

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Substância húmica e seu efeito em atributos químicos e biológicos do solo e
na produção vegetal**

Cristiane Alcantara dos Santos

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas

**Piracicaba
2014**

Cristiane Alcantara dos Santos
Engenheira Agrônoma

Substância húmica e seu efeito em atributos químicos e biológicos do solo e na produção vegetal

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Santos, Cristiane Alcantara dos

Substância húmica e seu efeito em atributos químicos e biológicos do solo e na produção vegetal / Cristiane Alcantara dos Santos.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

92 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Ácidos orgânicos 2. Atividade biológica 3. Ciclagem de nutrientes
4. Disponibilidade de fósforo I. Título

CDD 631.417
S237s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

**Aos meus pais, Luzia e José Carlos,
À minha irmã Luana,
Ao meu afilhado Luca,
Ao meu namorado Daniel.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades e desafios que sempre colocou na minha vida e por ter me ajudado a passar por cada um deles.

Aos meus pais, Luzia e José Carlos, e minha irmã Luana. Vocês são minha força para ir sempre em frente e ser sempre melhor. Às minhas tias Malu e Rosângela, sempre com uma palavra de carinho nos momentos mais complicados. Ao meu afilhado Luca, a alegria da minha vida. Ao meu namorado, amigo e parceiro Daniel, obrigada por estar comigo nessa caminhada, tanto acadêmica quanto da vida.

À professora Elke Cardoso pela orientação, amizade e confiança.

Aos colegas e amigos de laboratório pela ajuda, amizade e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial à Carolina Caetano e ao Thiago Gumière pelo envolvimento e ajuda em todos os momentos.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do Solo, Denise e Fernandinho por tudo o que fizeram por mim nessa minha passagem por aqui. Não existem palavras para agradecer.

Aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Ciência do Solo pela colaboração e paciência sempre que precisei. Em especial aos professores Ado e Fernando pela troca de ideias e discussões que contribuíram para este trabalho.

À CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsa durante um período do doutorado.

À FAPESP, pela concessão de bolsa de doutorado (processo nº 2011/02140-9) e também do auxílio pesquisa (processo nº 2011/12407-2), fundamentais para realização e desenvolvimento deste trabalho.

À empresa Agrolatino pelo apoio e fornecimento da substância húmica utilizada neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

“A Resiliência é a capacidade de se recuperar de situações de crise e aprender com ela. É ter a mente flexível e o pensamento otimista, com metas claras e a certeza de que tudo passa”.

Autor desconhecido

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.2 Revisão bibliográfica.....	16
1.2.1 As substâncias húmicas.....	16
1.2.2 Fracionamento da MOS.....	19
1.2.3 Efeito das substâncias húmicas em atributos físicos e químicos do solo.....	21
1.2.4 Efeito das substâncias húmicas em atributos biológicos do solo.....	24
1.2.5 Efeito das substâncias húmicas em aspectos relacionados ao desenvolvimento das plantas.....	27
1.2.6 Justificativa.....	29
Referências.....	29
2 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS – ALTERAÇÕES EM ATRIBUTOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS DO SOLO.....	35
Resumo.....	35
Abstract.....	35
2.1 Introdução.....	36
2.2 Material e métodos.....	38
2.2.1 Delineamento experimental.....	38
2.2.2 Análises durante a condução do experimento.....	39
2.2.3 Análises complementares.....	39
2.2.4 Análise molecular.....	39
2.2.5 Análises estatísticas.....	40
2.3 Resultados.....	41
2.3.1 Atividade e biomassa microbiana.....	41
2.3.2 Atributos químicos.....	45
2.4 Discussão.....	50
2.4.1 Substâncias húmicas e atividade biológica.....	50
2.4.2 Dinâmica do C e N no solo.....	53
2.4.3 Atributos químicos.....	54
2.5 Conclusão.....	56

Referências.....	56
3 ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM SOLOS TROPICAIS FAVORECE A DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES E A NUTRIÇÃO DE PLANTAS DE TRIGO.....	61
Resumo.....	61
Abstract.....	61
3.1 Introdução.....	62
3.2 Material e métodos.....	63
3.2.1 Solos utilizados.....	63
3.2.2 Delineamento e condução experimental.....	63
3.2.3 Análises químicas e microbiológicas do solo e dados de produção das plantas.....	65
3.2.4 Análise estatística.....	65
3.3 Resultados.....	66
3.3.1 Dados da primeira época de amostragem (florescimento).....	66
3.3.2 Dados da segunda época de amostragem (maturação fisiológica).....	68
3.4 Discussão.....	74
3.4.1 Influência das substâncias húmicas na atividade biológica do solo.....	74
3.4.2 Influência das substâncias húmicas no nitrogênio do solo e na planta.....	75
3.4.3 Influência das substâncias húmicas nas frações de fósforo do solo e na planta.....	76
3.4.4 Influência das substâncias húmicas no crescimento e produtividade das plantas de trigo.....	78
3.5 Conclusão.....	79
Referências.....	80
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
APÊNDICES.....	87

RESUMO

Substância húmica e seu efeito em atributos químicos e biológicos do solo e na produção vegetal

A matéria orgânica do solo (MOS) é composta de uma mistura complexa e heterogênea de compostos orgânicos, sendo as substâncias húmicas (SH) a fração mais recalcitrante da MOS. As SH têm grande influência sobre as propriedades químicas e biológicas do solo, contribuindo como fonte de energia para microrganismos e também contribuindo com a disponibilidade de nutrientes. Além disso, as SH podem contribuir de forma expressiva para o desenvolvimento e produção das plantas cultivadas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade e diversidade da comunidade bacteriana do solo, a disponibilidade de nutrientes e a produtividade da cultura de trigo após aplicação de doses crescentes de SH. Dois experimentos foram montados e avaliados, sendo um ensaio de incubação com um solo arenoso e outro um experimento de casa de vegetação com plantas de trigo em dois solos tropicais distintos (textura arenosa e argilosa). Houve um estímulo à atividade microbiana em ambos os experimentos, sendo este estímulo transitório, o que provavelmente ocorreu devido a um efeito *priming* provocado pela adição de SH. No entanto não houve alteração na estrutura da comunidade bacteriana pela adição de SH, o que pode ser devido ao fato de ser um material recalcitrante e já presente no solo. Também houve aumento na disponibilidade de fósforo, potássio, cálcio e nitrogênio, bem como da CTC, tanto em solo arenoso quanto argiloso, expressando o efeito das SH na melhoria das propriedades químicas de solos tropicais. Além disso, um efeito significativo foi visto em parâmetros relacionados à produtividade do trigo. Houve aumento de massa seca de raízes e parte aérea, além de aumento no peso e número de grãos, o que pode se refletir em aumento considerável de produtividade. Esses resultados são importantes por mostrarem que mesmo a fração mais recalcitrante da MOS pode influenciar positivamente aspectos químicos e biológicos do solo, contribuindo com a melhoria do sistema de produção e também com maiores produtividades vegetais.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos; Atividade biológica; Ciclagem de nutrientes; Disponibilidade de fósforo

ABSTRACT

Humic substances and their effects on soil chemical and biological attributes and plant production

The soil organic matter (SOM) is composed of a complex and heterogeneous mixture of organic compounds, in which the humic substances (HS) are considered to be the most recalcitrant fraction. HS have great influence on chemical and biological soil properties, contributing as energy source for microorganisms and as nutrient reservoir for plants. Furthermore, HS can contribute significantly to the development and production of crop plants. Therefore, the objective of this study was to evaluate the activity and diversity of the soil bacterial community, nutrient availability and productivity of a wheat crop after application of increasing doses of HS. For this purpose, two experiments were performed and evaluated, one is an incubation essay with a sandy soil and the other a greenhouse experiment with wheat plants using two distinct tropical soils as substrates (sandy and clayey). Microbial activity was stimulated in both experiments, and this transient stimulus may have been due to a *priming* effect caused by the addition of HS. However, there was no change in the bacterial community structure which may be due to the fact that HS is a recalcitrant material and already present in the soil. Nevertheless, we found an increase in the availability of phosphorus, potassium, calcium and nitrogen, as well as in the CEC in both, sandy and clayey soils, showing that HS do improve chemical properties of tropical soils. Furthermore, we found a significant effect on wheat productivity related parameters. There was an increase of dry weight of roots and shoots, as well as increased weight and number of grains, which may be reflected in a significant increase in productivity. These results are important because they show that even the most recalcitrant SOM fraction can positively influence soil chemical and biological aspects, contributing to the improvement of the production system and also to higher plant productivity.

Keywords: Organic acids; Biological activity; Nutrient cycling; Phosphorus availability

1 INTRODUÇÃO

O solo deve ser visto como um sistema dinâmico e complexo, que envolve aspectos físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si proporcionando o desenvolvimento das plantas e de organismos que ali habitam. Neste sentido, a matéria orgânica do solo, mais especificamente as substâncias húmicas, têm papel fundamental no equilíbrio deste sistema.

A matéria orgânica do solo (MOS) se refere a um conjunto altamente heterogêneo de diversos compostos carbonáceos, desde açúcares facilmente mineralizáveis a produtos mais complexos e recalcitrantes, sendo as substâncias húmicas (SH), principalmente humina e ácidos húmicos, as formas de carbono mais recalcitrantes da MOS, com persistência de centenas de anos (PICCOLO, 1996). As SH interagem com todos os atributos do solo, podendo melhorar a agregação do solo, a retenção de água, a disponibilidade de nutrientes e sua absorção pelas plantas, contribuindo com a CTC (PICCOLO, 2001; MOREIRA; SIQUEIRA, 2007). Além disso, servem como fonte de energia para os microrganismos do solo, regulando assim a disponibilidade de nutrientes no solo. Além disso, essas substâncias podem ter efeitos diretos nas plantas, influenciando sua atividade celular e, conseqüentemente, seu desenvolvimento e produtividade. No entanto, as SH têm características complexas e variadas, o que dificulta o completo entendimento de sua dinâmica no solo e sua interação com a produção das plantas.

Além disso, a MOS e as SH estão diretamente relacionadas à produtividade de culturas de interesse econômico. Por ser uma fonte de nutrientes e favorecer a manutenção da atividade biológica no solo, esses dois fatores em conjunto são capazes de regular a ciclagem de nutrientes no solo e, assim, influenciar de maneira positiva, na aquisição de nutrientes pelas plantas e, conseqüentemente, a sua produção.

A estrutura do solo, a atividade biológica e a disponibilidade química são as três maiores propriedades e processos do solo afetados diretamente pela MOS (PICCOLO, 2001). Por este motivo, entender a dinâmica das SH e sua implicação nos diversos compartimentos do solo é tão relevante para a compreensão da ciclagem de nutrientes e produtividade das culturas. Além disso, há um interesse evidente no efeito fisiológico que esses ácidos orgânicos podem exercer sobre as plantas, com conseqüente aumento de massa aérea, raízes e produtividade.

1.2 Revisão bibliográfica

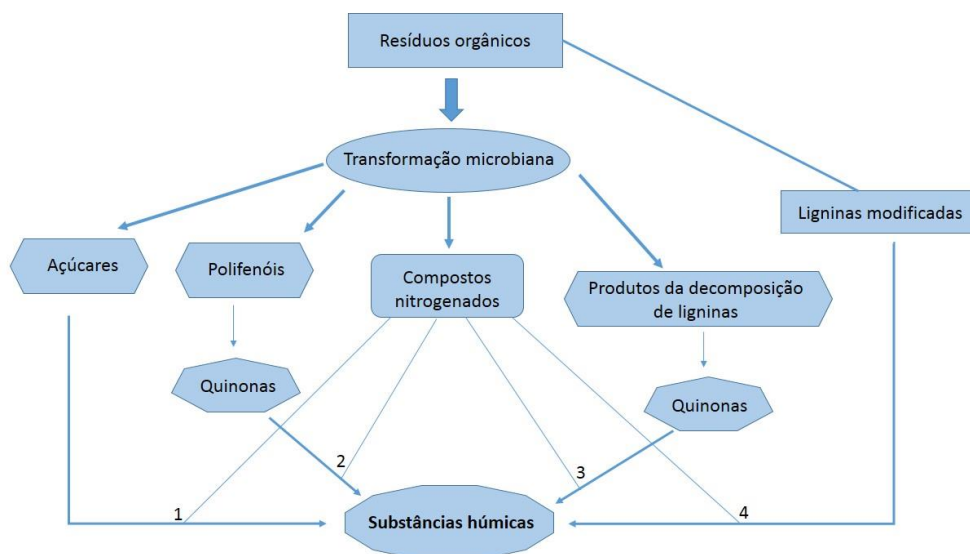
1.2.1 As substâncias húmicas

A MOS se refere a todo material orgânico depositado ou presente no solo, tais como a liteira, a biomassa microbiana do solo, os lixiviados orgânicos das plantas e as SH, sendo esta a fração mais recalcitrante e abundante no solo (MARINARI et al., 2010; PICCOLO, 1996; STEVENSON, 1994). No entanto, a meia vida dos diferentes constituintes orgânicos varia de um curto período até milhares de anos (STEVENSON; COLE, 1999). Sendo assim, há uma tendência crescente em simplificar a divisão da MOS em dois pools maiores, um pool ativo, onde a taxa de retorno do C é de algumas décadas e um pool passivo, com uma taxa de retorno do C muito maior, chegando a centenas de anos (PICCOLO, 1996). Stevenson (1994) dividiu a matéria orgânica do solo em dois grandes grupos, denominados substâncias húmicas e substâncias não-húmicas. As substâncias não-húmicas são aquelas que apresentam características definidas e distinguíveis bioquimicamente, tais como aminoácidos, carboidratos, ceras, gorduras, entre outros, enquanto que as substâncias húmicas são aquelas cuja característica química é mais complexa e indefinida, com cadeias de alto peso molecular. Uma das mais completas descrições para SH é a de que são compostos orgânicos heterogêneos, de coloração escura e produzidos a partir de subprodutos do metabolismo microbiano (SUTTON; SPOSITO, 2005).

As SH são formadas por uma complexa mistura de moléculas de diferentes tamanhos. Sua origem é a partir de reações químicas e bioquímicas que ocorrem durante o processo de decomposição de materiais orgânicos (IHSS, 2007; MUSCOLO; SIDARI; NARDI, 2012). As grandes diferenças existentes na composição e conformação das SH podem estar relacionadas à sua formação. Neste sentido, a formação e as transformações da MOS é um processo longo e complexo que envolve não somente a natureza química de diferentes compostos orgânicos, mas também tem influência direta do grau de alteração do solo. Tanto a adição de material orgânico fresco, como as alterações no uso e manejo do solo são responsáveis pela natureza única e a reatividade das SH, ditando a influência da MOS nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (PICCOLO, 1996).

Existem descritos na literatura vários mecanismos de formação das substâncias húmicas. Todos eles envolvem ação microbiana sobre o resíduo inicial e incorporação de compostos nitrogenados durante o processo de formação das SH (STEVENSON, 1994; PICCOLO, 2001). De acordo com Stevenson (1994), podem ocorrer quatro principais vias de

formação das substâncias húmicas, dependendo das características predominantes do ambiente (Figura 1): a partir de açúcares, polifenóis, lignina e ligninas modificadas. A via de formação a partir de ligninas modificadas é a teoria clássica e ocorreria após perda de metoxila e oxidação de cadeias laterais alifáticas. Já a formação a partir de lignina ocorreria a partir da transformação de aldeídos e ácidos fenólicos a quinonas durante o ataque microbiano em solos mal drenados, enquanto que a formação de SH a partir de polifenóis ocorreria principalmente em solos florestais, onde os resíduos da serapilheira possuem alta concentração deste composto. Esta via não envolve a lignina, sendo a fonte de C qualquer outro composto (como celulose, por exemplo). Durante a decomposição microbiana, o polifenol é oxidado via enzimas à quinona e convertido a SH. Quanto à formação via açúcares, essa é uma proposta mais recente que as anteriores, baseando-se na polimerização não enzimática de açúcares e aminoácidos e, como são produtos de fácil assimilação pela microbiota, este processo ocorreria em solos com baixa atividade microbiana (PICCOLO, 2001).



Adaptado de Stevenson, 1994

Figura 1 – Vias de formação das substâncias húmicas

Apesar de cada via de formação apresentar características distintas e predominar em determinados ambientes, variando devido a condições de clima, solo e vegetação, deve-se ressaltar que todos os mecanismos podem ocorrer de maneira simultânea em maior ou menor grau, acarretando nas grandes diferenças estruturais das SH no solo (PICCOLO, 2001; STEVENSON, 1994).

Toda essa diversidade e complexidade na formação das SH desperta o interesse da comunidade científica em estudar a composição e as propriedades das SH originadas de diversos ambientes, além de estudos sobre os efeitos que as SH de diferentes origens podem ter sobre atributos do solo e das plantas (CANELLAS et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2013; NARDI et al., 2000; NARDI et al., 2007).

Devido aos diversos caminhos de formação e conseqüente heterogeneidade das SH, ainda há muita discussão sobre a composição química e principalmente sobre sua estrutura, existindo várias propostas descritas na literatura. Essa heterogeneidade e diversidade na formação e nos materiais de origem faz com que este tema seja bastante controverso na literatura e também bastante discutido entre os pesquisadores da área, não havendo um consenso geral mesmo após longos anos de estudos sobre as SH.

A estrutura proposta para as SH mais aceita pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) era a de uma macromolécula, se assemelhando a um grande polímero, formado a partir dos processos já descritos (STEVENSON, 1994). No entanto, estudos recentes têm demonstrado e vem descrevendo outras estruturas para as substâncias húmicas (CANELLAS et al., 2005). Wershaw (1993) descreveu uma estrutura micelar para as SH. Neste caso, a macroestrutura seria apenas aparente, visto que se origina da associação de pequenas espécies moleculares com característica polar e apolar (micelar), com ligações fracas unindo diversas moléculas. Essa estrutura seria formada a princípio pela degradação de moléculas como lipídeos e ligninas, de forma a manter boa parte da estrutura inicial da molécula, mas com uma despolimerização e conseqüente formação de uma molécula anfifílica (com uma parte polar e outra apolar), sendo a apresentação gráfica da molécula semelhante à estrutura de uma membrana celular. A agregação de várias micelas e sua interação com os minerais do solo seriam o constituinte do húmus (CANELLAS et al., 2005).

Já os trabalhos de Piccolo e colaboradores têm introduzido um novo conceito para a estrutura das SH, o qual vem ganhando força entre a comunidade científica. Neste caso, a estrutura das SH seria uma associação supramolecular, formada pela aglomeração de moléculas orgânicas simples, resultantes da degradação microbiana e da síntese da lignina. Isso resultaria em uma conformação mais simples das substâncias húmicas, estabilizadas por pontes de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas, sendo essas ligações responsáveis pelo grande tamanho molecular aparente das substâncias húmicas (CONTE; PICCOLO, 1999; PICCOLO, 2001). Materiais menos recalcitrantes, produtos da atividade biológica e dos resíduos de plantas também são constantemente incorporados nas frações mais estáveis da

MOS. Sendo assim, as interações hidrofóbicas entre as substâncias húmicas parecem ser as responsáveis pela maior resiliência das substâncias húmicas no solo, protegendo esses materiais da degradação microbiana e aumentando seu tempo de residência no solo (MARINARI et al., 2010). Além disso, pode haver uma estabilização dos compostos orgânicos por partículas minerais do solo, o que reduziria o ataque microbiano a esse composto, podendo incorporá-lo a MOS mais recalcitrante (MILTNER et al., 2012). Essa estrutura foi proposta baseada em estudos de ácidos húmicos por cromatografia de exclusão por tamanho, onde os autores notaram comportamentos e rearranjos mais relacionados a uma associação molecular do que a um polímero (CONTE; PICCOLO, 1999). Assim, a estrutura das SH seria variável, de acordo com o ambiente e as interações que nele ocorrem. Este novo conceito de associação supramolecular vem ganhando forças devido aos avanços dos estudos na área, através de técnicas como espectroscopia, microscopia e pirólise (MUSCOLO; SIDARI; NARDI, 2012). Neste sentido, alterações no solo, com mudanças na disponibilidade de nutrientes e no pH alterariam a conformação das substâncias húmicas, resultando assim nas diferenças que existem entre essas substâncias quando extraídas de diferentes ambientes. Além disso, alterações no tipo de manejo do solo, como de convencional para orgânico também podem causar diferenças na estrutura das SH, uma vez que o manejo orgânico aumenta a quantidade de compostos hidrofóbicos, como lipídeos, resultando em um maior acúmulo da MOS bem como na repelência à água e maior estruturação do solo (MARINARI et al., 2010).

1.2.2 Fracionamento da MOS

Para diversos estudos, faz-se necessário o fracionamento da MOS a fim de se avaliar a dinâmica do carbono no solo. O fracionamento pode servir como indicador da qualidade da MOS medida pela sua recalcitrância (através da relação entre os ácidos húmicos e fúlvicos), para avaliação do manejo do solo (por meio das características espectrométricas das diferentes frações) e também para estudos sobre a estimulação do crescimento vegetal (CANELLAS et al., 2006; CANELLAS et al., 2002;). Para tanto, vários métodos podem ser utilizados, dependendo do objetivo, podendo ser um método físico (cuja separação das frações se dá pelo tamanho das partículas) e métodos químicos que, de modo geral, separam as frações de acordo com a sua solubilidade em meio ácido ou alcalino (PICCOLO, 2001; STEVENSON, 1994).

No fracionamento químico clássico, há uma divisão operacional das frações mais recalcitrantes da MOS em três principais frações: ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina, sendo baseada na solubilidade em meio ácido ou alcalino, sendo que suas características químicas não diferem substancialmente (PICCOLO, 1996). Essas frações são obtidas de acordo com sua solubilidade em ácido/base. Pela sua solubilidade, os ácidos fúlvicos podem ser considerados uma associação de pequenas moléculas hidrofílicas na qual existem grupos funcionais ácidos suficientes para manter os conjuntos fúlvicos dispersos em solução a qualquer faixa de pH. Já os ácidos húmicos são compostos por associações de compostos predominantemente hidrofóbicos, que são estabilizados a um pH neutro por forças dispersivas hidrofóbicas (Van der Waals e ligações CH). Em valores baixos de pH ocorrem alterações na conformação da estrutura e aumento das ligações intermoleculares de H, que aumentam seu tamanho permitindo a precipitação dessa fração (PICCOLO, 1996; PICCOLO, 2001).

A baixa hidrofobicidade e a elevada quantidade de cargas negativas dos ácidos fúlvicos, em relação aos ácidos húmicos, não suporta uma grande quantidade de interações hidrofóbicas, o que faz com que se observe um tamanho molecular aparentemente menor do que a dos ácidos húmicos (SUTTON; SPOSITO, 2005). No caso da humina esta é insolúvel tanto em meio ácido quanto alcalino, o que não quer dizer que no solo coexistam essas três distintas formas de substâncias húmicas (PICCOLO, 2001; STEVENSON, 1994; SUTTON; SPOSITO, 2005).

Por outro lado, existe um método de fracionamento químico onde há o interesse de dividir em frações o carbono mais lábil do solo, sendo que é utilizada a metodologia proposta por Walkey e Black (1934) adaptado por Chan, Bowman e Oates (2001), que consiste na oxidação do C orgânico pelo dicromato de potássio em meio com diferentes concentrações de ácido sulfúrico, o que permite a obtenção de 3 principais frações: C lábil, C moderadamente lábil e C resistente. Esse método torna-se interessante do ponto de vista de manejo e qualidade do solo a curto e médio prazos, uma vez que indica alterações que venham a ocorrer em frações mais oxidáveis do carbono no solo, enquanto que o método descrito anteriormente visa as alterações ocorridas em frações mais recalcitrantes. Como a ciclagem do C recalcitrante é mais lenta, as frações oxidáveis tornam-se indicadores mais sensíveis das modificações do C no solo (CHAN; BOWMAN; OATES, 2001), podendo ter maior relação com a atividade microbiana do que as frações mais estabilizadas. Além disso, Chan, Bowman e Oates (2001) observaram uma alta correlação entre as frações oxidáveis de C com a estabilidade dos agregados do solo e também com o aumento no teor de N. Piccolo (1996)

também afirma que a maior estabilidade de agregados do solo está mais relacionada com a fração leve das SH, ou seja, a fração mais lábil do C do solo.

No entanto, apesar destas técnicas auxiliarem na análise e interpretação dos dados e inferirem sobre os efeitos do manejo da área na qualidade e manutenção da MOS, deve-se ressaltar que a separação da MOS do solo em frações é simplesmente operacional e didática e realizada de forma a facilitar o entendimento deste assunto tão complexo. No solo estas frações são interligadas e atuam no equilíbrio e dinâmica do sistema de forma conjunta e integrada.

1.2.3 Efeito das SH em atributos físicos e químicos do solo

As SH são responsáveis pela formação de complexos organo-minerais com as argilas, aumentando a estabilidade dos agregados do solo e favorecendo a aeração e manutenção da estrutura do solo (DAL FERRO et al., 2012). O manejo orgânico do solo aumenta seus componentes hidrofóbicos, o que se relaciona de forma positiva não só com o aumento de C orgânico, mas também com os agregados do solo e a repelência à água (MARINARI et al., 2010). De modo geral, compostos orgânicos com caráter hidrofóbico são menos suscetíveis ao ataque microbiano, fato este que favorece a manutenção das SH no solo. Djajadi, Abbott e Hinz (2012) observaram maior estabilidade de macroagregados em solo arenoso quando houve adição de matéria orgânica. Estes autores encontraram também interação entre o teor de argila e teor de C, visto que com o aumento do C e maior teor de argila há incremento mais expressivo na estabilidade dos macroagregados do solo.

As substâncias húmicas contribuem de maneira significativa para melhoria nos atributos químicos do solo, uma vez que favorecem o aumento de cargas, auxiliam nas reações do solo, na formação de quelatos e complexos organo-minerais, além de favorecer a ciclagem de nutrientes e controlar sua disponibilidade no solo. Solos tropicais são, de modo geral, altamente intemperizados, como o caso dos solos brasileiros. Estes solos são bastante dependentes das substâncias húmicas, pois geralmente são pobres e possuem baixa capacidade de troca catiônica (CTC), tornando a estabilização da MOS mais importante em solos tropicais do que temperados (ZECH; SENESI; GUGGENBERG, 1997). Além disso, as SH contribuem com o aumento das cargas dependentes de pH do solo, que são altamente influenciadas pelo uso e manejo do solo.

No ambiente, a MOS funciona como ácido fraco, agindo como par conjugado ácido/base. A diversidade química dos componentes da matéria orgânica está relacionada à

sua diversidade de grupamentos funcionais, permitindo que a matéria orgânica tenha uma ação tamponante no solo em uma ampla faixa de pH (SILVA; MENDONÇA, 2007). Neste sentido, a maior ou menor contribuição da MOS nas reações do solo está diretamente relacionada à sua formação e grau de humificação. Estes fatores também estão relacionados com a formação de quelatos com cátions como Cu, Zn, Mn e também com a interação entre as SH e o Al e Fe do solo. Além disso, as práticas de cultivo e o manejo do solo podem contribuir com o maior ou menor grau de humificação das SH, interferindo nas suas propriedades e, conseqüentemente, na sua interação no solo. Nos solos tropicais, a formação de cargas é decorrente de substituição isomórfica das argilas, da ionização do grupamento OH das argilas e da geração de cargas dependentes de pH (PICCOLO, 1996, VERLINDEN et al., 2009). Como nos solos altamente intemperizados as cargas fixas, geradas por substituição isomórfica das argilas, são relativamente baixas, a MOS tem grande contribuição no aumento da CTC do solo, chegando a contribuir com até 70% da CTC total do solo. As interações hidrofóbicas da MOS podem explicar sua alta quantidade de cargas reativas, devido à baixa quantidade de cátions polivalentes e à protonação de grupos funcionais (VON LUTZOW et al., 2008).

Baldotto et al. (2007) verificaram aumento da atividade redox dos ácidos húmicos com o aumento do grau de humificação dos mesmos, ou seja, um aumento de grupos funcionais fenólicos, quinonas e semiquinonas na sua estrutura. Os ácidos húmicos representam uma fração intermediária do processo de humificação durante o qual os grupamentos fenólicos são oxidados a quinonas que se estabilizam durante o processo de humificação, sendo que esses grupamentos possuem uma importante contribuição na transferência de elétrons dos AH (BALDOTTO et al., 2008). Baldotto et al. (2008) observaram que a preservação da matéria orgânica (associada ao seu maior grau de humificação) aumentou a capacidade de troca catiônica (CTC) e dos teores de nutrientes, ocasionando uma redução do ponto de carga zero do solo (PCZ). Segundo esses autores, a redução do PCZ se deve principalmente à adsorção de ânions orgânicos nos sítios de carga positiva dos minerais de argila, e ainda ressaltam que este efeito é maior em solos intemperizados e com predominância de óxidos de ferro e alumínio.

A MOS representa uma fonte importante de nutrientes sendo responsável, por exemplo, por aproximadamente 95% do N orgânico presente nos solos, sendo este nutriente um dos mais dependentes da ciclagem da MO, além de funcionar como regulador dessa ciclagem (KNICKER, 2011). A ciclagem do N é determinada pela competição entre plantas e

microrganismos, sendo estes responsáveis pela mineralização do N orgânico e, dependendo das condições do meio, pela imobilização de parte do N mineral do solo. Porém, nem todo N orgânico passa pelo processo de mineralização, sendo que este N pode ser diretamente incorporado nas frações mais recalcitrantes da MOS (KNICKER, 2011). É estimado um acúmulo de 60 Tg N ano⁻¹ nos sistemas terrestres, demonstrando assim a importância da MOS na manutenção deste elemento no solo (KNICKER, 2011; GALLOWAY et al., 2004). Além disso, o N pode favorecer ou reduzir a decomposição de compostos orgânicos. A adição de N mineral pode favorecer, em curto período, a decomposição de carboidratos, mas, em longo prazo, pode reduzir a decomposição de compostos mais recalcitrantes, como a lignina (KNICKER, 2011). Essa supressão pode ser pela produção de compostos tóxicos ou inibição de enzimas lignolíticas, ou ainda pelo sequestro do N em compostos mais recalcitrantes e inacessíveis à microbiota do solo (BINI et al., 2013; KNICKER, 2011; TRESEDER et al., 2008).

Outro nutriente que tem sua disponibilidade alterada pela MOS é o P, principalmente em solos tropicais intemperizados, onde grande parte do P se encontra fortemente adsorvido aos óxidos e hidróxidos de Fe e Al (GUPPY et al., 2005; PAVINATO; ROSOLEM, 2008). Como grande parte dos ácidos orgânicos tem caráter aniônico, pode ocorrer competição entre esses ácidos orgânicos e os nutrientes aniônicos, como no caso dos fosfatos, pelos mesmos sítios de adsorção, o que aumentaria a disponibilidade de P e demais nutrientes aniônicos na solução do solo (OBURGER; JONES; WENZEL, 2011; PAVINATO; ROSOLEM, 2008; ANDRADE et al., 2003).

Os ácidos orgânicos mais ativos no solo são cítrico, oxálico, glucônico, láctico e málico (GUPPY et al., 2005). No entanto, ácidos fúlvicos e húmicos também podem cumprir papel semelhante na disponibilidade de P. Estes ácidos podem reduzir a adsorção de P por meio de um mecanismo de competição pelos mesmos sítios de adsorção das argilas, o que resulta no aumento da concentração de P na solução do solo (GUPPY et al., 2005; HUNT et al., 2007). Além desse efeito, os ácidos orgânicos podem formar complexos organometálicos, principalmente com o Fe e o Al, o que também acarreta em redução na adsorção do P (GUPPY et al., 2005; SPOSITO, 1989). Ácidos orgânicos de alto peso molecular e de alta complexação, como os ácidos húmicos, podem persistir por maiores períodos no solo, devido à sua recalcitrância, o que poderia aumentar o efeito de maior disponibilidade do P (PAVINATO; ROSOLEM, 2008). Em trabalho de Andrade et al. (2003), a adição de ácidos orgânicos, dentre eles os ácidos húmicos, acarretou em diminuição da adsorção do P e

consequente aumento da sua concentração na solução do solo. Guppy et al. (2005) demonstraram que os ácidos húmicos e fúlvicos reduziram a adsorção de fósforo em até 63% em Oxissolos.

No entanto, deve-se ressaltar que a redução na adsorção do P é dependente da natureza e composição dos ácidos orgânicos, de sua concentração e persistência no solo, assim como do pH e da composição mineral do solo (HUNT et al., 2007; STEVENSON, 1994). No caso de solos intemperizados, deve-se levar em consideração ainda a questão das cargas que são dependentes do pH, que podem influenciar diretamente a dinâmica do P do solo. Assim, a acidificação do solo pode resultar tanto na adsorção do fósforo quanto na solubilização deste, dependendo das condições do meio. Por um lado, a acidificação do solo pode resultar em um aumento de cargas positivas das superfícies dos óxidos de carga variável, o que possibilita uma maior afinidade destas superfícies pelo P. Por outro lado, a acidificação pode aumentar a solubilidade de minerais de Fe e Al, resultando na liberação do P adsorvido nesses minerais (OBURGER; JONES; WENZEL, 2011)

1.2.4 Efeito das SH em atributos biológicos do solo

A atividade, crescimento e estrutura da comunidade microbiana podem ser alterados pela disponibilidade e qualidade do substrato (DILLY, 2004). Enzimas extra-celulares podem se associar à matéria orgânica do solo através de uma combinação de mecanismos (troca iônica, aprisionamento físico na estrutura de ácidos orgânicos, formação de pontes de H⁺ e ligações covalentes), aumentando o tempo de permanência e atividade das enzimas no solo (ZIMMERMAN; AHN, 2011).

Zimmerman e Ahn (2011) compilaram diversos estudos mostrando os complexantes orgânicos de diversas enzimas extra-celulares. Para tanto, grande parte de enzimas como urease, fosfatase ácida e glucosidase tem sua atividade significativamente reduzida quando complexadas na fração ácido húmico da MOS no solo. Estes estudos mostram que este isolamento das enzimas pelas substâncias húmicas reduzem a atividade enzimática pela redução do contato entre enzima e substrato, favorecendo a manutenção da enzima no ambiente por maior tempo. Benitez, Sainz e Nogales (2005) mensuraram a quantidade de enzimas hidrolases (β -glucosidade, fosfatase e urease) associadas a um extrato húmico e notaram um aumento da formação do complexo húmus-enzima. Isso é interessante do ponto de vista ecológico, uma vez que a formação desses complexos leva a uma proteção dessas enzimas extracelulares quando este material é adicionado ao solo, diminuindo sua degradação

por ações físicas e biológicas, acarretando em maior período de atividade das mesmas e, conseqüentemente na maior contribuição na ciclagem de nutrientes no solo. Em trabalho de Mazzei, Oschkinat e Piccolo (2013), através de técnicas de NMR, os autores observaram a formação de complexos não covalentes entre a enzima fosfatase alcalina e os ácidos húmicos, indicando afinidade da enzima a se ligar aos AH do solo, resultando em complexos húmus-fosfatase, reduzindo a mobilidade molecular da enzima e, conseqüentemente, sua atividade. No entanto, esses estudos são realizados em frações isoladas de material orgânico, não levando em consideração toda a complexidade existente no solo quanto a interações entre os diversos compartimentos do solo.

Já no caso de um ambiente com maior aporte de material orgânico passível de degradação enzimática poderá acarretar em aumento da atividade enzimática. Neste sentido, Benitez, Sainz e Nogales (2005) observaram que houve um aumento na atividade de enzimas hidrolases, como β -glucosidade, fosfatase e urease durante o processo de vermicompostagem. Giovannini et al. (2013) também observaram aumento na atividade destas enzimas quando da aplicação de fertilizante fosfatado complexado com ácido húmico, sugerindo que há um estímulo evidente à microbiota do solo mesmo quando é realizada a utilização de ácidos orgânicos de maior recalcitrância.

Benitez, Sainz e Nogales (2005) também relatam que a atividade da enzima desidrogenase é maior no início do processo de vermicompostagem, quando há maior concentração de substâncias metabolizáveis pela microbiota, enquanto que a atividade desta enzima diminui no final do processo, onde há formação de substâncias humificadas. Com isso pode-se dizer que a atividade da enzima desidrogenase é maior quanto maior a quantidade de carbono facilmente oxidável. Isto fica claro visto que a desidrogenase é uma enzima intracelular que atua na cadeia transportadora de elétrons e, com isso, se relaciona diretamente com microrganismos vivos e ativos, sabendo-se que quanto maior a quantidade de C facilmente decomponível maior a microbiota ativa (CARDOSO et al., 2013; NAYAK; BABU; ADHYA, 2007). Neste sentido, a atividade desta enzima pode não ser alterada pela adição de material orgânico recalcitrante ou aumento de SH, uma vez que a recalcitrância inerente a este material não influenciará de forma direta a atividade da desidrogenase (SANTOS et al., 2013).

Já a biomassa microbiana do solo (BMS) é a fração viva da matéria orgânica e responsável pela decomposição da MOS e ciclagem de nutrientes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Desta forma, esta é responsável pelas transformações que ocorrem com o material

orgânico no solo. Além disso, é uma fonte de C e nutrientes, sendo que este carbono poderá, a curto e médio prazo, fazer parte de frações mais estáveis do carbono no solo. Vários compostos derivados de células microbianas são encontrados nas SH, sendo esta estabilização de restos microbianos no solo derivada de interações entre a matriz do solo, do fluxo de carbono pela biomassa microbiana e também da estrutura molecular do composto microbiano (MILTNER et al., 2012). Tanto a biomassa quanto a atividade microbiana podem fornecer informações de como a adição de compostos orgânicos influenciam processos importantes no solo (SANTOS et al., 2013).

O manejo do solo, com práticas conservacionistas, com manutenção e incremento do C orgânico do solo influenciam a biomassa microbiana. Em trabalho de Babujia et al. (2010) os autores verificaram aumento no C relacionado à biomassa microbiana de $0,76 \text{ Mg C ha}^{-1}$ em áreas há 20 anos sob plantio direto, em comparação com áreas de cultivo convencional. Santos et al. (2012) mostraram um aumento da biomassa microbiana em áreas de agricultura orgânica em comparação com áreas de cultivo convencional, o que coincidiu com a maior quantidade de ácidos húmicos e fúlvicos, sugerindo uma maior estabilização do carbono nessas áreas. Isso mostra a estreita relação entre a entrada de material orgânico no solo e a atividade microbiana sobre a transformação e manutenção deste C no solo. Giovannini et al. (2013) mostraram um aumento da biomassa microbiana de C quando da adição de fertilizante fosfatado complexado com ácidos húmicos, sendo este efeito mais evidente nos tratamentos com maiores teores de C, o que indica que a biomassa microbiana no solo também pode ter sua dinâmica alterada pela entrada de SH, e não somente por material orgânico fresco e energético. Por outro lado, Santos et al. (2013) não encontraram alterações na atividade e biomassa microbiana com a adição de lixiviado de aterro sanitário no solo, sendo este também um material contendo C recalcitrante.

O estímulo aos microrganismos do solo mediado pela matéria orgânica pode ser visto como um efeito *priming* no solo. Com isso há um predomínio inicial de microrganismos r-estrategistas, que possuem um rápido crescimento e utilizam as formas mais facilmente assimiláveis de C. Quando este material se torna escasso e a fonte de C torna-se basicamente recalcitrante, essa comunidade microbiana diminui e é substituída por microrganismos k-estrategistas, que possuem crescimento mais lento e são capazes de utilizar fontes mais complexas de C para obtenção de energia (FONTAINE; MARIOTTI; ABBADIE, 2003). No caso da adição de materiais recalcitrantes, o efeito *priming* acarretaria em maior tempo de atividade microbiana pelo melhor aproveitamento do carbono na obtenção de energia pelos

microrganismos do solo (KUZYAKOV, 2010). No entanto, o efeito *priming* e a sucessão microbiana podem resultar em um consumo de C em formas menos complexas presentes no solo mesmo antes da adição do material orgânico, o que pode ocasionar uma aceleração na mineralização do C. Devido a esta problemática, o aporte de material orgânico e/ou ácidos orgânicos deve ser frequente, a fim de não reduzir o estoque de C no solo e causar danos à ciclagem de nutrientes.

1.2.5 Efeito das SH em aspectos relacionados ao desenvolvimento das plantas

A MOS funciona como fonte de nutrientes, auxiliando na melhor nutrição e, conseqüentemente, no melhor desenvolvimento vegetal (STEVENSON, 1994). Além disso, o estímulo à microbiota do solo e a melhoria nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, já discutidas anteriormente, propiciam um ambiente mais favorável ao desenvolvimento das plantas, podendo aumentar a produção primária líquida das plantas (MILTNER et al., 2012). No entanto, diversos estudos tem mostrado uma alteração fisiológica atribuída às substâncias húmicas, contribuindo de maneira direta no desenvolvimento e produtividade das plantas (CANELLAS et al, 2002; NARDI et al., 2002; TREVISAN, 2010). Todos esses fatores somados tornam difícil de distinguir os efeitos diretos e indiretos das SH sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (TREVISAN, 2010). Além disso, as SH podem conter dentro de sua estrutura moléculas de ácido indol-acético (AIA), que vão sendo liberadas conforme ocorre a mineralização do C das SH (QUAGGIOTTI et al., 2004; ZANDONADI; CANELLAS; FAÇANHA, 2007).

Os mecanismos de interação entre as SH e as plantas ainda não são totalmente claros. Alguns estudos têm mostrado que há uma indução à formação e crescimento das raízes, principalmente laterais, bem como no tamanho das células das raízes e no funcionamento da bomba de prótons (CANELLAS et al., 2002; TREVISAN, 2010). Além disso, as SH podem influenciar a respiração, a síntese de proteínas e a atividade enzimática (CARLETTI et al., 2008; NARDI et al., 2000; NARDI et al., 2007; TREVISAN, 2010). Aguiar et al. (2009) encontraram um maior crescimento radicular de plântulas de *Arabidopsis* e milho tratadas com SH em comparação com o controle sem SH e, segundo os autores, esse maior crescimento está associado à ação auxínica presente nas SH. No entanto, esses mesmos autores sugerem que espécies diferentes podem responder de maneira específica a um mesmo material, assim como a dose ótima da SH para estímulo do crescimento radicular também é particular de cada espécie vegetal.

Devido à heterogeneidade das SH, pode haver alterações da resposta de indução ao crescimento e desenvolvimento vegetal. Além do efeito auxínico, pode ocorrer também um estímulo dos AH sobre a atividade de H^+ -ATPase, sendo que pode ser esse o responsável pela maior formação de raízes laterais e, conseqüentemente, maiores sítios de crescimento celular (AGUIAR et al., 2009; CANELLAS et al., 2002; ZANDONADI; CANELLAS; FAÇANHA, 2007). Quanto maior o grau de humificação do AH, maior a sua bioatividade, provavelmente por conferir maior proteção às moléculas de AIA presentes na sua estrutura (ZANDONADI; CANELLAS; FAÇANHA, 2007). Ainda não é bem entendido como auxinas endógenas alteram o funcionamento das células e induzem seu desenvolvimento. No entanto, em trabalho de Zandonadi, Canellas e Façanha (2007), os autores usaram fontes diversas de auxina, entre elas alguns resíduos orgânicos, AH e AIA. Os resultados mostraram que tanto o AIA endógeno quanto os AH podem induzir novos sítios de formação de raízes laterais, mostrando um recrutamento e “reprogramação” das células para esta nova função, mas com um estímulo externo (ZANDONADI; CANELLAS; FAÇANHA, 2007).

O processo de glicólise também pode ser afetado pela adição de SH. Nardi et al. (2007) mostraram que diferentes frações de SH influenciam em níveis distintos a glicólise em sementes de milho. Essa diferença é atribuída ao tamanho, conformação e bioatividade da molécula (NARDI et al., 2007)

A absorção de nutrientes também pode ser facilitada pela presença de SH. Szczerki et al. (2013) observaram aumento nos teores de P e K nas raízes de *Medicago sativa* e *Elymus trachycaulus* com adição de ácido húmico, e sugeriram que a absorção desses nutrientes pode ter sido favorecida pela presença do AH. Além desses, o N também pode ter sua absorção favorecida pela presença de SH, principalmente na forma de nitrato (NARDI et al., 2002; TREVISAN, 2010). Quaggiotti et al. (2004) observaram alterações no estímulo das SH na captação de nitrato pelas raízes de milho e também um acúmulo do nutriente nas folhas, comportamento confirmado pela expressão dos genes responsáveis pela codificação dos transportadores de nitrato, o que pode ocorrer pela interação com as H^+ -ATPases da membrana plasmática da célula (QUAGGIOTTI et al., 2004). Também a atividade de enzimas relacionadas ao aporte de N pode ser alterada, como no caso da glutamina sintetase, responsável pela assimilação e controle do metabolismo do N na planta (MUSCOLO et al., 1999). Esses fatores atuam conjuntamente para aumentar a eficiência no metabolismo e na translocação do N pela planta, refletindo em um melhor e mais eficiente uso deste nutriente pelas plantas (QUAGGIOTTI et al., 2004). A nutrição da planta pode ocorrer também pela

absorção de nutrientes na forma orgânica. A absorção de algumas moléculas orgânicas, tal como aminoácidos, peptídeos, entre outras, pode ser favorecida em presença de SH (PAUNGFOO et al., 2012).

1.2.6 Justificativa

Diversos estudos trazem as alterações em atributos químicos e biológicos do solo ocasionados pela introdução da MOS, sobretudo pelas SH. Além disso, sabe-se também da influência das SH em parâmetros fisiológicos das plantas. No entanto, faltam na literatura pesquisas que estudem todos esses fatores em conjunto, sendo esta a proposta desse trabalho.

Referências

AGUIAR, N.O.; CANELLAS, L.P.; DOBBSS, L.B.; ZANDONADI, D.B.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.R. Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 1613-1623, 2009.

ANDRADE, F.V.; MENDONÇA, E.S.; ALVAREZ, V.H.; NOVAIS, R.F. Adição de ácidos orgânicos e húmicos em Latossolos e adição de fosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 1003-1011, 2003.

BABUJIA, L.C.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; BROOKES, P.C. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian Oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 2174–2181, 2010.

BALDOTTO, M.; CANELLAS, L.; CANELA, M.; SIMÕES, M.; MARTIN-NETO, L.; FONTES, M.P.; VELLOSO, A.C. Propriedade redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 465-475, 2007.

BALDOTTO, M.A.; CANELLAS, L.P.; CANELA, M.C.; REZENDE, C.E.; VELLOSO, C.X. Propriedades redox de ácidos húmicos isolados de um solo cultivado com cana-de-açúcar por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1043–1052, 2008.

BENITEZ, E.; SAINZ, H.; NOGALES, R. Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. **Bioresource technology**, Oxon, v. 96, p. 785-790, 2005.

BINI, D.; SANTOS, C.A.; BOUILLET, J.P.; GONÇALVES, J.L.M.; CARDOSO, E.J.B.N. *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in monoculture and intercropped plantations: Evolution of soil and litter microbial and chemical attributes during early stages of plant development. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.63,p. 57-66, 2013.

CANELLAS, L.P.; DOBBSS, L.B.; OLIVEIRA, A.L.; CHAGAS, J.G.; AGUIAR, N.O.; RUMJANEK, V.M.; NOVOTNY, E.H.; OLIVARES, F.L.; SPACINI, R.; PICCOLO, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. **European Journal of Soil Science**, Amsterdam, v. 63, p. 315–324, 2012.

CANELLAS, L.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.L.O.; FAÇANHA, A.R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 130, p. 1951–1957, 2002.

CANELLAS, L.C.; ZANDONADI, D.B.; MEDICI, L.O.; PERES, L.E.P.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.R. Bioatividade de substâncias húmicas - ação sobre o metabolismo e desenvolvimento de plantas. In: CANELLAS, L.C.; SANTOS, G.A. (Ed.). **Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. Campo dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2005. p.224-243.

CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D.B.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às H⁺-ATPases. In: FERNANDES, M.S. (Ed). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.175-200.

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

CARLETTI, P.; MASI, A.; SPOLAORE, B.; LAURETO, P.P.; ZORZI, M.; TURETTA, L.; FERRETTI, M.; NARDI, S. Protein expression changes in maize roots in response to humic substances. **Journal of Chemical Ecology**, New York, p. 34, v. 804-818, 2008.

CHAN, K.Y.; BOWMAN, A.; OATES, A. Oxidizable organic carbon fractions and soil quality changes in an Oxic Paleustalf under different pasture leys. **Soil Science**, Philadelphia, v.166, p. 61-67, 2001.

CONTE, P.; PICCOLO, A. Conformational arrangement of dissolved humic substances. influence of solution composition on association of humic molecules. **Environmental Science & Technology**, New York, v. 33, p. 1682-1690, 1999.

DAL FERRO, N.; BERTI, A.; FRANCIOSO, O.; FERRARI, E.; MATTHEWS, G.P.; MORARI, F. Investigating the effects of wettability and pore size distribution on aggregate stability: the role of soil organic matter and the humic fraction. **European Journal of Soil Science**, Amsterdam, v.63, p. 152-164, 2012.

DILLY, O. Effects of glucose, cellulose and humic acids on soil microbial eco-physiology. **Journal of Plant Nutrition & Soil Science**, Oldenburg v. 167, p. 261-266, 2004.
DJAJADI, L.K.A.; HINZ, C. Synergistic impacts of clay and organic matter on structural and biological properties of a sandy soil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 183, p. 19-24, 2012.

FONTAINE, S.; MARIOTTI, A.; ABBADIE, L. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 837-843, 2003.

GALLOWAY, J.; DENTENER, F.; CAPONE, D.; BOYER, E.W.; HOWARTH, R.W.; SEITZINGER, S.P.; ASNER, G.P.; CLEVELAND, C.C.; GREEN, P.A.; HOLLAND, E.A.; KARL, D.M.; MICHAELS, A.F.; PORTER, J.H.; TOWNSEND, A.R.; VOROSMARTY, C.J. Nitrogen cycles: past, present, and future. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v.70, p. 153-226, 2004.

GIOVANNINI, C.; GARCIA-MINA, J.M.; CIAVATTA, C.; MARZADORI, C. Effect of organic-complexed superphosphates on microbial biomass and microbial activity of soil. **Biology & Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, p. 395-401, 2013.

GUIMARÃES, D.V.; GONZAGA, M.I.S.; DA SILVA, T.O.; DA SILVA, T.L.; DA SILVA DIAS, N.; MATIAS, M.I.S. Soil organic matter pools and carbon fractions in soil under different land uses. **Soil & Tillage Research**, Berlin, v. 126, p. 177-182, 2013.

GUPPY, C.N.; MENZIES, N.W.; MOODY, P.W.; BLAMEY, F.P.C. Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: a review. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 43, p. 189-202, 2005.

HUNT, J.F.; OHNO, T.; HE, Z.; HONEYCUTT, C.W.; DAIL, D.B. Inhibition of phosphorus sorption to goethite, gibbsite, and kaolin by fresh and decomposed organic matter. **Biology & Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 277-288, 2007.

IHSS. International humic substances society. 2007. Disponível em: <<http://www.ihss.gatech.edu/whatarehs.html>>. Acesso em: 04 maio 2011.

KNICKER, H. Soil organic N - An under-rated player for C sequestration in soils? **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 1118-1129, 2011.

KUZYAKOV, Y. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1363-1371, 2010.

MARINARI, S.; LIBURDI, K.; CORRADINI, D.; GREGO, S. Reversed-phase high performance liquid chromatographic profile of organic fractions extracted by solvents with different polarity as a tool to evaluate the hydrophobic character of soil under different management. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 109, p. 36-40, 2010.

MAZZEI, P.; OSCHKINAT, H.; PICCOLO, A. Reduced activity of alkaline phosphatase due to host-guest interactions with humic superstructures. **Chemosphere**, Oxford, v. 93, p. 1972-1979, 2013.

MILTNER, A.; BOMBACH, P.; SCHMIDT-BRÜCKEN, B.; KÄSTNER, M. SOM genesis: microbial biomass as a significant source. **Biogeochemistry**, Dordrecht v. 111, p. 41-55, 2012.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; NARDI, S. Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 129, p. 57-63, 2013.

MUSCOLO, A.; BOVALO, F.; GIONFRIDDO, F.; NARDI, S. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1303-1311, 1999.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO D.; RENIERO, F.; RASCIO, N. Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from Forest Soils and Plant Growth. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p. 639-645, 2000.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 1527-1537, 2002.

NARDI, S.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; BAIANO, S.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, p. 39, v. 3138-3146, 2007.

NAYAK, D.R.; BABU, Y.J.; ADHYA, T.K. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aeris Endoaquept planted to rice under flooded condition. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1897-1906, 2007.

OBURGER, E.; JONES, D.L.; WENZEL, W.W. Phosphorus saturation and pH differentially regulate the efficiency of organic acid anion-mediated P solubilization mechanisms in soil. **Plant & Soil**, Dordrecht, v. 341, p. 363-382, 2011.

PAUNGFOO, C.; VISSER, J.; LONHIENNE, T.G.A.; SCHMIT, S. Past, present and future of organic nutrients. **Plant & Soil**, Dordrecht, v. 359, p. 1-18, 2012.

PAVINATO, P.S.; ROSOLEM, C.A. Disponibilidade de nutrientes no solo - decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 911-920, 2008.

PICCOLO, A. Humus and Soil conservation. In: PICCOLO, A. (Ed). **Humic Substances in Terrestrial Ecosystems**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 225-264.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil Science**, Philadelphia, v.225, p. 810- 832, 2001.

QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 55, p. 803-813, 2004.

SANTOS, C.A.; PANCHONI, L.C.; BINI, D.; KUWANO, B.H.; CARMO, K.B.; SILVA, S.M.C.P.; MARTINES, A.M.; ANDRADE, G.; ANDRADE, D.S.; CARDOSO, E.J.B.N.; ZANGARO, W.; NOGUEIRA, M.A.. Land application of municipal landfill leachate: Fate of ions and ammonia volatilization. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 42, p. 1-9, 2013.

SANTOS, V.B.; ARAUJO, A.S.F.; LEITE, L.F.C.; NUNES, L.A.P.L.; MELO, W.J. Soil microbial biomass and organic matter fractions during transition from conventional to organic farming systems. **Geoderma**, Amsterdam, v. 170, p. 227-231, 2012.

SILVA, I.R.; MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V.; V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.275-374.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989. 304p.

STEVENSON, F.J. **Humus Chemistry: genesis, composition, reactions**. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. 496p.

STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. **Cycles of: Carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1999. 448p.

SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: the new view. **Environmental Science & Technology**, New York, v. 39, p. 9009-9015, 2005.

SZCZERSKI, C.; NAGUIT, C.; MARKHAM, J.; GOH, T.B.; RENAULT, S. Short- and long-term effects of modified humic substances on soil evolution and plant growth in gold mine tailings. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 224, p. 1471, 2013.

TRESEDER, K.K. Nitrogen additions and microbial biomass: a meta-analysis of ecosystem studies. **Ecology letters**, Oxford, v. 11, p. 1111-1120, 2008.

TREVISAN, S. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: From environmental aspects to molecular factors. **Plant signaling & Behavior**, Bethesda, v. 5, p. 635-643, 2010.

VERLINDEN, G.; PYCKE, B.; MERTENS, J.; DEBERSAQUES, F.; VERHEYEN, K.; BAERT, G.; BRIES, J.; HAESAERT, G. Application of humic substances results in consistent increases in crop yield and nutrient uptake. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 32, p. 1407-1426, 2009.

VON LÜTZOW, M.; KÖGEL-KNABNER, I.; LUDWIG, B.; MATZNER, E.; FLESSA, H.; EKSCHMITT, K.; GUGGENBERGER, G.; MARSCHNER, B.; KALBITZ, K. Stabilization mechanisms of organic matter in four temperate soils: Development and application of a conceptual model. **Journal of Plant Nutrition & Soil Science**, Oldenburg, v. 171, p. 111-124, 2008.

WALKLEY, A.; BLACK, I.A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, Philadelphia, v. 37, p. 29-38, 1934.

WERSHAW, R.L. Model for humus in soils and sediments. **Environmental Science Technology**, New York, v. 27, p. 814-816, 1993.

ZANDONADI, D.B.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalema and tonoplast H⁺ pumps activation. **Planta**, Berlin, v. 225, p. 1583-1595, 2007.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, Amsterdam, v. 79, p. 117-161, 1997.

ZIMMERMAN, A.R.; AHN, M. Soil Enzymology. In SHUKLA, G.; VARMA A. (Ed.). **Soil Enzymology**. Heidelberg: Springer, v. 22, p. 271-292, 2011.

2 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS – ALTERAÇÕES EM ATRIBUTOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS DO SOLO

Resumo

A atividade biológica do solo está diretamente relacionada com a ciclagem de nutrientes. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar as alterações na atividade e estrutura genética da comunidade microbiana, no pH e na disponibilidade de N no solo ao longo do tempo, além de alterações nos teores de C e N total e na disponibilidade de P decorrentes da aplicação de doses de substâncias húmicas (SH), com e sem N mineral, em um Latossolo Vermelho Amarelo de textura arenosa. Foram utilizadas seis doses de SH com e sem adição de N. Durante o período de incubação foram avaliados o desprendimento de C-CO₂, a atividade da enzima desidrogenase, a biomassa microbiana de C, pH e N mineral do solo. Ao final da incubação foram determinados o C e N total do solo, P disponível, cálcio, magnésio, potássio, CTC e a estrutura da comunidade bacteriana pela técnica de T-RFLP. De modo geral, houve aumento da atividade e biomassa microbiana com as doses de SH, porém sem alteração na estrutura da comunidade bacteriana. Além disso, a adição de SH associada à de N mineral reduziu a atividade microbiana, em relação a não-adição de N. Esta alteração na atividade microbiana é transitória e possivelmente estimulada por um efeito *priming*. Houve aumento expressivo no teor de fósforo e N mineral do solo, bem como do potássio, cálcio e da CTC do solo. Foi observado um efeito sinérgico entre as SH e a adição de N mineral

Palavras-chave: Mineralização de N; Biomassa microbiana; Atividade da desidrogenase; Ácidos orgânicos.

Abstract

Soil biological activity is directly related to nutrient cycling. Thus, the objective of this study was to evaluate changes in the activity and structure of microbial community, in pH and N availability in the soil over time, and to look for changes in levels of C and N and P availability due to the application of increasing doses of humic substances (HS), with or without mineral N, on a sandy textured soil. Six doses of HS, with or without addition of N, were used. During the incubation period C-CO₂ evolution, dehydrogenase activity, microbial biomass C, pH and mineral N in the soil were evaluated. At the end of incubation (77 days) we determined soil C and total N, available phosphorus, calcium, magnesium, potassium, CEC and the bacterial community structure by T-RFLP. In general, an increase in microbial biomass and activity in accordance with the increase of HS was detected, but without changing the structure of the bacterial community. Furthermore, the addition of HS together with N reduced bacterial activity, when comparing with the non-addition of N. This change in microbial activity was transient and possibly stimulated by a *priming* effect. There was a significant increase in phosphorus and mineral soil N, as well as potassium, calcium and soil CEC. A synergistic effect between HS and N addition was observed.

Keywords: N mineralization; Microbial biomass; Dehydrogenase activity; Organic acids

2.1 Introdução

A matéria orgânica do solo (MOS) é constituída por compostos orgânicos com distintos graus de labilidade. Entre os fatores que afetam a comunidade microbiana do solo, podemos destacar a característica do material orgânico, uma vez que vários autores já relataram um aumento da biomassa microbiana e atividade biológica em sistemas de cultivo onde há aumento nos teores de C orgânico no solo (BALOTA et al., 2003; BALOTA et al., 2004. HUNGRIA et al., 2009). Resíduos lábeis são mais facilmente degradados pela microbiota do solo, que o utilizará como fonte de C e nutrientes, resultando em um rápido aumento da atividade biológica do solo. Por outro lado, substâncias orgânicas de maior recalcitrância teriam menor influência na atividade dos microrganismos do solo, uma vez que esses resíduos estão menos disponíveis ao ataque microbiano, quando comparados a resíduos mais lábeis. Essa matéria orgânica recalcitrante ou humificada compõe o C orgânico mais estável e persiste por maiores períodos no solo. Essas propriedades proporcionam efeitos em características físicas, químicas e biológicas do solo, tais como na agregação e porosidade do solo, aumento da CTC e efeito tampão do solo. Além disso, os ácidos orgânicos podem atuar como reservatório de nutrientes e apresentar efeitos fisiológicos para as plantas (BRONICK; LAL, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; PAVINATO; ROSOLEM, 2008; PICCOLO, 1996; PICCOLO et al., 2004;).

Os microrganismos do solo são considerados essenciais nos ecossistemas, pois atuam na mineralização e síntese da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, alterando propriedades físicas e químicas do solo e interferindo diretamente na sua fertilidade. Esses fatores culminam na redução da quantidade e diversidade de compostos orgânicos utilizados como fonte de energia pelos microrganismos, alterando os ciclos biogeoquímicos no solo (BADIANE et al., 2001). A biomassa microbiana e a atividade biológica do solo são influenciadas por diversos fatores, tais como temperatura, precipitação e umidade, além de atributos químicos e físicos do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Neste contexto, como o solo é um sistema complexo e dinâmico, envolvendo aspectos físicos, químicos e biológicos, deve-se levar em consideração o tipo de solo e a interação deste com a comunidade microbiana e a matéria orgânica do solo.

Define-se como condicionador orgânico aquele material orgânico (ou ácidos orgânicos) que, quando aplicado ao solo, proporciona melhoria nas condições físicas, químicas e biológicas do solo (PICCOLO, 1996). Sendo assim, o estudo de ácidos orgânicos tem recebido atenção especial nos últimos anos devido à sua capacidade em interagir com a

fase sólida do solo e ocupar os sítios de adsorção de nutrientes. No caso de solos altamente intemperizados, essa capacidade é de fundamental importância para o aumento das cargas do solo, bem como na redução da adsorção de fosfatos. Entre os ácidos orgânicos, as substâncias húmicas (SH) tem tido um crescente interesse, por se tratar de um material de maior tempo de permanência no solo, devido à sua recalcitrância, o que prolonga seus efeitos. Os benefícios associados às substâncias húmicas estão associados a sua natureza química e reatividade, em função da presença de grupos hidroxila e carboxila (LIZARAZO et al., 2005; PICCOLO, 1996).

Assim como o material orgânico, o tipo de solo também irá influenciar diretamente a comunidade microbiana do solo, seja por suas características físicas ou químicas. Diferentes solos possuem características que se distinguem por agregação, porosidade, retenção de umidade, modificando o acesso dos microrganismos aos compostos orgânicos (BRONICK; LAL, 2005; D'ACQUI et al., 1998). Neste contexto, Djajadi, Abbott e Hinz (2012) notaram que a respiração era reduzida com o aumento no teor de argila e concluíram que havia uma proteção do material orgânico pela argila, limitando o acesso dos microrganismos. Além disso, diferentes tipos de argilas possuem diferentes arranjos estruturais e, conseqüentemente, podem interferir de modos distintos na atividade microbiana do solo (D'ACQUI et al., 1998). Do mesmo modo, a distribuição heterogênea da microbiota está diretamente ligada ao tamanho dos poros e agregados do solo, visto que estes interferem na distribuição e interação do C orgânico (SCHUTTER; DICK, 2002).

Diversos trabalhos têm mostrado o efeito de SH na atividade microbiana e em alguns atributos químicos do solo. No entanto, ainda são escassos os trabalhos em solos tropicais e com avaliação ao longo do tempo, principalmente quanto às variações microbianas. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar as alterações na atividade e comunidade microbiana, no pH e na disponibilidade de N no solo ao longo do tempo, além de alterações nos teores de C e N totais e na disponibilidade de P decorrentes da aplicação de doses de substâncias húmicas, com e sem N mineral, em um Latossolo Vermelho Amarelo de textura arenosa.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Delineamento experimental

Foi utilizado neste ensaio um Latossolo Vermelho Amarelo de textura arenosa (LVA), coletado em uma área não agrícola na profundidade de 0-20 cm, no município de Itirapina, SP, além de um condicionador orgânico líquido à base de substâncias húmicas (SH), obtido após fracionamento químico de turfa. As propriedades químicas do solo utilizado são apresentadas na tabela 1. O delineamento foi inteiramente aleatorizado e os tratamentos consistiam em doses crescentes de SH, equivalentes a 0, 300, 600, 900, 1500 e 3000 L ha⁻¹ (D0, D300, D600, D900, D1500 e D3000, respectivamente), com 5 repetições cada. Além disso, todas as doses tinham seu tratamento correspondente com e sem adição de N (na forma de nitrato de amônio, correspondente a 60 kg ha⁻¹). Na tabela 2 são apresentadas algumas propriedades químicas da SH utilizada. A umidade foi mantida a 75% da capacidade de retenção de água durante todo o período de avaliação.

Tabela 1 - Propriedades químicas e físicas do solo utilizado em experimento de incubação

	pH H ₂ O	pH CaCl ₂	P mgdm ⁻³	K mmol _c dm ⁻³	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC	Areia	Silte	Argila
LVA	5,6	4,7	1	0,7	7	6	2	27	41,3	740	30	230

Tabela 2 - Propriedades químicas da SH utilizada em experimento de incubação

	SH
pH	7,8
Densidade (g mL ⁻¹)	0,99
Resíduo seco a 100°C (g L ⁻¹)	64,04
Carbono total (g L ⁻¹)	294,5
Nitrogênio total (g L ⁻¹)	4,09
Fósforo total – P ₂ O ₅ (g L ⁻¹)	6,01
Potássio – K ₂ O (g L ⁻¹)	9,65

2.2.2 Análises durante a condução do experimento

Para avaliação do desprendimento de C-CO₂ pela respirometria, foram montados frascos com 100 g de solo (seguindo os tratamentos anteriormente citados) mantidos hermeticamente fechados, em frascos de 0,5 L, com solução de NaOH 0,25 mol L⁻¹ para captura do CO₂ desprendido, quantificando-se o CO₂ produzido pela titulação do NaOH remanescente com solução de ácido clorídrico 0,25 mol L⁻¹ na presença de fenolftaleína (ALEF, 1995). As quantificações foram feitas após 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 15, 18, 21, 25, 28, 35, 42, 50, 57, 64, 70 e 77 dias da instalação do experimento.

Para as avaliações de biomassa microbiana de carbono (BMC), atividade da enzima desidrogenase, pH e N mineral (amônio e nitrato) e umidade, frascos de 2,0 L contendo inicialmente 600 g de solo com os tratamentos estabelecidos foram mantidos em incubação, sendo realizada avaliação periódica aos 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 77 dias após o início da incubação. Em cada período de avaliação, 50 g de solo eram retirados dos frascos e destinados às análises anteriormente citadas. O solo remanescente nos frascos tinha sua umidade corrigida proporcionalmente. A extração da biomassa microbiana foi realizada pelo método de fumigação e extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987), sendo a determinação do C feita pela metodologia de oxidação por dicromato (YEOMANS; BREMNER, 1988). A atividade da desidrogenase seguiu a metodologia proposta por Casida, Klein e Santoro (1964) e o pH foi determinado em CaCl₂ (PAVAN et al., 1992). Para a determinação do N mineral do solo foi utilizada a destilação a vapor para N-NH₄⁺ (KEENEY; NELSON, 1982) e a determinação por espectrofotometria em ultravioleta para N-NO₃⁻ (APHA, 2005).

2.2.3 Análises complementares

Ao final do período de incubação foram realizadas análises de C e N total do solo em analisador elementar, além de P em resina (RAIJ et al., 2001), cálcio, magnésio, potássio, H+Al e CTC, a fim de averiguar diferenças que ocorreram nos principais atributos químicos do solo após 77 dias da adição de SH.

2.2.4 Análise molecular

A fim de avaliar as alterações na comunidade microbiana ao longo do período estudado, foi realizada análise molecular por T-RLFP de amostras obtidas aos 3, 14, 28 e 42 dias. Estes períodos de avaliação foram estipulados a fim de se obter possível gradiente de alterações do perfil da comunidade microbiana. Para tanto, o DNA das amostras foi extraído

com o kit comercial PowerSoil DNA Isolation (MoBio, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O resultado das extrações foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA), para o que foram aplicados 5µl de produto de DNA extraído e, posteriormente, corado em solução de brometo de etídeo. Para realizar a análise por T-RLFP, o DNA das amostras foi submetido à amplificação com *primers* específicos da região ribossomal 16S DNAr (“FAM*-8fm –AGAGTTTGATCMTGGCTCAG” e “1404R-Eub –GGGCGGWGTGTACAAGGC”). Todas as reações de PCR foram conduzidas de acordo com as metodologias descritas por Schütte et al (2009), sendo realizadas triplicatas de cada uma para minimizar os efeitos de variação (*bias*) de PCR (FEINSTEIN; SUL; BLACKWOOD, 2009).

Além disso, medidas para evitar efeitos de quimeras e falsos TRFs foram adotadas, como a diminuição no número de ciclos e o aumento no tempo de alongação (ANGEL et. al., 2010). Após a amplificação, as amostras foram purificadas com *QuiaQuick PCR purification kit* (Quiagen) e o produto quantificado em géis de agarose 2%. As clivagens com as respectivas endonucleases foram realizadas utilizando quantidades de aproximadamente 200 ng de produto de amplificação com 20 unidades de enzima, de acordo com as instruções dos fabricantes (ANGEL et. al., 2010). Para se obterem réplicas do equipamento, cada amostra foi lida 2 vezes em sequenciador automático *ABI Prism 3500* (Applied Biosystems).

2.2.5 Análises estatísticas

Os dados químicos e microbiológicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias feita com o teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa estatístico R 2.15.2 (Copyright© 2012. The R Foundation for Statistical Computing). Já para o T-RFLP, a matriz de dados para as análises estatísticas foi obtida pelo software GeneMapper Software version 4.1 (Applied Biosystem), no qual os perfis eletroforéticos foram averiguados, normalizados e os considerados não satisfatórios descartados. Posteriormente, estes dados foram transformados em Excel, em dados de abundância relativa de cada pico encontrado. A matriz gerada foi submetida à análise de PCOA (Análise de Coordenadas Principais), a partir de uma matriz de similaridade com o algoritmo Bray Curtis, para estabelecer os agrupamentos entre as amostras, utilizando o software PAST (HAMMER; HARPER; ABBADIE, 2001).

2.3 Resultados

2.3.1 Atividade e biomassa microbiana

Houve aumento da respiração microbiana com adição de SH (Figura 1). Nos tratamentos sem N, o desprendimento de C-CO₂ foi mais expressivo, com diferença superior a 100% entre a maior e menor dose. Já quando o N foi adicionado, as diferenças se mantiveram apenas nas duas maiores doses, com aumento no desprendimento de C-CO₂ de cerca de 70% (Figura 1).

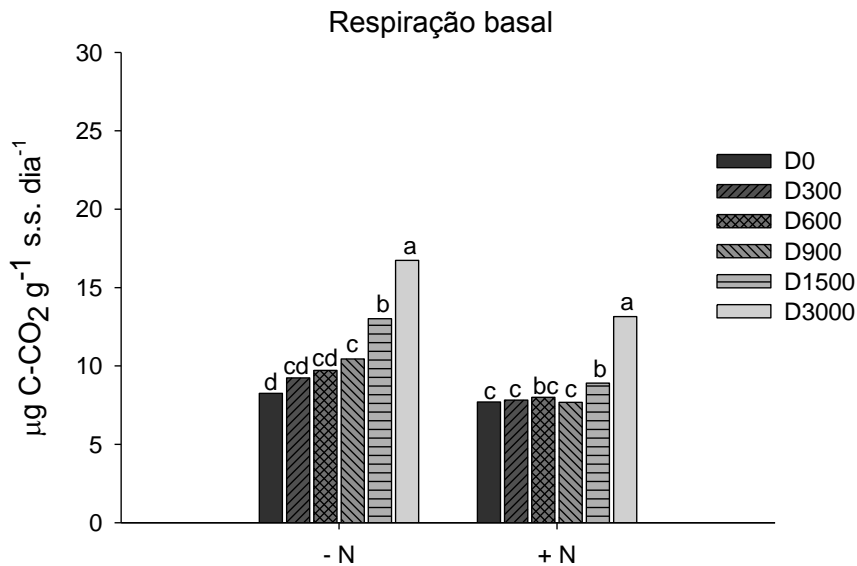


Figura 1 – Avaliação da respiração basal em experimento de incubação com adição de SH e N mineral em solo arenoso

Quando se avaliou o desprendimento diário de C-CO₂, independente da adição de N, houve diferenças entre os tratamentos em todos os períodos avaliados, principalmente nas duas maiores doses (Figura 2). De modo geral, houve maior desprendimento de C-CO₂ nas primeiras 24 horas de incubação com redução gradativa da mineralização do carbono durante um período de estabilização das condições, (Figura 2A e 2B). Com o somatório do desprendimento de C-CO₂ fica evidente a maior distinção entre os tratamentos quando não é adicionado N (Figura 3).

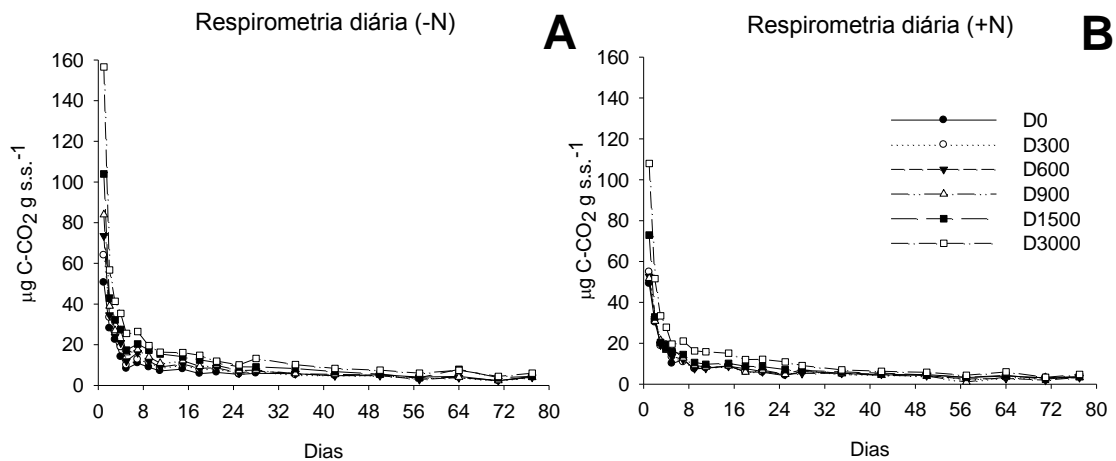


Figura 2 – Avaliação da respirometria diária em experimento de incubação com adição de SH (A) ou SH e N mineral (B) em solo arenoso

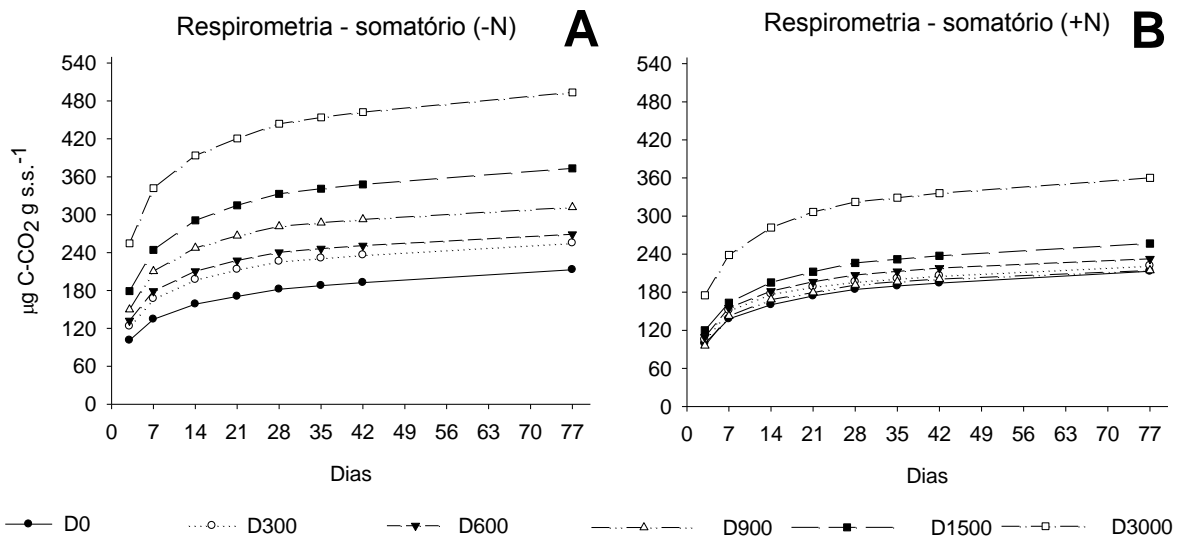


Figura 3 – Somatório do desprendimento de C-CO₂ durante experimento de incubação com SH em solo arenoso, sem adição de N (A) e com adição de N (B)

Houve alteração na atividade da enzima desidrogenase com adição de SH (Fig. 4). Quando não adicionado N, a adição de SH promoveu um aumento na atividade enzimática até D1500, com redução na maior dose (Figura 4A). Já quando adicionado N, houve uma maior oscilação entre os tratamentos, porém com menor atividade geralmente em D300 e D600 (Figura 4B). Independentemente da adição de N foi verificada uma redução acentuada da atividade enzimática aos 77 dias após o início da incubação, onde já não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

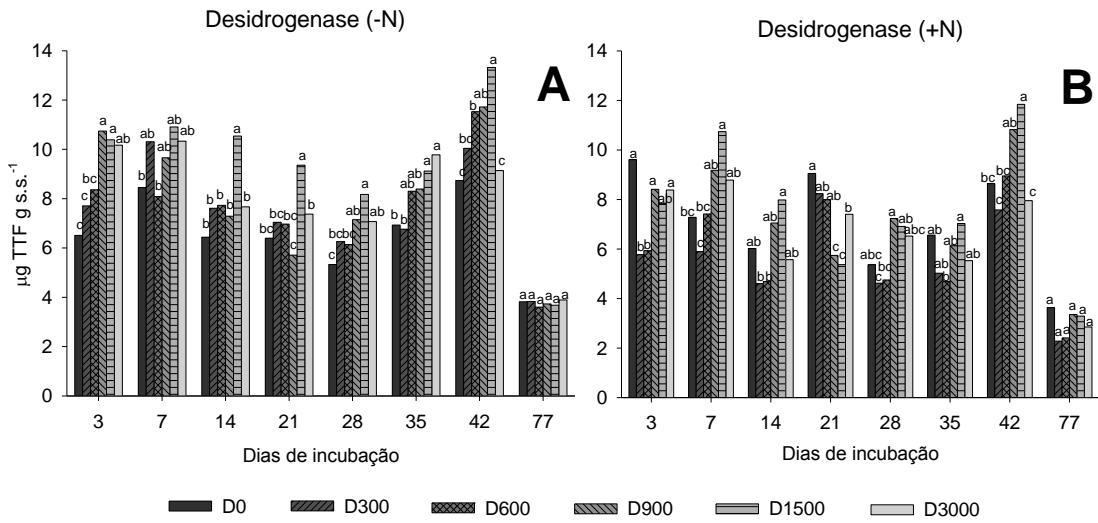


Figura 4 – Atividade da enzima desidrogenase em experimento de incubação com adição de SH em solo arenoso (A) e com adição de SH e N mineral (B)

Sem adição de N, as alterações na BMC pela adição de SH são consistentes apenas após 28 dias de incubação, onde nota-se redução da biomassa nas duas maiores doses de SH (Figura 5A). Já quando houve adição de N, as diferenças foram notadas a partir dos 7 dias de incubação, de modo geral aumentando a biomassa nas maiores doses de SH (Figura 5B).

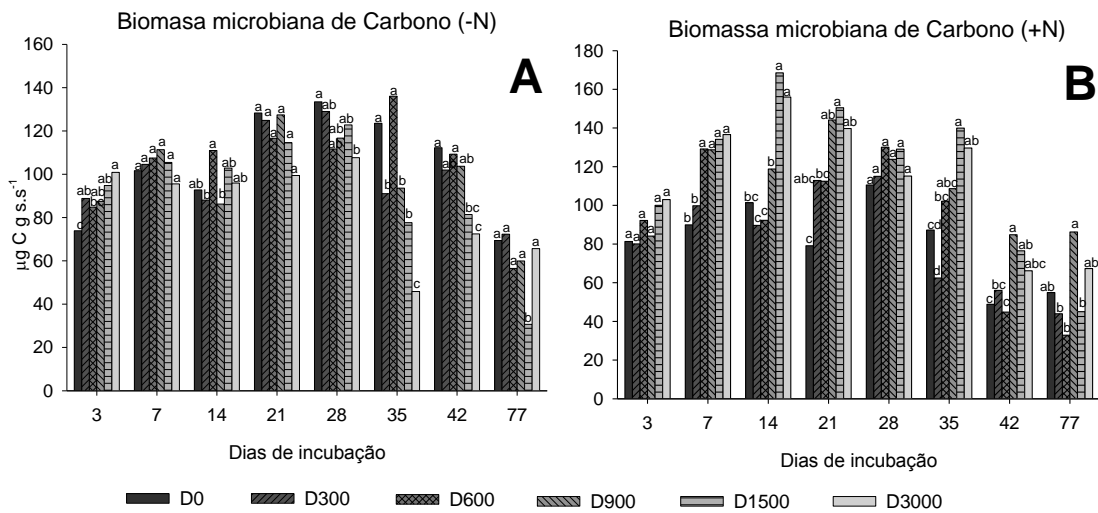


Figura 5 – Biomassa microbiana de carbono em experimento de incubação com adição de SH em solo arenoso (A) e com adição de SH e N mineral (B)

Ao considerar o comportamento das variáveis ao longo do tempo, ressaltam-se oscilações temporais na biomassa e atividade enzimática (Fig. 6 e 7). Houve redução na atividade da enzima desidrogenase nos períodos intermediários de avaliação, mesma ocasião

em que ocorreu aumento da BMC (Fig. 4 e 5). As oscilações entre os tratamentos foram mais evidentes quando houve adição de SH em conjunto com o N mineral.

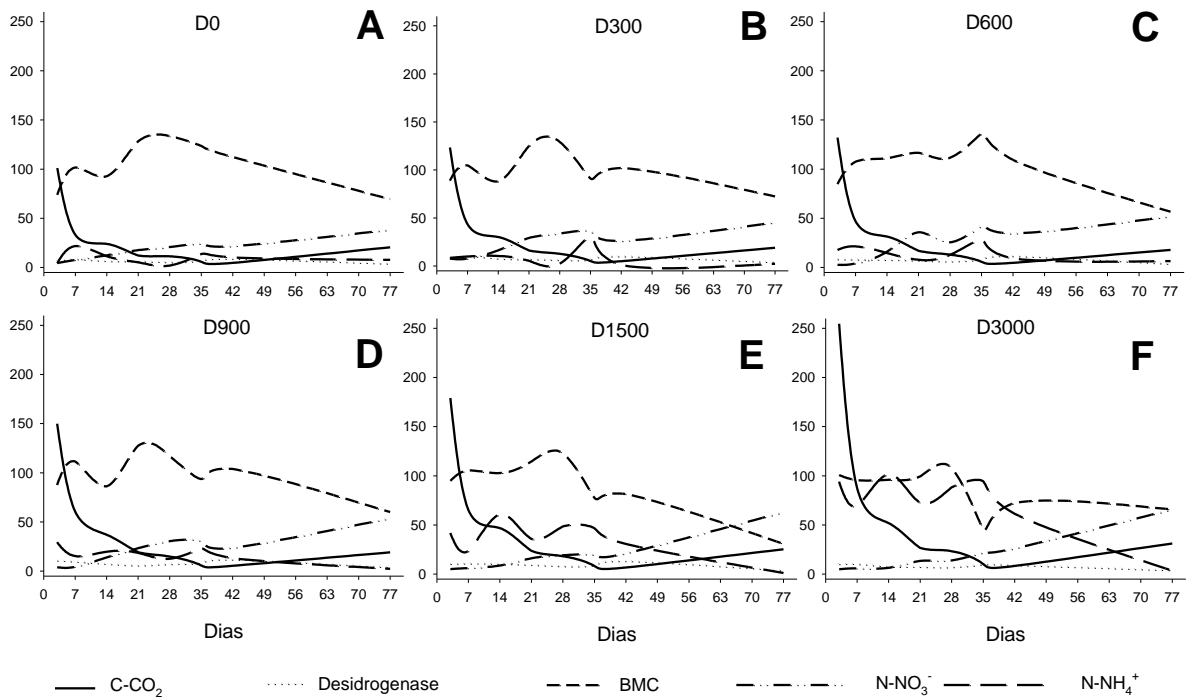


Figura 6 – Desprendimento de C-CO₂, atividade da enzima desidrogenase, biomassa microbiana de C (BMC), N mineral do solo (amônio e nitrato) em experimento de incubação com adição de SH em solo arenoso, sem adição de N mineral

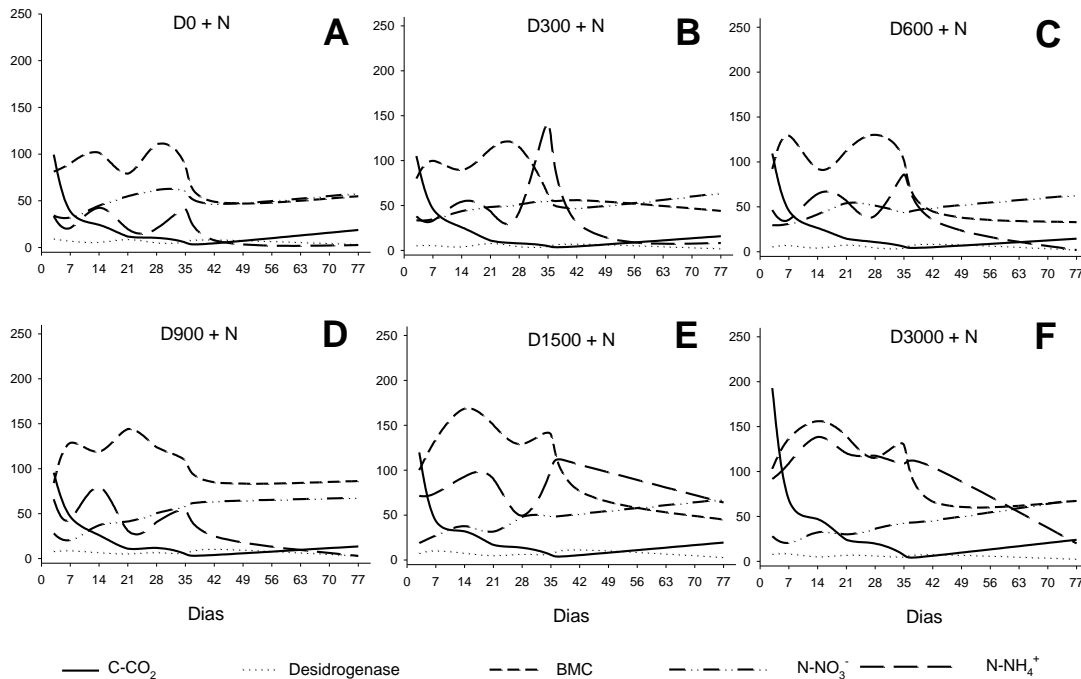


Figura 7 - Desprendimento de C-CO₂, atividade da enzima desidrogenase, biomassa microbiana de C (BMC), N mineral do solo (amônio e nitrato) em experimento de incubação com adição de SH e N mineral em solo arenoso, com adição de N mineral

No caso da avaliação da estrutura da comunidade microbiana do solo houve grande variação dentro dos tratamentos e as diferenças entre os tratamentos não foram significativas (Apêndices A e B). No entanto, foi constatada uma alteração na estrutura da comunidade microbiana por influência do tempo de incubação, ou seja, a comunidade no início da avaliação era distinta daquela encontrada no final do período avaliado (Apêndices C e D).

2.3.2 Atributos químicos

Houve um aumento expressivo no teor de N mineral do solo com adição de SH (Tabela 3). Sem adição de N, esse aumento ocorre até os 35 dias, momento em que ocorreu redução nos teores de N mineral. Mesmo com essa redução, há 50% mais N mineral em D3000 do que em D0. Já quando da adição de N, o incremento ao final do período avaliado foi de 45%. Na avaliação ao longo do tempo, o teor de N mineral apresentou grandes oscilações, tanto na forma de amônio quanto de nitrato (Fig. 6 e 7). Apenas pela presença de SH, houve oscilação nas formas de N do solo, com redução do amônio e aumento do nitrato ao longo do tempo (Fig. 6). Já quando adicionado N, as oscilações nos teores de N durante os

períodos avaliados foram maiores, mas com manutenção do amônio em teores mais elevados, principalmente nas doses mais elevadas (Fig. 7).

Tabela 3 - N mineral ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) no solo (mg kg^{-1}) avaliado em experimento de incubação com adição de SH, com e sem adição de N mineral

	Período de incubação (dias)							
	3	7	14	21	28	35	42	77
----- Sem N mineral -----								
D0	8,7 e	29,4 b	23,7 e	22,8 e	22,7 e	37,7 d	31,7 e	45,1 c
D300	16,2 d	16,6 d	26,7 de	34,6 d	36,2 d	67,2 b	26,8 f	47,6 c
D600	20,5 d	25,6 bc	30,5 cd	45,1 bc	38,4 cd	70,4 b	43,6 c	57,8 b
D900	35,7 c	19,5 cd	33,7 c	41,7 cd	43,0 c	52,8 c	36,8 d	56,2 b
D1500	47,1 b	29,8 b	69,8 b	51,8 b	69,5 b	64,6 b	54,4 b	64,0 a
D3000	99,1 a	75,2 a	104,8 a	85,9 a	102,9 a	113,0 a	87,4 a	69,1 a
----- Com N mineral -----								
D0	67,7 d	53,1 d	89,1 e	74,5 e	80,5 d	101,1 d	54,2 c	60,6 e
D300	71,6 cd	67,9 c	97,9 de	92,0 d	94,1 bc	197,2 a	77,9 b	72,1 c
D600	76,2 c	66,8 c	106,1 d	110,8 c	91,4 bc	130,2 bc	84,2 b	64,8 de
D900	93,9 b	64,2 c	117,0 c	72,4 e	88,2 cd	116,5 cd	88,3 b	70,6 cd
D1500	90,4 b	102,1 b	130,6 b	122,0 b	97,5 b	149,2 b	157,4 a	131,5 a
D3000	119,7 a	133,3 a	170,8 a	150,3 a	154,0 a	152,1 b	150,4 a	87,7 b

Todas as diferenças são significativas a $p < 0,1$

O teor de água teve pouca influência da adição de SH, com pequenas oscilações transitórias. No entanto, quando também se adicionou N, maiores diferenças foram notadas, sendo essa diferença maior após 35 dias de avaliação, onde houve menor teor de água em D0 (Tabela 4).

Tabela 4 - Teor de água no solo (%) avaliado em experimento de incubação com adição de SH e N mineral

	Período de incubação (dias)							
	3	7	14	21	28	35	42	77
----- Sem N mineral -----								
D0	22,1 a	20,6 a	21,9 a	22,9 a	22,5 a	18,7 a	19,6 ab	20,5 a
D300	23,5 a	20,8 a	20,6 a	22,9 a	21,7 ab	19,9 a	21,1 a	22,9 a
D600	22,1 a	21,2 a	21,6 a	21,6 a	20,8 ab	19,8 a	19,4 ab	21,0 a
D900	23,3 a	21,2 a	22,3 a	22,1 a	20,5 ab	19,1 a	19,5 ab	21,3 a
D1500	21,9 a	20,8 a	21,5 a	22,0 a	22,4 ab	19,8 a	19,6 ab	21,3 a
D3000	22,0 a	21,6 a	22,4 a	20,9 a	20,2 b	18,8 a	18,2 b	19,7 a
<i>p valor</i>					*	*	*	
----- Com N mineral -----								
D0	20,6 b	18,1 b	19,5 b	19,6 a	19,2 a	16,6 d	16,8 c	18,2 b
D300	22,2 ab	22,7 a	24,0 a	23,2 a	25,2 a	20,5 ab	21,0 a	22,5 a
D600	23,4 a	23,6 a	24,5 a	21,9 a	23,2 a	21,2 a	21,0 a	22,4 a
D900	22,3 ab	22,5 a	23,5 a	22,9 a	22,2 a	19,2 bc	20,6 ab	21,7 a
D1500	20,9 ab	22,3 a	23,3 a	21,7 a	21,3 a	17,7 cd	18,2 bc	21,8 a
D3000	23,2 ab	21,7	23,6 a	22,5 a	23,1 a	20,0 ab	20,5 ab	22,8 a
		ab						
<i>p valor</i>	*	**	***			***	***	***

(*) significativo a 5%; (**) significativo a 1%; (***) significativo a 0,1%

De maneira geral, houve aumento do pH com adição de SH (Tabela 5). Sem adição de N, os maiores valores de pH foram encontrados geralmente nas maiores doses, enquanto que quando acrescido N, a variação do pH foi maior, sempre com menores valores de pH em D0.

Ao final do período de incubação, foram realizadas algumas análises químicas a fim de observar as alterações que a adição de SH ocasionou nestes atributos do solo. Houve aumento dos teores de N total nas maiores doses de SH apenas quando da adição de N (Figura 8A), enquanto que poucas diferenças foram notadas no C total (Figura 8B). Entretanto, o aumento no N total refletiu em redução da relação C/N do solo nas maiores doses de SH, em conjunto com a adição de N (Figura 8C).

Tabela 5 - pH do solo avaliado em experimento de incubação com adição de SH e N mineral

	Período de incubação (dias)							
	3	7	14	21	28	35	42	77
----- Sem N mineral -----								
D0	4,41 b	4,61 b	5,03 ab	5,0 b	5,17 b	5,05 b	4,99 bc	5,0 a
D300	4,7 b	5,0 ab	5,17 ab	5,29 ab	5,04 b	5,12 b	4,9 c	5,04 a
D600	4,7 b	5,13 ab	5,06 ab	5,17 b	5,13 b	5,2 b	4,97 c	5,07 a
D900	5,51 a	5,24 ab	4,97 ab	5,42 ab	5,2 b	5,16 b	4,99 bc	5,06 a
D1500	4,54 b	5,21 ab	5,5 a	5,65 a	5,6 a	5,57 a	5,23 ab	5,21 a
D3000	4,86 b	5,38 a	4,55 b	5,69 a	5,7 a	5,72 a	5,41 a	5,08 a
<i>p valor</i>	***	*	*	***	***	***	***	
----- Com N mineral -----								
D0	4,91 b	4,81 ab	4,65 c	5,22 ab	5,01 b	4,91 b	4,68 c	4,75 b
D300	4,85 b	5,47 a	4,86 bc	5,19 ab	5,43 ab	5,45 a	5,18 ab	5,06 a
D600	4,97 b	5,49 a	5,16 ab	5,19 ab	5,62 a	5,35 ab	5,11 ab	5,03 a
D900	5,08 ab	5,73 a	5,04 ab	5,08 b	5,35 ab	5,27 ab	4,94 bc	4,96ab
D1500	5,06 ab	5,36 ab	5,52 a	5,17 ab	5,37 ab	5,52 a	4,95 bc	4,97ab
D3000	5,54 a	5,52 a	5,56 a	5,58 a	5,64 a	5,62 a	5,37 a	5,14 a
<i>p valor</i>	**	**	***	.	**	**	***	**

(.) significativo a 10%; (*) significativo a 5%; (**) significativo a 1%; (***) significativo a 0,1%

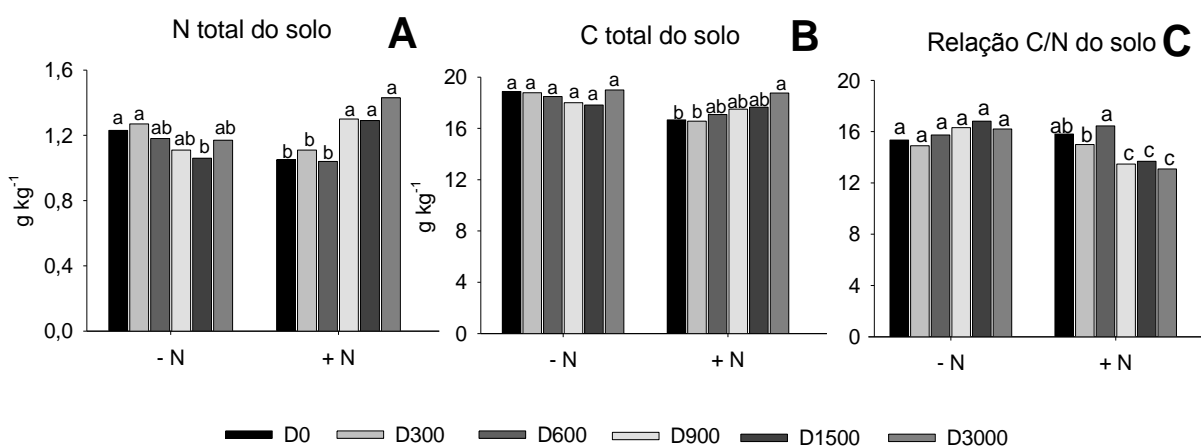


Figura 8 - Teor total de N (A) e C (B) e relação CN do solo (C) em experimento de incubação com adição de SH e N mineral em solo arenoso

O fósforo teve aumento significativo e progressivo proporcionalmente às doses, sendo que, sem adição de N, todos os tratamentos diferiram do controle, com oito vezes mais fósforo disponível na maior dose em comparação com o controle (Tabela 6). Já quando adicionado N, as diferenças entre as doses de SH foram menores, mas ainda assim, houve incremento na disponibilidade de fósforo em D3000 de 4 vezes em relação a D0 (Tabela 6).

Tabela 6 - Atributos químicos do solo avaliados em experimento de incubação com adição de SH e N mineral

	P	K	Ca	Mg	H+Al	CTC
	mg dm ⁻³	mmol _c dm ⁻³				
	----- Sem N mineral -----					
D0	3,0 f	0,74 f	13,4 b	10,8 b	26,2 b	50,02 c
D300	4,8 e	1,36 e	13,8 b	12,0 ab	25,0 b	50,96 c
D600	6,4 d	2,02 d	14,2 b	11,4 ab	24,4 b	52,10 c
D900	9,2 c	2,56 c	19,0 a	13,2 a	26,2 b	58,80 ab
D1500	16,0 b	3,76 b	17,2 ab	11,4 ab	24,4 b	54,84 bc
D3000	25,4 a	5,46 a	17,2 ab	12,8 ab	29,2 a	64,48 a
<i>p valor</i>	***	***	**	*	***	***
	----- Com N mineral -----					
D0	7,0 e	0,76 f	13,4 b	10,2 a	29,2 a	53,40 b
D300	8,2 de	1,4 e	14,8 ab	10,8 a	26,8 a	56,54 b
D600	10,8 cd	1,94 d	15,0 ab	11,6 a	27,4 a	54,60 b
D900	11,8 c	2,56 c	17,4 a	11,6 a	27,4 a	59,10 ab
D1500	15,2 b	3,48 b	13,8 b	10,8 a	29,8 a	57,42 b
D3000	30,2 a	6,84 a	17,8 a	12,0 a	29,8 a	64,84 a
<i>p valor</i>	***	***	***		*	***

() não significativo; (.) significativo a 10%; (*) significativo a 5%; (**) significativo a 1%; (***) significativo a 0,1%

O potássio também teve sua disponibilidade expressivamente aumentada com a adição de SH, independente da adição de N (Tabela 6). No caso do cálcio, houve aumento dos teores nas doses intermediárias, enquanto que o teor de magnésio aumentou quando não adicionado

N mineral, assim como o H+Al (Tabela 6). A CTC do solo aumentou significativamente nas maiores doses de SH aplicadas, seja com ou sem adição de N mineral (Tabela 6).

2.4 Discussão

2.4.1 Substâncias húmicas e atividade biológica

O comportamento de redução e aumento da atividade biológica ao longo do experimento pode estar relacionado a dois fatores: a disponibilidade de C facilmente assimilável e/ou ao efeito *priming*, que é um estímulo à microbiota do solo para decompor o C nativo do solo.

A estrutura supramolecular das SH e a constante incorporação de materiais menos recalcitrantes a essa estrutura, através de interações hidrofóbicas, parecem ser as responsáveis pela maior resiliência das substâncias húmicas no solo, protegendo esses materiais da degradação microbiana e aumentando seu tempo de residência no solo (CONTE; PICCOLO, 1999; MARINARI et al., 2010; PICCOLO, 1996; PICCOLO, 2001). Sabendo que alterações no ambiente podem alterar a estrutura das substâncias húmicas e liberar compostos de fácil assimilação, de acordo com nossos resultados, podemos dizer que num primeiro momento há maior acesso ao C de fácil assimilação, que se reduz após o período inicial de 28 dias. No entanto, com a ciclagem da biomassa microbiana e a sucessão microbiana existente no solo, após alguns dias volta a aumentar a disponibilidade de C aos microrganismos, resultando em aumento da atividade microbiana.

A biomassa microbiana funciona como fonte e dreno de C e nutrientes, imobilizando-os temporariamente, porém é uma fonte de rápida ciclagem, o que pode favorecer a liberação de nutrientes, beneficiando assim a ciclagem de nutrientes no solo de modo geral. A adição de materiais que estimulem a biomassa microbiana pode contribuir para a manutenção de nutrientes no solo em formas lábeis, visto que sua incorporação na biomassa microbiana pode reduzir os problemas de lixiviação e adsorção de alguns elementos de relevante importância para as plantas. O comportamento da BMC visto no presente trabalho indica que há um estímulo à BMC do solo quando da adição de C orgânico no solo, mesmo que em uma forma mais recalcitrante e de difícil acesso aos microrganismos, como no caso das SH.

Já em relação à atividade da enzima desidrogenase, Lizarazo et al. (2005) não verificaram efeito da aplicação de ácido húmico originário de turfa na atividade desta enzima. A desidrogenase é uma enzima intracelular ligada à cadeia transportadora de elétrons e, por

isso, é empregada para medir a atividade microbiana do solo. De acordo com Lizarazo et al. (2005), a atividade da desidrogenase pode responder à aplicação de ácido húmico nos primeiros dias após aplicação, com redução da atividade após 10 dias, porém o incremento inicial na atividade desta enzima é muito baixo quando o ácido húmico é originário de turfa. No presente trabalho, entretanto, houve aumento significativo da atividade da enzima durante os primeiros 42 dias de avaliação, mas a atividade foi mais pronunciada em D1500, o que evidencia uma baixa resposta da enzima desidrogenase para doses menores e também uma inibição da atividade em doses muito elevadas.

Outro fator que também pode contribuir com a maior atividade microbiana pela adição de C recalcitrante é um efeito *priming*, ocasionado pela adição de SH. Este efeito seria decorrente de um estímulo causado à microbiota para mineralizar o C nativo do solo. Neste caso, há um predomínio inicial de microrganismos r-estrategistas, que possuem um rápido crescimento e utilizam as formas mais facilmente assimiláveis de C sendo que, quando a fonte de C torna-se basicamente recalcitrante, essa população microbiana diminui e é substituída por microrganismos k-estrategistas, que possuem crescimento mais lento e são capazes de utilizar fontes mais complexas de C para obtenção de energia (FONTAINE; MARIOTTI; ABBADIE, 2003). De acordo com Kuzyakov (2010) o efeito *priming* ocorre em “hotspots” no solo quando da adição de material orgânico facilmente assimilável. No entanto, o efeito *priming* e a sucessão microbiana podem resultar em um consumo de C em formas menos complexas presentes no solo, mesmo antes da adição do material orgânico, ocasionando uma aceleração na mineralização do C. No caso da adição de materiais recalcitrantes, como no presente trabalho, o efeito *priming* levaria a um maior tempo de atividade microbiana pelo melhor aproveitamento deste C na obtenção de energia pelos microrganismos do solo.

A redução acentuada da atividade enzimática aos 77 dias de incubação indica que os efeitos dos tratamentos se equipararam. De acordo com Szczerki et al. (2013), quando há altas concentrações de SH no solo, isso pode resultar em redução de nutrientes disponíveis devido à ligação destes nutrientes nas estruturas dos SH, o que poderia limitar a atividade microbiana nestas condições. Contudo, isso não pode ser afirmado no presente trabalho, uma vez que houve aumento na disponibilidade de alguns nutrientes avaliados. Sendo assim, pode-se afirmar que, mesmo com alterações na biomassa e atividade microbiana ao longo do tempo, este efeito é transitório e existe uma tendência da microbiota voltar ao estado original.

Neste trabalho torna-se interessante uma comparação entre o comportamento da atividade da enzima desidrogenase e da BMC. É comum encontrar maior atividade da

desidrogenase onde há maior biomassa microbiana. No entanto, nossos resultados mostraram um comportamento inverso entre esses dois atributos avaliados. Neste estudo, há tendência a um comportamento inverso entre a biomassa e a desidrogenase. Enquanto a desidrogenase tende a reduzir a atividade entre os 21 e 28 dias de incubação, a biomassa microbiana aumenta neste mesmo período, com redução nos períodos posteriores. Nos tratamentos com N, após 42 dias, houve um estímulo acentuado na atividade da desidrogenase e com redução acentuada da BMC. Isso pode ter sido causado pela sucessão microbiana que ocorre no solo com alterações em frações assimiláveis de C e nutrientes no solo (FONTAINE; MARIOTTI; ABBADIE, 2003). Uma vez que a biomassa microbiana se torna dreno de nutrientes, há o acúmulo destes em suas células até o momento em que estes se tornam escassos no solo ou menos acessíveis à ação microbiana, resultando em menor atividade microbiana. Como a biomassa microbiana possui uma rápida ciclagem, em pouco tempo começa a ocorrer morte e lise de células microbianas e liberação de compostos lábeis, o que resulta em novo aumento da atividade microbiana (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Apesar de todos os fatores citados anteriormente sobre a disponibilidade de C, deve-se salientar que há uma recalcitrância inerente às SH, o que não permite acesso total dos microrganismos ao C presente nesta estrutura. Outro fator também é de que, apesar de uma possível alteração da estrutura da SH com acesso de parte dos compostos carbonados pelos microrganismos, esta SH adicionada irá interagir no solo e se estabilizar novamente. Sendo assim, há uma tendência de redução do C mais facilmente assimilável, com consequente redução da atividade microbiana.

A estrutura da comunidade microbiana do solo também não foi alterada pela adição de SH. Nakatani et al. (2012) apenas encontraram alterações no perfil de ácidos graxos de bactérias do solo após longo período de aplicação de resíduo orgânico. Alguns fatores podem ter contribuído para a manutenção da comunidade microbiana no presente trabalho. A adição de um resíduo orgânico altamente recalcitrante e que de certa forma já está presente no solo, não estimulou uma expressiva sucessão microbiana. Com isso, podemos dizer que a sucessão microbiana existente nas condições avaliadas não foi influenciada pelas SH, mas sim pelo tempo, ou seja, há uma sucessão bacteriana natural no solo, sem a necessidade de adição de compostos orgânicos.

2.4.2 Dinâmica do C e N no solo

Diversos fatores podem controlar os teores de C e N no solo, tal como sua adição (fertilizantes, fixação biológica e restos culturais) e perdas (erosão do solo, lixiviação e mineralização da MOS) (BAYER et al., 2006). No presente trabalho, perdas consideráveis de C são constatadas pela atividade biológica do solo, com a mineralização do C pelos microrganismos e liberação de CO₂. Diekow et al. (2005) também encontraram maiores teores de C em solos de plantio direto quando da adição de fertilização nitrogenada em detrimento às áreas sem fertilização.

Mesmo com adição de C, seu teor total só diferiu quando da adição de N junto com a SH, visto que o N reduziu a atividade microbiana, com menor liberação de C-CO₂. O estímulo à mineralização do C do solo foi menor quando ocorreu adição de N, o que pode ser devido a diversos mecanismos que podem reduzir a atividade microbiana. De acordo com Treseder (2008), o N pode se condensar com compostos de C e aumentar a polimerização de polifenóis, transformando-se em compostos mais recalcitrantes. Além disso, o excesso de N pode inibir a produção de ligninase, responsável pela decomposição da lignina, presente em material orgânico altamente recalcitrante (BINI et al., 2013; TRESSEDER, 2008). Ambos os processos podem dificultar o acesso dos microrganismos ao C do solo, reduzindo assim a atividade biológica. Outro fator que pode reduzir a atividade é uma alteração no potencial osmótico do solo. Com a adição de sais de N, que são solúveis em água, há um aumento na concentração de sais na solução do solo, acarretando em menor atividade dos microrganismos do solo (BRADDOCK et al., 1997; FERGUSON et al., 2003; WALWORTH et al., 2007; TRESSEDER, 2008). Esse efeito pode ser visto em solos extremamente arenosos e com consequente baixa capacidade de retenção de água (BRADDOCK et al., 1997). No entanto, apesar do solo arenoso utilizado no presente trabalho, sua capacidade de retenção de água é satisfatória, visto que este solo possui 23% de argila (Tabela 1). Ainda, a quantidade de N adicionado não foi elevada, sendo comumente aplicada em condições de campo. Sendo assim, pode-se dizer que não apenas o efeito do potencial osmótico pode ter influenciado a redução da atividade microbiana, mas sim uma junção de fatores pode ter contribuído para este evento.

No presente trabalho, houve maior teor de N mineral no solo com a adição de SH (Tabela 3), mas sem resultados expressivos no N total do solo. Este fato também é decorrente da mineralização da MOS e da liberação de N antes estável em compostos carbonados, visto que o teor de N total na SH não é elevado (Tabela 2). Ramirez et al. (2010) observaram

redução da atividade microbiana quando da adição de fertilizante nitrogenado, porém não encontraram relação do teor de N mineral do solo com este fato. Porém, apesar de saber que o C e o N orgânico do solo estão intimamente relacionados, pouco se sabe sobre a importância do N nos pools de MOS recalcitrante (KNICKER, 2011). A formação de compostos heterocíclicos de N talvez esteja diretamente relacionada à estabilização do N no solo, no entanto, a alteração na disponibilidade de N no solo também está relacionada ao C, com possível imobilização em biomassa, afetando tanto a quantidade quanto a qualidade dos pools de MOS (KNICKER, 2004; KNICKER, 2011).

2.4.3 Atributos químicos

A CTC do solo é fundamental para retenção de cátions no solo, em formas trocáveis e disponíveis (ZECH; SENESI; GUGGENBERGER, 1997). Solos intemperizados possuem, devido à sua mineralogia, baixa quantidade de cargas trocáveis (CTC) e, por isso, são altamente dependentes das cargas geradas pela MOS, o que os torna dependentes do manejo do solo. Por este fator, a manutenção da MOS para aumento de CTC de solos tropicais possui maior relevância do que em solos de clima temperado, onde as argilas já possuem alta CTC (ZECH; SENESI; GUGGENBERGER, 1997). Como as SH constituem a maior parte da MOS, estas tem papel fundamental na formação e manutenção de cargas, o que auxilia na formação de quelatos, nas reações do solo e contribui no controle da disponibilidade de nutrientes. No presente trabalho, ficou evidente um aumento da CTC do solo quando houve aplicação de elevadas doses de SH (acima de 900 kg ha^{-1}), aumentando os sítios de trocas de cargas no solo e potencializando as reações químicas que ali ocorrem.

A adição de SH em associação a N mineral aumentou o pH do solo, o que pode contribuir na manutenção das cargas oriundas das SH, uma vez que o pH também é fator preponderante na formação e manutenção de cargas nos solos tropicais (ZECH; SENESI; GUGGENBERGER, 1997). Em solos ácidos com adição de MO, o aumento da CTC é transitório, pois em longo prazo haverá um bloqueio por Fe e Al dos novos sítios de cargas negativas formadas (ZECH; SENESI; GUGGENBERGER, 1997). Contudo, no presente trabalho, além do aumento da CTC, houve também aumento do pH do solo com as doses de SH. Apesar do aumento no pH não ser muito expressivo, a interação entre todos os fatores pode favorecer a manutenção das cargas formadas no solo, contribuindo durante mais tempo com a manutenção e equilíbrio de cátions no sistema. Pode-se dizer que a adição do N mineral não causou grandes alterações no pH do solo e que as diferenças encontradas são realmente

decorrentes da adição de SH, o que pode ser resultado da ocorrência de processos como a mineralização de formas orgânicas de nitrogênio e da descarboxilação de ácidos orgânicos (SILVA; MENDONÇA, 2007).

A retenção de água no solo teve maiores alterações quando da adição de SH e N mineral (Tabela 4). Neste caso, o que acontece é que a adição de N mineral muda o comportamento das SH no solo quanto à sua capacidade de retenção de água, já que a matéria orgânica, assim como as SH aumentam a retenção de água no solo (STEVENSON, 1994) e sem a adição do N o resultado foi contrário ao descrito na literatura.

Entre os elementos minerais analisados, o que mais teve sua disponibilidade influenciada foi o fósforo. Em solos altamente intemperizados, o fósforo se encontra fortemente adsorvido nos coloides de argila e nos óxidos e hidróxidos de Fe e Al (PAVINATO; ROSOLEM, 2008). Devido ao caráter aniônico dos SH, pode haver competição pelos sítios de adsorção que o fósforo ocupa (HUNT et al., 2007; GUPPY et al., 2005). Sendo assim, há um aumento na concentração de fósforo na solução do solo, ficando este disponível às plantas e microrganismos. Em trabalho de Guppy et al. (2005), os autores mostraram uma redução da adsorção do fósforo em mais de 60% em Oxisolos após adição de ácidos orgânicos. Por outro lado, quando adicionado N mineral, foram observados maiores valores de P disponível, mostrando um efeito também do N mineral na disponibilidade de P. Este fato pode ser decorrente da maior mineralização da MOS, o que aumenta os teores de nutrientes na sua forma mineral no solo.

A SH utilizada também contém fósforo, o que pode contribuir com o incremento deste elemento no solo (Tabela 2). No entanto, a quantidade de fósforo presente na SH não causaria um aumento tão expressivo como o encontrado no presente trabalho. Pavinato (2007), adicionando o equivalente a 30 kg ha⁻¹ de P no solo, observou incremento de 10 mg kg⁻¹ P. No presente trabalho, na maior dose foi adicionado, via SH, o equivalente a menos de 8 kg ha⁻¹ de P, com aumento no teor de P superior a 20 mg kg⁻¹, o que não pode ser justificado apenas pela adição de P via SH. Sendo assim, podemos afirmar que as SH podem atuar como fonte de fósforo, mas o efeito químico da competição das SH pelos sítios de adsorção do fósforo no solo foi o fator que mais contribuiu para o aumento da concentração deste nutriente.

Houve também um efeito evidente das SH sobre o teor de potássio do solo. Uma vez que não foram observadas diferenças entre os tratamentos com e sem adição de N mineral, pode-se concluir que todo o efeito sobre o potássio foi devido à adição de SH. Como aconteceu com o fósforo, também há potássio na SH utilizada (Tabela 2) o que, da mesma

forma, não justifica todo o incremento observado no teor disponível na solução do solo. O potássio tem importância como ativador enzimático em vários processos bioquímicos e também na regulação do potencial osmótico da célula. Maior disponibilidade do nutriente no solo pode refletir em maior aproveitamento do mesmo por plantas e microrganismos.

Apesar de o solo já apresentar naturalmente SH, a adição destas resultou em aumento na disponibilidade de nutrientes como N e K. Isso demonstra um grande potencial do uso de SH como condicionadores orgânicos uma vez que podem melhorar a nutrição das plantas culminando em maiores produtividades das culturas com menores custos com insumos.

2.5 Conclusão

Houve efeito sinérgico entre SH e N mineral, principalmente na atividade e biomassa microbiana. No entanto, os efeitos na atividade microbiana foram transitórios e, provavelmente, estimulados por um efeito *priming*, o que não contribuiu para diferenciar a estrutura da comunidade bacteriana do solo. No entanto, as alterações nos parâmetros químicos do solo permitem concluir que, mesmo materiais recalcitrantes, podem contribuir positivamente na disponibilidade de nutrientes, o que se reflete nas melhorias tanto no solo quanto no rendimento das plantas cultivadas.

Referências

ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 214-219.

APHA. **Standard methods for the examination for water and wastewater**. 21st ed. Washington: APPA; American Water Works Association, Water Environment Federation, 2005. 1600p.

ANGEL, R.; SOARES, M.I.M.; UNGAR, E.D.; GILLOR, O. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. **The ISME Journal**, London, v.4, p.553-563, 2010.

BADIANE, N.N.Y.; CHOTTE, J.L.; PATE, E.; MASSE, D.; ROULAND, C. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.18, p.229-238, 2001.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology & Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, v. 15-20, 2003.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazilian Oxisol. **Soil & Tillage Research**, Berlin, v. 77, p. 137-145, 2004.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; DIECKOW, J.; AMADO, T.J.C. C and N stocks and the role of molecular recalcitrance and organomineral interaction in stabilizing soil organic matter in a subtropical Acrisol managed under no-tillage. **Geoderma**, Amsterdam, v. 133, p. 258-268, 2006.

BINI, D.; SANTOS, C.A.; BOUILLET, J.P.; GONÇALVES, J.L.M.; CARDOSO, E.J.B.N. *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in monoculture and intercropped plantations: Evolution of soil and litter microbial and chemical attributes during early stages of plant development. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.63, p57-66, 2013.

BRADDOCK, J.F.; RUTH, M.L.; CATTERALL, P.H.; WALWORTH, J.L.; MCCARTHY, K.A. Enhancement and Inhibition of Microbial Activity in Hydrocarbon-Contaminated Arctic Soils: Implications for Nutrient-Amended Bioremediation. **Environmental Science & Technology**, New York, v. 31, p. 2078-2084, 1997.

BRONICK, C.J.; LAL, R. Soil structure and management: a review. **Geoderma**, Amsterdam, v. 124, p. 3-22, 2005.

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

CONTE, P.; PICCOLO, A. Conformational arrangement of dissolved humic substances. influence of solution composition on association of humic molecules. **Environmental Science & Technology**, New York, v. 33, p. 1682-1690, 1999.

D'ACQUI, L.P.D.; DANIELE, E.; FORNASIER, F.; RADAELLI, L.; RISTORI, G.G. Interaction between clay microstructure, decomposition of plant residues and humification. **European Journal of Soil Science**, Amsterdam, v.49, p.579-587, 1998.

DIEKOW, J.; MIELNICZUK, J.; KNICKER, H.; BAYER, C.; DICK, D.P.; KOGEL-KNABNER, I. Soil C and N stocks as affected by cropping systems and nitrogen fertilisation in a southern Brazil Acrisol managed under no-tillage for 17 years. **Soil & Tillage Research**, Berlin, v. 81, p. 87-95, 2005.

DJAJADI, L.K.A.; HINZ, C. Synergistic impacts of clay and organic matter on structural and biological properties of a sandy soil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 183, p. 19-24, 2012.

FEINSTEIN, L.M.; SUL, W.J.; BLACKWOOD, C.B. Assessment of bias Associated with incomplete extraction of microbial DNA from Soil. **Applied & Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 5428-5433, 2009.

FERGUSON, S.H.; FRANZMANN, P.D.; REVILL, A.T.; SNAPE, I.; RAYNER, J.L. The effects of nitrogen and water on mineralization of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. **Cold Regions Science & Technology**, Amsterdam, v. 37, p. 197-212, 2003.

FONTAINE, S.; MARIOTTI, A.; ABBADIE, L. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, p. 837-843, 2003.

GUPPY, C.N.; MENZIES, N.W.; MOODY, P.W.; BLAMEY, F.P.C. Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: a review. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v.43, p.189-202, 2005.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological electronica**, Califórnia, v.4, p. 1-9, 2001.

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

HUNT, J.F.; OHNO, T.; HE, Z.; HONEYCUTT, C.W.; DAIL, D.B. Inhibition of phosphorus sorption to goethite, gibbsite, and kaolin by fresh and decomposed organic matter. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 277-288, 2007.

KUZYAKOV, Y. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 42, p. 1363-1371, 2010.

KEENEY, D.R.; NELSON, D.W. Nitrogen inorganic forms. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of Soil Analysis**. Pt 2: Chemical and Microbiological Properties. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 643-698.

KNICKER, H. Stabilization of N-compounds in soil and organic-matter-rich sediments-what is the difference? **Marine Chemistry**, Philadelphia, v. 92, p. 167-195, 2004.

KNICKER, H. Soil organic N - An under-rated player for C sequestration in soils? **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 43, p. 1118-1129, 2011.

LIZARAZO, L.M.; JORDÁ, J.D.; JUÁREZ, M.; SÁNCHEZ-ANDREU, J. Effect of humic amendments on inorganic N, dehydrogenase and alkaline phosphatase activities of a Mediterranean soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 42, p. 172-177, 2005.

MARINARI, S.; LIBURDI, K.; CORRADINI, D.; GREGO, S. Reversed-phase high performance liquid chromatographic profile of organic fractions extracted by solvents with different polarity as a tool to evaluate the hydrophobic character of soil under different management. **Soil & Tillage Research**, Berlin, v. 109, p. 36-40, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

- NAKATANI, A.S.; NOGUEIRA, M.A.; MARTINES, A.M.; SANTOS, C.A.; BALDESIN, L.F.; MARSCHNER, P.; CARDOSO, E.J.B.N. Effects of tannery sludge application on physiological and fatty acid profiles of the soil microbial community. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.61, p. 92-99, 2012.
- PAVAN, M.A; BLOCH, M.F; ZEMPULSKI, H.C; MIYAZAWA, M; ZOCOLER, D.C. **Manual de análise química do solo e controle de qualidade** Londrina: IAPAR, 1992. 40p. (Circular técnica, 76).
- PAVINATO, P.S. **Dinâmica do fósforo no solo em função do manejo e da presença de resíduos em superfície**. 2007. 158p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2007.
- PAVINATO, P.S.; ROSOLEM, C.A. Disponibilidade de nutrientes no solo - decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 911-920, 2008.
- PICCOLO, A. Humus and Soil conservation. In: PICCOLO, A. (Ed). **Humic Substances in Terrestrial Ecosystems**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 225-264.
- PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil Science**, Philadelphia, v.225, p. 810- 832, 2001.
- PICCOLO, A.; SPACCINI, R.; NIEDER, R.; RICHTER, J. Sequestration of a biologically labile organic carbon in soils by humified organic matter. **Climatic Change**, Germantown, v. 67, p. 329-343, 2004.
- RAIJ, B.V.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade em solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285p.
- RAMIREZ, K.S.; CRAINE, J.M.; FIERER, N. Nitrogen fertilization inhibits soil microbial respiration regardless of the form of nitrogen applied. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 42, p. 2336–2338, 2010.
- SILVA, I.R.; MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V.; V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.275-374.
- STEVENSON, F.J. **Humus Chemistry: genesis, composition, reactions**. 2nd . ed. New York: Wiley, 1994. 496p.
- SCHÜTTE, U.M.E.; ALDO, Z.; BENT, S.J.; WILLIAMS, C.J.; SHNEIDER, G.M.; SOLHEIM, B.; FORNEY, L.F. Bacterial succession in a glacier foreland of the High Arctic. **The ISME Journal**, Washington, v.3, p. 1258-1268, 2009.
- SCHUTTER, M.E.; DICK, R.P. Microbial community profiles and activities among aggregates of winter fallow and cover-cropped soil. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 66, p.142-153, 2002.

SZCZERSKI, C.; NAGUIT, C.; MARKHAM, J.; GOH, T.B.; RENAULT, S. Short- and long-term effects of modified humic substances on soil evolution and plant growth in gold mine tailings. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 224, p. 1471, 2013.

TRESEDER, K.K. Nitrogen additions and microbial biomass: a meta-analysis of ecosystem studies. **Ecology letters**, Oxford, v. 11, p. 1111-1120, 2008.

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

YEOMANS, J.C.; BREMMER, J.M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, London, v.19, p.1467-1476, 1988.

WALWORTH, J.; POND, A.; SNAPE, I.; RAYNER, J.; FERGUSON, S.; HARVEY, P. Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. **Cold Regions Science and Technology**, Philadelphia, v. 48, p. 84-91, 2007.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, Amsterdam, v. 79, p. 117-161, 1997.

3 ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM SOLOS TROPICAIS FAVORECE A DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES E A NUTRIÇÃO DE PLANTAS DE TRIGO

Resumo

A matéria orgânica do solo, em especial as substâncias húmicas (SH), contribuem para a melhoria de características químicas e biológicas do solo, assim como também apresentam efeitos na fisiologia das plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de substâncias húmicas em atributos químicos e biológicos de dois solos tropicais e em parâmetros relacionados à produtividade da cultura de trigo (*Triticum spp.*). Para isso foi realizado um experimento de vaso com adição de doses crescentes de substâncias húmicas na cultura do trigo em dois tipos de solos tropicais. No período do florescimento foi mensurada a atividade biológica do solo pela respiração microbiana e atividade da enzima desidrogenase, colonização micorrízica, N mineral e pH do solo, além de massa seca de raiz e parte aérea das plantas e teores de N e P na parte aérea. Já ao final do ciclo da cultura foi mensurada a massa seca de raízes e parte aérea, C e N total do solo, pH, relação C/N do solo, além de parâmetros de produtividade como massa seca de espigas e grãos e o número de espigas. Procedeu-se, ainda, ao fracionamento do P do solo. De modo geral, a adição de substâncias húmicas aumentou o desprendimento de C-CO₂ e reduziu o teor de N total e mineral em ambos os solos, bem como nas diferentes frações de P. Já em relação à atividade da desidrogenase e ao C total do solo, poucas alterações ocorreram com a adição de SH. Porém, o efeito mais pronunciado foi em relação à planta, com aumento da massa de raízes e parte aérea do trigo, o que se refletiu nos parâmetros de produtividade avaliados, que também foram superiores com a adição de SH. Com isso, pode-se concluir que há um efeito evidente das SH na nutrição das plantas, com melhor aproveitamento do N e P em solo tropical.

Palavras-chave: Fósforo; Produtividade de trigo; Matéria orgânica do solo; Respiração microbiana

Abstract

Soil organic matter, mainly humic substances (HS), contribute to the improvement of biological and chemical characteristics of soil. They also have effects on the physiology of plants. The objective of this study was to evaluate the effects of adding humic substances on chemical and biological characteristics of two tropical soils and on the productivity of wheat (*Triticum spp.*). A pot experiment was conducted in the greenhouse with increasing doses of HS incorporated into two types of tropical soils. At flowering (2 months) soil biological activity was measured by means of microbial respiration and dehydrogenase activity, mycorrhizal colonization, mineral N and soil pH, and root and shoot dry weight besides N and P contents in shoots. At the end of the crop cycle (4 months) we measured dry mass of roots and shoots, C and total nitrogen, pH, C/N ratio of the soil, and productivity parameters such as dry weight of ears and grains and the number of spikes. Furthermore, we made the fractionation of soil phosphorus. In general, the addition of HS increased CO₂-C evolution and reduced the total N content as well as the different fractions of P in both mineral soils. In relation to dehydrogenase activity and total soil C, little change occurred with the addition of HS. However, there was greater effect on plant growth, with increased wheat root and shoot mass, which was reflected in the productivity parameters. Thus we can conclude that there is a clear effect of HS on plant nutrition, with a more efficient use of N and P in tropical soils.

Keywords: Phosphorus; Wheat productivity; Soil organic matter; Microbial respiration

3.1 Introdução

A matéria orgânica do solo (MOS) pode ser dividida em diversos compartimentos e frações, que podem ser distinguidas pela sua qualidade e labilidade. Dependendo das características da MOS esta pode influenciar atributos químicos, físicos e biológicos do solo, além de contribuir para o desenvolvimento e nutrição das plantas (PICCOLO, 2001). As substâncias húmicas (SH) correspondem à fração mais recalcitrante da MOS representando de 70 a 80% do total (PICCOLO, 2001). Estas frações são formadas por uma mistura de compostos complexos e provenientes da estabilização da MOS pelo metabolismo microbiano (SUTTON; SPOSITO, 2005). Por ser uma fração mais recalcitrante, seu tempo de permanência no solo é muito superior ao das demais e, com isso, consegue influenciar a dinâmica do solo por mais tempo.

No solo, as SH são responsáveis pela formação de complexos organo-minerais e, especificamente em solos altamente intemperizados, como os solos tropicais, também têm função fundamental na geração de cargas do solo, contribuindo com a CTC (ZECH; SENESI; GUGGENBERGER, 1997). Apesar de se tratar de material orgânico recalcitrante, as SH podem estimular a atividade microbiana do solo e, conseqüentemente, a ciclagem de nutrientes, aumentando sua disponibilidade (TREVISAN et al., 2010). Os microrganismos do solo são responsáveis pela mineralização da MOS, bem como pela ciclagem dos nutrientes. Sendo assim, alterações na quantidade e qualidade da MOS podem alterar a dinâmica da comunidade microbiana.

A adição de SH no solo pode afetar o desenvolvimento das plantas, por meio de efeitos morfológicos, fisiológicos e/ou bioquímicos (TREVISAN et al. 2010). Dentre a complexidade desse material, há moléculas capazes de mimetizar o efeito auxínico nas plantas, auxiliando na promoção do crescimento, principalmente da raiz (AGUIAR et al., 2009; CANELLAS et al., 2008; NARDI et al., 2002). Essa interação entre SH e plantas altera a permeabilidade das membranas vegetais e a absorção de nutrientes, o que pode refletir em maiores ganhos em produtividade.

Diversos trabalhos são encontrados na literatura sobre os efeitos das SH em plantas (AGUIAR et al., 2009; CANELLAS et al., 2006; FAÇANHA et al., 2002; NARDI et al., 2002). De modo geral, estes trabalhos mostram a atuação das SH em mecanismos específicos das plantas, tais como promoção de efeitos hormonais e também no funcionamento de

H⁺ATPases. No entanto, devido à heterogeneidade e complexidade já descritas, ainda é difícil distinguir os efeitos diretos e indiretos no solo e nas plantas. Além disso, a interação entre as SH e diferentes tipos de solos e espécies vegetais também podem resultar em efeitos distintos, o que aumenta a dificuldade na interpretação dos resultados obtidos com estudos dessa natureza. De modo geral, grande parte dos estudos visa compreender o efeito das SH no desenvolvimento vegetal e quase não existem dados considerando a adição de SH em solos tropicais em relação à produtividade das plantas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de substâncias húmicas (SH) em atributos químicos e biológicos de dois solos tropicais, assim como em parâmetros relacionados à produtividade da cultura de trigo (*Triticum spp.*).

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Solos utilizados

Foram utilizados dois solos classificados (EMBRAPA, 2006) como Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) e Latossolo Vermelho (LVdf), coletados na profundidade de 0-20 cm em áreas não agrícolas de Itirapina, SP (LVA) e Palmital, SP (LVdf). Estes solos foram utilizados pela baixa disponibilidade de P e contrastantes capacidades de adsorção de P, sendo esta capacidade de adsorção de 438 mg kg⁻¹ de P para LVA e de 1238 mg kg⁻¹ de P para LVdf, (MATIAS, 2010).

As características químicas e físicas dos solos encontram-se na tabela 1. Não se compararam os resultados de um solo para outro devido a diferenças significativas de características inerentes a cada solo utilizado.

3.2.2 Delineamento e condução experimental

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado com 16 repetições por tratamento. Os tratamentos utilizados foram baseados em doses crescentes de substâncias húmicas (SH), correspondentes a 0, 150, 300, 600 e 900 L ha⁻¹. As características químicas da SH utilizada estão descritas na tabela 2 do capítulo 2 desta tese.

A planta-teste utilizada foi o trigo (*Triticum spp.*), variedade BRS 220. Esta planta foi escolhida por se tratar de uma cultura com grande importância econômica e de fácil condução em vasos até a maturação dos grãos. Quatro sementes de trigo foram semeadas em vasos de 3 kg, nos quais foi adicionado, no momento da semeadura, o equivalente a 90 kg ha⁻¹ de P₂O₅,

na forma de fosfato natural de Gafsa. Também no momento da semeadura foi realizada a aplicação das SH na forma de condicionador orgânico comercial (AGROLMIN[®]), obtido após o fracionamento químico da turfa. A umidade do solo foi mantida entre 60 e 70% da capacidade de campo durante todo o período de condução do experimento.

Tabela 1 - Características químicas e granulométricas de Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) e Latossolo Vermelho (LVdf) em experimento com adição de substâncias húmicas (SH)

	Solo LVA	Solo LVdf
pH H ₂ O	5,6	5,8
pH CaCl ₂	4,7	5,4
P (mg dm ⁻³)	1	< 1
K (mmol _c dm ⁻³)	0,7	1,7
Ca (mmol _c dm ⁻³)	7	13
Mg (mmol _c dm ⁻³)	6	9
Al (mmol _c dm ⁻³)	2	<1
H+Al (mmol _c dm ⁻³)	27	29
SB (mmol _c dm ⁻³)	14,4	24
CTC (mmol _c dm ⁻³)	41,3	52,6
Saturação por bases (%)	35	46
Saturação por alumínio (%)	12	0
Areia (g kg ⁻¹)	710	69
Silte (g kg ⁻¹)	36	239
Argila (g kg ⁻¹)	254	695

No período de pleno florescimento da cultura do trigo (cerca de 60 dias após a semeadura) 8 repetições de cada tratamento foram avaliadas quanto à atividade microbiana do solo, à colonização de raízes por fungos micorrízicos arbusculares (FMA), N mineral e massa das plantas. As demais repetições dos tratamentos foram conduzidas até a maturação fisiológica dos grãos (cerca de 120 dias após a semeadura), para determinação de parâmetros relacionados à produtividade do trigo, além da realização de análises químicas no solo.

3.2.3 Análises químicas e microbiológicas do solo e dados de produção das plantas

Para avaliação do desprendimento de C-CO₂ no solo pela respiração microbiana, incubaram-se 100 g de cada amostra de solo em frascos hermeticamente fechados contendo 20 mL de hidróxido de sódio 0,25 mol L⁻¹ em béquer para captura do CO₂ liberado (ALEF, 1995). As amostras em umidade natural tiveram seu teor de água ajustados para 60% da capacidade de retenção de água. Quantificou-se o CO₂ produzido pela titulação diária do hidróxido de sódio remanescente com solução de ácido clorídrico 0,25 mol L⁻¹ na presença de fenolftaleína, durante 21 dias.

Para avaliação da atividade da desidrogenase foi seguida a metodologia proposta por Casida et al. (1964), utilizando uma solução 1,5% de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) como substrato. Para avaliar a colonização radicular por FMA, as raízes finas foram preparadas de acordo com Phillips e Hayman (1970) e a determinação da porcentagem de colonização radicular foi feita em placa quadriculada segundo Giovannetti e Mosse (1980).

A determinação do N mineral (amônio e nitrato) do solo foi realizada após extração do solo com KCl 2 mol L⁻¹ e determinado por destilação em destilador tipo Kjeldahl (KEENEY; NELSON, 1982). Já o N na folha e nos grãos foi determinado de acordo com Sarruge e Haag (1974), com digestão da parte aérea moída (folha ou grãos) e posterior destilação do extrato obtido, enquanto que a determinação do teor de P na planta foi feita com digestão nítrico-perclórica e posterior determinação pelo método do ácido ascórbico (MURPHY; RILEY, 1962).

O pH foi lido em CaCl₂ 0,001 mol L⁻¹ (PAVAN et al., 1992) e o fracionamento do P foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Hedley, Stewart e Chauhan (1982) com modificações de Condon, Goh e Newman (1985).

A massa seca da parte aérea, raízes, espigas e grãos foram avaliadas após secagem do material em estufa a 60°C até peso constante.

3.2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias feita pelo teste de Tukey (p<0,05), utilizando o programa estatístico R 2.15.2 (Copyright© 2012. The R Foundation for Statistical Computing). Também foi realizada uma análise de correlação com as variáveis avaliadas na primeira e segunda época de avaliação para cada solo (p<0,05) pelo programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc. Data analysis software system).

3.3 Resultados

3.3.1 Dados da primeira época de amostragem (florescimento)

Em relação ao desprendimento de C-CO₂, houve diferença entre as doses nos dois solos (Figura 1A). No solo arenoso (LVA) as duas maiores doses apresentaram maior perda de C-CO₂ em comparação com as demais, enquanto que no solo argiloso (LVdf) houve menor desprendimento de C-CO₂ em D0, com aumento da respiração com adição de SH. Porém, houve maior respiração em D150 com posterior redução de C-CO₂ (Figura 1A). Para a atividade da enzima desidrogenase no solo arenoso, apenas D150 diferiu dos demais tratamentos, enquanto que no solo argiloso houve uma pequena redução da atividade enzimática nas três maiores doses (Figura 1B).

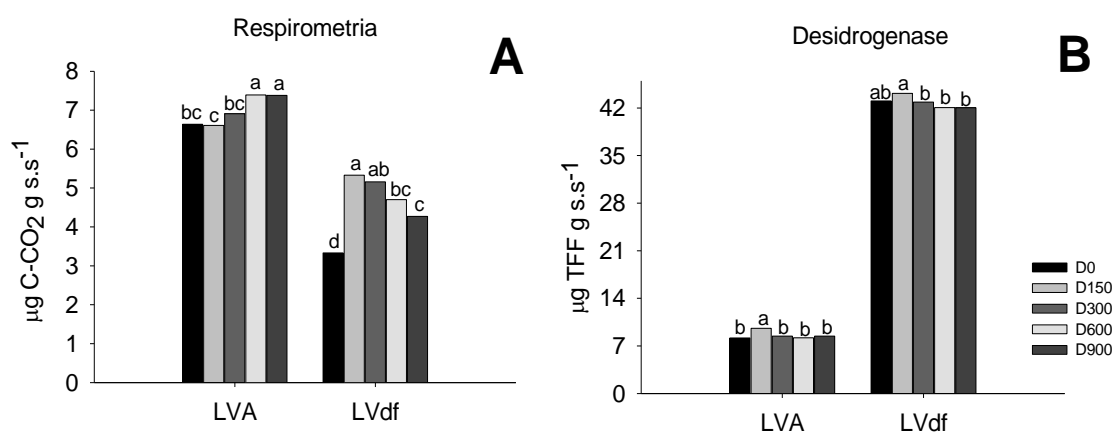


Figura 1 - Atividade microbiana do solo medida pela respirometria (A) e atividade da enzima desidrogenase (B) no período do florescimento do trigo após incorporação de substâncias húmicas (SH) em Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) e Latossolo Vermelho (LVdf)

Quanto à colonização micorrízica, o comportamento nos solos foi diferenciado (Figura 2A). No solo LVA a maior dose (900L ha⁻¹) resultou em maior colonização micorrízica, enquanto que no solo LVdf em D600 houve redução na colonização. Neste experimento, notou-se uma redução do N mineral em ambos os solos com adição de SH (Figura 2B). No solo LVA, D0 e D150 apresentaram os maiores teores, enquanto que nas duas maiores doses observou-se redução de mais de 50% no teor de N mineral do solo. Já no solo LVdf, o N mineral teve uma redução aproximada de 40% com a adição de SH. Em relação ao pH do solo, apesar de serem observadas diferenças significativas em ambos os solos, essa variação

foi de cerca de 0,1 unidade de pH (Figura 2C), fato que não deve ter tido efeito perceptível na fisiologia vegetal e na ecologia do solo.

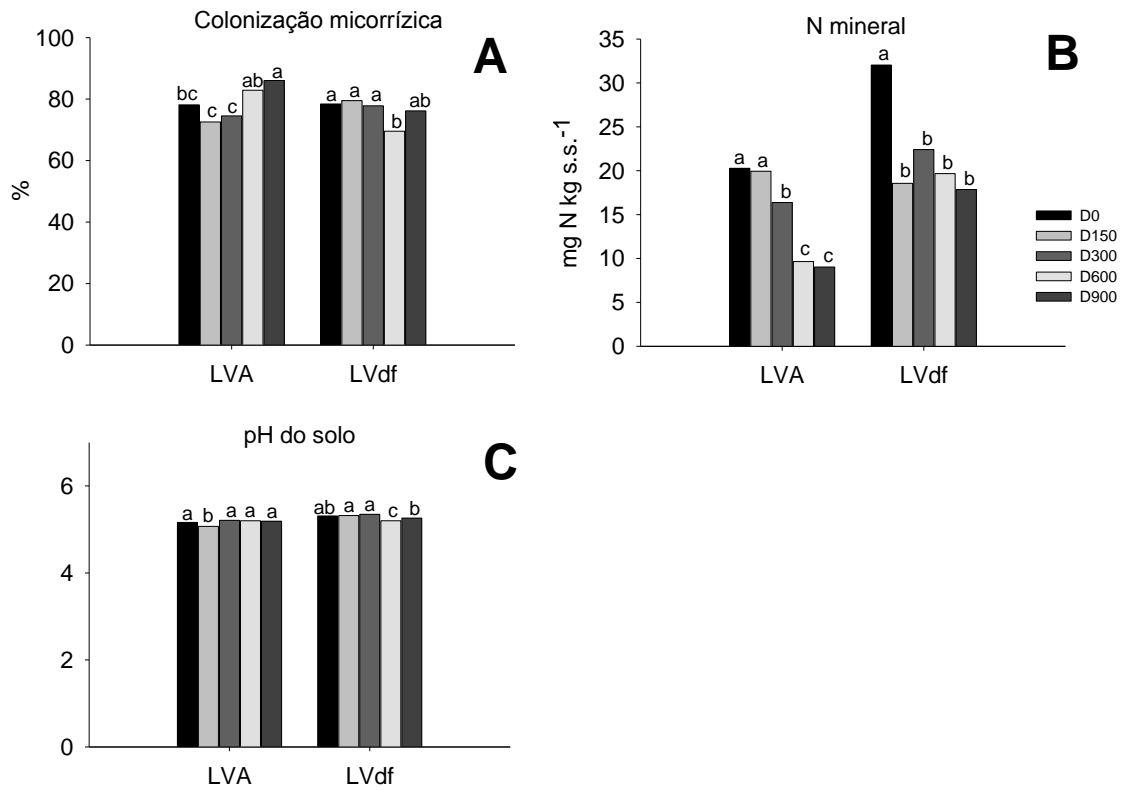


Figura 2 - Colonização micorrízica (A), teor de N mineral no solo (B) e pH do solo (C) no período de florescimento do trigo após incorporação de substâncias húmicas (SH) em Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) e Latossolo Vermelho (LVdf)

A massa seca das plantas de trigo, tanto raízes quanto a parte aérea tiveram um aumento crescente com a adição das doses de SH em ambos os solos (Figura 3A e 3B). De modo geral, os maiores valores de massa seca foram vistos nas maiores doses (D600 e D900).

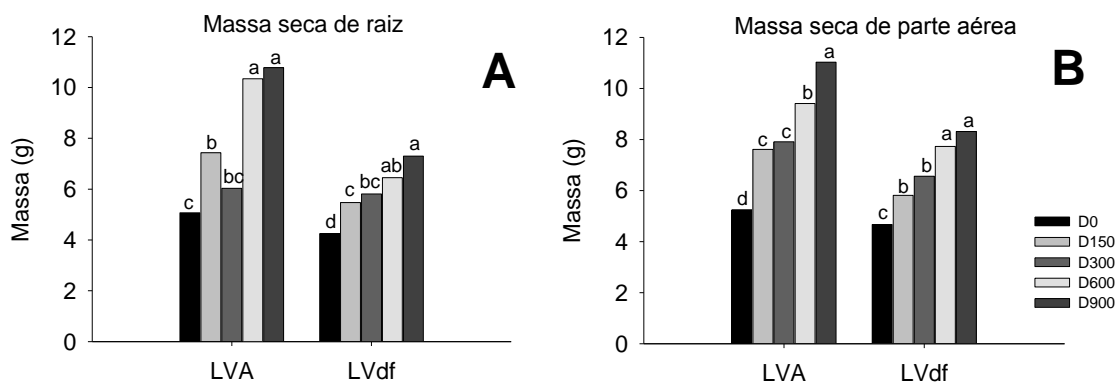


Figura 3 - Massa seca de raízes (A) e da parte aérea (B) de plantas de trigo no período de florescimento após incorporação de substâncias húmicas (SH) em Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) e Latossolo Vermelho (LVdf)

O N na planta aumentou nas duas maiores doses no solo LVA, sendo o maior teor encontrado em D900 (Figura 4A). Já no solo LVdf, apenas D300 e D900 foram superiores aos demais tratamentos. Por outro lado, o solo LVA não apresentou grandes alterações no teor de P na parte aérea das plantas (Figura 4B), sendo que apenas D300 foi menor que as demais, enquanto que no solo LVdf a adição de SH aumentou o teor de P na planta em cerca de 10 vezes em relação a D0.

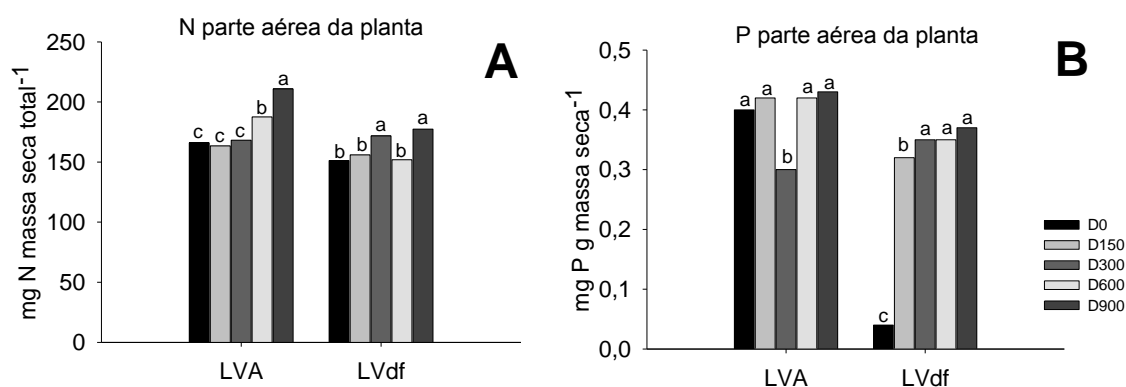


Figura 4 - Teor de N (A) e P (B) na parte aérea de plantas de trigo, no período do florescimento do trigo após incorporação de substâncias húmicas (SH) em Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) e Latossolo Vermelho (LVdf)

3.3.2 Dados da segunda época de amostragem (maturação fisiológica)

A aplicação de SH aumentou a massa seca da planta em ambos os solos (Figura 5A). No solo LVA, as plantas dos tratamentos D300, D600 e D900 apresentaram maior massa seca, enquanto que no solo LVdf houve uma proeminência em D900 (Figura 5A). Na massa

seca da raiz foram verificados comportamentos distintos entre os solos (Figura 5B). No solo LVA a menor massa de raiz foi verificada em D900 e a maior massa em D300, enquanto que no solo LVdf a maior massa foi encontrada onde houve adição de SH, independentemente da dose (Figura 5B).

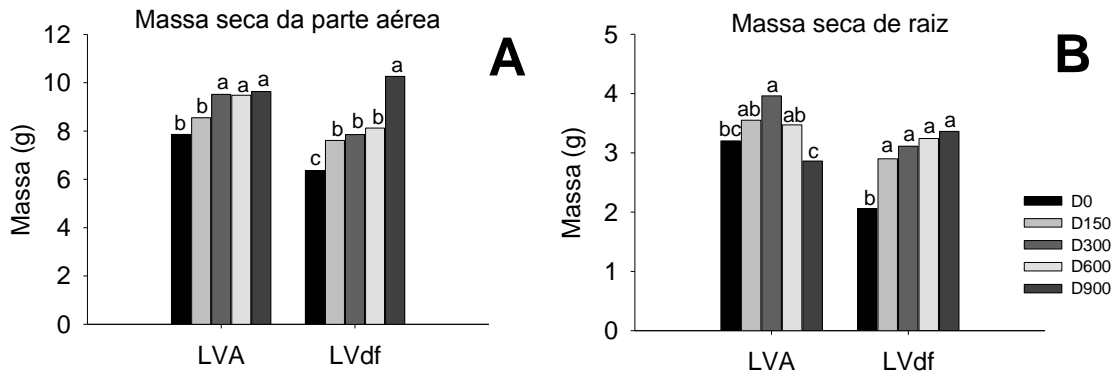


Figura 5 – Massa seca da parte aérea (A) e de raízes (B) de trigo no final do ciclo da cultura após incorporação de substâncias húmicas (SH) em Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) e Latossolo Vermelho (LVdf)

Em ambos os solos houve maior massa seca de grãos e espigas e número de espigas na maior dose de SH, sendo que no solo LVA a resposta foi sempre mais evidente do que no solo LVdf (Tabela 2). Em relação ao teor de N no grão, no solo LVA D600 foi superior às demais doses, enquanto que no solo LVdf D0 houve maiores teores de N no grão em comparação com as doses de SH utilizadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros de produtividade do trigo obtidos em experimento com adição de substâncias húmicas (SH) em Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) e Latossolo Vermelho (LVdf)

	Nº espigas	MS espigas (g)	MS grãos (g)	N no grão (mg g ⁻¹)
----- LVA -----				
D0	7,37 b	6,14 c	3,7 c	32,22 bc
D150	8,37 b	7,89 b	5,45 b	31,82 c
D300	8,37 b	7,88 b	5,38 b	35,96 b
D600	10,75 a	8,44 b	5,48 b	42,03 a
D900	10,12 a	9,82 a	7,35 a	32,89 ab
----- LVdf -----				
D0	7,5 c	5,74 b	3,71 b	38,35 a
D150	7,5 c	6,32 b	4,33 ab	32,05 b
D300	7,75 c	6,36 b	4,01 b	32,59 b
D600	9,62 b	6,09 b	3,96 b	32,93 b
D900	11,75 a	8,2 a	4,91 a	31,43 b

Em relação ao teor total de C do solo, de modo geral não ocorreram grandes diferenças entre as doses utilizadas (Figura 6A). No entanto, houve mudanças no teor total de N do solo, onde se verificou, em solo LVA, maior teor de N total em D0 e D600, enquanto que no solo LVdf, houve redução no teor de N total com adição de SH (Figura 6B). Devido à alteração no teor de N total, foram encontradas diferenças também na relação C/N do solo, com menor relação C/N em D0 e D600 no solo LVA e em D0, D600 e D900 no solo LVdf (Figura 6C). O pH neste período de avaliação teve um comportamento semelhante ao constatado na primeira época de avaliação, com diferenças significativas porém com pequena alteração nos valores (Figura 6D).

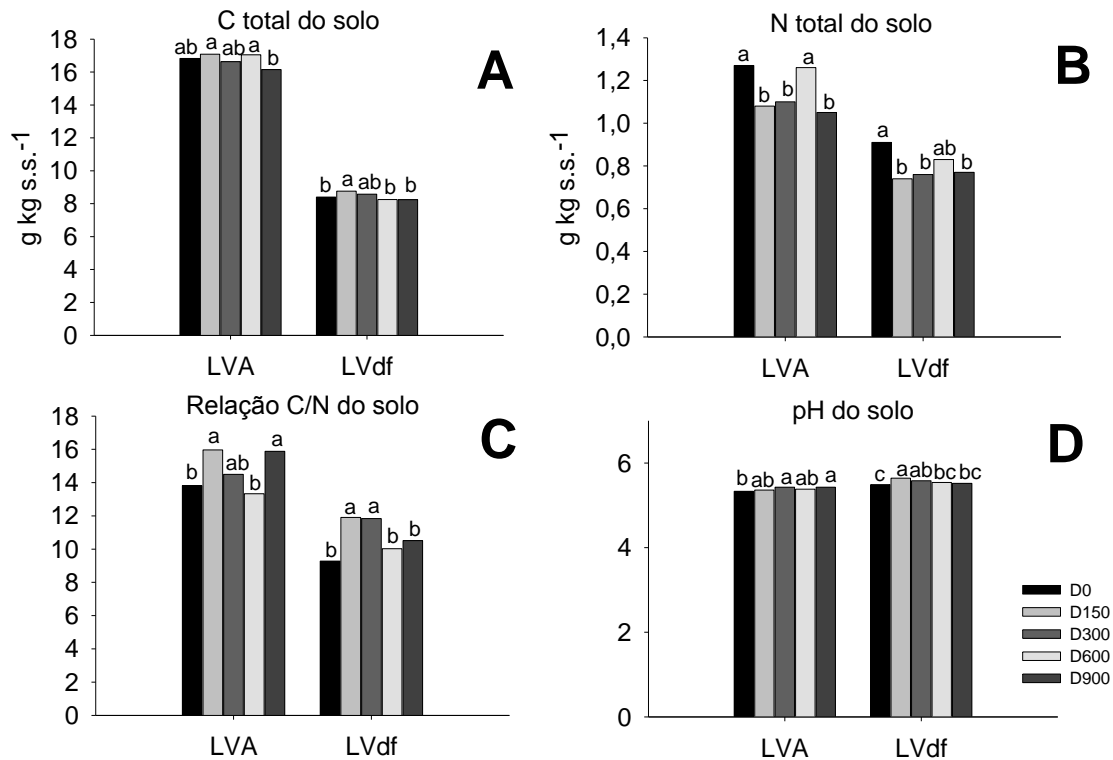


Figura 6 - Carbono (A) e nitrogênio total do solo (B), relação C/N (C) e pH do solo (D) após adição de substâncias húmicas (SH) em Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) e Latossolo Vermelho (LVdf)

Quanto às diversas frações inorgânicas de P, no solo LVA houve alteração em todas as frações, ocasionadas pela adição de SH (Tabela 3). De modo geral, nas frações mais lábeis de P (P-resina, P-NaHCO₃ e P-NaOH 0,1N) a dose D900 resultou em maior teor de fósforo em comparação com as demais. Já na fração P-HCl, os maiores teores foram encontrados em D300 enquanto P-NaOH 0,5N, o maior teor de P foi observado em D600 (Tabela 3). Já no caso do solo LVdf, a fração P-resina teve maiores teores com as doses intermediárias (D300 e D600) e a fração P-NaHCO₃ teve leve redução dos teores de P com adição de SH. Na fração P-NaOH 0,1N houve redução de P nas doses D150 e D300, enquanto que na fração P-HCl a dose D150 apresentou os maiores valores de P em relação às demais (Tabela 3).

Tabela 3 - Fracionamento do fósforo do solo em experimento com adição de substâncias húmicas (SH) em Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) e Latossolo Vermelho (LVdf)

	P-resina	P-NaHCO ₃	P-NaOH 0.1N	P-HCl	P-NaOH 0.5N
	mg kg ⁻¹				
	----- LVA -----				
D0	1.12 c	0.42 bc	0.23 b	0.23 b	12.95 ab
D150	1.41 a	0.39 c	0.23 b	0.15 b	11.61 b
D300	1.23 bc	0.41 bc	0.24 ab	0.44 a	11.82 b
D600	1.32 ab	0.43 b	0.25 ab	0.25 b	14.22 a
D900	1.42 a	0.48 a	0.26 a	0.17 b	12.33 ab
<i>p</i> valor	***	***	**	***	*
	----- LVdf -----				
D0	1.05 b	0.40 a	1.19 a	0.79 b	19.84 a
D150	1.15 ab	0.38 b	1.06 b	0.92 a	19.81 a
D300	1.18 a	0.39 ab	1.06 b	0.86 ab	18.41 a
D600	1.16 a	0.39 ab	1.17 a	0.82 ab	19.18 a
D900	1.15 ab	0.38 b	1.24 a	0.76 b	20.55 a
<i>p</i> valor	*	*	***	**	.

(.)significativo a 10%; (*) significativo a 5%; (**) significativo a 1%; (***) significativo a 0,1%

No solo LVA foi notada correlação negativa entre o N mineral do solo e a respiração microbiana, a colonização micorrízica, a massa seca de raiz e parte aérea (Tabela 4). Além disso, o N na planta teve forte correlação positiva com a massa seca de raízes e parte aérea e negativa com o teor de N mineral do solo (Tabela 4). Já no solo LVdf, o N mineral apresentou correlação negativa com a respiração microbiana, a massa seca de raízes e parte aérea e o P da planta, enquanto que o P na planta teve correlação positiva com a respiração microbiana, a massa seca de raízes e parte aérea, além de correlação negativa com o N mineral (Tabela 5).

Tabela 4 - Correlação dos atributos avaliados no primeiro desmonte (solo LVA). Marcação em negrito indica correlação significativa a $p < 0,05$

Variável	Resp ¹	N min ²	Desid ³	Coloniz ⁴	MS raiz ⁵	MS PA ⁶	N Planta ⁷	P planta ⁸
Resp	1,00							
N min	-0,52	1,00						
Desid	-0,19	0,33	1,00					
Coloniz	0,54	-0,68	-0,29	1,00				
MS raiz	0,36	-0,81	-0,09	0,53	1,00			
MS PA	0,52	-0,84	-0,03	0,55	0,83	1,00		
N planta	0,32	-0,83	-0,28	0,60	0,77	0,77	1,00	
P planta	0,15	-0,22	0,10	0,31	0,45	0,27	0,38	1,00

¹Respirometria; ²N mineral do solo; ³Desidrogenase; ⁴Colonização micorrízica; ⁵Massa seca de raiz; ⁶Massa seca de parte aérea; ⁷Teor de N na parte aérea; ⁸Teor de P na parte aérea.

Tabela 5 - Correlação dos atributos avaliados no primeiro desmonte (solo LVdf). Marcação em negrito indica correlação significativa a $p < 0,05$

Variável	Resp ¹	N min ²	Desid ³	Coloniz ⁴	MS raiz ⁵	MS PA ⁶	N Planta ⁷	P planta ⁸
Resp	1,00							
N min	-0,61	1,00						
Desid	0,11	0,33	1,00					
Colon	-0,06	0,10	0,35	1,00				
MS raiz	0,24	-0,56	-0,37	-0,16	1,00			
MS PA	0,27	-0,68	-0,59	-0,35	0,73	1,00		
N planta	0,18	-0,30	-0,22	-0,08	0,42	0,43	1,00	
P planta	0,69	-0,77	-0,19	-0,18	0,74	0,75	0,43	1,00

¹Respirometria; ²N mineral do solo; ³Desidrogenase; ⁴Colonização micorrízica; ⁵Massa seca de raiz; ⁶Massa seca de parte aérea; ⁷Teor de N na parte aérea; ⁸Teor de P na parte aérea.

Levando-se em consideração alguns atributos do solo e de produção das plantas, notou-se que o N na planta teve correlação positiva com os parâmetros de produtividade (massa seca de espigas e grãos e número de espigas), enquanto que o N mineral do solo teve correlação negativa com estes parâmetros, o que pode ser visto em ambos os solos (Tabelas 6 e 7). No entanto, no solo LVdf, o teor de P na planta também apresentou correlação positiva com os parâmetros de produtividade (Tabela 7).

Tabela 6 - Correlação dos atributos avaliados no primeiro desmante (respiração, N mineral, N e P na parte aérea das plantas) e no segundo desmante (massa seca de espigas e grãos e número de espigas) no solo LVA. Marcação em negrito indica correlação significativa a $p < 0,05$

Variável	Resp ¹	N min ²	N planta ³	P planta ⁴	MS espigas ⁵	MS grãos ⁶	Nº espigas ⁷
Resp	1,00						
N min	-0,52	1,00					
N planta	0,32	-0,83	1,00				
P planta	0,15	-0,22	0,38	1,00			
MS espigas	0,41	-0,74	0,69	0,15	1,00		
MS grãos	0,40	-0,68	0,71	0,20	0,91	1,00	
Nº espigas	0,44	-0,73	0,62	0,34	0,61	0,58	1,00

¹Respirometria; ²N mineral do solo; ³Teor de N na parte aérea; ⁴Teor de P na parte aérea; ⁵Massa seca de espigas; ⁶Massa seca de grãos; ⁷Número de espigas.

Tabela 7 - Correlação dos atributos avaliados no primeiro desmante (respiração, N mineral, N e P na parte aérea das plantas) e no segundo desmante (massa seca de espigas e grãos e número de espigas) no solo LVdf. Marcação em negrito indica correlação significativa a $p < 0,05$

Variável	Resp ¹	N min ²	N planta ³	P planta ⁴	MS espigas ⁵	MS grãos ⁶	Nº espigas ⁷
Resp	1,00						
N min	-0,61	1,00					
N planta	0,18	-0,30	1,00				
P planta	0,69	-0,77	0,43	1,00			
MS espigas	0,09	-0,41	0,62	0,43	1,00		
MS grãos	0,19	-0,41	0,46	0,36	0,80	1,00	
Nº espigas	-0,13	-0,37	0,38	0,43	0,59	0,41	1,00

¹Respirometria; ²N mineral do solo; ³Teor de N na parte aérea; ⁴Teor de P na parte aérea; ⁵Massa seca de espigas; ⁶Massa seca de grãos; ⁷Número de espigas.

3.4 Discussão

3.4.1 Influência das substâncias húmicas na atividade biológica do solo

Os dados apresentados sugerem um aumento da atividade microbiana em ambos os solos em comparação com o tratamento sem adição de SH. Sharif, Khattak e Sarir (2002)

também observaram maior desprendimento de C-CO₂ em solos com adição de SH e cultivados com milho e associaram o maior desenvolvimento vegetal à melhora na estrutura bioquímica do solo proporcionada pela adição de SH. Neste sentido, a adição de SH estimula a atividade microbiana favorecendo o processo de mineralização da MOS, resultando em mineralização de nutrientes e favorecendo a sua disponibilidade tanto para plantas quanto para microrganismos. Esse comportamento pode influenciar positivamente o desenvolvimento e produtividade das plantas, o que pode ser constatado neste trabalho pela alta correlação existente em ambos os solos com os parâmetros de produtividade.

No entanto, no experimento em questão, no solo LVdf, com o aumento das doses de SH houve uma diminuição no desprendimento de C-CO₂, bem como na atividade da enzima desidrogenase, sugerindo um efeito negativo na microbiota do solo com altas concentrações de SH. Baseadas nesses achados, algumas hipóteses podem ser consideradas. Primeiramente a questão da redução do teor de N mineral no solo, que pode ser limitante e não suprir a atividade microbiana nesta situação. Outro fator pode ser que doses menores podem ser mais eficientes no estímulo à microbiota em determinados solos, sendo que a concentração ótima varia de um solo para outro. Por fim, por ser um material recalcitrante, as comunidades microbianas presentes nos distintos solos podem apresentar também comportamentos distintos no que tange à sua ação sobre o substrato.

3.4.2 Influência das substâncias húmicas no teor de nitrogênio do solo e da planta

As SH possuem diversos efeitos diretos e indiretos nos atributos do solo e também em determinadas funções das plantas, como no estímulo à absorção de nutrientes, alterações na permeabilidade da membrana celular e regulação de mecanismos envolvidos no estímulo do crescimento das plantas (NARDI et al., 2002; TREVISAN et al., 2010;). No presente trabalho foi verificada redução do N mineral do solo (55 e 44% em LVA e LVdf, respectivamente) (Fig 2B), entretanto, houve aumento na quantidade de N na parte aérea das plantas de trigo, com incrementos de 27 e 17% em LVA e LVdf, respectivamente (Fig 4A). Neste sentido, pode-se dizer que nestas condições ocorre maior aproveitamento do N pelas plantas, visto não só o aumento no teor de N da planta, mas também a maior produção de grãos e massa seca. Em contraposição, Sharif, Khattak e Sarir (2002) observaram aumento do teor de N tanto na planta quanto no solo quando da adição de ácidos húmicos. Assim, os efeitos das SH parecem também estar relacionados à fração de SH utilizada, além de sua origem e concentração. Deve-se levar em consideração também a espécie de planta utilizada e as condições do meio,

tal como pH e tipo de solo, que também influem nos resultados obtidos (ROSA et al., 2009; TREVISAN et al., 2010; VERLINDEN et al., 2009).

O efeito das SH é positivo para a absorção da maioria dos nutrientes (TREVISAN et al., 2010). Neste sentido, a absorção de N, principalmente na forma de nitrato (N-NO_3^-), pode ser aumentada quando da adição de ácidos húmicos, com forte efeito positivo de frações leves de SH nessa absorção (NARDI et al., 2002; PICCOLO et al., 2002, TREVISAN et al., 2010). Porém, o mecanismo envolvido na absorção de nutrientes e desenvolvimento das plantas, sob influência de substâncias húmicas, ainda não é bem compreendido devido à natureza heterogênea dessas substâncias, o que acaba por dificultar a sua caracterização e, conseqüentemente, sua real influência sobre as plantas (PICCOLO; NARDI; CONCHERI, 1992). Quaggiotti et al. (2004) também obtiveram incremento no teor de N em plantas de milho em condições semelhantes e um estímulo das SH na absorção de nitrato, bem como uma diferenciação na expressão de genes responsáveis pela codificação dos transportadores de nitrato. Eles também perceberam alteração na atividade da enzima glutamina sintetase, responsável pelo metabolismo do N na planta (MUSCOLO et al., 1999).

O N é um nutriente essencial às plantas e, por isso, também limitante para o seu desenvolvimento, o que pôde ser confirmado no presente trabalho com a correlação positiva entre o teor de N na planta e a massa seca, tanto de raízes quanto de parte aérea. A redução do teor de N mineral do solo não deve causar prejuízos à planta, uma vez que, em ambos os solos, houve uma correlação negativa entre o N mineral do solo e a massa seca de parte aérea e raízes (tabelas 6 e 7). Isto pode ainda significar que o N do solo diminui sempre que a planta absorve maiores quantidades desse elemento. Dado que o N é um nutriente com grandes possibilidades de perdas no ambiente, principalmente por lixiviação na sua forma nítrica, torna-se interessante um maior aproveitamento deste por parte das plantas, mesmo com a redução de seus teores no solo. Isso pode contribuir para o melhor desenvolvimento das culturas e ainda minimizar os problemas de lixiviação de nitrato e contaminação de águas subterrâneas, acarretando em redução de custos com fertilizantes nitrogenados. Porém, para que não haja prejuízos à ciclagem e manutenção deste nutriente no solo, deve-se considerar a manutenção dos restos culturais, a fim de não prejudicar a ciclagem bioquímica do N.

3.4.3 Influência das substâncias húmicas nas frações de fósforo do solo e na planta

A dinâmica do P no solo é bastante complexa, visto sua capacidade de se ligar fortemente às argilas e óxidos e hidróxidos de Fe e Al. Em solos altamente intemperizados,

esta dinâmica torna-se problemática no que diz respeito à nutrição das plantas, uma vez que o fósforo adicionado pode tornar-se rapidamente indisponível para absorção pelas plantas. No entanto, o manejo adotado pode ajudar a minimizar tais problemas, tal como a adição de resíduos orgânicos que, além de fornecerem P na forma orgânica, também liberam ácidos orgânicos, que competem pelos mesmos sítios de adsorção que o P (GATIBONI et al., 2007; GUPPY et al., 2005; OBURGER; JONES; WENZEL, 2011; PAVINATO; ROSOLEM, 2008;). No caso do presente trabalho, a adição de SH alterou a distribuição do P nas diversas frações avaliadas; embora não tenha ocorrido linearidade de aumento com a adição de SH, essa mudança mostra uma alteração no equilíbrio de P no solo. Apesar dos baixos valores, a maior diferença entre os tratamentos ocorreu na fração P-HCl, principalmente no solo LVA. Essa fração é composta por P extraído preferencialmente de fosfatos de cálcio (CERETTA et al., 2010). Nas demais frações, também foi evidente o aumento do P, no entanto, no solo LVA o aumento se evidenciou pela adição da maior dose de SH. Já no solo LVdf, doses intermediárias de SH contribuíram mais na disponibilização do P. A não linearidade na disponibilização de P com adição de SH e um maior efeito de doses intermediárias no solo LVdf podem ser decorrentes do fato de que, nesses casos, a SH também poder atuar como dreno de P. Neste sentido, o P pode ser adsorvido pela SH através de pontes de cátions (SANTOS; GATIBONI; KAMINSKI, 2008). No entanto, a adsorção de P em formas orgânicas pode auxiliar a ciclagem e disponibilização do P, visto que, ao passo em que ocorre a mineralização da MOS, a sua liberação para a solução do solo é mais lenta, o que pode promover a utilização mais eficiente deste nutriente por plantas e microrganismos, reduzindo sua adsorção no solo.

No solo LVdf a adição de SH aumentou em cerca de 10 vezes o teor de fósforo na parte aérea das plantas de trigo. Já no solo LVA, apenas D300 diferiu das demais doses (Fig. 4B). Este efeito no solo argiloso pode ser decorrente das interações que ocorrem entre o P e os óxidos de Fe no solo. Deve-se ressaltar que o solo LVA possui menor capacidade de adsorção de P, enquanto que o solo LVdf possui alta capacidade de adsorção de P. Sendo assim, o efeito das SH sobre a disponibilidade e absorção de P pelas plantas, no solo LVA, pode não ser tão evidente. Uma vez que os AH podem interagir com as argilas e os óxidos e hidróxidos de Fe e Al do solo, competindo com o P pelos mesmos sítios de adsorção, a adição desses ácidos orgânicos em solos com alto potencial de adsorção de P pode auxiliar a nutrição das plantas neste aspecto (ANDRADE et al., 2003; GUPPY et al., 2005; PAVINATO; ROSOLEM, 2008). No caso do presente trabalho, fica evidente o benefício nutricional da

aplicação de SH em solo de alta capacidade de adsorção de P. Além disso, também no solo LVdf, houve forte correlação entre o P e a massa seca da planta, enfatizando os efeitos aditivos da aquisição de P no desenvolvimento vegetativo do trigo.

3.4.4 Influência das substâncias húmicas no crescimento e produtividade das plantas de trigo

Neste trabalho houve maior desenvolvimento da parte aérea e raízes, fatores atribuídos à utilização da SH. CANELLAS et al. (2009) relataram que, em plantas de trigo, mediante adição de ácidos húmicos, ocorre um aumento da área de raízes e também da atividade de H⁺ATPases nas raízes, atribuindo esse maior desenvolvimento a uma resposta fisiológica da planta à adição de ácido húmico. Sharif, Khattak e Sarir (2002) constataram aumento de 30% no peso das raízes de milho com adição de SH, enquanto Rosa et al. (2009) chegaram a medir diferenças de 30 e 40% na massa seca de parte aérea e raízes, respectivamente, com adição de SH. No presente trabalho, houve um incremento de mais de 110% tanto em massa seca de parte aérea quanto de raízes no solo LVA, e acima de 70% em ambos os parâmetros no solo LVdf, valores superiores aos encontrados na literatura.

A adição de ácido húmico no solo pode fazer com que haja um estímulo fisiológico semelhante ao da auxina para as plantas. Devido à estrutura e conformação molecular complexa das SH, estas podem conter moléculas de auxinas ou outras com efeito semelhante a estas que, quando dissociadas da estrutura das SH, podem interagir com receptores na superfície celular das raízes, desencadeando processos que culminam em estímulo ao desenvolvimento radicular (FAÇANHA et al., 2002). Assim, os ácidos húmicos podem induzir a formação de raízes laterais, o mesmo efeito provocado pela auxina (AGUIAR et al., 2009). O aumento de massa de raízes também pode estar relacionado a um efeito das SH sobre a atividade de H⁺ ATPase, sendo esta interação sugerida por diversos autores (AGUIAR et al., 2009; CANELLAS et al., 2002; ZANDONADI; CANELLAS; FAÇANHA, 2007;).

Ainda não é bem definido o que é efeito direto ou indireto das SH. Como ocorre maior mineralização da MOS com conseqüente disponibilização de nutrientes, além de maior absorção de N pelas plantas, estes fatores também contribuem para aumentar o metabolismo vegetal, resultando em maior produção de massa seca.

A maior quantidade de raízes influencia diretamente na captação de nutrientes pela planta, se refletindo na parte aérea. Com maior capacidade de absorção de nutrientes, pode

haver um incremento na produtividade, como visto no presente trabalho. Foi notado aumento no número e massa seca de espigas e consequente aumento na massa de grãos de trigo. Além disso, foi encontrada também uma correlação positiva entre a massa seca de raízes com a massa seca da parte aérea, a massa seca e número de espigas, o que mostra que a adição de SH nos solos utilizados aumentou não só a massa das plantas, mas também os parâmetros relacionados à produtividade das mesmas, deixando evidente o efeito das SH na produtividade da cultura do trigo. No entanto, os resultados encontrados no presente trabalho foram contrários aos achados por Jones, Jacobsen e Mugaas (2007), que não encontraram efeitos na produção de grãos de trigo com adição de SH, mas corroboram os encontrados por Verlinden et al. (2009) em diversas culturas.

Houve variação de efeito na massa seca das plantas entre as épocas avaliadas, sendo que na segunda época de avaliação os efeitos foram menores, principalmente no solo LVA. Nesta fase de avaliação, as plantas já haviam chegado ao estágio final de desenvolvimento, passando pela fase de formação, enchimento e maturação dos grãos, sendo esse o provável motivo de não mais ocorrerem efeitos significativos em ambos os solos. Durante a formação dos grãos, há uma demanda de nutrientes e energia por parte destes, sendo que a demanda nutricional não mais está relacionada ao desenvolvimento das plantas, mas sim ao dos grãos. O efeito mais evidente no solo argiloso (LVdf) pode ser decorrente da maior interação entre os nutrientes e os óxidos e hidróxidos do solo. Uma vez que há influência dos ácidos orgânicos na dinâmica de nutrientes no solo, este efeito pode perdurar por mais tempo. Portanto, fica claro que em estudos como este, a melhor época para avaliação do desenvolvimento das plantas e inferência dos tratamentos sobre estes atributos é na fase de florescimento da cultura, quando os efeitos ficam mais evidentes.

O reflexo do manejo na produtividade das culturas é essencial para adoção de determinada prática. O aumento da produtividade neste caso está associado à maior capacidade do solo em suprir as necessidades da planta e também à capacidade desta de adquirir os nutrientes necessários para seu pleno desenvolvimento.

3.5 Conclusão

A adição de SH altera a atividade biológica do solo e a disponibilidade de N e P, principalmente em solo com alta capacidade de adsorção de P. Seu efeito fica mais evidente no desenvolvimento e nutrição das plantas de trigo. O estímulo das SH ao desenvolvimento

das plantas resulta em incremento na produtividade, evidenciando o benefício das SH para culturas em solos tropicais.

Referências

AGUIAR, N.O.; CANELLAS, L.P.; DOBBSS, L.B.; ZANDONADI, D.B.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.R. Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.33, p. 1613-1623, 2009.

ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology & Biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 214-219.

ANDRADE, F.V.; MENDONÇA, E.S.; ALVAREZ, V.H.; NOVAIS, R.F. Adição de ácidos orgânicos e húmicos em Latossolos e adição de fosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 1003-1011, 2003.

CANELLAS, L.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.L.O.; FAÇANHA, A.R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, Monona Drive, v. 130, p. 1951-1957, 2002.

CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D.B.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas - O estímulo às H⁺-ATPases. In: FERNANDES, M.S. (Ed). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 175-200.

CANELLAS, L.P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; DOBBSS, L.B.; FAÇANHA, A.L.O.; SANTOS, G.A.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.R. Relationships between chemical characteristics and root growth promotion of humic acids isolated from Brazilian Oxisols. **Soil Science**, Philadelphia, v. 174, p. 611-620, 2009.

CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D.B.; BUSATO, J.G.; BALDOTTO, M.A.; SIMÕES, M.L.; MARTIN-NETO, L.; FAÇANHA, A.R.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soil sequence. **Soil Science**, Philadelphia, v. 173, p. 624-637, 2008.

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

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

CONDRON, L.M.; GOH, K.M.; NEWMAN, R.H. Nature and distribution of soil phosphorus as revealed by a sequential extraction method followed by ^{31}P nuclear magnetic resonance analysis. **Journal of Soil Science**, Oxford, v.36, p.199-207, 1985.

EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Serviço Nacional de Levantamento e Classificação de Solos. Rio de Janeiro, 2006. 306p.

FAÇANHA, A.R.; FAÇANHA, A.L.O.; OLIVARES, F.L.; GURIDI, F.; SANTOS, G.A.; VELLOSO, A.C.X.; RUMJANEK, V.M.; BRASIL, F.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M.A.; CANELLAS, L.P. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 1301–1310, 2002.

GATIBONI, L.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D.; FLORES, J. Biodisponibilidade de formas de fósforo acumuladas em solo sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 1, p. 691-699, 2007.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of technique for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, p. 489-50, 1980.

GUPPY, C.N.; MENZIES, N.W.; MOODY, P.W.; BLAMEY, F.P.C. Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: a review. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 43, p. 189-202, 2005.

HEDLEY, M.J.; STEWART, J.W.B.; CHAUHAN, B.S. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 46, p. 970-976, 1982.

JONES, C.A.; JACOBSEN, J.S.; MUGAAS, A. Effect of low-rate commercial humic acid on phosphorus availability, micronutrient uptake and spring wheat yield. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, London, v. 38, p. 921-933, 2007.

KEENEY, D.R.; NELSON, D.W. Nitrogen inorganic forms. In: PAGE et al. (Ed.) **Methods of soil analysis, part 2: chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy - Soil Science Society of America, 1982. p. 643-698.

MATIAS, G.C.S. **Eficiência agronômica de fertilizantes fosfatados em solos com diferentes capacidades de adsorção de fósforo e teores de matéria orgânica**. 2010. 175p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MURPHY, J.; RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 27, p. 31-36, 1962.

MUSCOLO, A.; BOVALO, F.; GIONFRIDDO, F.; NARDI, S. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1303-1311, 1999.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 1527-1537, 2002.

OBURGER, E.; JONES, D.L.; WENZEL, W.W. Phosphorus saturation and pH differentially regulate the efficiency of organic acid anion-mediated P solubilization mechanisms in soil. **Plant & Soil**, Netherlands, v. 341, p. 363-382, 2011.

PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F.; ZEMPULSKI, H.C.; MIYAZAWA, M.; ZOCOLER, D.C. **Manual de análise química do solo e controle de qualidade** Londrina: IAPAR, 1992. 40p. (Circular técnica, 76).

PAVINATO, P.S.; ROSOLEM, C.A. Disponibilidade de nutrientes no solo - decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 911-920, 2008.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 55, p. 158-160, 1970.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil Science**, Philadelphia, v.225, 810- 832, 2001.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 373-380, 1992.

QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays L.*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p.803–813, 2004.

ROSA, C.; CASTILHOS, R.; VAHL, L.; CASTILHOS, D.; PINTO, L.; OLIVEIRA, E.; LEAL, O. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris L.* **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 5, p. 959-967, 2009.

SANTOS, D.R.; GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 576-586, 2008.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1974. 56p.

SHARIF, M.; KHATTAK, R.A.; SARIR, M.S. Effect of different levels of lignitic coal derived humic acid on growth of maize plants. **Communications in Soil Science & Plant Analysis**, London, v. 33, p. 3567-3580, 2002.

SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: the new view. **Environmental Science & Technology**, New York, v. 39, p.23, 2005.

TREVISAN, S. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: From environmental aspects to molecular factors. **Plant signaling & Behavior**, Bethesda, v. 5, n.6, p. 635-643, 2010.

VERLINDEN, G.; PYCKE, B.; MERTENS, J.; DEBERSAQUES, F.; VERHEYEN, K.; BAERT, G.; BRIES, J.; HAESAERT, G. Application of humic substances results in consistent increases in crop yield and nutrient uptake. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 32, p. 1407-1426, 2009.

ZANDONADI, D.B.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. **Planta**, Berlin, v. 225, p. 1583-1595, 2007.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, Netherlands, v. 79, p. 117-161, 1997.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

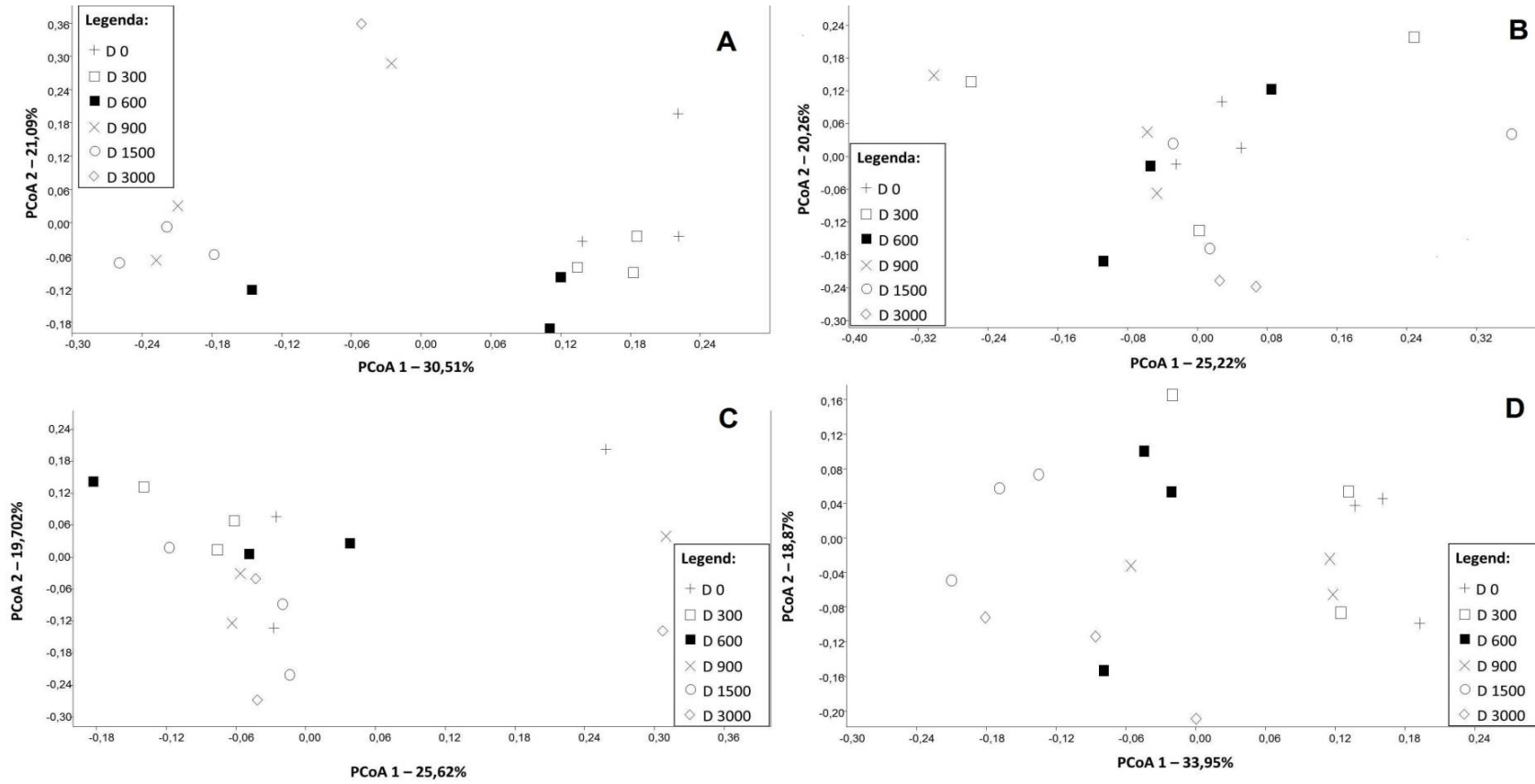
Os resultados obtidos indicam que:

1. As substâncias húmicas estimulam a atividade microbiana, mesmo sendo um material orgânico recalcitrante;
2. Apesar do estímulo à atividade, não houve alteração na estrutura genética da comunidade microbiana do solo;
3. A associação de substâncias húmicas e nitrogênio reduz a atividade microbiana;
4. Ocorreu aumento no teor de P e N do solo, bem como potássio, cálcio e também a CTC;
5. Houve maior desenvolvimento da parte aérea e raízes das plantas de trigo, que resultaram em maior produção de grãos e espigas.

Esses resultados trazem informações importantes a respeito dos benefícios da adição de material recalcitrante sobre parâmetros relacionados com a melhoria de propriedades químicas e biológicas do solo, bem como com o desenvolvimento de plantas em condições tropicais.

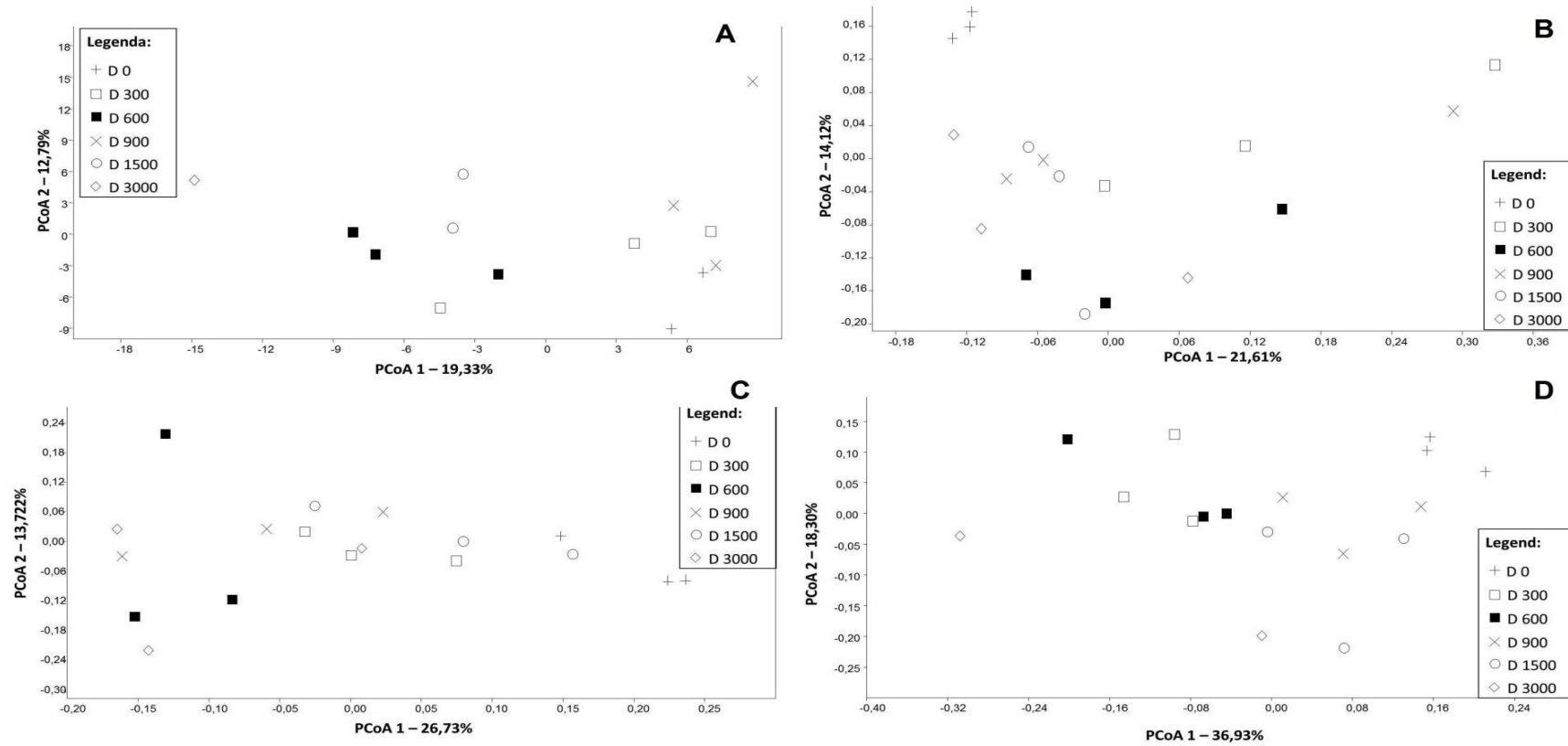
APÊNDICES

APÊNDICE A



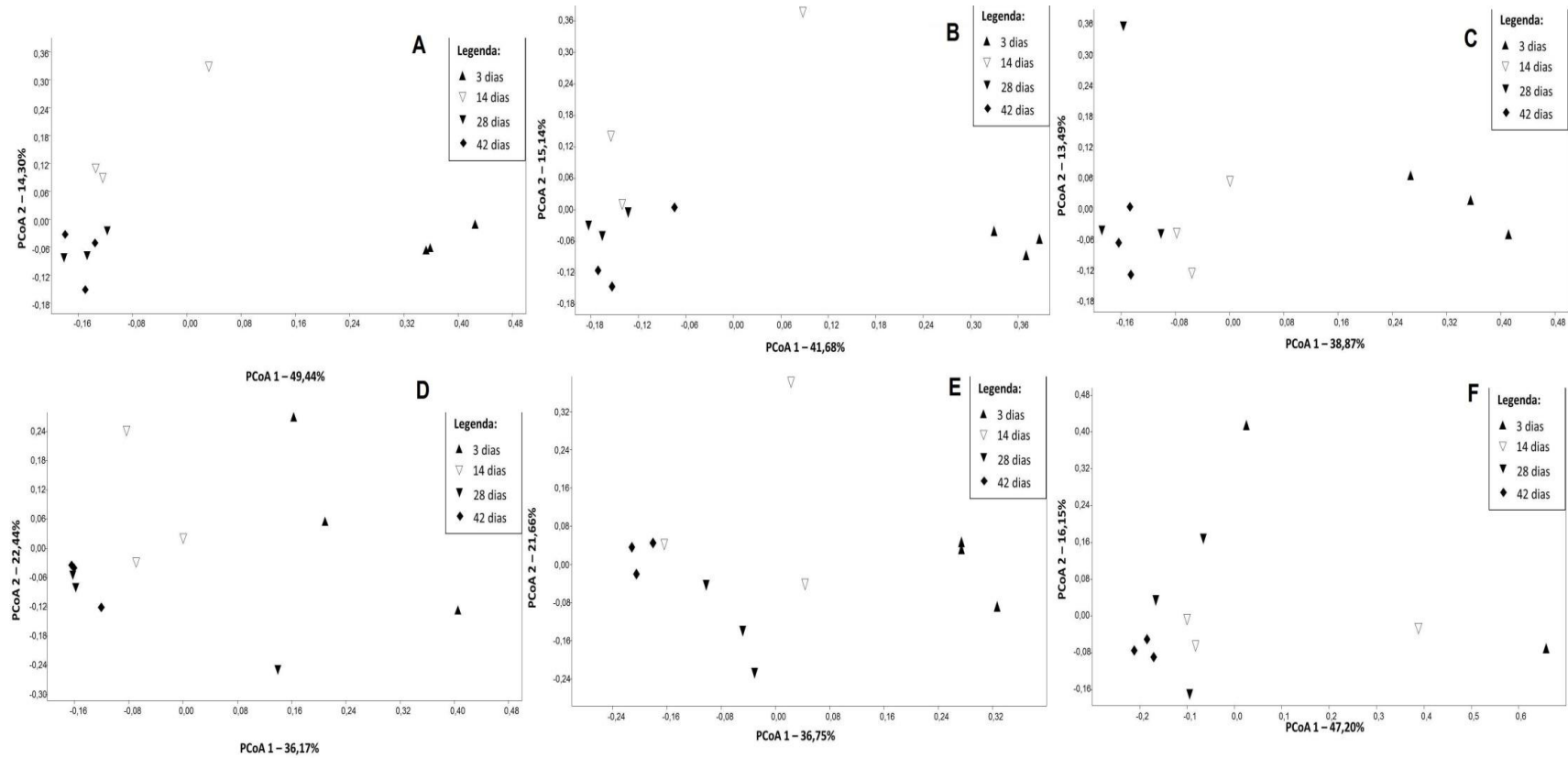
Análise de agrupamento com base na técnica de T-RFLP após incubação de SH sem adição de N. (A) Após 3 dias; (B) Após 14 dias; (C) Após 28 dias; (D) Após 42 dias.

APÊNDICE B



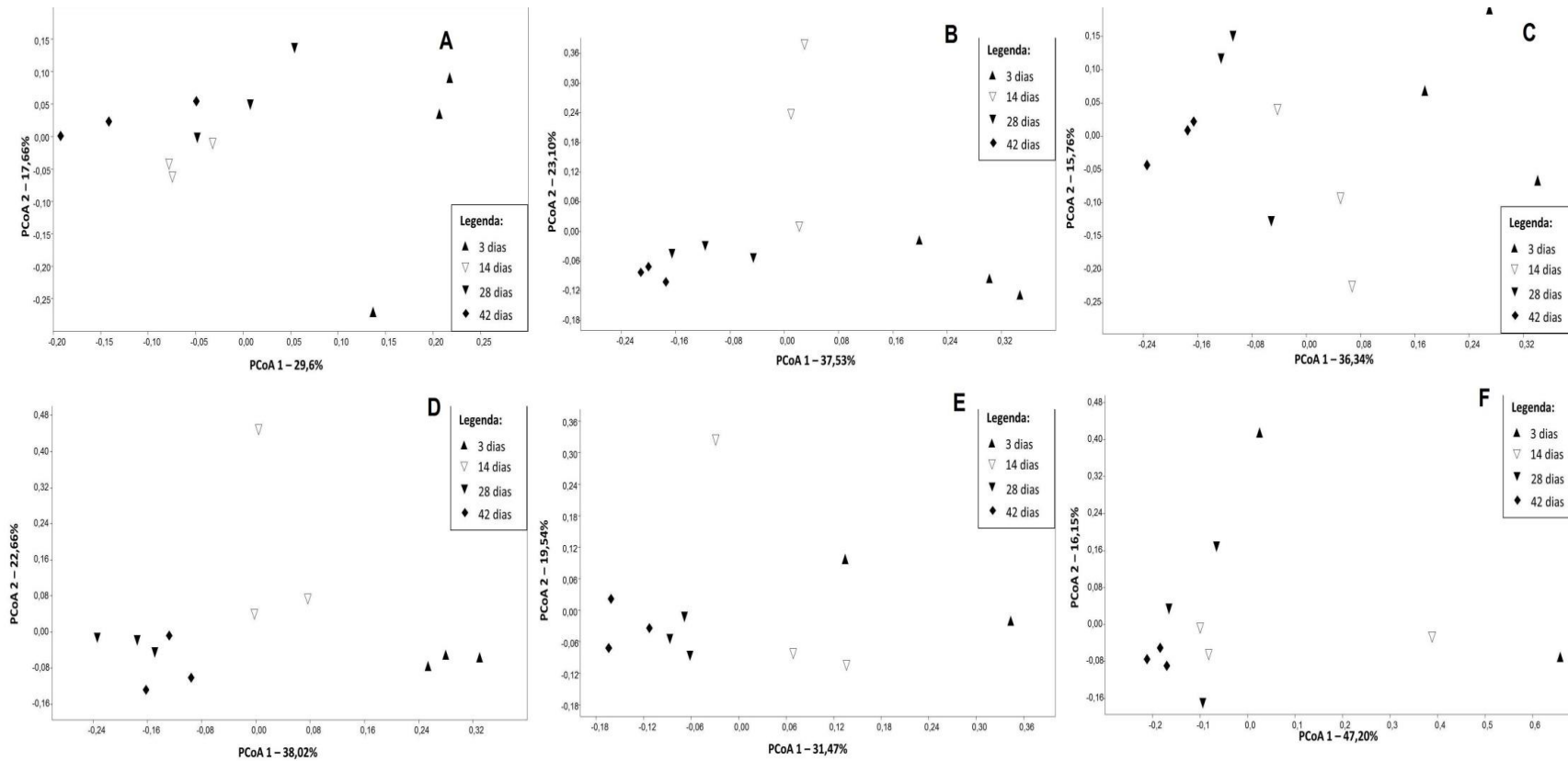
Análise de agrupamento com base na técnica de T-RFLP após incubação de SH com adição de N. (A) Após 3 dias; (B) Após 14 dias; (C) Após 28 dias; (D) Após 42 dias

APÊNDICE C



Análise de agrupamento com base na técnica de T-RFLP após incubação de SH sem adição de N, comparando o comportamento da comunidade microbiana ao longo do tempo. (A) D0; (B) D300; (C) D600; (D) D900; (E) D1500; (F) D3000.

APÊNDICE D



Análise de agrupamento com base na técnica de T-RFLP após incubação de SH com adição de N, comparando o comportamento da comunidade microbiana ao longo do tempo. (A) D0; (B) D300; (C) D600; (D) D900; (E) D1500; (F) D3000

