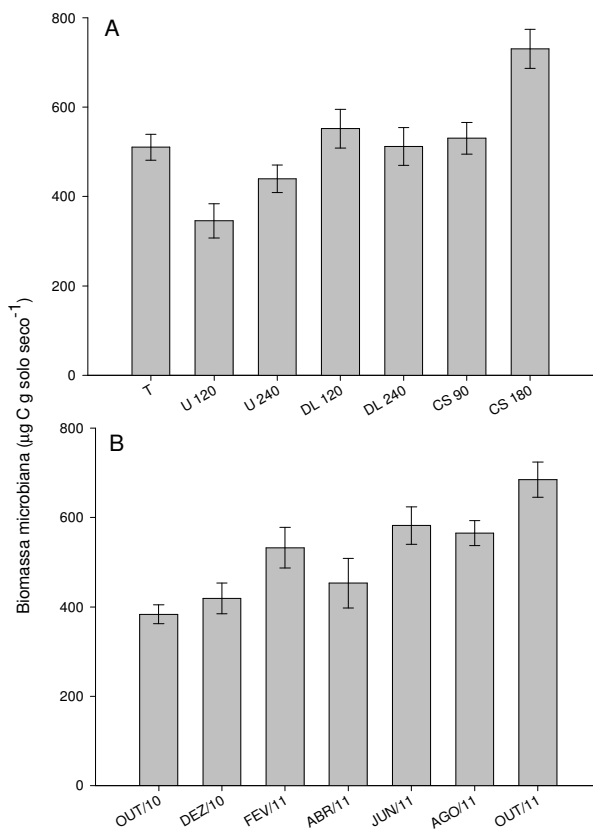
## 4.2 Atividade biológica dos microrganismos do solo

### 4.2.1 Biomassa microbiana

Os teores de carbono da biomassa microbiana (CBM) diferenciaram-se em resposta à adubação com os tipos de substratos e entre às épocas de coleta sem apresentar interação entre essas fontes de variação. Os solos adubados com CS<sub>180</sub> apresentaram os maiores teores de CBM (730 µg C g de solo seco<sup>-1</sup>) o que representou um acréscimo de 43% em relação ao solo sem adubação (T) (Figura 1A). Os solos tratados com DL nas duas doses, assim como aquele tratado com CS<sub>90</sub>, não apresentaram diferenças quando comparados com o solo sem adubação (T) e apresentaram valores oscilando entre 510 e 552 µg C g de solo seco<sup>-1</sup>. Os solos tratados com U nas duas doses (346 e 440 µg C g de solo seco<sup>-1</sup>), mostraram decréscimos de 32 % e 13% respectivamente em relação ao solo sem adubação. Houve incrementos gradativos nos teores de CBM do início ao final do experimento, como

mostrado na Figura 1B.

Figura 1- (A) Carbono da biomassa microbiana (CBM) em solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, sem adubação (T) e adubado com ureia (U), dejetos líquidos (DL) e cama sobreposta (CS) em duas doses de nitrogênio. (B) Valores médios do CBM em diferentes épocas de coleta.

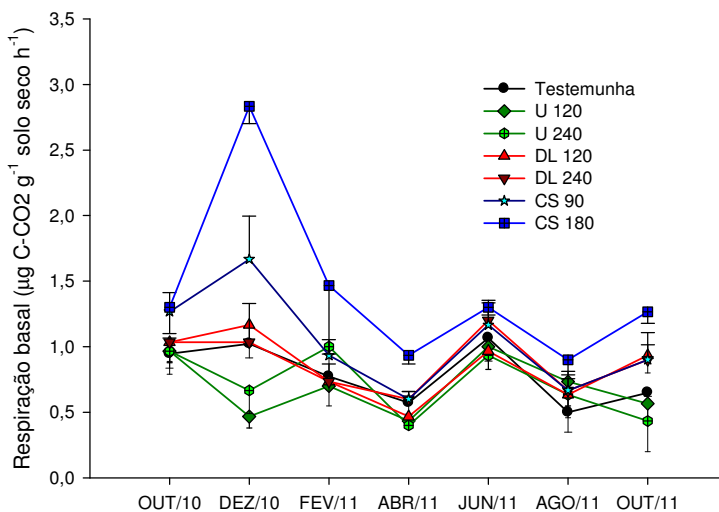


Barras representam o erro padrão da média, (n=21).

#### 4.2.2 Respiração basal

A respiração basal mostrou diferenças entre os tipos de adubos avaliados e entre as épocas nas que o solo foi coletado. Em dezembro de 2010, os solos com CS apresentaram a maior produção de  $\text{CO}_2$  (1,7 e 2,8  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g solo seco}^{-1}$ ), respondendo ao efeito da dose, sendo quase três vezes maior para os solos adubados com  $\text{CS}_{180}$ . Para a mesma época, os solos adubados com U nas duas doses apresentaram decréscimos de 55% e 12%, respectivamente, na respiração basal em relação ao solo sem adubação. Os solos recebendo dejetos líquidos e os solos sem adubação não apresentaram diferenças entre si, com valores entre 1,02 e 1,14  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$  solo seco. Em outubro de 2011, os efeitos dos tipos de adubo foram menores do que aqueles verificados para dez/10 mais ainda constata-se que solos adubados com CS e DL foram iguais entre si e apresentaram as maiores médias, com valores em torno de 1,01  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g solo seco}^{-1}$ . Por outro lado, os solos adubados com uréia tiveram uma produção de  $\text{CO}_2$  igual àquela apresentada pelos solos sem adubação, apresentando decréscimos de 50% na produção de  $\text{CO}_2$ , quando comparados aos solos adubados com dejetos. Para as demais épocas de coleta não houve efeitos dos tratamentos de adubação sobre a respiração basal dos microrganismos (Figura 2)

Figura 2 - Respiração basal microbiana no período de Out/10 a Out/2011, em solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, sem adubação (T) e adubado com ureia (U), dejetos líquidos (DL) e cama sobreposta (CS) em duas doses de nitrogênio.



\*Diferenças significativas com o teste Skott-Knott 5%.

### 4.2.3 Quociente metabólico

Na tabela 5 são apresentados os valores de quociente metabólico ( $qCO_2$ ). Verifica-se que não houve interação entre as épocas de coleta e os tratamentos de adubação, mas houve efeito significativo das duas fontes de variação isoladamente (Tabela 5). Quando comparados com o solo sem adubação, os solos recebendo DL<sub>120</sub> e aqueles adubados com U<sub>240</sub>, não apresentaram diferenças no  $qCO_2$ , com um valor médio de 1,73  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ CBM h}^{-1}$ . Entretanto, os solos tratados com DL<sub>240</sub>, CS nas duas doses e U<sub>120</sub> apresentaram médias superiores à testemunha, de 2,28  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ CBM h}^{-1}$ . O  $qCO_2$  também respondeu às épocas, sendo mais elevado no começo do experimento, nos meses de outubro e dezembro de 2010, e diminuindo no final, nas épocas de agosto e outubro de 2011.

Tabela 5 - Quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) de solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, sem adubação (testemunha) e com adubações sucessivas de uréia, dejetos líquidos suínos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio.

Tratamentos	Out/10	Dez/10	Fev/11	Abr/11	Jun/11	Ago/11	Out/11	Média
	----- $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ mg CBM h}^{-1}$ -----							
T	2,73	2,29	1,49	1,16	1,95	0,87	0,8	1,61 <sup>b</sup>
U <sub>120</sub>	3,58	1,84	3,54	3,57	3,07	1,58	0,86	2,58 <sup>a</sup>
U <sub>240</sub>	3,05	1,99	2,3	1,42	1,72	1,35	0,75	1,80 <sup>b</sup>
DL <sub>120</sub>	2,7	3,54	1,38	0,93	1,46	1,11	1,32	1,78 <sup>b</sup>
DL <sub>240</sub>	3,14	2,26	1,35	2,74	3,37	1,33	1,33	2,22 <sup>a</sup>
CS <sub>90</sub>	3,12	4,19	1,42	1,82	1,9	1,14	1,5	2,15 <sup>a</sup>
CS <sub>180</sub>	2,48	4,87	2,17	1,47	1,59	1,2	1,31	2,15 <sup>a</sup>
Média	2,97 <sup>A</sup>	3,00 <sup>A</sup>	1,95 <sup>B</sup>	1,87 <sup>B</sup>	2,15 <sup>B</sup>	1,22 <sup>C</sup>	1,13 <sup>C</sup>	2,04

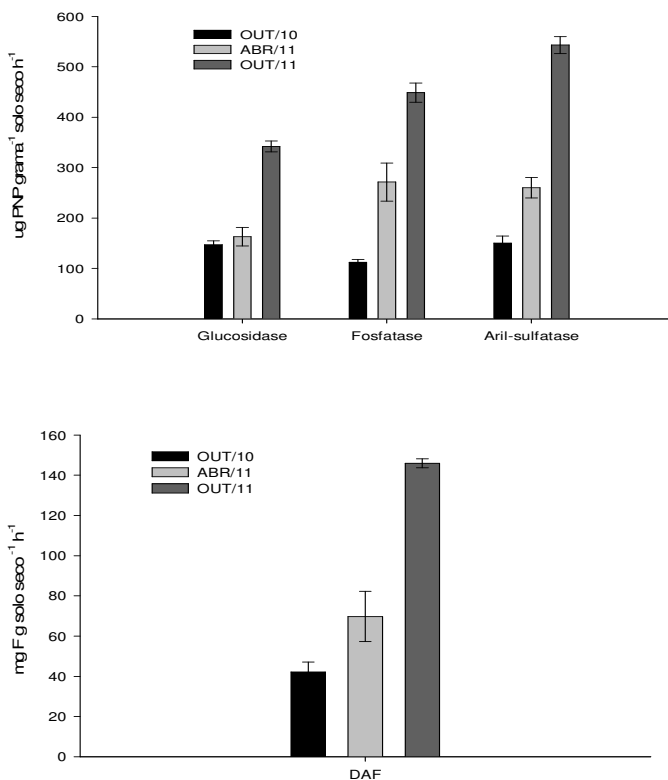
Médias seguidas pela mesma letra em cada fila ou coluna não diferem significativamente pelo teste Skott-Knott 5%.



#### 4.2.4 Atividade enzimática

Na figura 3 são apresentados os resultados da atividade das enzimas no solo. Apenas as épocas de coleta influenciaram a atividade enzimática, sendo que esta aumentou 2,0; 3,8 e 3,6 vezes para  $\beta$ -glucosidase, fosfatase e sulfatase, e DAF, respectivamente, em out/11 em relação a out/10.

Figura 3 - Atividade enzimática da B-glucosidase, fosfatase, arilsulfatase e DAF em três épocas de coleta.



Barras representam a média dos tratamentos para cada época e o erro padrão da média (n=21)

### 4.3 Teores de Cu e Zn no solo

Nas tabelas 6 e 7 são apresentados os efeitos dos tipos de adubação e épocas de coleta sobre os teores de Cu no solo extraídos por HCl e EDTA. Os dois extratores mostraram respostas dos teores de Cu aos diferentes substratos adicionados ao solo, sendo que, no geral, os teores de Cu dos solos tratados com CS<sub>180</sub> apresentaram as maiores médias, seguidos pelos solos tratados com CS<sub>90</sub> ou com DL<sub>240</sub>, que exibiram valores intermediários e que não se diferenciaram entre si. Por outro lado, os solos tratados com DL<sub>120</sub>, U nas duas doses e o solo sem adubação apresentaram as menores médias, sem se diferenciar entre si. Os teores de Cu extraídos com HCl também responderam às épocas de coleta; no mês de dezembro foram recuperados os maiores teores para todos os tratamentos, mantendo o comportamento antes descrito: maiores teores de Cu nos solos com CS<sub>180</sub>, seguidos pela CS<sub>90</sub> e com menores teores de Cu nos solos com DL<sub>120</sub> e U nas duas doses.

As tabelas 8 e 9 apresentam os efeitos dos tipos de adubação e as épocas de coleta sobre os teores de Zn no solo, sendo que houve interação entre esses dois fatores. Os dois extratores recuperaram os maiores teores de Zn nos solos adubados com cama CS nas duas doses, enquanto que os solos recebendo U e aqueles que não foram adubados apresentaram as médias menores.

Tabela 6 - Teores de Cu (extrator HCl) de solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, submetido a sucessivas adubações com uréia, dejetos líquidos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio.

Tratamentos	Out/10	Dez/10	Fev/11	Abr/11	Jun/11	Ago/11	Out/11	Média
	----- mg Cu kg solo-1 -----							
T	4,6	5,2	13,2	5,7	3,6	6,9	3,0	6,0 <sup>B</sup>
U <sub>120</sub>	4,4	9,0	4,2	4,9	2,8	6,8	4,1	5,2 <sup>B</sup>
U <sub>240</sub>	2,8	7,8	8,6	4,0	1,7	3,6	2,5	4,4 <sup>B</sup>
DL <sub>120</sub>	10,2	11,1	11,9	11,9	10,7	10,5	14,4	11,5 <sup>B</sup>
DL <sub>240</sub>	13,3	41,2	13,9	20,8	20,1	17,9	21,4	21,2 <sup>A</sup>
CS <sub>90</sub>	17,2	19,7	18,7	20,0	22,7	23,8	19,4	20,2 <sup>A</sup>
CS <sub>180</sub>	18,6	35,2	20,6	6,7	12,9	9,0	12,2	16,5 <sup>A</sup>
Média	10,2 <sup>b</sup>	18,4 <sup>a</sup>	13,0 <sup>b</sup>	10,6 <sup>b</sup>	10,6 <sup>b</sup>	11,2 <sup>b</sup>	11,0 <sup>b</sup>	

Médias seguidas pela mesma letra em cada linha ou coluna não diferem significativamente pelo teste Skott-Knott 5%.

Tabela 7 - Teores de Cu (extrator EDTA) de solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, submetido a sucessivas adubações com uréia, dejetos líquidos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio.

Tratamentos	Out/10	Dez/10	Fev/11	Abr/11	Jun/11	Ago/11	Out/11
	----- mg Cu kg solo <sup>-1</sup> -----						
T	5,9 <sup>Cc</sup>	13,9 <sup>Cc</sup>	8,5 <sup>Cc</sup>	2,3 <sup>Cc</sup>	4,3 <sup>Cc</sup>	9,5 <sup>Dc</sup>	12,3 <sup>Dc</sup>
U <sub>120</sub>	4,3 <sup>Cc</sup>	20,1 <sup>Cc</sup>	10,3 <sup>Cc</sup>	7,3 <sup>Cc</sup>	6,9 <sup>Cc</sup>	12,2 <sup>Dc</sup>	6,3 <sup>Dc</sup>
U <sub>240</sub>	2,7 <sup>Cc</sup>	9,1 <sup>Cc</sup>	18,1 <sup>Cc</sup>	7,3 <sup>Cc</sup>	2,1 <sup>Cc</sup>	4,9 <sup>Dc</sup>	3,4 <sup>Dc</sup>
DL <sub>120</sub>	18,6 <sup>Cc</sup>	27,5 <sup>Cc</sup>	20,3 <sup>Cc</sup>	20,9 <sup>Cc</sup>	20,6 <sup>Bc</sup>	18,0 <sup>Cc</sup>	24,6 <sup>Cc</sup>
DL <sub>240</sub>	19,7 <sup>Bc</sup>	40,3 <sup>Bc</sup>	26,3 <sup>Bc</sup>	35,4 <sup>Cc</sup>	31,8 <sup>Bc</sup>	28,8 <sup>Cc</sup>	37,8 <sup>Bc</sup>
CS <sub>90</sub>	37,7 <sup>Bc</sup>	52,5 <sup>Bc</sup>	41,8 <sup>Bc</sup>	43,8 <sup>Bc</sup>	43,2 <sup>Bc</sup>	39,2 <sup>Bc</sup>	47,3 <sup>Bc</sup>
CS <sub>180</sub>	102,5 <sup>Ab</sup>	123,7 <sup>Ab</sup>	75,5 <sup>Ac</sup>	104,3 <sup>Ab</sup>	90,5 <sup>Ac</sup>	87,8 <sup>Ac</sup>	100,0 <sup>Ab</sup>

Médias seguidas pela mesma letra (maiúsculas na coluna e minúsculas na fila) não diferem significativamente pelo teste Skott-Knott 5%

Tabela 8 - Teores de Zn (extrator HCl) de solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, submetido a sucessivas adubações com uréia, dejetos líquidos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio.

Tratamentos	Out/10	Dez/10	Fev/11	Abr/11	Jun/11	Ago/11	Out/11
	----- mg Zn kg solo <sup>-1</sup> -----						
T	14,4 <sup>Cc</sup>	15,6 <sup>Cc</sup>	10,8 <sup>Ac</sup>	19,8 <sup>Ac</sup>	12,6 <sup>Dc</sup>	24,8 <sup>Ac</sup>	25,0 <sup>Dc</sup>
U <sub>120</sub>	16,2 <sup>Cc</sup>	23,1 <sup>Cc</sup>	12,0 <sup>Ac</sup>	27,2 <sup>Ac</sup>	18,9 <sup>Dc</sup>	23,4 <sup>Ac</sup>	17,4 <sup>Dc</sup>
U <sub>240</sub>	10,8 <sup>Cc</sup>	9,2 <sup>Cc</sup>	28,2 <sup>Ac</sup>	12,1 <sup>Ac</sup>	10,4 <sup>Dc</sup>	10,7 <sup>Ac</sup>	10,3 <sup>Dc</sup>
DL <sub>120</sub>	33,3 <sup>Cc</sup>	29,8 <sup>Cc</sup>	33,7 <sup>Ac</sup>	50,1 <sup>Ac</sup>	53,8 <sup>Dc</sup>	45,1 <sup>Ac</sup>	62,4 <sup>Dc</sup>
DL <sub>240</sub>	42,1 <sup>Bc</sup>	51,8 <sup>Cc</sup>	32,8 <sup>Ac</sup>	93,2 <sup>Ab</sup>	124,7 <sup>Cb</sup>	66,1 <sup>Ac</sup>	101,3 <sup>Cb</sup>
CS <sub>90</sub>	61,1 <sup>Bc</sup>	64,8 <sup>Bc</sup>	60,0 <sup>Ac</sup>	141,8 <sup>Ab</sup>	201,9 <sup>Bb</sup>	141,7 <sup>Ab</sup>	161,6 <sup>Bb</sup>
CS <sub>180</sub>	73,4 <sup>Ac</sup>	73,9 <sup>Ac</sup>	69,2 <sup>Ac</sup>	300,8 <sup>Ab</sup>	344,9 <sup>Aa</sup>	373,0 <sup>Ab</sup>	393,1 <sup>Aa</sup>

Médias seguidas pela mesma letra (maiúsculas na coluna e minúsculas na fila) não diferem significativamente pelo teste Skott-Knott 5%.

Tabela 9 - Teores de Zn (extrator EDTA) de solo sob plantio direto numa sucessão milho – aveia, submetido a sucessivas adubações com uréia, dejetos líquidos e cama sobreposta em duas doses de nitrogênio.

Tratamentos	Out/10	Dez/10	Fev/11	Abr/11	Jun/11	Ago/11	Out/11
	----- mg Zn kg solo <sup>-1</sup> -----						
T	10,4 <sup>Bc</sup>	12,2 <sup>Cc</sup>	8,9 <sup>Bc</sup>	5,7 <sup>Bc</sup>	14,7 <sup>Cc</sup>	22,5 <sup>Bc</sup>	29,1 <sup>Cc</sup>
U <sub>120</sub>	12,5 <sup>Bc</sup>	30,5 <sup>Cc</sup>	9,7 <sup>Bc</sup>	7,7 <sup>Bc</sup>	15,0 <sup>Cc</sup>	17,3 <sup>Bc</sup>	17,4 <sup>Cc</sup>
U <sub>240</sub>	8,9 <sup>Bc</sup>	7,0 <sup>Cc</sup>	36,9 <sup>Bc</sup>	4,8 <sup>Bc</sup>	10,6 <sup>Cc</sup>	15,3 <sup>Bc</sup>	12,9 <sup>Cc</sup>
DL <sub>120</sub>	30,5 <sup>Bc</sup>	25,7 <sup>Cc</sup>	25,3 <sup>Bc</sup>	23,7 <sup>Bc</sup>	45,5 <sup>Cc</sup>	42,1 <sup>Bc</sup>	63,5 <sup>Cc</sup>
DL <sub>240</sub>	42,1 <sup>Bc</sup>	60,9 <sup>Cc</sup>	27,6 <sup>Bc</sup>	39,6 <sup>Bc</sup>	70,6 <sup>Cc</sup>	61,4 <sup>Bc</sup>	91,1 <sup>Cc</sup>
CS <sub>90</sub>	90,5 <sup>Bc</sup>	134,5 <sup>Bc</sup>	98,6 <sup>Bc</sup>	59,0 <sup>Ac</sup>	142,6 <sup>Bc</sup>	165,7 <sup>Bc</sup>	171,1 <sup>Bc</sup>
CS <sub>180</sub>	627,2 <sup>Aa</sup>	632,1 <sup>Aa</sup>	160,6 <sup>Ac</sup>	184,0 <sup>Ab</sup>	283,1 <sup>Ab</sup>	291,9 <sup>Ab</sup>	354,2 <sup>Ab</sup>

Médias seguidas pela mesma letra (maiúsculas na coluna e minúsculas na fila) não diferem significativamente pelo teste Skott-Knott 5%

#### **4.4 Correlações entre atributos químicos e biológicos do solo.**

A tabela 10 apresenta a matriz de correlação entre os atributos químicos e biológicos do solo. O CBM correlacionou-se positivamente com o COT e com as enzimas avaliadas, a RB esteve correlacionada com o COT e o NT. De outro lado o nitrogênio total do solo, apresentou correlações negativas com as enzimas avaliadas; porém estas correlações ao parecer foram um artifício causado pelo fato de ter só duas avaliações para os teores de NT.

Devido à alta variação entre coletas, que apresentaram os dados de Cu e Zn, não foram realizadas correlações entre esses elementos e os atributos biológicos avaliados.

Tabela 10 - Correlação de Pearson entre os atributos químicos e biológicos do solo em experimento de nove anos, com aplicação de duas doses de uréia e dejetos suínos em forma líquida e em cama sobreposta.

	CBM <sup>1</sup>	RB <sup>1</sup>	COT <sup>2</sup>	NT <sup>2</sup>	Glucosidase <sup>3</sup>	Fosfatase <sup>3</sup>	Sulfatase <sup>3</sup>	DAF <sup>3</sup>
CBM		0,24	0,50**	-0,45	0,77**	0,70**	0,70**	0,68**
RB	0,24		0,67**	0,77**	0,02	-0,31	-0,25	-0,27
COT	0,50**	0,67**		0,44	0,19	0,15	0,08	0,08
NT	-0,45	0,77**	0,44**		-0,72**	-0,72**	-0,80**	0,78**

1 Correlação obtida a partir de 49 médias (sete tratamentos, sete épocas de coleta).

2 Correlação obtida a partir de 14 médias (sete tratamentos nas épocas de out/10 e out/11).

3 Correlação obtida a partir de 21 médias (sete tratamentos nas épocas de out/10; abr/11; out/11).

CBM (Carbono da biomassa microbiana), RB (Respiração basal), COT (carbono orgânico total), NT (nitrogênio total). \*\* (p<0,01); \* (p<0,05).



## 5 DISCUSSÃO

No presente experimento foi avaliada a resposta da microbiota do solo sob plantio direto, a aplicações sucessivas de dejetos suínos líquidos e em cama sobreposta em experimento de nove anos de duração. Aplicações sucessivas de dejetos suínos causam mudanças nas propriedades físicas e químicas do solo, além da possibilidade de acumular elementos traço, fatores que podem influenciar positiva ou negativamente a biota do solo e por tanto a ciclagem dos nutrientes no ecossistema.

### 5.1 pH, carbono orgânico e nitrogênio total

A diminuição de pH verificada nos solos adubados com uréia pode obedecer a acidificação causada a longo prazo, pela adição repetida desse substrato ao solo em razão dos altos níveis de nitrificação que ocorrem após as aplicações sucessivas desse fertilizante (BANERJEE et al., 1999; GUO et al., 2010). Respeito ao comportamento do pH em solos adubados com dejetos suínos, vários autores relataram aumentos nos valores de pH nos solos adubados com DL e com CS, quando eles foram aplicados em solos ácidos (PLAZA et al., 2002; LOURENZI et al., 2011); porém a calagem feita no início deste experimento pode ter mascarado esse efeito.

Verificou-se que os tratamentos de adubação com dejetos de suínos (líquidos e sólidos) promoveram a variação nos teores de COT e que esse comportamento teve efeitos residuais ao longo dos nove anos do experimento. Incrementos no teor de COT do solo estão relacionados com as quantidades de carbono adicionadas ao solo e às formas em que esse elemento encontra-se nos diferentes substratos. O aumento de COT observado no solo adubado com CS<sub>180</sub>, em relação à testemunha e aos outros tipos de adubação, provavelmente aconteceu em decorrência de sua maior relação C/N, por causa da mistura dos dejetos com a maravalha, que está constituída basicamente por lignina (BARTELS, 2001). No lugar de criação dos animais, a CS começa a se decompor: ali são utilizadas em um primeiro momento, as formas mais lábeis de C permitindo o crescimento dos microrganismos e a fixação desse elemento nas organelas celulares. Na medida em que essa decomposição vai acontecendo, permanecem as formas mais recalcitrantes, que devem ser as predominantes na hora da aplicação ao solo (TIQUIA, 2002). Os compostos carbonados mais recalcitrantes tem

mineralização mais lenta, o que resulta em menores perdas de C. Giacomini et al. (2008a), em experimento realizado em laboratório, observaram menor mineralização do C orgânico contido na CS, que após 80 dias de avaliação, tinha mineralizado 23% do C em comparação a 59% nos DL. .

A baixa velocidade de mineralização da CS também pode ser a causa do aumento no COT nos nove anos do experimento. Aumentos no teor de matéria orgânica contribuem para o melhoramento de várias características físico- químicas do solo. Bhogal et al. (2009) observaram maior capacidade de retenção de água, incrementos nos teores de N e C e menor densidade e resistência à penetração em solos com aplicações sucessivas de esterco como fonte de C, mostrando que essas variáveis estavam relacionadas à quantidade de C orgânico adicionada ao solo, além de demonstrar que os efeitos positivos persistiam dois anos depois de cessada a adubação. Efeitos semelhantes, decorrentes da aplicação de esterco, foram encontrados por outros autores em experimentos de curta e de longa duração (SCHJONNING et al., 1994, SCHJONNING et al., 2007; HAYNES e NAIDU, 1998; EDMEADES, 2003).

Os teores de NT do solo não apresentaram acréscimos no período de 2010 a 2011 em nenhum dos tratamentos testados, em conformidade com os resultados obtidos por outros autores (SAVIOZZI et al., 1997; PLAZA, et al., 2004). Esse fato pode estar relacionado à rápida imobilização desse nutriente nos tecidos de plantas e microrganismos e à alta mobilidade que apresentam suas formas inorgânicas (KAYE e HART, 1997). Neste experimento, a maioria dos anos, a dose de N recebida pelos solos adubados com DL e U (120 Kg de N ha<sup>-1</sup>) foi maior que aquela recebida pelos solos com cama sobreposta (90 kg de N ha<sup>-1</sup>); mas mesmo assim, o teor de N encontrado naquelas parcelas não diferiu do encontrado no solo sem adubação. Os DL têm baixa relação C/N e estão altamente diluídos pela grande quantidade de água que é usada no sistema produtivo (BELLI FILHO et al., 2001). Trabalhos que não observaram incrementos do NT em solos recebendo DL relacionaram esse fato às seguintes situações: I) rápida imobilização nos tecidos de plantas e microrganismos; II) perdas por volatilização de NH<sub>3</sub>; III) retenção de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas partículas do solo; e, IV) perdas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por escoamento ou lixiviação (PLAZA, et al., 2004; SAVIOZZI et al., 1997), processos que acontecem rapidamente uma vez que a maior parte do N contido nos dejetos está em forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (AITA e GIACOMINI, 2008a). De fato, AITA et al. (2007) observou altos valores de nitrificação em solos sob plantio direto recebendo DL e relatou a oxidação total das formas amoniacais de N contidas nos dejetos em períodos de 15 a 20 dias após a aplicação dos mesmos.

Com o passar do tempo o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> contido nos dejetos pode acumular-se

nos corpos de água, chegando a representar perigos à saúde e deixando-a não apta para consumo de animais e humanos, como comprovado em vários estudos avaliando as concentrações de N lixiviado e percolado de solos recebendo dejetos suínos (BASSO et al., 2005; CERETTA et al., 2005; HADLICH e SCHEIBE, 2007).

Os solos adubados com U também apresentam perdas que podem ser atribuídas á volatilização do  $\text{NH}_3$  produzido após a ação da urease sobre esse fertilizante (BIEDERBECKL et al., 1996).

Em contraste, o N contido na CS, encontra-se principalmente em formas orgânicas (GIACOMINI et al., 2008a), e, devido a que é preparada com materiais que exibem altos teores de lignina, como a maravalha ou a palha de arroz, apresenta baixa mineralização (AITA e GIACOMINI, 2008b). Esse fato, ficou demonstrado, por exemplo, por Giacomini (2005), em experimento realizado em laboratório, quem constatou que só 14% do N orgânico contido na CS foi mineralizado num período de 80 dias. Desta forma, a aplicação de CS possibilita uma maior retenção de N nas camadas superficiais do solo e reduz a velocidade das transformações deste elemento, diminuindo os impactos negativos que poderia causar ao meio ambiente.

## **5.2 Atividade biológica**

### **5.2.1 Biomassa microbiana**

Estudos avaliando o CBM em solos adubados com DL em condições controladas demonstraram que, depois da aplicação dos dejetos, o CBM aumentou até atingir valores significativamente superiores ao solo sem adubação. Depois dessa primeira etapa, cuja duração variou com o tipo de solo e com as condições edafoclimáticas, seguiu uma diminuição gradual até atingir valores próximos ao solo sem adubação, em períodos de tempo que foram, em média, de 45 a 60 dias (GRIFFITHS, et al., 1998; PLAZA, et al., 2007; GUERRERO et al., 2007). Nesses trabalhos foi demonstrado que, a primeira etapa, de crescimento da biomassa, está vinculada à degradação dos compostos lábeis presentes nos dejetos, enquanto que, o decréscimo posterior está vinculado à diminuição desses compostos. Esse padrão de comportamento é concomitante com o observado no presente experimento nos solos adubados com DL, os quais não se diferenciaram daqueles sem adubação. Se for assumido, que o padrão de comportamento acima explicado é geral para todos os solos recebendo DL, poder-se-ia concluir que a adição sucessiva de dejetos na forma líquida estimula só de

forma efêmera os microrganismos do solo, apresentando efeitos que não são persistentes ao longo do tempo.

Por outro lado, no presente experimento, a aplicação de CS<sub>180</sub> aumentou o teor de CBM em comparação aos demais tratamentos. Guerrero et al. (2007) encontraram aumentos da biomassa microbiana em solos com aplicação da fração sólida de dejetos suínos compostados, e resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, se for considerado que a cama sobreposta é um material em que predomina a fração sólida dos dejetos (KUNZ et al., 2005).

O teor de matéria seca e as características químicas da CS fazem com que os nutrientes contidos nesse material fiquem retidos no solo por mais tempo. Isso evita a lixiviação e melhora a estrutura do solo, o que pode se refletir em melhores condições para o crescimento e atividade metabólica dos microrganismos. Também se espera que o nível de humificação da CS, tenha influenciado de maneira direta o comportamento da biomassa microbiana nas parcelas com esse tratamento. Os substratos humificados são colonizados principalmente por populações de microrganismos mais especializados, equipados com sistemas enzimáticos mais complexos capazes de degradar moléculas de maior peso molecular, provavelmente polimerizadas. Na medida em que esses organismos vão liberando enzimas para o rompimento inicial dessas moléculas, outros organismos menos especializados encontram condições para proliferar. Essa diversidade de nichos só é possível em materiais que como a cama sobreposta, tenham relações C/N mais elevadas no começo da decomposição, possibilitando uma sucessão ecológica mais dinâmica (McGUIRE e TRESEDER, 2010; GESSNER et al., 2010).

Além disso, os teores de COT encontrados nas parcelas com CS provavelmente também acarretaram aumentos no teor de CBM, uma vez que, como já foi mencionado, maiores teores de COT causam melhorias nas condições físicas do solo, particularmente na estrutura dos agregados, o que afeta a capacidade de retenção de água e a aeração, os quais são importantes fatores que determinam o crescimento dos microrganismos heterotróficos do solo (STEINBERGER e SHORE, 2009).

Já no caso da adubação com uréia, observou-se a diminuição do CBM em relação ao solo sem adubação. Este resultado está em contradição com aqueles encontrados por diferentes autores que, ou relataram aumentos no teor de CBM em solos adubados com fertilizantes minerais, ou encontraram semelhanças com os teores exibidos pelos solos sem adubação (PLAZA et al., 2004; SINGH, H.; SINGH, K. E., 1993). Porém a diminuição no CBM nos solos adubados com uréia pode ser explicada por vários fatores. Em primeiro lugar, em solos submetidos a adubação com

substratos de baixa relação C/N, como a uréia, os microrganismos encontram-se em situação de estresse metabólico por falta de C o que leva a diminuições no crescimento e por tanto a diminuições na biomassa microbiana (KAYE e HART, 1997). Além disso, as adubações com uréia não conseguem repor a perda de nutrientes como fósforo e potássio, que são exportados pelas plantas durante a colheita e que podem diminuir até atingir níveis que sejam limitantes à sobrevivência dos microrganismos. Para simular esta situação, Chu, et al. (2007) avaliaram os efeitos de adubações não balanceadas e verificaram que solos adubados com formulações pobres em fósforo ou em potássio, apresentaram teores de CBM inferiores àqueles encontrados em solos com formulações balanceadas. Kanchikerimath e Singh, (2001) em experimento de 26 anos avaliando os efeitos da aplicação de formas não balanceadas de fertilizantes orgânicos e inorgânicos sobre a atividade dos microrganismos, encontraram que os solos com fertilização balanceada apresentaram a maior atividade enzimática e o maior teor de CBM. Diante dessas observações pode-se concluir que nos solos recebendo adubação com uréia há limitação de recursos que impede o aumento nas populações microbianas do solo. Outros autores que encontraram decréscimos na biomassa microbiana em solos adubados com fertilizantes minerais (ASSIS et al., 2007; GE et al., 2009) relacionaram essas observações a possíveis efeitos deletérios da ureia sobre os microrganismos, que podem acontecer pelas drásticas mudanças de pH produzidas após a aplicação desse material e pela acidificação que ela promove no solo.

Respeito as épocas de coleta, em todos os tratamentos a biomassa microbiana tendeu a crescer ao longo do tempo (em outubro de 2011 foi maior que em outubro de 2010), inclusive no solo sem adubação. É possível que os incrementos devam-se não só à contribuição dos dejetos, mas também ao efeito da palhada da aveia e do milho, que permitiram manter um substrato para o crescimento dos microrganismos, mesmo no solo sem adição de dejetos. A palha de resíduos culturais pode causar aumentos na biomassa microbiana, e alguns autores observaram que solos recebendo palhada de cereais apresentam incrementos na biomassa microbiana inclusive quando comparados com solos recebendo fertilização mineral (SINGH e SINGH, 1993).

De acordo com Kaschuk et al. (2010) em uma meta-análise dos teores de CBM em solos de diferentes biomas do Brasil, os valores de carbono da biomassa microbiana observados neste trabalho estão próximos àqueles relatados para os solos agrícolas do bioma mata atlântica, com exceção dos tratamentos com ureia, que permaneceram abaixo do observado na região.

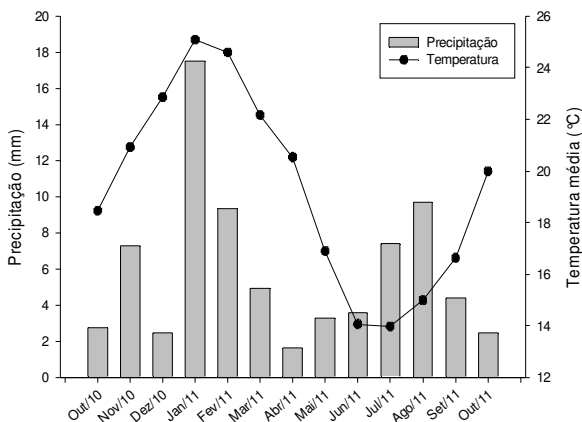
### 5.2.2 Respiração basal

A RB é utilizada como indicador da atividade metabólica dos microrganismos do solo dado que ela reflete de forma direta a decomposição do C orgânico, sendo amplamente usada para avaliar de maneira global, os processos metabólicos de bactérias e fungos do solo (PARKIN et al., 1996). Mudanças na RB dos microrganismos estão relacionadas a condições ambientais como temperatura, umidade ou disponibilidade de fontes energéticas e de nutrientes. Assim, diferentes formas de manejo e adubação do solo podem causar diversas respostas nessa variável.

No presente experimento, houve influência da época de aplicação dos diferentes adubos na RB do solo. Observou-se que os solos submetidos à aplicação de CS apresentaram maior produção de CO<sub>2</sub> durante a avaliação feita em dez/10, provavelmente porque para essa época, a CS alcançou o seu pico de decomposição. Posteriormente, à medida que o tempo avançou, o fluxo de CO<sub>2</sub> foi diminuindo, e em out/11, um ano após a aplicação da CS, chegou aos mesmos níveis do solo recebendo DL, os quais tinham sido aplicados um mês antes. Aumentos na RB dos microrganismos no solo recebendo DL provavelmente não foram detectados devido ao tempo entre amostragens, uma vez que, como demonstrado em diferentes trabalhos, a emissão de CO<sub>2</sub> nestes solos é maior nas primeiras horas, logo após a aplicação, e depois diminui até alcançar valores semelhantes àqueles observados no solo sem adição de dejetos (AITA, et al., 2007; GIACOMINI et al., 2008b).

Já durante os meses de abril a setembro, não houve diferenças na RB entre os solos com os diferentes tipos de adubos (CS, DL, U). Esse período coincidiu com a temporada mais fria na área de estudo, o que pode ter limitado a atividade microbiana no solo. A maioria dos microrganismos do solo são mesófilos, que crescem a temperaturas entre 15 e 35 °C, e como pode-se observar na figura 4, durante os meses mencionados a temperatura manteve-se perto do limite inferior desse intervalo. De fato, a temperatura e a umidade do solo são fatores primordiais no controle da variação estacional na produção de CO<sub>2</sub>, como demonstrado por Ge et al. (2009) que encontraram incrementos na respiração dos microrganismos durante a estação do verão.

Figura 4 - Médias mensais de temperatura do ar e de precipitação registrados na estação meteorológica mais próxima ao município de Braço do Norte (Estação Urussanga).



Dados cedidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural, Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (EPAGRI - CIRAM).

De outro lado, a diminuição no fluxo de  $\text{CO}_2$  nos solos recebendo uréia pode ser explicada pelo desbalanço da relação C/N desses solos e pela baixa quantidade de nutrientes que limitam o crescimento das populações microbianas e sua atividade metabólica. Outros trabalhos avaliando a RB dos microrganismos em solos submetidos à adubação com resíduos orgânicos e com fertilizantes minerais demonstraram que solos recebendo apenas ureia, apresentaram menor fluxo de  $\text{CO}_2$  quando comparados com aqueles recebendo resíduos orgânicos (FAUCI e DICK, 1994). Esses autores, também observaram que o padrão de resposta persistia mesmo se os fertilizantes minerais eram aplicados em datas mais próximas das coletas, onde se supõe que a adição de substratos lábeis incentivaria a atividade microbiana, mesmo que de forma efêmera.

### 5.2.3 Quociente metabólico

No presente trabalho, os solos recebendo dejetos nas duas formas, (líquidos e sólidos), apresentaram  $q\text{CO}_2$  maiores que o solo sem adubação; a exceção do solo recebendo  $\text{DL}_{120}$  cuja demanda energética específica se manteve no mesmo nível que aquela apresentada pelo solo sem adubação.

No presente trabalho, os solos adubados com  $U_{120}$  apresentaram um valor alto de  $qCO_2$  indicando comunidades em situação de estresse, nesse tratamento, a fonte de estresse experimentada pelos microrganismos pode ter a ver com dois fatores, o pH mais ácido desse solo e a baixa relação C/N desse material, que coloca os microrganismos em alto nível de competição por C. Segundo Wardle e Ghani (1995), o quociente metabólico ou demanda energética específica ( $qCO_2$ ) indica o nível de estresse ao qual está submetida uma comunidade microbiana. Este índice pode ser afetado por mudanças na estrutura das comunidades microbianas, por disponibilização ou imobilização de substratos e por diferentes tipos de manejo do solo (LEITA et al., 1999). Valores maiores de  $qCO_2$  são encontrados em situações adversas à população microbiana, nas quais os microrganismos gastam mais energia (carbono) para sua manutenção, em detrimento do crescimento populacional (ANDERSON e DOMSCH, 2010). Valores altos de  $qCO_2$  podem indicar comunidades microbianas em condição de estresse fisiológico, enquanto valores baixos, indicariam ausência de estresse.

O aproveitamento e a eficiência no uso dos recursos energéticos providos pelos dejetos suínos aos microrganismos do solo dependem do período de avaliação, o histórico da área estudada e as características intrínsecas à composição de espécies da comunidade microbiana. Por exemplo, em experimentos feitos em laboratório com solos adubados com dejetos, líquidos ou sólidos, observaram-se acréscimos no  $qCO_2$  nos dias seguintes à aplicação, mais esses valores diminuíram com o decorrer do tempo, até atingir valores iguais aos do solo sem adubação (PLAZA, et al., 2007; GUERRERO et al., 2007). De outra parte, em experimento realizado a campo, Plaza et al. (2004), encontraram decréscimos no  $qCO_2$  dos solos adubados com dejetos líquidos em um solo de clima semiárido sob cultivo de cevada. Os autores relacionaram os decréscimos no  $qCO_2$  desses solos a diminuições no estresse da comunidade microbiana, uma vez que aqueles solos estavam sendo manejados de forma intensiva, com alta aplicação de insumos de síntese química e alto revolvimento do solo, vindo daí o alívio que as adições de material orgânico podem ter produzido sobre essas comunidades. Respostas contrárias foram encontradas por LEITA et al (1999) que observaram decréscimos na eficiência energética dos microrganismos de solos recebendo esterco quando comparado a solos com adubação mineral e explicaram essas diferenças pelos teores de Cu e Zn desses materiais.

Diferentes espécies microbianas alocam os recursos mediante estratégias que favorecem o crescimento ou a reprodução de maneira diferencial. Em termos gerais, os microrganismos com estratégias *k*



investem mais recursos no crescimento e são muito mais eficientes no aproveitamento dos mesmos, contrario aos estrategistas *r* que são organismos tipicamente oportunistas, que investem mais recursos na reprodução e são menos eficientes no seu uso. Sob pressões de seleção, de baixa disponibilidade de nutrientes, os estrategistas *k* estariam mais adaptados para sobreviver, enquanto que em ambientes onde os recursos são abundantes por períodos curtos e intermitentes, seriam os estrategistas *r* os organismos melhor preparados (BOTTOMLEY, 1999; BEGON et al., 2006). No solo, microrganismos de estratégias *k* exibiriam maior eficiência na conversão dos substratos em biomassa, pelo que se esperaria que em ambientes dominados por esse tipo de organismos, o  $qCO_2$  mostrasse valores baixos, ocorrendo o contrario em ambientes dominados por populações de estratégias *r*. No entanto, em ambientes ricos em nutrientes, sem pressão de seleção, espécies com as duas estratégias podem colonizar e se manter sem restrições a seu crescimento. A adubação sucessiva com dejetos suínos líquidos e cama sobreposta cria uma situação na que hipoteticamente não haveria competição por nutrientes, uma vez que estes são disponibilizados de forma constante, pelo que poderia se pensar que nos solos adubados com esses substratos as populações *r* e *k* tem a mesma chance de sobreviver. Tendo isso em conta, poderia se pensar que os valores altos de  $qCO_2$  encontrados nos solos adubados com DL e CS, devem-se a possível proliferação de organismos menos eficientes no uso dos recursos que aproveitaram essa situação particular de abundância de nutrientes e aumentaram suas populações.

#### **5.2.4 Atividade enzimática**

Em solos com aplicação de dejetos suínos, ainda com acúmulo de Cu e Zn, Martens et al., (1992), Lalande et al., (2000) e Plaza et al., (2004) reportaram incrementos na atividade de varias enzimas como  $\beta$ -glucosidase, hidrogenase, protease, catalase, urease e arilsulfatase. No presente experimento a adição de DL, CS e U não afetou a atividade das enzimas avaliadas, sendo que para todos os tratamentos as médias foram semelhantes. Esse resultado pode ser a consequência de duas situações contrastantes: a alta disponibilidade de nutrientes nos solos adubados com DL e CS e a baixa disponibilidade deles nos solos adubados com U. Ao ser as enzimas, moléculas biológicas cuja produção acarreta grandes custos energéticos á célula, os microrganismos em solos onde os nutrientes são abundantes, não produzem enzimas extracelulares, pois não são indispensáveis para obter os nutrientes; de maneira contraria, nos solos com

baixa disponibilidade deles como aqueles adubados com U, onde, há menor teor de nutrientes, e baixa relação C/N, e a produção de enzimas extracelulares pode levar a um dreno de energia (ALLISON et al., 2011; ARNOSTI, 2003).

A atividade enzimática aumentou de forma significativa durante o período de avaliação do experimento, sendo mais alta em outubro de 2011 do que em outubro de 2010. Esse resultado, somado à alta correlação observada entre as enzimas e a biomassa microbiana, faz pensar que o aumento na atividade enzimática é causado pelo crescimento das populações microbianas dos solos avaliados. De fato, a biomassa microbiana é responsável pela produção de grande parte das enzimas presentes no solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A atividade das enzimas B-glucosidase e fosfatase ácida estão dentro dos níveis reportados para essas enzimas em outros estudos feitos no Brasil; no entanto, a atividade da arilsulfatase foi pelo menos 10 vezes maior que a média reportada em outros estudos, em solos sob plantio direto (BALOTA, et al., 2004, BALOTA, et al., 2011). Atividades elevadas da arilsulfatase indicam aumentos nas populações de fungos, uma vez que essa enzima apresenta uma forte correlação com o ergosterol, componente particular da membrana celular desses organismos. Frey et al. (2000) demonstraram que o plantio direto favoreceu as condições de crescimento dos fungos uma vez que neste sistema de manejo as populações de microrganismos do solo sofrem menos perturbações. Assim, é possível que a alta atividade da arilsulfatase registrada neste experimento associe-se ao sistema de manejo do solo na área estudada.

### **5.3 Teores de cobre e zinco**

No geral, os teores de Cu e Zn foram maiores nos solos adubados com dejetos nas duas formas (líquido e cama sobreposta) do que nos solos adubados com fertilizante mineral ou naqueles que não receberam adubação, ainda levando em conta que o solo sem adubação apresentou teores altos de Cu e Zn em comparação a outros Argissolos da região sul do Brasil (GIROTTI et al., 2010; LOURENZI et al., 2011). Isso provavelmente aconteceu pelo histórico da área de estudo antes da implantação do experimento, na qual foram aplicados dejetos suínos.

Teores elevados de Cu e Zn em solos adubados com dejetos suínos foram encontrados também por outros autores (LANE, 1989; BENCKISER et al., 1994; LEITA et al., 1999; LIPOTH e SCHOENAU, 2007; MATTIAS et al., 2010). A presença do Cu e o Zn nos dejetos suínos é resultado da sua

ingestão na dieta e da baixa absorção desses elementos por parte dos animais, o que faz com que altas proporções do ingerido, sejam eliminadas via dejetos (DOURMAD e JONDREVILLE, 2007).

Vários estudos têm demonstrado que o acúmulo de Cu e Zn em solos submetidos a sucessivas aplicações de dejetos suínos ocorre preferencialmente nas camadas superficiais do solo, principalmente nos primeiros cinco centímetros. Nesta situação, normalmente o Cu encontra-se ligado à fração orgânica do solo, enquanto o Zn encontra-se preferencialmente ligado à fração mineral do solo (LANE, 1989; MATTIAS, 2006; GIROTTO et al., 2010).

Giroto et al. (2010) avaliaram os teores biodisponíveis de Cu e Zn (extração por HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) em um Argissolo Vermelho Distrófico Arênico submetido a sucessivas aplicações de dejetos líquidos suínos durante seis anos e constataram que o aumento na dose de aplicação acarreta incrementos nos teores disponíveis desses elementos no solo. Na maior quantidade de dejetos suínos aplicada (80 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) esses autores verificaram teores de Cu e Zn na camada de 0-10 cm equivalentes a 78,2 e 139,9 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Por outro lado, Mattias et al. (2010) encontraram teores biodisponíveis de 1 a 20 e de 2 a 46 mg kg<sup>-1</sup> de Cu e Zn respectivamente, na camada de 0 – 20 cm, em três diferentes tipos de solos do estado de Santa Catarina, submetidos a aplicações sucessivas de dejetos suínos, em propriedades suinicultoras com diferentes ciclos produtivos, com um histórico de pelo menos 24 anos de aplicações. No presente trabalho, os teores disponíveis de Cu e Zn atingiram valores semelhantes aos encontrados por aqueles autores, nos solos sob aplicação de DL. Os teores mais elevados, encontrados nos solos adubados com CS podem decorrer da maior percentagem de matéria seca deste material (BARTELS, 2001). Os valores de Cu e Zn relatados no presente trabalho e nos estudos supracitados estão acima dos valores reportados no manual de adubação e calagem para os estados de Rio Grande do Sul e Santa Catarina, o qual aponta que quantidades acima de 0,4 e 0,5 mg kg<sup>-1</sup> de Cu e Zn respectivamente, são considerados como muito altos e podem ser prejudiciais para o desenvolvimento das culturas.

Devido à alta variação entre coletas, que apresentaram os dados de Cu e Zn e, perante ao fato de que não foi identificada a fonte que introduziu tal variação, não é feita nenhuma conclusão sobre o comportamento desses elementos no tempo avaliado.

#### **5.4 Correlações entre atributos químicos e biológicos do solo.**

Como esperado, houve correlação positiva entre a atividade das enzimas avaliadas e a biomassa microbiana e isso se deve ao fato de serem os microrganismos a principal fonte de enzimas extracelulares no solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), em que o aumento das populações microbianas proporcionam incrementos na atividade enzimática do solo. A correlação positiva entre o CBM e o COT também era de se esperar, uma vez que aumentos no teor de carbono orgânico, como já foi explicado, levam a incrementos no número de microrganismos no solo, principalmente devido a melhoras nas condições físicas nesse ambiente. A correlação positiva entre a RB e os teores de COT e NT está relacionada à maior atividade microbiana promovida pela presença desses dois nutrientes essenciais (WAGNER e WOLF, 1999).

## 6 CONCLUSÕES

A aplicação de uréia e de dejetos suínos, em forma líquida e em cama sobreposta, afetou de maneira diferenciada a comunidade microbiana do solo. A aplicação de cama sobreposta promoveu o aumento da biomassa e da atividade microbiana, a adubação com uréia reduziu estes atributos biológicos e a aplicação de dejetos na forma líquida ao parecer não afetou os microrganismos do solo.

Houve acúmulo de Cu e Zn no solo relacionado à aplicação de dejetos suínos em sistema de plantio direto e verificaram-se incrementos nos teores de C orgânico e na biomassa microbiana, principalmente nos tratamentos com CS, não havendo indicações de diminuição da atividade dos microrganismos do solo após nove anos de adubação.

## 7 REFERÊNCIAS

AITA, C., GIACOMINI, S. Nitrato no solo com a aplicação de dejetos líquidos de suínos no milho em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 5, p. 2101–2111, 2008a.

AITA, C., GIACOMINI, S. Cama sobreposta e dejetos líquidos de suínos como fonte de nitrogênio ao milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 195 - 205, 2008b.

AITA, C., GIACOMINI, S., HUBNER, P. Nitrificação do nitrogênio amoniacal de dejetos líquidos de suínos em solo sob sistema de plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 95-102, 2007.

ALEFF, K., NANPIPERI, P. **Methods in applied soil biology and biochemistry**. London, Academic Press, 1995.

ALLISON, S.D., WEINTRAUB, M.N., GARTNER, T.B., WALDROP, M.P. Soil Enzymology. In: SHUKLA, G., VARMA, A. (Eds.) **Soil Biology**, v. 22, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 229-243.

AMARAL, A.L. do., MORES, N., VENTURA, L.V., et al. Ocorrência de linfadenite por *Mycobacterium avium* em suínos criados em cama de maravalha sobreposta. In: Congresso Latino Americano de Suinocultura; I Congresso de Suinocultura do Mercosul; III Congresso da Alvec. Foz do Iguaçu. **Anais dos trabalhos científicos...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002.

AMARAL SOBRINHO, N.M., BARRA, C.M., LÃ, O.R. Química dos metais pesados no solo. In: MELO, V., ALLEONI, L.R.F. **Química e mineralogia do solo: Parte II - Aplicações**. Viçosa, Mg, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009, p. 250-278.

ANDERSON, T.H., DOMSCH, K.H. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2039-2043, 2010.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. **Biology and Fertility of Soils**, v. 1, n. 2, p. 81-89, 1985.

ANDERSON, T.H., DOMCH, K.H. Application of eco-physiological quotients ( $qCO_2$  and  $qD$ ) on microbial biomass from soils of different cropping histories. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 22, p.251-255, 1990.

ARNOSTI, C. Microbial Extracellular Enzymes and their role in dissolved organic matter cycling. In: **Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter**. USA, Elsevier Science, 2003, p. 315-342.

ASSIS E.P.M., CORDEIRO, M.A.S., PAULINO, H.B Efeito da aplicação de nitrogênio na atividade microbiana e na decomposição da palhada de sorgo em solo de cerrado sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária tropical**, v. 33, n. 2, p. 107-112, 2007.

BALOTA, E.L., KANASHIRO, M., COLOZZI-FILHO, A., et al. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in subtropical agro-ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 300-306, 2004.

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

BANERJEE, M., BURTON, D., GRANT, C. Influence of urea fertilization and urease inhibitor on the size and activity of the soil microbial biomass under conventional and zero tillage at two sites. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 79, n. 2, p. 255-263, 1999.

BARTELS, H. Criação de suíno sobre cama. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 2, n. 2, p. 27-29, 2001.

BASSO, C.J., CERETTA, C.A., DURIGON, R., et al. Dejeito líquido de suínos: II—perdas de nitrogênio e fósforo por percolação no solo sob plantio direto. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1305 - 1312, 2005.

BEGON, M., TOWNSEND, C.R., HARPER J.L., Ecology: from

individuals to ecosystems. 4th ed. Oxford UK, Blackwell Publishing, 2006.

BELLI FILHO, P., CASTILHOS JÚNIOR, A.B., COSTA, R.H.R., et al. Tecnologias para o tratamento de dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande**, v.5, n.1, p.166-170, 2001.

BENCKISER, G., SIMARMATA, T., JAVA, W. Environmental impact of fertilizing soils by using sewage and animal wastes. **Fertilizer Research**, v. 37, p. 1-22, 1994.

BHATTACHARYYA, P., TRIPATHY, S., CHAKRABARTI, K., et al. Fractionation and bioavailability of metals and their impacts on microbial properties in sewage irrigated soil. **Chemosphere**, v. 72, n. 4, p. 543-50, 2008.

BHOGAL, A., NICHOLSON, F.A., CHAMBERS, B.J. Organic carbon additions: effects on soil bio-physical and physico-chemical properties. **European Journal of Soil Science**, v. 60, n. 2, p. 276-286, 2009.

BIEDERBECKL, V.O., CAMPBELL, C.A., UKRAINETZ, H., et al. Soil microbial and biochemical properties after ten years of fertilization with urea and anhydrous ammonia. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 76, p. 7-14, 1996.

BOTTOMLEY, P.J. Microbial ecology. In: SYLVIA, D.M. et al. (Eds.). Principles and applications of soil microbiology. New Jersey, Prentice Hall Inc., 1999, p. 149-167.

BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution. **Biology and Fertility of Soils**, v. 19, n. 4, p.269-279, 1995.

CERETTA, C., BASSO, C., VIEIRA, F. et al. Dejeito líquido de suínos : I - perdas de nitrogênio e fósforo na solução escoada na superfície do solo, sob plantio direto. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1296-1304, 2005.

CEPA - Centro de Socio-economia e Planejamento Agrícola. Levantamento Agropecuário de Santa Catarina - LAC, 2005. Disponível em: <http://cepa.epagri.sc.gov.br/>



CHAIGNON, V., QUESNOIT, M., HINSINGER, P. Copper availability and bioavailability are controlled by rhizosphere pH in rape grown in an acidic Cu-contaminated soil. **Environ. Pollut.**, v. 157 p. 3363-3369, 2009.

CHU, H., LIN, X., FUJII, T. et al. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 2971-2976, 2007.

DAS, S.K., VARMA, A. Role of enzymes in maintaining soil health. In: SHUKLA, G., VARMA, A. (Eds.) **Soil Enzymology**. v. 22, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg 2011, p.25-42.

DICK, R.P., Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: PANKHURST, C.; DOUBE, B.; GUPTA, V. (Eds.). **Biological indicators of soil health**. New York, Cab International, 1997, p. 211-223.

DICK, R.P.; BREAKWELL, D.P.; TURCO, R.F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J.; JONES, A. (Eds.). **Methods for assessing soil quality**. Madison, Usa., Soil Science Society of America, 1996. p. 247-271.

DORTZBACH, D. Dinâmica de atributos físicos e químicos em solo sob plantio direto adubado com dejetos suínos e uréia. *Disertação (Mestrado em Agroecossistemas)*. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009

DOURMAD, J., JONDREVILLE, C. Impact of nutrition on nitrogen, phosphorus, Cu and Zn in pig manure, and on emissions of ammonia and odours. **Livestock Science**, v. 112, n. 3, p. 192-198, 2007.

EDMEADES, D.C. The long-term effects of manures and fertilisers on soil productivity and quality: a review. **Nutrient Cycling In Agroecosystems**, v. 66, p.165-180, 2003.

EGHBALL, B., WIENHOLD, B.J., GILLEY, J.E., EIGENBERG, R.A. Mineralization of manure nutrients. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 57, n. 6, p. 470-473, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. CNPS.

Sistema brasileiro de classificação de solos. 2. Ed. Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006.

FATMA – Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina – Instrução Normativa 11. Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br>.

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

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45., 2000, São Carlos. Programas e resumos... São Carlos, SP: UFSCAR, 2000.p. 255-258.

FREY, S.D., ELLIOTT, E.T., PAUSTIAN, K., PETERSON, G.A. Fungal translocation as a mechanism for soil nitrogen inputs to surface residue decomposition in a no-tillage agroecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 689-698, 2000.

FROSSARD, A., GERULL, L., MUTZ, M., GESSNER, M.O. Disconnect os microbial structure and function: enzyme activities and bacterial communities in nascent stream corridors. **The ISME Journal**, v. 12, p. 680 – 691, 2012.

GATIBONI, L.C., BRUNETTO, G., KAMINSKI, J., RHEINHEIMER, D.S., CERETTA, C.A., BASSO, C.J. Formas de fósforo no solo após sucessivas adições de dejetos líquidos de suínos em pastagem natural. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32 p.1753-1761, 2008.

GE, G., LI, Z., FAN, F. et al. Soil biological activity and their seasonal variations in response to long-term application of organic and inorganic fertilizers. *Plant and Soil*, v. 326, n. 1-2, p. 31-44, 2009.

GESSNER, M.O., SWAN, C.M., DANG, C.K. et al. Diversity meets decomposition. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 372-380, 2010.

GIACOMINI, S. Avaliação e modelização da dinâmica de carbono e nitrogênio em solo com o uso de dejetos de suínos. Tese (Doutorado em Ciência do solo). Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

GIACOMINI, S., AITA, C., CARVALHO MIOLA, E., RECOUS, S. Mineralização do carbono da palha de aveia e dejetos de suínos aplicados na superfície ou incorporados ao solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 2661-2668, 2008 a.

GIACOMINI, S., AITA, C. Emissão de dióxido de carbono após aplicação de dejetos líquidos e cama sobreposta de suínos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 107-114, 2008 b.

GILLER, K.E., WITTER, E., McGRATH, S.P. Heavy metals and soil microbes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 2031-2037, 2009.

GIROTTTO, EDUARDO. Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas cultivadas em solos com acúmulo de cobre e zinco. Tese (Doutorado em Ciência do solo), Universidade Federal de Santa Maria. 2010.

GIROTTTO, E., CERETTA, C.A., BRUNETTO, G. et al. Acúmulo e formas de cobre e zinco no solo após aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos. **Engenharia Agrícola**, v. 34, p. 955-965, 2010.

GRIFFITHS, B.S., WHEATLEY, R.E., OLESEN, T. et al. Dynamics of nematodes and protozoa following the experimental addition of cattle or pig slurry to soil. **Science**, v. 30, n. 10, p. 1379-1387, 1998.

GUERRERO, C., MORAL, R., GÓMEZ, I., et al. Microbial biomass and activity of an agricultural soil amended with the solid phase of pig slurries. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3259-3264, 2007.

GUO, P., WANG, C., JIA, Y. et al. Responses of soil microbial biomass and enzymatic activities to fertilizations of mixed inorganic and organic nitrogen at a subtropical forest in East China. **Plant and Soil**, v. 338, n. 1-2, p. 355-366, 2010.

HADLICH, G., SCHEIBE, L. Dinâmica físico-química de águas superficiais em região de intensa criação de suínos: exemplo da bacia hidrográfica do rio Coruja-Bonito, Município de Braço do Norte, SC. **Geochimica Brasiliensis**, v. 21, n. 3, p. 245-260, 2007.

HAN, F.X. et al. Accumulation, distribution and toxicity of copper in

soils of catfish pond receiving periodic copper sulfate applications. **Journal Environmental of Quality**, v. 30, p. 912–919, 2001.

HARRIS, J.A., TYRREL, S.F., RITZ, K. et al. Does soil biology hold the key to optimized slurry management? A manifesto for research. **Soil Use and Management**, v. 27, n. 4, p. 464-469, 2011.

HARRISON, J.J., CERI, H., TURNER, R.J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 928-38, 2007.

HAYNES, R.J., NAIDU, R. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: a review. **Nutrient Cycling In Agroecosystems**, v. 51, n. , p.123-137, 1998.

HIGARASHI, M.M., OLIVEIRA, P.A.V., SILVA, V.S., AMARAL, A.L. Recomendações de Manejo de Sistema de Cama Sobreposta nas Fases de Crescimento e Terminação. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. 8p. (Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 430)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuario.pdf>. 2006.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/default\\_pdf.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/default_pdf.shtm). 2009.

ISLAM, K.R., WEIL, R.R. Soil quality indicator properties in mid-Atlantic soils as influenced by conservation management. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 55, n. 1, p. 69-78, 2000.

JENKINSON, D.S., POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—I. Fumigation with chloroform. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 167-177, 1976.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. USA. 4th ed. Taylor and Francis Group, 2011.

KANCHIKERIMATH, M., SINGH, D. Soil organic matter and

biological properties after 26 years of maize–wheat–cowpea cropping as affected by manure and fertilization in a Cambisol in semiarid region of India. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 86, p. 155-162, 2001.

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

KAYE, J.P., HART, S.C. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 139-143, 1997.

KUNZ, A., HIGARASHI, M.M., OLIVEIRA, P.A. Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, v. 22, n 3, p. 652-665, 2005.

LAAD, F.N. **Origin and range of enzymes in soil**. In: BURNS, R.G (Ed.). **Soil Enzymes**. New York, Academic Press, 1978. p. 51-97.

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

LANE, N. Grassland soil microbial biomass and accumulation of potentially toxic metals from long-term slurry application. **Journal of Applied Ecology**, p. 597-612, 1989.

LEITA, L., DE NOBILI, M., MONDINI, C. et al. Influence of inorganic and organic fertilization on soil microbial biomass, metabolic quotient and heavy metal bioavailability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, n. 4, p. 371–376, 1999.

LIPOTH, S.L., SCHOENAU, J.J. Copper, zinc, and cadmium accumulation in two prairie soils and crops as influenced by repeated applications of manure. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 170, n. 3, p. 378-386, 2007.

LOURENZI, C.R., CERETTA, C.A., SILVA, L.S., et al. Atributos

químicos relacionados a acidez em solo com sucessivas aplicações de dejetos líquidos de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 5, p. 1827 – 1836, 2011.

MATTIAS, J.L. Metais pesados em solos sob aplicação de dejetos líquidos de suínos em duas microbacias hidrográficas de Santa Catarina. Tese (Doutorado em Ciência do solo) Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria. 2006

MATTIAS, J.L., CERETTA, C.A., NESI, C.N. et al. Copper, zinc and manganese in soils of two watersheds in Santa Catarina with intensive use of pig slurry. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1445–1454, 2010.

MEURER, E.J., BISSANI, C., SELBACH, P.A. Poluentes do solo e do ambiente. In: MEURER, E.J. (Ed.). **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre, Genesis, 2000, p. 151-169.

McGUIRE, K.L., TRESEDER, K.K. Microbial communities and their relevance for ecosystem models: Decomposition as a case study. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 529-535, 2010.

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

OLIVEIRA, Paulo A. A escolha do sistema para o manejo dos dejetos de suínos uma difícil decisão. Concórdia, 2000. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br>.

PARKIN, T.; DORAN, J.; FRANCO - VIZCAÍNO, E. Field and laboratory test of soil respiration. In: Doran; J., Jones A. (Eds.); **Methods for Assessing Soil Quality**. Soil Science Society of America. p.231 - 246, New York, 1996

PLAZA, C., HERNÁNDEZ, D., GARCÍA-GIL, J.C., POLO, A. Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1577-1585, 2004.

PLAZA, C., SENESI, N., GARCÍA-GIL, J.C. et al. Effects of pig slurry application on soils and soil humic acids. **Journal of agricultural and**

**food chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4867-4874, 2002.

PLAZA, C., GARCÍA-GIL, J.C., POLO, A. Microbial activity in pig slurry-amended soils under aerobic incubation. **Biodegradation**, v. 18, n. 2, p. 159-165, 2007.

SILVA, I.R; MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R., ALVAREZ, V., BARROS, N.F, et al. (Eds.) **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.275-374.

SAVIOZZI, A., LEVI-MINZI, R., RIFFALDI, R., et al. Laboratory studies on the application of wheat straw and pig slurry to soil and the resulting environmental implications. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 61, n. 1, p. 35-43, 1997.

SCHJONNING, P. et al. Organic matter and soil tilth in arable farming: management makes a difference within 5-6 years. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 122, p.157-172, 2007.

SCHJONNING, P., CHRISTENSEN, B.T., CARSTENSEN, B. Physical and chemical properties of a sandy loam receiving animal manure, mineral fertilizer or no fertilizer for 90 years. **European Journal Of Soil Science**, v. 45, p.257-268, 1994.

SCHNURER, J., ROSSWALL, T. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1256-1261, 1982.

SCHERER, E.E., AITA, C., BALDISSERA, I.T. Avaliação da qualidade do esterco líquido de suíno da região Oeste Catarinense para fins de utilização como fertilizante. Florianópolis, EPAGRI, 1996. 46p. (Boletim Técnico)

SILVA FILHO, A.V., SILVA, M.I.V. Importância das Substâncias Húmicas para a Agricultura. In: Inhame: II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro, 2002. João Pessoa, PB. Anais... João Pessoa, PB: EMEPA-PB, 2002. v. 2, 234 p.

SINGH, H.; SINGH, K. Effect of residue placement and chemical fertilizer on soil microbial biomass under tropical dryland cultivation. **Biology and Fertility of Soils**, v. 16, n. 4, p. 275–281, 1993.

SPARLING, G.P. Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. In: PANKHURST, C.E., DOUBE, B.M., GUPTA, V. (Eds.) **Biological indicators of soil health**. New York, CAB International, 1997, p. 97-119.

STEINBERGER, Y., SHORE, L. Soil Ecology and Factors affecting biomass. In: PRUDEN, A., SHORE, L.S. (Eds.), **Hormones and Pharmaceuticals Generated by Concentrated Animal Feeding Operations**. New York, Springer, 2009. p.53-61.

TABATABAI, M.A. Enzymes. In: WEAVER, R.W., AUGLE, S., BOTTOMLY, P.J. et al. (Eds.). **Methods of soil analysis**. Part 2. Microbial and biochemical properties. Madison: SSSA, 1994. p. 775-833.

TEDESCO, M.J., GIANELLO, C., BISSANI, C.A., BOHNEN, H., VOLKWEISS, S.J. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2. Ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Boletim Técnico, n° 5. 174 p., 1995.

TIQUIA, S.M. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 764-775, 2002.

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

VIEIRA, F.C.B., HERBES, M.G., CERETTA, C.A. et al. Uso de esterco líquido de suínos na agricultura e evolução de CO<sub>2</sub>. In: **Fertbio 2004 - Avaliação das Conquistas: Bases para estratégias futuras**, Lages. Resumos. Lages: CBCS/UDESC, 19 a 23 de julho de 2004.

WAGNER, G.H., WOLF, D.C. Carbon transformations and soil organic matter formation. In: SYLVIA, D.M. et al. (Eds.) **Principles and applications of soil microbiology**. Usa., Prentice Hall, Inc., 1999, p. 218-258.

WARDLE, D.A., GHANI, A.A. Critique of the microbial metabolic quotient. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 12, p. 1601-1610, 1995.



ZHANG, Y.G., YIN, Y.L., FANG, J., WANG, Q.I. Pig production in subtropical agriculture. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 92, n 5, p 1016 – 1024, 2011.

## 8 Anexo 1

# Métodos utilizados para avaliação da atividade microbiana do solo.

### 1. Purificação do clorofórmio

#### Princípio

O clorofórmio comercial é aditivado com etanol para estabilizá-lo, aproveitando que o etanol é uma substância polar e o clorofórmio não, usa-se água como veículo para extrair o etanol da solução.

#### Reagentes:

Clorofórmio

Água destilada

Sulfato de sódio anidro

Papel filtro

#### Procedimento

Em um recipiente para decantação, misturar 200 mL de clorofórmio e 200 mL de água destilada, agitar de maneira tal que os dois líquidos se misturem bem, mais de forma vagarosa durante 3 minutos, deixar em repouso até decantar. Como o clorofórmio é mais denso do que a água, ele vai ficar no fundo do recipiente. Tirar a água e repetir o procedimento três vezes, repondo a cada vez os 200 mL de água destilada e descartando a água usada. Na terceira repetição, depois de tirar a água adicionar ao clorofórmio 50 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e agitar vigorosamente, filtrar a vácuo e armazenar em vidro escuro na geladeira.

## 2. Cálculo do teor de umidade das amostras de solo

Em cachimbo metálico ou de porcelana, pesar 10 gramas de solo. Registrar o peso do recipiente. Levar a secar em estufa a 105°C durante 24 horas. Pesar novamente, descontar o peso do recipiente e calcular o teor de umidade como segue:

$$\% \text{ de umidade} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) * 10$$

Assim por exemplo se o peso inicial foi de 40g e o peso final foi de 38g então a percentagem de umidade do solo é de 20 por cento e isso que dizer que por cada 100 gramas de solo úmido, vão ter 20 gramas de água.

Realizar este procedimento com cada uma das amostras de solo.

### 3. Estimativa do carbono da biomassa microbiana

#### Princípio

Vance et al. (1987) propuseram que o carbono orgânico que se torna extraível pelo  $K_2SO_4$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) após fumigação por 24 horas com clorofórmio (livre de álcool), é proveniente das células microbianas e pode ser usado para estimar a biomassa microbiana (CBM) do solo, tanto em solos neutros como ácidos.

O método baseia-se na oxidação do carbono orgânico, mediante redução do dicromato de potássio em meio ácido como mostrado na seguinte reação:



O dicromato de potássio excedente na reação anterior é titulado com sulfato ferroso amoniacal, como indicado seguir:



#### Reagentes:

Sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ )  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$

Clorofórmio purificado ( $CH_3Cl_3$ )

Dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ )  $66,7 \text{ mmol L}^{-1}$

Ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) 98% p.a

Sulfato ferroso amoniacal ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ )  $33,3 \text{ mmol L}^{-1}$

Ácido fosfórico ( $H_3PO_3$ ) 88% p.a.

Difenilamina 1% (guardar em vidro escuro ou envolto em papel de alumínio na geladeira).

## Soluções

- Solução de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 87,14 g de  $K_2SO_4$  em 800 mL de água destilada e completar para 1 litro sob aquecimento e agitação. Preparar um dia antes da extração, a solução é rapidamente colonizada por microrganismos, razão pela qual não é recomendado armazená-la por mais tempo.
- Solução de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$   $66,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ): dissolver 19,62 g de  $K_2Cr_2O_7$  (o reagente deve ser previamente seco a  $130^\circ\text{C}$  por 1 hora antes de pesar a quantidade indicada) em 800 mL de água e completar para 1 litro. Armazenar na geladeira em vidro escuro.
- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$   $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ): diluir 40 mL de  $H_2SO_4$  concentrado em 800 mL de água destilada e completar para 1 litro. Armazenar em vidro escuro.
- Solução de sulfato ferroso amoniacal ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$   $33,3 \text{ mmol L}^{-1}$ ) dissolver 13,06 g de  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$  em 24 mL de ácido sulfúrico ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) e completar para 1 L com  $H_2O$  destilada. Preparar solução no dia da titulação das amostras, não é recomendado armazená-la.
- Difenilamina (1%): dissolver 1 g de difenilamina, em uma solução contendo 20 mL de água destilada mais 80 mL de  $H_2SO_4$  concentrado. Armazenar em vidro escuro na geladeira.

## Procedimento

A extração do carbono da biomassa microbiana têm quatro etapas: fumigação, extração, digestão e titulação, a continuação, são

apresentados os procedimentos que devem ser seguidos em cada uma dessas etapas. Em primeiro lugar, devem ser pesadas seis sub-amostras do solo a ser avaliado, cada uma correspondente a 20 g de solo úmido (ver acondicionamento das amostras) em vidros com capacidade para 100 mL, três das quais serão fumigadas enquanto as outras 3 servirão de controle. Se o solo a ser pesado, esteve armazenado na geladeira, é recomendável deixá-lo incubando em local escuro, a temperatura ambiente, durante um período de seis dias antes de começar a fumigação. Se após esse período de seis dias, as amostras apresentavam emergência de plântulas, é recomendável tirá-las antes de começar a fumigação.

- **Fumigação:** colocar as três sub-amostras a ser fumigadas em um dessecador contendo um beacker com 20 mL de NaOH e outro com 50mL de clorofórmio livre de álcool junto a algumas pérolas de vidro. Tampar o dessecador e, com a ajuda de uma bomba de vácuo, tirar o ar do interior dele, até a bomba marcar -600 mm de Hg. Repetir esta operação pelo menos três vezes até que o clorofórmio comece a borbulhar. Girar a tampa do dessecador para vedá-lo e deixá-lo em encubação durante 24 horas, em local escuro e a temperatura ambiente. Todo este procedimento deve ser feito em câmara de extração de gases e a manipulação do clorofórmio deve ser extremamente cuidadosa, sendo recomendado o uso de luvas. As três amostras deixadas para controle, devem passar pelo mesmo procedimento, só que no dessecador contendo essas amostras, não deve ser colocado o Becker com clorofórmio. No fundo dos dessecadores usados deve ser colocado papel toalha úmido, com o objetivo de conservar a umidade durante o tempo de incubação.
- **Extração:** Após as 24 horas de incubação depois da fumigação, os dessecadores devem ser submetidos a três vácuos mais, o objetivo é retirar o excesso de clorofórmio e evitar que as amostras de solo fiquem com o cheiro desse reagente, devido a que a inalação dessa substancia, pode prejudicar a saúde. Uma vez feito isso, pode-se prescindir da câmara de extração de gases. A extração é feita, colocando 50 mL de sulfato de potássio em cada uma das sub-

amostras e levando para agitação a 220 r.p.m durante 30 minutos. A agitação deve ser forte, e deve misturar todo o sulfato de potássio com o solo, uma vez que esta solução é o veículo para extrair o carbono. Deixar em repouso mais 30 minutos e depois proceder a filtrar o sobrenadante, com a ajuda de papel de filtro Whatman n° 42. O extrato assim obtido pode ser armazenado na geladeira (4°C) durante um máximo de cinco dias, durante o armazenamento pode acontecer a formação de cristais que não interferem no procedimento. O processo de extração é igual para as amostras que foram fumigadas e para seus respectivos controles.

- Digestão: em um Erlenmayer com capacidade maior a 25 mL, adicionar, respeitando a ordem, as seguintes soluções e reagentes, agitando suavemente depois de cada adição: 8 mL de extrato (obtido como explicado no ítem extração), 2mL de solução de dicromato de potássio, 10 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado e 5 mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) concentrado. Colocar em chapa aquecedora (300°C) a ferver por refluxo durante um tempo de 3 a 5 minutos. Tirar os vidros da chapa e deixar esfriar, acrescentar 10 mL de água destilada e agitar suavemente.

O mesmo procedimento deve ser feito com as sub-amostras fumigadas e com as não fumigadas. Todo o processo deve ser feito em câmara de extração de gases e deve tomar-se extremo cuidado na manipulação dos ácidos e do dicromato. A quantidade de dicromato adicionada deve ser medida com instrumento de precição uma vez que esse é o reagente que irá oxidar o carbono na amostra e, erros na sua medição podem causar erros importantes na estimação do CBM.

È necessaria a preparação de três brancos para calibrar a titulação, os quais vão ser chamados de brancos esquentados. Para prepará-los procede-se de igual forma que com as amostras, só que no lugar de extrato, colocam-se 8 mL de solução de sulfato de potássio, da mesma utilizada para a extração do carbono.

Também é necessário a preparação de outros três brancos que serão utilizados no cálculo da molaridade exata do sulfato ferroso amoniacal, para o qual se procede de igual maneira que com os brancos descritos no parágrafo anterior, porém, estes brancos não são levados à chapa aquecedora.

- Titulação: para titular, adicionar às amostras digeridas, três gotas de difenilamina (1%), misturar suavemente e titular com a solução de sulfato ferroso amoniacal até a mudança da cor azul escuro para verde translúcido. A titulação deve ser feita no mesmo dia da digestão. A titulação segue o mesmo padrão para as sub-amostras fumigadas e para aquelas não fumigadas.

### Cálculos

- Cálculo da normalidade exata do sulfato ferroso amoniacal:

$$N_{\text{exata}} = (V_a * N_a) * V_g^{-1}$$

Onde:

$V_a$  = Volume de  $K_2Cr_2O_7$  adicionado na preparação do branco frio

$N_a$  = Normalidade do  $K_2Cr_2O_7$

$V_g$  = Volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do branco frio.

NOTA: para calcular a normalidade do  $K_2Cr_2O_7$  utiliza-se a fórmula:

$$N = M * k$$

Onde

$k$  é a valência do  $K_2Cr_2O_7$  na reação de óxi-redução em meio ácido  
= 6

$M$  = molaridade do  $K_2Cr_2O_7$



- Cálculo do teor de carbono orgânico nas amostras de solo

$$C (\mu\text{g g}^{-1}) = (V_b - V_a) * N * 0,003 * 50 * (8 * PS)^{-1} * 10^6$$

Donde:

$V_b$  = Volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do branco esquentado

$V_a$  = Volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra

$N$  = Normalidade exata do sulfato ferroso amoniacal

0,003 = Equivalentes de carbono (mg)

Este valor é obtido pela divisão do peso molecular do carbono (12g) entre a valência desse elemento na molécula de  $\text{CO}_2$  (4), dividido por 1000 para expressar o valor em  $\text{mg} * (\text{meq g})^{-1}$

50 = volume de extrator ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) utilizado

8 = Alíquota de extrato utilizada na digestão.

$PS$  = Peso seco da amostra (matéria seca de 20 g de solo, calculada como indicado no ítem teor de umidade das amostras)

$10^6$  = Fator de multiplicação para as unidades de medida.

- O cálculo da biomassa microbiana é dado pela fórmula:

$$CBM (\mu\text{g g}^{-1}) = FC * Kc^{-1}$$

Onde:

$CBM$  = Carbono da biomassa microbiana em  $\mu\text{g g}$  de solo seco<sup>-1</sup>

FC = Diferencia entre o carbono extraído da sub-amostra de solo fumigada e o extraído da sub-amostra não fumigada

Kc = 0,33 que é o fator de correção do método, o qual foi obtido pelos autores da metodologia ao compará-lo com os resultados obtidos pelo método de fumigação – incubação.

#### 4. Respiração basal dos microrganismos do solo

##### Princípio

O  $\text{CO}_2$  produzido durante a respiração pelos microrganismos é capturado em uma solução de hidróxido de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . O hidróxido de sódio residual é titulado com solução de ácido clorídrico.

##### Materiais e Reagentes

Frascos de vidro com tampa, com capacidade para 500 mL

Erlenmayer de 125 mL

Solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ )  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$

Solução de cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ) 10% (m/v)

Fenolftaleína ( $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ) 1% (m/v) em etanol

Solução tris hidroxí amino metano ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )  $0,03 \text{ mol L}^{-1}$

Solução de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 1% (m/v)

Solução de  $\text{HCl}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$

##### **Soluções**

- Solução de hidróxido de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ : pesar 8,00 g de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), transferir para um Becker de 1000 mL, adicionar cuidadosamente 700 de água deionizada. Dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL aferindo o volume com água deionizada, após o resfriamento.
- Solução de cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ) 10% (m/v): pesar 10,00 g de cloreto de bário, transferir para um Becker de 100 mL e adicionar 60 mL de água deionizada, dissolver o sal por completo e transferir

quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL aferindo o volume com água deionizada

- Fenolftaleína ( $C_{20}H_{14}O_4$ ) 1% (m/v) em etanol: pesar 1,000 g de fenolftaleína e transferir para um Becker de 100 mL. Adicionar 50 mL de etanol ( $C_2H_5OH$ ) P.A.; dissolver e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e aferir o volume a 100 mL com o mesmo álcool.
- Solução tris hidroxí amino metano ( $C_4H_{11}NO_3$ )  $0,03\text{ mol L}^{-1}$ : pesar 3,6340 g de THAM, previamente seco em estufa a  $105^\circ\text{C}$  e transferir para um Becker de 1000 mL, dissolver o sal e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL, aferindo o volume com água deionizada.
- Solução de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) 1% (m/v): pesar 10,000 g de ácido bórico e dissolver em 900 mL de água deionizada acondicionando em um balão volumétrico de 1000 mL (Sol. A). Dissolver 0,100 g de vermelho de metila em um balão volumétrico de 100 mL aferindo o volume com metanol P.A (Sol. B). Dissolver 0,100 g de verde de bromocresol em um balão volumétrico de 100 mL aferindo o volume com metanol P.A. (Sol. C). Tomar 7 mL da “Sol. B” e 10 mL da “Sol. C” e adicionar no balão volumétrico contendo a “Sol. A”. Ajustar o pH da solução entre 5,0 – 6,0 usando gotas de NaOH ou HCl. Após ajuste do pH na faixa requisitada aferir o volume final com água deionizada.
- Solução de HCl  $0,2\text{ mol L}^{-1}$ : pipetar 19,72 mL de ácido clorídrico P.A. 37%, em capela de exaustão, em um Becker de 1000 mL contendo 500 mL de água deionizada. Homogeneizar a solução no Becker e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL, aferindo o valor com água deionizada.

### Procedimento

As amostras serão analisadas em triplicata, para isto a amostra inicial será dividida em três subamostras de 50 g acondicionadas nos frascos de 500 mL. O solo deve-se deixar incubando a temperatura ambiente durante seis dias, antes de começar as análises.

Para cada sub-amostra de solo, serão precisados 20 mL de NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup>, o qual deve ser colocado em Becker de 50 mL de capacidade. O Becker contendo o NaOH transfere-se imediatamente para o frasco de 500 mL, fechando ele e vedando com papel filme para que não haja entrada de CO<sub>2</sub> do ar externo ou fuga do CO<sub>2</sub> internamente produzido. Preparar um branco para cada batelada, colocando no frasco de 500 mL sem solo, um Becker com NaOH. Após realizar todo este preparo, deve-se anotar a hora e a data do início da análise, dado que será necessário para fazer posteriormente os cálculos. As amostras devem ser levadas a incubação durante 6 dias a temperatura ambiente e em local isento de luminosidade.

Após o processo de incubação, retirar do frasco de 500 mL o frasco contendo NaOH e adicionar 2 mL de BaCl<sub>2</sub> 10% (m/v) para a completa precipitação do CO<sub>2</sub>, adicionar duas gotas de fenolftaleína 1% (m/v) e titular sob agitação magnética com solução 0,2 mol L<sup>-1</sup> de HCl que posteriormente deve ser padronizada. Ao final da titulação a coloração da solução irá de rosa para incolor. O procedimento descrito deve ser realizado pegando uma amostra de cada vez, enquanto isso, as demais amostras devem ficar tampadas.

## Cálculos

- **Determinação da molaridade exata do ácido clorídrico**

Adicionar 50 mL da solução THAM e 10 mL da solução de ácido bórico em um Erlenmeyer, e titular sob agitação magnética com ácido clorídrico a ser determinado. Ao final da titulação a coloração da solução irá de verde para rosa. O cálculo da molaridade exata do HCl é feito da seguinte maneira:

$$M=(M_{\text{THAM}} * V_{\text{THAM}})/V$$

Onde,

M = molaridade do ácido clorídrico a ser determinada;

V = Volume de ácido clorídrico gasto na titulação;

$M_{\text{THAM}}$  = molaridade da solução THAM e

$V_{\text{THAM}}$  = Volume de THAM utilizado na titulação.

- **Cálculo da respiração basal do solo**

O cálculo da respiração basal do solo é dado pela seguinte equação:

$$\text{RB} = (\text{mg de C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo hora}^{-1}) = ((V_b - V_a) \cdot M \cdot 6.1000) / \text{PS} / t$$

Onde:

RB = Respiração basal do solo

$V_b$  (mL) = volume de ácido clorídrico gasto na titulação da solução controle (branco)

$V_a$  (mL) = volume gasto na titulação da amostra

M = molaridade exata do HCl

PS = peso seco da amostra em g

t = tempo de incubação da amostra em horas

## 5. Determinação da hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF)

A hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) indica a atividade de proteases, lípases e esterases do solo, que atuam sobre este substrato, liberando fluoresceína, que é uma substância com coloração verde-amarelada.

### Materiais:

- Mesa agitadora
- pHmetro
- Papel filtro Whatman 42
- Centrífuga
- Tubos tipo Falcon.
- Centrífuga
- Espectrofotômetro

### **Soluções**

- Solução tampão ou buffer fosfato de sódio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  60mM, pH 7,6). Dissolver 22,74g de fosfato de sódio em 800 ml de água. Ajustar o pH para 7,6 com ácido clorídrico (1N).
- Solução de diacetato de fluoresceína (Sigma F-7378) (4,8 mM):
- Passo A: Dissolver 0,5 g de diacetato de fluoresceína em 250 mL de buffer fosfato de sódio pH 7,6. Armazenar a 4° C (Solução A).
- Passo B: Pegar 10 mL da solução A e levar a 1000 mL, usando buffer fosfato pH 7,6.
- Solução padrão de fluoresceína sódica (2,6 mM). Dissolver 0,5 g de fluoresceína sódica (Sigma F6377) em 500 mL de água.
- Acetona

**Procedimento:**

As análises devem ser feitas em duplicata (duas análises por amostra). A continuação é descrito o procedimento para cada uma:

1. Pesar 1g de solo úmido em tubo Falcon de 50 mL



2. Adicionar 20 mL de buffer fosfato e agitar por 15 min.



3. Adicionar 12,5 mL de solução de diacetato de fluoresceína e 12,5 mL de buffer fosfato, agitar por 2h a 35 °C.



4. Adicionar 5 mL de acetona e misturar para interromper a reação.



1. Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos e filtrar o sobrenadante com papel Watman # 42



6. Medir absorbância em espectrofotômetro a 490 nm



**Preparação do controle:**

Preparar uma amostra controle para cada amostra de solo

1. Pesar 1g de solo úmido em tubo Falcon de 50 mL



2. Adicionar 20 mL de solução tampão e agitar por 15 min.



3. Agitar por 2h a 25°C



4. Adicionar 5mL de acetona.



5. Adicionar 12,5 mL de solução de diacetato de fluoresceína e 12,5 mL de buffer fosfato.



6. Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos e filtrar o sobrenadante com papel Watman # 42



Medir absorvância em espectrofotômetro a 490 nm

### Preparação da curva padrão:

A quantidade de fluoresceína liberada após a hidrólise é calculada por interpolação em uma curva padrão preparada com as seguintes concentrações: 2,5 – 5,0 – 7,5 – 10,0 e 12,5 µg de fluoresceína/mL.

Para realizar a curva, procede-se conforme tabela abaixo. A solução padrão da curva (SPC) é obtida pipetando 5,0 mL da solução padrão de fluoresceína sódica em um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com acetona e homogeneizando bem a solução.

SPC (mL)	Solução tampão	Acetona	Volume total
0	20	20	40
1	20	19	40
2	20	18	40
3	20	17	40
4	20	16	40
5	20	15	40

Se a intensidade da cor do filtrado exceder os 12,5 µg de fluoresceína, uma alíquota do filtrado deve ser diluída com solução tampão até que fique dentro dos limites da curva padrão.

### Cálculo:

Fluoresceína (F) ( $\mu\text{g de F g solo seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) =

$$(Z \times V) + (PS \times PSU \times t)$$

Sendo que  $Z = A - C$

Onde:

$A$  = Média das duas concentrações obtidas por interpolação na curva padrão (leitura das amostras)

$C$  = Concentração obtida por interpolação na curva padrão durante a leitura do controle.

$V$  = Volume total (em mL) da suspensão do solo (50 mL)

$PS$  = Peso seco (em gramas) de 1 grama de solo

$PSU$  = Gramas de solo usadas na análise (1 g)

$t$  = Tempo de incubação em horas (2 horas)

## 2. Quantificação da enzima $\beta$ -glucosidase

As  $\beta$ -glucosidases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólises de ligações glicosídicas  $\beta$  1-4, típicas de polímeros como a celulose. Estão amplamente distribuídas na natureza, no solo são produzidas principalmente por fungos. O método apresentado a continuação esta baseado na determinação colorimétrica do *p* – nitrofenol liberado pela ação da  $\beta$ -glucosidase sobre o *p*-nitrofenil-  $\beta$ - D-glucosideo quando o solo é incubado com uma solução tampão (pH 6,0).

### Materiais:

- Espectrofotômetro
- pHmetro
- Banho María
- Filtro de papel Whatman # 42

### **Soluções:**

- Tampão universal (MUB), solução estoque: dissolver 12,1 g tris (hidroximetil) aminometano (THAM); 11,6 g de ácido maleico; 14 g de ácido cítrico e 6,3 g de  $H_3BO_3$  em 488 mL de NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e diluir a solução para 1000 mL com água destilada. Armazenar a solução em geladeira a  $4^\circ\text{C}$ .
- Tampão universal (MUB), pH 6,0: pipetar 200 mL da solução estoque MUB em um beaker de 500 mL e titular a solução com HCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) até atingir pH 6,0. Transferir para um balão volumétrico 1000 mL e completar o volume com água destilada.
- Solução PNG (*p*-nitrofenil-  $\beta$ -D-glucosideo  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 0,377 g de PNG em 40 mL de MUB (pH 6,0), após a dissolução, completar a solução para 50 mL com MUB (pH 6,0). Estocar a solução em geladeira.
- $CaCl_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 73,5 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  em 700 mL de água destilada, completar o volume para 1000 mL com água destilada.

- NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 20 g de NaOH em 700 mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL com água destilada.
- THAM ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 10: dissolver 12,2 g de THAM em 800 mL de água destilada, ajustar o pH para 10, adicionando NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e completar o volume para 1000mL.
- THAM ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 12: dissolver 12,2 g de THAM em 800 mL de água destilada, ajustar o pH para 12, adicionando NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e completar o volume para 1000 mL.
- Solução padrão de PNF (*p* – nitrofenol): dissolver 0,1 g de *p* – nitrofenol em 70 mL de água destilada e completar a solução para 100 mL com água destilada. Armazenar a solução em frasco escuro e em geladeira.

## Procedimento

As análises devem ser feitas em duplicata (duas análises por amostra). A continuação é descrito o procedimento para cada uma:

1. Pesar 1,0 g de solo em tubo Falcon de 15 mL



2. Adicionar 0,25 mL de tolueno, 4 mL de MUB (pH 6) e 1,0 mL de solução PNG, agitar o frasco por alguns segundos até misturar o conteúdo.



3. Fechar o frasco e incubar em banho Maria por 1 hora a 37 °C



4. Adicionar 1,0 mL de solução  $\text{CaCl}_2$  e 4,0 mL do tampão THAM (pH 12), agitar por alguns segundos até misturar.



5. Filtrar a solução com papel Whatman # 42.



6. Medir absorvância em espectrofotômetro a 410 nm.

**Preparação do controle:**

1. Pesar 1,0 g de solo em tubo Falcon de 15 mL



2. Adicionar 0,25 mL de tolueno, 4 mL de MUB (pH 6), agitar o frasco por alguns segundos até misturar o conteúdo.



3. Fechar o frasco e incubar por 1 hora a 37°C



4. Adicionar 1,0 mL de solução  $\text{CaCl}_2$  e 4,0 mL do tampão THAM (pH 12), agitar por alguns segundos até misturar.



Adicionar 1,0 mL de solução PNG e misturar.



5. Filtrar a solução com papel Whatman # 42.



6. Medir absorvância em espectrofotômetro a 410 nm.

### 3. Preparação da curva padrão:

A quantidade de PNF liberado após a hidrólise é calculada por interpolação em uma curva padrão preparada com as seguintes concentrações: 0, 1, 2, 3, 4 e 5  $\mu\text{g}$  de PNF/mL.

Para realizar a curva, procede-se conforme tabela abaixo. A solução padrão da curva (SPC) é obtida pipetando 1,0 mL da solução padrão de PNF em um balão volumétrico de 100 mL, completando com água destilada.

SPC (mL)	Água destilada	CaCl <sub>2</sub> (0,5 mol L <sup>-1</sup> )	NaOH (0,5 mol L <sup>-1</sup> )	Total (mL)
0	5	1	4	10
1	4	1	4	10
2	3	1	4	10
3	2	1	4	10
4	1	1	4	10
5	0	1	4	10

Se a intensidade da cor do filtrado exceder os 5  $\mu\text{g}$  de PNF, uma alíquota do filtrado deve ser diluída com THAM (pH 10) até que fique dentro dos limites da curva padrão.

#### Cálculo:

$p$  – nitrofenol ( $\mu\text{g}$  de PNF g solo seco<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) =

$$(Z \times V) + (PS \times PSU \times t)$$

Sendo que  $Z = A - C$



Onde:

$A$  = Média das duas concentrações obtidas por interpolação na curva padrão (leitura das amostras)

$C$  = Concentração obtida por interpolação na curva padrão durante a leitura do controle.

$V$  = Volume total (em mL) da suspensão do solo (10 mL)

$PS$  = Peso seco (em gramas) de 1 grama de solo

$PSU$  = Gramas de solo usadas na análise (1 g)

$t$  = Tempo de incubação em horas (1 hora)

#### 4. Quantificação da enzima fosfatase ácida.

A fosfatase participa do ciclo do fósforo, promovendo a liberação do P na forma iônica ( $\text{H}_2\text{PO}_4$ ), que é utilizado pelas plantas e microrganismos. Ela catalisa a hidrólise dos ésteres de fosfato e é capaz de agir sobre grande número de substratos mais com velocidades diferentes.

A mensuração da atividade da fosfatase é baseada na leitura em espectrofotômetro do  $p$  – nitrofenol resultante da atividade enzimática da fosfatase ácida.

##### Materiais:

- Espectrofotômetro
- pHmetro
- Banho María
- Filtro de papel Whatman # 42

##### **Soluções:**

- Tampão universal (MUB), solução estoque: dissolver 12,1 g tris (hidroximetil aminometano THAM); 11,6 g de ácido maleico; 14 g de ácido cítrico e 6,3 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  em 488 mL de NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e diluir a solução para 1000 mL com água destilada. Armazenar a solução em geladeira a  $4^\circ\text{C}$ .
- Tampão universal (MUB), pH 6,5: pipetar 200 mL da solução estoque MUB em um beaker de 500 mL e titular a solução com HCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) até atingir pH 6,5. Transferir para um balão volumétrico 1000 mL e completar o volume com água destilada.
- Solução PNP (p-nitrofenil- fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 0,840 g de PNP em 40 mL de MUB (pH 6,5), após a dissolução, completar a solução para 50 mL com MUB (pH 6,5). Estocar a solução em geladeira.

- $\text{CaCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 73,5 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 700 mL de água destilada, completar o volume para 1000 mL com água destilada.
- $\text{NaOH}$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 20 g de  $\text{NaOH}$  em 700 mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL com água destilada.
- Solução padrão de PNF (*p*-nitrofenol): dissolver 0,1 g de *p*-nitrofenol em 70 mL de água destilada e completar a solução para 100 mL com água destilada. Armazenar a solução em frasco escuro e em geladeira.

## Procedimento

As análises devem ser feitas em duplicata (duas análises por amostra). A continuação é descrito o procedimento para cada uma:

1. Pesar 1,0 g de solo em tubo Falcon de 15 mL



2. Adicionar 0,25 mL de tolueno, 4 mL de MUB (pH 6,5) e 1,0 mL de solução PNP, agitar o frasco por alguns segundos até misturar o conteúdo.



3. Fechar o frasco e incubar em banho Maria por 1 hora a 37 °C



4. Adicionar 1,0 mL de solução  $\text{CaCl}_2$  e 4,0 mL de  $\text{NaOH}$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), agitar por alguns segundos até misturar.



5. Filtrar a solução com papel Whatman # 42.



6. Medir absorvância em espectrofotômetro a 410 nm.

**Preparação do controle:**

1. Pesar 1,0 g de solo em tubo Falcon de 15 mL



2. Adicionar 0,25 mL de tolueno, 4 mL de MUB (pH 6,5), agitar o frasco por alguns segundos até misturar o conteúdo.



3. Fechar o frasco e incubar por 1 hora a 37°C



4. Adicionar 1,0 mL de solução  $\text{CaCl}_2$  e 4,0 mL de  $\text{NaOH}$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), agitar por alguns segundos até misturar.



Adicionar 1,0 mL de solução PNP e misturar.



5. Filtrar a solução com papel Whatman # 42.



6. Medir absorvância em espectrofotômetro a 410 nm.

### Preparação da curva padrão:

A quantidade de PNF liberado após a hidrólise é calculada por interpolação em uma curva padrão preparada com as seguintes concentrações: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg de PNF/mL.

Para realizar a curva, procede-se conforme tabela abaixo. A solução padrão da curva (SPC) é obtida pipetando 1,0 mL da solução padrão de PNF em um balão volumétrico de 100 mL, completando com água destilada.

SPC (mL)	Água destilada	CaCl <sub>2</sub> (0,5 mol L <sup>-1</sup> )	NaOH (0,5 mol L <sup>-1</sup> )	Total (mL)
0	5	1	4	10
1	4	1	4	10
2	3	1	4	10
3	2	1	4	10
4	1	1	4	10
5	0	1	4	10

Se a intensidade da cor do filtrado exceder os 5 µg de PNF, uma alíquota do filtrado deve ser diluída com água destilada até que fique dentro dos limites da curva padrão.

#### Cálculo:

$$p\text{-nitrofenol } (\mu\text{g de PNF g solo seco}^{-1} \text{ h}^{-1}) = (Z \times V) + (PS \times PSU \times t)$$

Sendo que  $Z = A - C$

Onde:

$A$  = Média das duas concentrações obtidas por interpolação na curva padrão (leitura das amostras)

$C$  = Concentração obtida por interpolação na curva padrão durante a leitura do controle.

$V$  = Volume total (em mL) da suspensão do solo (10 mL)

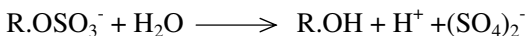
$PS$  = Peso seco (em gramas) de 1 grama de solo

$PSU$  = Gramas de solo usadas na análise (1 g)

$t$  = Tempo de incubação em horas (1 hora)

## 5. Quantificação da enzima aril-sulfatase

As sulfatases catalisam a hidrólise de ésteres orgânicos de sulfato. A arilsulfatase é uma enzima do grupo das sulfatases, detectada em microrganismos, animais e plantas, ela catalisa a seguinte reação irreversível:



A atividade da arilsulfatase decresce com a profundidade do solo e correlaciona-se com o teor de carbono orgânico, o nitrogênio total e a capacidade de troca de cátions.

### Materiais:

- Espectrofotômetro
- pHmetro
- Banho María
- Filtro de papel Whatman # 12

### **Soluções:**

- Tampão universal (MUB), solução estoque: dissolver 12,1 g tris (hidroximetil) aminometano (THAM); 11,6 g de ácido maleico; 14 g de ácido cítrico e 6,3 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  em 488 mL de NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e diluir a solução para 1000 mL com água destilada. Armazenar a solução em geladeira a  $4^\circ\text{C}$ .
- Solução tampão de acetato ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 5,8): Dissolver 68 g de acetato de sódio tri-hidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) em 700 mL de água destilada. Ajustar o pH para 5,8 usando ácido acético concentrado. Completar o volume para 1000 mL com água destilada.
- Solução PNS (p-nitrofenil- sulfato  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 0,312 g de p-nitrofenil – sulfato em 40 mL de buffer acetato e diluir a solução para 50 mL com a solução tampão de acetato. Estocar a solução a  $4^\circ\text{C}$ .



- $\text{CaCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 73,5 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 700 mL de água destilada, completar o volume para 1000 mL com água destilada.
- $\text{NaOH}$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 20 g de  $\text{NaOH}$  em 700 mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL com água destilada.
- Solução padrão de PNF (*p*-nitrofenol): dissolver 0,1 g de *p*-nitrofenol em 70 mL de água destilada e completar a solução para 100 mL com água destilada. Armazenar a solução em frasco escuro e em geladeira.

**Procedimento**

As análises devem ser feitas em duplicata (duas análises por amostra). A continuação é descrito o procedimento para cada uma:

1. Pesar 1,0 g de solo em tubo Falcon de 15 mL



2. Adicionar 0,25 mL de tolueno, 4 mL de solução tampão de acetato e 1,0 mL de solução PNS, agitar o frasco por alguns segundos até misturar o conteúdo.



3. Fechar o frasco e incubar em banho Maria por 1 hora a 37 °C



4. Adicionar 1,0 mL de solução  $\text{CaCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 4,0 mL de NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), agitar por alguns segundos até misturar.



5. Filtrar a solução com papel Whatman # 42.



6. Medir absorvância em espectrofotômetro a 410 nm.

**Preparação do controle:**

1. Pesar 1,0 g de solo em tubo Falcon de 15 mL



2. Adicionar 0,25 mL de tolueno, 4 mL de solução tampão de acetato, agitar o frasco por alguns segundos até misturar o conteúdo.



3. Fechar o frasco e incubar por 1 hora a 37°C



4. Adicionar 1,0 mL de solução  $\text{CaCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 4,0 mL de  $\text{NaOH}$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), agitar por alguns segundos até misturar.



Adicionar 1,0 mL de solução PNS e misturar.



5. Filtrar a solução com papel Whatman # 42.



6. Medir absorbância em espectrofotômetro a 410 nm.

### Preparação da curva padrão:

A quantidade de PNF liberado após a hidrólise é calculada por interpolação em uma curva padrão preparada com as seguintes concentrações: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg de PNF/mL.

Para realizar a curva, procede-se conforme tabela abaixo. A solução padrão da curva (SPC) é obtida pipetando 1,0 mL da solução padrão de PNF em um balão volumétrico de 100 mL, completando com água destilada.

SPC (mL)	Água destilada	CaCl <sub>2</sub> (0,5 mol L <sup>-1</sup> )	NaOH (0,5 mol L <sup>-1</sup> )	Total (mL)
0	5	1	4	10
1	4	1	4	10
2	3	1	4	10
3	2	1	4	10
4	1	1	4	10
5	0	1	4	10

Se a intensidade da cor do filtrado exceder os 5 µg de PNF, uma alíquota do filtrado deve ser diluída com THAM (pH 10) até que fique dentro dos limites da curva padrão.

Cálculo:

$$p\text{-nitrofenol } (\mu\text{g de PNF g solo seco}^{-1} \text{ h}^{-1}) = (Z \times V) + (PS \times PSU \times t)$$

Sendo que  $Z = A - C$

Onde:

$A$  = Média das duas concentrações obtidas por interpolação na curva padrão (leitura das amostras)

$C$  = Concentração obtida por interpolação na curva padrão durante a leitura do controle.

$V$  = Volume total (em mL) da suspensão do solo (10 mL)

$PS$  = Peso seco (em gramas) de 1 grama de solo

$PSU$  = Gramas de solo usadas na análise (1 g)

$t$  = Tempo de incubação em horas (1 hora)

**NOTA:** Todas as análises descritas devem ser feitas o mais rápido possível depois de coletar o solo; porém, em caso de ser necessário, o solo poderá ser armazenado em geladeira, a 4 °C por algumas semanas. Nesse caso, é recomendável fazer um período de incubação a temperatura ambiente, durante pelo menos 6 dias antes da realização das análises.