

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

Especação de fósforo e atributos microbiológicos da rizosfera de soja e trigo em
função do preparo do solo

Luciana de Arruda Garcia

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

Piracicaba
2019

Luciana de Arruda Garcia
Engenheira Agrônoma

Especiação de fósforo e atributos microbiológicos da rizosfera de soja e trigo em função do preparo do solo

Orientador:
Prof. Dr. **LUÍS REYNALDO FERRACCIÚ ALLEONI**

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

Piracicaba
2019

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

Garcia, Luciana de Arruda

Especiação de fósforo e atributos microbiológicos da rizosfera de soja e trigo em função do preparo do solo / Luciana de Arruda Garcia. - - Piracicaba, 2019.

95 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Sistema de Plantio Direto 2. XANES 3. Qualidade do solo 4. Especiação de P I. Título

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial minha mãe Maria Josefina e irmã Daniela, que estão sempre comigo na linha de frente, me apoiando e encorajando e a meus queridos sobrinhos Ana Carolina e Luís Gabriel, que vieram para deixar nossa vida mais feliz.

Ao meu amor e compaheiro José Carlos de Deus Júnior que esteve e está comigo em todos os momentos, me ajudando, auxiliando e compartilhando as alegrias e angústias da caminhada, obrigada pelo carinho, te amo!

Ao professor Luís Reynaldo Ferracciú Alleoni, pela orientação, apoio e contribuição na minha formação acadêmica.

Aos pesquisadores da Embrapa Soja, Julio Cezar Franchini dos Santos e Henrique Debiasi e ao técnico Luiz Gustavo Garbelini, pela parceria e por todo auxílio prestado.

Aos pesquisadores da Embrapa Instrumentação, Ladislau Martin Neto, Luiz Alberto Colnago e a técnica Viviane Faria Soares, pelo auxílio prestado.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e pesquisadores do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) que auxiliaram neste trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

A todos os professores da ESALQ/USP e CENA/USP dos quais utilizei os laboratórios para as análises desta pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP, Marina Colzato, Denise Mescolotti, Ednéia Mondoni, Luiz Silva, Nivanda Ruiz, Leandro Goia, Luis Fernando Baldesin e Anderson Luiz Scarazate. Em especial a Sonia Pires pela atenção e auxílio prestados a este trabalho.

Aos amigos queridos da pós-graduação, Alexys Boim, Eloá Moura, Letícia de Pierri, Flávio Pinto, Cintia Lopes, Rodolfo Fagundes, Matheus Barreto, Ruan Firmano, Matheus Bortolanza, Ana Paula Teles, Thais Soares, Beatriz Motta, Nayana Alves, Rodrigo de Souza e Felipe Hipólito.

A todos que de qualquer maneira contribuíram neste trabalho.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. Sistema de plantio direto	9
2.2. Especiação de fósforo no solo	11
2.3. Atributos da microbiologia do solo influenciados pelo manejo do solo.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Descrição da área experimental e caracterização inicial do solo	17
3.2. Delineamento experimental e amostragens do solo.....	18
3.3. Histórico de operações de manejo, calagem e adubação.....	20
3.4. Análises do solo.....	23
3.4.1. Mineralogia da fração argila	23
3.4.2. Atributos químicos para fins de avaliação da fertilidade do solo	23
3.4.3. Ação dos extratores de fósforo	24
3.4.4. Especiação iônica de fósforo da solução do solo.....	25
3.4.5. Especiação de fósforo da fase sólida por XAS/XANES.....	26
3.4.6. Caracterização de fósforo orgânico por ressonância nuclear magnética – ³¹ PRNM.....	27
3.4.7. Fracionamento químico de fósforo	28
3.5. Análises microbiológicas	29
3.5.1. Carbono da biomassa microbiana (CBM)	29
3.5.2. Atividade de fosfatases	31
3.5.3. Quantificação de bactérias e fungos por PCR em tempo real – qPCR.....	31
3.5.4. Determinação da estrutura de comunidades de bactérias e fungos por T-RFLP	32
3.6. Análises estatísticas	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Análises do solo.....	35
4.1.1. Mineralogia da fração argila	35
4.1.2. Atributos químicos para fins de avaliação da fertilidade do solo	37
4.1.3. Ação dos extratores de fósforo	42
4.1.4. Especiação iônica de fósforo da solução do solo.....	44
4.1.5. Especiação de fósforo da fase sólida por XAS/XANES.....	47
4.1.6. Caracterização de fósforo orgânico por ressonância nuclear magnética - ³¹ P RNM.....	52
4.1.7. Fracionamento químico de fósforo	55
4.2. Análises microbiológicas	66
4.2.1. Carbono da biomassa microbiana.....	66
4.2.2. Atividade de fosfatases	69
4.2.3. Quantificação de bactérias e fungos por PCR em tempo real – qPCR.....	72
4.2.4. Estrutura de comunidades de bactérias e fungos por T-RFLP	78
5. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS.....	85

RESUMO

Especiação de fósforo e atributos microbiológicos da rizosfera de soja e trigo em função do preparo do solo

O fósforo (P) é um dos macronutrientes mais limitantes para a produção agrícola em grande parte dos solos tropicais úmidos, devido ao baixo teor natural e à sua capacidade de formar compostos de alta energia de ligação com a fase sólida do solo. A especiação química, que consiste na distribuição de um elemento químico entre suas espécies químicas, é uma ferramenta útil para avaliação das formas de P no solo. Os processos e mecanismos que controlam a disponibilidade de nutrientes no solo em função do preparo do solo influenciam diferentemente a dinâmica e a ciclagem de P e, conseqüentemente, a quantidade e distribuição das espécies de P do solo. Na rizosfera, há um efeito de seleção imposto pelas mudanças físico-químicas criadas na proximidade das raízes que moldam a composição microbiana. Os microrganismos do solo participam de mecanismos que influenciam a dinâmica do P no solo e conseqüentemente auxiliam a absorção de P pelas plantas. O objetivo nessa pesquisa foi avaliar como as espécies e a disponibilidade de P é influenciada pelo sistema de preparo na rizosfera, na linha e na entrelinha de semeadura da soja (*Glycine max* L Merrill) e do trigo (*Triticum spp.*) em rotação cultivados num Latossolo Vermelho distroférrico argiloso sob sistema de preparo convencional (SPC) e plantio direto (SPD) há 36 anos. As técnicas utilizadas para especiação de P foram especiação da solução do solo, o fracionamento químico e a espectroscopia de absorção de raios-X. Os atributos microbiológicos avaliados foram o teor de carbono da biomassa microbiana (CBM), a atividade de enzimas fosfatases, a quantificação de bactérias e fungos por PCR em tempo real – qPCR e a determinação das estruturas das comunidades de bactérias e fungos por T-RFLP. Os teores biodisponíveis de P foram superiores no SPD em relação ao SPC. Houve predomínio da forma monovalente de P ($H_2PO_4^-$) na solução do solo. As formas predominantes de P na fase sólida do solo foram as ligadas a Al amorfo, gibbsita, goethita, hematita e ácido fítico. As frações de P na rizosfera e na linha de semeadura foram, em geral, semelhantes e superiores às frações de P na entrelinha de semeadura, devido ao efeito rizosférico e/ou do processo de amostragem do solo. Houve distribuição semelhante das formas P lábil, moderadamente lábil e não lábil entre todos os tratamentos. Os teores de CBM foram superiores no SPD e linha de semeadura, em relação à rizosfera. A atividade das fosfatases foram superiores no SPD, com teores semelhantes na rizosfera e na linha de semeadura, devido à proximidade do sistema radicular. O predomínio da abundância de bactérias em relação aos fungos nos sistemas de manejo do solo pode estar relacionado ao ambiente químico do solo mais favorável ao domínio Bactéria. O teor de matéria orgânica do solo foi o principal fator que contribuiu para distinção entre os sistemas de preparo do solo, o que pode ter propiciado ambiente mais estável à microbiota do solo da cultura da soja.

Palavras-chave: Sistema de Plantio Direto, XANES, Qualidade do solo, Especiação de P

ABSTRACT

Phosphorus speciation and microbiological attributes of soybean and wheat rhizosphere as a function of soil tillage

Phosphorus (P) is one of the most limiting macronutrients for agricultural production in humid tropical region because of its low natural content in soils and its ability to form high energy binding compounds with the solid phase of the soil. Chemical speciation, which consists in the distribution of a chemical element among its chemical species, is a useful tool for evaluating P forms in the soil. The processes and mechanisms that control soil nutrient availability as a function of soil tillage influence P dynamics and cycling differently and, consequently, the amount and distribution of soil P species. In the rhizosphere, there is a selection effect imposed by the physico-chemical changes created in the vicinity of the roots that affect the microbial composition. Soil microorganisms have mechanisms that influence the dynamics of P in the soil and consequently assist the absorption of P by plants. The objective in this research was to evaluate how P species and P availability are influenced by tillage systems in the rhizosphere, row and inter row of soybean (*Glycine max* L Merrill) and wheat (*Triticum spp.*) rotated in an Oxisol under conventional tillage and no-tillage (NT) for 36 years. The techniques used for P speciation were soil solution speciation, chemical fractionation and X-ray absorption spectroscopy. The microbiological attributes evaluated were the carbon content of the microbial biomass, the activity of phosphatase enzymes, the quantification of bacteria and fungi by real time PCR - qPCR and the determination of bacterial and fungal community structures by T-RFLP. Bioavailable P contents were higher in NT than in conventional tillage. There was a predominance of monovalent P form ($H_2PO_4^-$) in the soil solution. The predominant forms of P in the solid soil phase were those linked to amorphous Al, gibbsite, goethite, hematite and phytic acid. The fractions of P in the rhizosphere and sowing line were generally similar and higher than the P fractions in the inter row, due to the rhizospheric effect or soil sampling process. There was a similar distribution of labile, moderately labile and non-labile P forms among all treatments. Carbon contents of the microbial biomass were higher in NT system and sowing line than rhizosphere. Phosphatase activity was higher in no-tillage, with similar levels in the rhizosphere and seeding row because of the proximity of the root system. The predominance of bacterial abundance over fungi in soil management systems may be related to the soil chemical environment more favorable to the Bacteria domain. The soil organic matter content was the main factor that contributed to the distinction between tillage systems, which may have provided a more stable environment for soybean soil microbiota.

Keywords: No-Tillage System, XANES, Soil quality, P speciation

1. INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um dos macronutrientes mais limitantes para a produção agrícola em grande parte dos solos tropicais úmidos, devido ao seu baixo teor natural e à sua capacidade de formar compostos de alta energia de ligação com a fase sólida do solo, o que resulta em baixas quantidades de P disponível às plantas. As espécies de P do solo são divididas em função da natureza do composto a que estão ligadas.

Para o estudo do comportamento das formas de P no solo a especiação química é uma ferramenta útil, que consiste na avaliação da distribuição de um elemento químico entre suas espécies químicas. Na especiação química da solução do solo a estimativa dos íons em solução geralmente é efetuada por meio de programas computacionais, que utilizam cálculos de equilíbrio químico a partir das concentrações totais dos componentes determinados experimentalmente, na solução do solo.

A espectroscopia de absorção de raios-X é outra técnica de especiação química que tem sido utilizada, nas últimas décadas, pela Ciência do Solo para o estudo da especiação sólida do solo, baseada na luz síncrotron essa técnica mede a variação do coeficiente de absorção de uma amostra de solo em função da energia aplicada. A vantagem exclusiva dessa técnica é que o método é não destrutivo na identificação molecular “in situ” das informações químicas locais do elemento de interesse.

As técnicas de especiação química do solo além de estimar a distribuição dos elementos no solo é utilizada também para auxiliar no entendimento sobre os processos e mecanismos que controlam a disponibilidade de nutrientes no solo sob diferentes sistemas de preparo do solo, que influenciam diferentemente a dinâmica e a ciclagem de P e, conseqüentemente, a quantidade e distribuição das espécies na matriz do solo.

O revolvimento do solo é uma prática utilizada no preparo convencional do solo desde os primórdios da agricultura. Esse processo quebra os agregados do solo, expõe a matéria orgânica do solo (MOS) aos processos de decomposição, acelera a erosão do solo e favorece o aumento da fixação de P devido à exposição a novos sítios de adsorção. Porém, devido ao aumento do processo erosivo e à redução no teor da MOS adotaram-se, nos últimos 50 anos, práticas conservacionistas de solo, como o sistema de plantio direto (SPD).

O SPD preconiza a ausência de revolvimento do solo associada à manutenção dos resíduos culturais na superfície do solo, o que influencia diretamente a diminuição da erosão hídrica que atenua o impacto das gotas de chuva, propicia um ambiente estável que favorece o

aumento na densidade e diversidade dos microrganismos que atuam nos processos de mineralização e imobilização de P.

Os microrganismos do solo possuem mecanismos que influenciam a dinâmica do P no solo e, conseqüentemente, auxiliam a absorção de P pelas plantas. Dentre eles destacam-se as associações micorrízicas, crescimento lateral de raízes e pêlos radiculares induzido por fitohormônios, incremento dos processos metabólicos que participam da solubilização e mineralização de fosfatos por meio da exsudação de ácidos orgânicos e produção de enzimas fosfatases.

A compreensão da dinâmica do P no solo nos distintos sistemas de manejo do solo pode auxiliar na eficiência do uso deste nutriente nos sistemas agrícolas, auxiliar na possível redução do consumo de fertilizante fosfatados e maximizar o potencial biológico dos atributos relacionados à qualidade do solo, o que aprimora as técnicas de manejo da fertilidade dos solos.

O objetivo nesta pesquisa foi compreender como as espécies e a disponibilidade de P são influenciadas pelo manejo de um Latossolo sob sistema de preparo convencional e plantio direto em rotação de soja (*Glycine max* L Merrill) e trigo (*Triticum* spp.) há 36 anos, em função das posições de amostragem da rizosfera, linha e entrelinha de semeadura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sistema de plantio direto

A agricultura conservacionista é o principal caminho para a agricultura sustentável e a conservação dos recursos naturais e do meio ambiente. Os três princípios fundamentais dos sistemas de agricultura conservacionista são: (i) minimizar a perturbação do solo (ii) maximizar a cobertura da superfície do solo (iii) estimular a atividade biológica por meio de rotações de culturas (FAO, 2016). O sistema de plantio direto (SPD) é um dos pilares da agricultura conservacionista (SHAHZAD et al., 2016).

O SPD consiste em conjunto de processos tecnológicos destinados à exploração de sistemas agrícolas produtivos, que compreende a mobilização de solo apenas na linha ou cova de semeadura, manutenção permanente da cobertura do solo, diversificação de espécies e minimização ou supressão do intervalo de tempo entre colheita e semeadura (REBELLO; TURETTA, 2017).

A introdução do plantio direto no Brasil remonta ao final da década de 1960, e seu desenvolvimento no Brasil ocorreu com o agravamento do processo erosivo dos solos no estado do Paraná nas décadas de 1960 e 1970, decorrente do sistema intensivo de preparo do solo (CRUZ et al., 2015). Uma das dificuldades para implantação do plantio direto no Brasil era a falta de máquinas semeadoras, o que exigiu adaptações das semeadoras convencionais a essa realidade emergente. Enquanto o plantio direto já vinha sendo pesquisado nos Estados Unidos na década de quarenta e, mais intensamente, no final da década de cinquenta, somente em 1971 iniciaram-se as primeiras pesquisas no Brasil e na América Latina (DERPSCH, 2000). As dificuldades iniciais para o domínio da tecnologia do SPD e a resistência à mudança de conceitos estabelecidos atrasaram a plena adoção do SPD no país, particularmente no Cerrado. Somente a partir dos anos noventa é que o SPD se expandiu e ocupou espaços importantes na agricultura brasileira (OLIVEIRA, NOVAIS, ALVAREZ, 2002).

De acordo com o Censo Agropecuário 2017 (IBGE, 2017) o Brasil possui 33 milhões de hectares sob SPD. Na última década, houve aumento de 85% na área sob plantio direto, a maior parte está concentrada nas regiões Sul e Central, especialmente nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso.

Embora o SPD tenha aumentado em área plantada no Brasil, a qualidade do SPD empregado ainda é um desafio, pois segundo Derpsch (2013) existem ameaças importantes à sustentabilidade do SPD relativas à execução deficiente do SPD, as mais comuns estão relacionadas com a monocultura; a insuficiente cobertura do solo causada pela produção e adição

escassa se biomassa; períodos do ano sem culturas ou sem suficiente cobertura vegetal sob a superfície do solo (pousio); a insuficiente utilização de plantas de cobertura do solo e adubação verde; a deficiente distribuição dos resíduos pelas colhedoras; a eliminação indiscriminada ou a não existência de terraços em áreas declivosas; o excessivo revolvimento do solo na operação de plantio e a falta de continuidade pela interrupção periódica do SPD.

O sistema de plantio direto não deve ser visto apenas como um procedimento de semeadura em solo não revolvido e protegido por resíduos vegetais de culturas anteriores. O conceito de plantio direto deve assumir a visão integrada de um sistema (OLIVEIRA, NOVAIS, ALVAREZ, 2002). Segundo Sá (1998) o SPD envolve a combinação de práticas culturais como: (i) o uso de produtos químicos e, ou práticas mecânicas no manejo de culturas destinadas à adubação verde, para formação de cobertura do solo, mediante manutenção dos resíduos culturais na sua superfície, (ii) a combinação de espécies com exigências nutricionais, produção de fitomassa e sistema radicular diferenciados, visando a constituir uma rotação de culturas; (iii) adoção de métodos integrados de controle de plantas daninhas, mediante a cobertura do solo, herbicidas específicos e o não-revolvimento do solo, exceto nos sulcos de semeadura.

A adoção do SPD resulta em benefícios pelo incremento na retenção de água no solo, pelo decréscimo nas temperaturas máximas do solo, pelo controle da erosão e pela melhoria em diversas outras propriedades físicas, químicas e biológicas. A melhoria nessas propriedades resulta em maiores rendimentos das culturas, sustentabilidade agrícola e qualidade do solo sob SPD, em comparação ao sistema convencional de preparo do solo (HUNGRIA, 2010) .

As mobilizações da camada arável, proporcionadas pelos sucessivos preparos de solo, modificam a agregação do solo e alteram outros atributos físicos. A ação de implementos agrícolas na mobilização do solo, principalmente do arado e das grades de discos, fraciona e desarranja os agregados do solo e acelera a oxidação da matéria orgânica, o que torna os agregados menores e menos estáveis. Esse processo de redução de diâmetro, de desestabilização e de desarranjo de agregados na camada arável promove progressivamente redução e descontinuidade da porosidade total e elevação da densidade do solo, com reflexos negativos diretos na permeabilidade do solo ao ar, a água e a raízes (KOCHHANN; DENARDIN, 2000).

No SPD a não incorporação da biomassa da parte aérea das plantas de cobertura e dos resíduos das culturas comerciais ao solo torna possível a manutenção de cobertura vegetal na superfície do solo que favorece a acumulação de matéria orgânica no solo, aumento da atividade microbiana e maior mineralização de nutrientes como P que favorece o acesso de nutrientes prontamente disponíveis para a absorção de plantas (CORBEELS et al., 2016). O revolvimento do solo sob preparo convencional promove maior contato entre o íon fosfato e a superfície dos

coloides inorgânicos, o que favorece reações de adsorção e a redução de sua disponibilidade para as plantas (LANTMANN; ÁUREO; CASTRO, 2004).

No SPD, ao contrário do que ocorre no sistema de preparo convencional, os fertilizantes são aplicados na superfície do solo sem posterior incorporação, o que tem aumentado os teores de P total da camada superficial (RHEINHEIMER; ANGHINONI, 2001). Portanto, os sistemas de manejo do solo podem alterar a dinâmica das transformações de P de maneira benéfica, melhorando a utilização de P no solo ou de maneira prejudicial por perdas desse nutriente (RHEINHEIMER et al., 2008).

2.2. Especiação de fósforo no solo

As principais reações químicas do solo ocorrem na solução do solo, a interface solo-solução é muito dinâmica e os elementos dissolvidos são afetados por várias reações, como equilíbrio ácido-base, complexação iônica, precipitação e dissolução de sólidos, oxidação, redução e troca iônica (FONTES; ALLEONI, 2006).

As interações químicas que ocorrem na solução do solo interferem na mobilidade e disponibilidade dos nutrientes para as plantas (ZAMBROSI; ALLEONI; CAIRES, 2008). O elemento é considerado biodisponível se estiver em uma forma química que a planta é capaz de absorver rapidamente e, quando absorvido, afeta o ciclo de vida da planta (SPOSITO, 1989). A biodisponibilidade de um elemento é determinada pela competição entre as raízes das plantas, a solução do solo e as fases sólidas do solo. As propriedades eletroquímicas da fase sólida influenciam diretamente o comportamento dos elementos do solo (FONTES; ALLEONI, 2006).

A maioria das partículas coloidais carrega carga elétrica significativa em sua superfície, exibindo potenciais elétricos que se estendem à solução do solo. Os íons presentes na solução interagem com essas cargas, e os da mesma carga são repelidos, enquanto o oposto é atraído. Portanto, potenciais eletrostáticos associados a superfícies de carga podem ter influência significativa na adsorção de íons (FONTES; ALLEONI, 2006). Nos solos altamente intemperizados, os óxidos/hidróxidos são os principais responsáveis pela alta retenção de fosfato (NOVAIS, SMYTH, 1999).

A biodisponibilidade de fósforo em ambientes terrestres está relacionada à concentração total na solução e à distribuição de suas espécies, como ortofosfato livre (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), formas orgânicas ou complexos coloidais (HENS; MERCKX, 2002). O pH influencia a proporção dos ânions H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} na solução do solo, na quantidade de cargas elétricas negativas e positivas, ou seja, no potencial elétrico da superfície dos coloides com cargas elétricas variáveis (HAYNES, 1982).

A presença de fósforo na solução do solo é determinada também por sua interação com os íons Fe, Al e Ca. Em ambientes mais ácidos, a formação de fosfatos de alumínio, de baixa solubilidade, controla a presença de P em solução. Em pH mais elevado, a formação de fosfatos de cálcio, também de baixa solubilidade, passa a controlar P (NOLLA; ANGHINONI, 2006).

Para o estudo do comportamento das formas de P no solo a especiação iônica é uma ferramenta útil, que consiste na avaliação da distribuição do elemento entre suas espécies químicas na solução do solo. Na especiação são levadas em conta espécies complexadas e não complexadas e a distribuição entre os estados de oxidação, e obtém-se com resultado em quais formas os elementos se apresentam na solução do solo.

A estimativa da especiação química dos íons em solução geralmente é efetuada por meio de programas computacionais que utilizam cálculos de equilíbrio químico a partir de concentrações totais de componentes determinados experimentalmente na solução do solo. O Minteq é um programa geoquímico de modelagem de soluções aquosas e de interações com fases sólidas (ALLISON et al., 1991). Com base em constantes de equilíbrio, usa o princípio de ação das massas para relacionar as atividades de metais, ligantes e complexos metal-ligantes, sendo essas relações ligadas por meio de equações de balanço de massa (RODELLA, 2006).

Ao analisar uma amostra de solução de solo, determina-se normalmente: pH, condutividade elétrica, carbono orgânico dissolvido e teores totais de componentes inorgânicos, tais como: K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^- , CO_3^{2-} (RODELLA, 2006) que são usados posteriormente para efetuar a estimativa da especiação química dos íons em solução por meio do programa de modelagem. Os resultados ajudam a interpretar, com maior ou menor sucesso, os processos que ocorrem em sistemas naturais (RODELLA, 2006).

Muitos métodos foram desenvolvidos para caracterizar o P do solo, e o mais usado é o fracionamento químico sequencial. O método proposto por Hedley et al. (1982) envolve extrações sequenciais com reagentes alcalinos e ácidos que extraem as formas de P do solo. Com uso desse método, consegue-se descrever de forma precisa as transformações de P ao longo do desenvolvimento do solo de acordo com os processos biológicos na dinâmica dos pools de P que contribuem para a ciclagem de P (MOIR; TIESSEN, 2007).

O fracionamento químico tem sido amplamente utilizado para investigar a distribuição de formas lábeis e não lábeis de Pi e Po entre fosfatos minerais e componentes orgânicos do solo (ARRUDA COELHO et al., 2019; RODRIGUES et al., 2016; SHI et al., 2015). Porém, o método do fracionamento mede apenas o estoque de P com base na solubilidade de diversos extratores e não determinam formas P inorgânicas ou orgânicas específicas (CADE-MENUN; LIU, 2014).

A técnica de espectroscopia de absorção de raios-X (XAS) foi desenvolvida no início da década de 1970 (SAYERS; STERN; LITTLE, 1971) e nas últimas décadas tem sido amplamente utilizada por meio da radiação síncrotron no estudo de diversas áreas da Ciência do Solo, como mineralogia e geoquímica (KELLY et al., 2008). A espectroscopia de absorção de raios-X consiste na medição da variação do coeficiente de absorção de uma amostra em função da energia aplicada (KRUSE et al., 2015).

Os espectros de absorção são obtidos a partir da excitação dos elétrons dos átomos do elemento de interesse, que ocorre a quando a energia dos raios-X que incide sobre a amostra é aproximadamente igual à energia de ligação dos elétrons do átomo de interesse (Lombi; Susini, 2009). No caso do fósforo, a energia da borda de absorção é próxima a 2151 eV. Semelhante a outras técnicas espectroscópicas, a relação entre as características espectrais e os fenômenos atômicos leva a interpretações em escala molecular. No entanto, os espectros XAS derivados do solo representam uma absorção média ponderada do grande número de átomos absorventes (KIZEWSKI et al., 2011) devido à característica heterogênea da matriz do solo.

Os espectros de absorção podem ser coletados em misturas heterogêneas de gases, líquidos e ou sólidos com reduzido ou nenhum pré-tratamento de amostra, o que a torna uma técnica favorável para o estudo de solos (KELLY et al., 2008). O espectro de absorção é dividido em três regiões: (i) primeira região abaixo da borda de absorção é chamada de pré-borda; (ii) segunda região é denominada XANES (iii) terceira região é chamada de EXAFS. A técnica de espectroscopia de absorção de raios-X próximo à estrutura da borda (X-ray spectroscopy near edge structure – XANES) é um método que determina as prováveis espécies de P do solo comparando os dados com padrões de P conhecidas. Os resultados espectrais obtidos pela análise XANES na borda K do P geralmente mostram características únicas entre grupos de espécies P (HASHIMOTO; WATANABE, 2014).

Um dos inconvenientes associados à espectroscopia XANES da borda K do P é a falta de sensibilidade na diferenciação de espécies de fosfato orgânico (HESTERBERG, 2010). A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P (^{31}P -RMN) é um método mais poderoso que a espectroscopia XANES para identificar espécies orgânicas de P (HASHIMOTO; WATANABE, 2014).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P (^{31}P -RMN) pode ser usada para obter estimativas qualitativas e quantitativas das formas de P no solo, tais como ortofosfato inorgânico, polifosfato, fosfonato, pirofosfato, ortofosfato monoésteres, como fosfato de inositol e ortofosfato diésteres, como fosfolipídios. A técnica ^{31}P NMR é relativamente insensível, exige

mais de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de P na solução para análise quantitativa, e a extração e a concentração do extrato são necessárias para produzir bons espectros (CADE-MENUN; PRESTON, 1996).

Os trabalhos iniciais de ^{31}P - RMR no estudo do solo produziram espectros muito amplos com pouca resolução de picos individuais. Assim, as formas P eram identificadas apenas como classes de compostos, por exemplo, ortofosfato, ortofosfato monoésteres, com poucas tentativas de identificar formas P específicas. Porém, com os avanços ao longo do tempo, a técnica permite agora que a maioria dos picos sejam identificados e comparados com bibliotecas de compostos, apesar de ainda ser difícil distinguir algumas formas específicas (CADE-MENUN, 2017).

Cada método tem sua especificidade e limitação, porém o uso combinado dos diferentes métodos disponíveis para estudo do P no solo (espeiação iônica da solução, fracionamento sequencial e técnicas espectroscópicas XANES e ^{31}P -RMN) é importante para determinar com precisão a espeiação de P nos solos (AJIBOYE et al., 2007).

2.3. Atributos da microbiologia do solo influenciados pelo manejo do solo

Os microrganismos, juntamente com a meso e macrofauna e as raízes das plantas, constituem a fração viva da matéria orgânica do solo e podem ser utilizados como indicadores biológicos ou bioindicadores, uma vez que estão intimamente relacionados ao funcionamento do solo e tem estreita relação com seus componentes físicos e químicos (MENDES et al., 2009). Dentre os parâmetros utilizados pela comunidade científica para caracterizar o componente biológico dos solos, destacam-se as avaliações de fauna do solo, o crescimento de raízes e planta e as avaliações de biomassa, atividade e diversidade microbiana (MENDES et al., 2009).

As propriedades biológicas e bioquímicas do solo, tais como: a atividade enzimática, a taxa de respiração, a diversidade e a biomassa microbiana, são indicadores utilizados no monitoramento de alterações ambientais decorrentes do uso agrícola e são ferramentas para orientar o planejamento e a avaliação das práticas de manejo utilizadas (DORAN et al., 1994).

A biomassa microbiana do solo é um componente essencial da matéria orgânica do solo que, entre outras funções, regula a ciclagem de nutrientes no solo. As determinações do teor de carbono da biomassa microbiana do solo são importantes para avaliação do tamanho do reservatório ativo e dinâmico da matéria orgânica do solo, constituído basicamente por fungos, bactérias e actinomicetos (OLIVEIRA; MENDES; VIVALDI, 2001).

Os microrganismos do solo possuem mecanismos que influenciam a dinâmica do P no solo e conseqüentemente auxiliam a absorção de P pelas plantas. Dentre eles destacam-se: (i) incremento da área superficial das raízes pela extensão do sistema radicular por meio das

associações micorrízicas ou pela promoção do crescimento de raízes laterais e pelos radiculares induzidos por fito-hormônios; (ii) deslocamento do equilíbrio de adsorção, do que resulta a transferência de íons fosfato para a solução do solo ou incremento na mobilidade de formas orgânicas de P; (iii) estímulos de processos metabólicos efetivos na solubilização e mineralização do P a partir de formas pouco disponíveis de fósforo inorgânico e orgânico. Esses processos incluem a excreção de íons hidrogênio, liberação de ácidos orgânicos, produção de sideróforos e a produção de enzimas fosfatases capazes de hidrolisar o P orgânico (MENDES; REIS JÚNIOR, 2003).

A comunidade microbiana mais complexa, diversa e ativa está localizada na rizosfera, a camada do solo imediatamente influenciada pela rizodeposição (PRASHAR; KAPOOR; SACHDEVA, 2014). Na rizosfera, há efeito de seleção imposto pelas mudanças físicoquímicas criadas na proximidade das raízes que moldam a composição microbiana. Essa seleção pode ocorrer tanto indiretamente, favorecendo o crescimento de microrganismos oportunistas adaptados a condições químicas específicas, como pelo recrutamento ativo de microrganismos que favorecem o desenvolvimento e nutrição da planta e auxiliam na capacidade da planta de resistir a estressores bióticos e abióticos (BULGARELLI et al., 2013; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Fora da zona de influência das raízes, o solo pode ser considerado oligotrófico ou relativamente pobre em fontes de carbono disponíveis (ROSADO, 2000).

As práticas agrícolas são frequentemente correlacionadas com mudanças na estrutura das comunidades microbianas associadas às plantas. Essa influência decorre de mudanças físicas e químicas promovidas na matriz do solo, que influenciam a maneira pela qual as plantas exercem a seleção de seu microbioma (ANDREOTE; GUMIERE; DURRER, 2014).

As práticas agrícolas causam distúrbios na comunidade microbiana do solo. Os distúrbios físicos causados no solo pela aeração e pelo manejo de resíduos são fatores determinantes da atividade da biota do solo e da diversidade de espécies do agroecossistema. A aração utilizada no preparo convencional do solo usualmente causa distúrbio de pelo menos 15-25 cm na superfície do solo e homogeneiza as características físicas e a distribuição de resíduos. A perda de um habitat de solo estratificado causa decréscimo na densidade de espécies (ALTIERI, 1999).

Um solo com teor elevado de matéria orgânica tende a manter a população microbiana mais estável ao longo do ano, provavelmente, em decorrência da riqueza de nichos ecológicos, pela heterogeneidade das fontes de carbono (GRAYSTON et al., 2001). A diversidade de plantas estimula diferentes espécies da biota do solo, o que favorece interações e o estímulo entre os componentes do sistema solo. As interações bióticas dependem da riqueza das espécies de

plantas e de seus modelos de distribuição (BEARE et al., 1995). A biomassa microbiana é maior em solos sob SPD do que em solos sob preparo convencional (FRANCHINI et al., 2007; BALOTA et al., 1998). O SPD também favorece quantitativamente alguns microrganismos de importância agrícola, como bactérias diazotróficas (HUNGRIA, 2000) e fungos micorrízicos arbusculares (COLOZZI FILHO; BALOTA, 1999). A inclusão de espécies leguminosas e/ou adubos verdes no sistema de rotação de culturas no SPD também apresentam benefícios para a microbiota do solo (FRANCHINI, 2007).

Sistemas agrícolas que possuem cultivo de espécies diferentes no espaço e no tempo potencializam o sistema solo a se organizar em estruturas físicas e químicas com complexidade e diversidade crescente e alta quantidade de energia e matéria retida na forma de compostos orgânicos e biota edáfica, o que habilita o solo a exercer suas funções na natureza e, conseqüentemente, atingir um alto padrão de qualidade (VEZZANI; MIELNICZUK, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Descrição da área experimental e caracterização inicial do solo

A área experimental foi ocupada com o cultivo de café (*Coffea sp.*) por aproximadamente 40 anos até 1973, quando então passou a ser utilizada para a produção de grãos em sistema de sucessão com trigo no inverno e soja no verão, cultivados sob manejo convencional do solo com a utilização de arados e grades até a implementação do experimento em 1981/1982 na Fazenda Experimental da Embrapa Soja em Londrina, estado do Paraná (PR) em um Latossolo Vermelho distroférico (DEBIASI et al., 2013), o qual continua sendo conduzido até os dias atuais. O clima de Londrina é subtropical úmido, classificado como Cfa conforme a classificação de Köppen, com temperatura máxima de 25,5°C em fevereiro e mínima de 13,3°C em julho e precipitação média anual de 1.651mm (Figura 1).

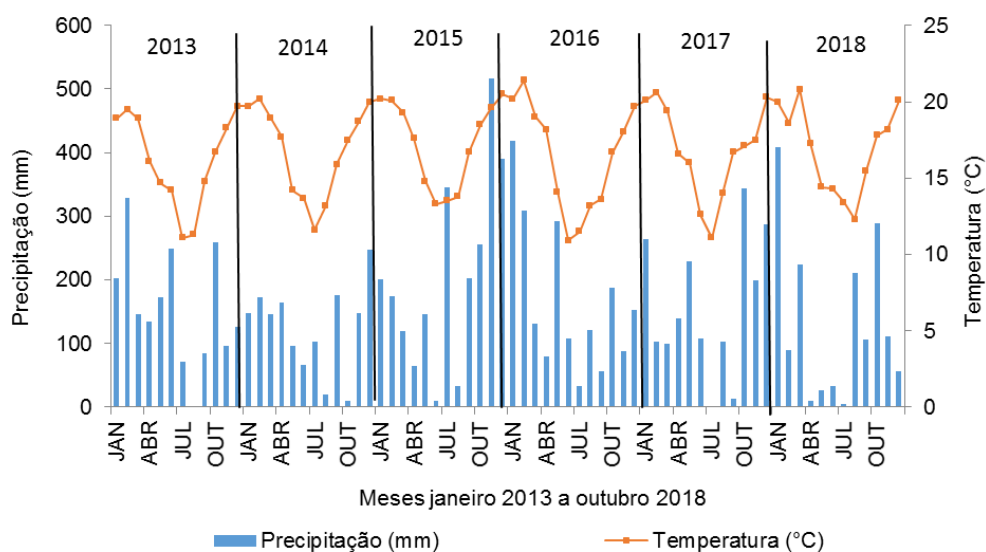


Figura 1. Precipitação e temperatura médias do município de Londrina-PR no período de 2013 a 2018.

Alguns atributos químicos e físicos do solo da área experimental foram determinados antes da instalação do experimento. (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1. Caracterização química do Latossolo Vermelho distroférico, antes da implantação do experimento, em 1980 segundo Debiasi et al. (2013).

pH H ₂ O	Ca ¹	Mg ¹	K ²	Al ¹	P ²	C
	mmol _c dm ⁻³				mg dm ⁻³	g kg ⁻¹
5,8	65	20	4,2	0,0	21	12

¹ Extração com KCl 1M; ² Extração com Mehlich 1 (0,05 mol L⁻¹ de HCl e 0,0125 mol L⁻¹ de H₂SO₄).

Tabela 2. Caracterização física em profundidade do Latossolo Vermelho distroférico, antes da implantação do experimento, em 1980. Fonte: Debiasi et al. (2013).

Camada	Ds	Pt	MA	MI	CAD
--- cm ---	-- Mg m ⁻³	----- m ³ m ⁻³ -----			
0-14	1,09	0,62	0,22	0,40	0,12
14-25	1,13	0,62	0,19	0,43	0,11
25-40	1,08	0,62	0,19	0,43	0,11
40-60	1,04	0,64	0,21	0,43	0,11

Ds: densidade do solo; Pt: porosidade total; MA: macroporosidade. MI: microporosidade. CAD: capacidade de armazenamento de água disponível.

Tabela 3. Teores de argila, silte e areia em profundidade de um Latossolo Vermelho distroférico, antes da implantação do experimento, em 1980. Fonte: Debiasi et al. (2013).

Camada	Argila	Silte	Areia
--- cm ---	----- g kg ⁻¹ -----		
0-10	776	164	60
10-20	788	154	58
20-30	809	142	49
30-40	830	118	52
40-60	837	121	43
60-80	846	98	56
80-100	825	113	62

3.2. Delineamento experimental e amostragens do solo

O experimento é conduzido em delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições, em parcelas de 8 x 50 m, com área total de 400 m² (Figura 2). Neste trabalho foram utilizados os tratamentos de sistema de plantio direto (SPD) e preparo convencional com arado de discos que foi denominado sistema de preparo convencional (SPC). Foram escolhidas três posições de amostragem: rizosfera, linha e entrelinha (Figura 3), num sistema fatorial 2 x 3, sendo dois sistemas de manejo do solo e três posições de amostragem do solo.

Quinze plantas por parcela foram retiradas do solo com auxílio de uma vanga de aproximadamente 15 cm no período de florescimento da soja (*Glycine max L Merrill*) e do trigo (*Triticum spp*). As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos tomando-se cuidado para não desfazer a agregação ao redor do sistema radicular. Posteriormente, as plantas foram levadas ao laboratório (Figura 3a) onde se realizou a separação do solo da rizosfera (Figura 3a). As amostras da rizosfera foram coletadas seguindo uma adaptação do método proposto por Chung e Zasoski (1994).

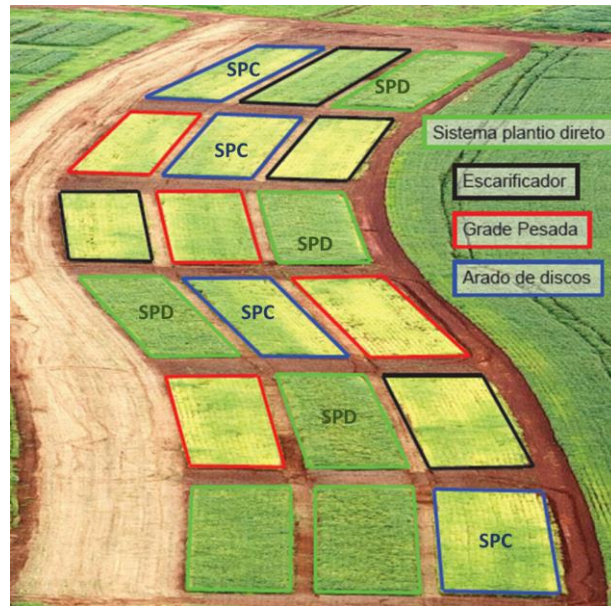


Figura 2. Aspecto visual da cultura da soja na safra 2008/2009 (cultivar BRS 184), em função dos diferentes sistemas de preparo do solo Adaptado de Debiasi et al. (2013). Indicação das parcelas do sistema de preparo convencional (SPC) e sistema de plantio direto (SPD).



Figura 3. a: Materiais utilizados para separação do solo rizosférico; b: Solo rizosférico sendo separado com auxílio de pincel; c: Coleta de solo da entrelinha com tradagem a 20 cm de profundidade.

Primeiramente, as plantas foram suavemente abaladas, o solo não aderido que se desprende após a primeira abalada foi separado e utilizado para compor as amostras da linha de semeadura. A fração do solo que permaneceu completamente aderido às raízes foi removida cuidadosamente com o auxílio de pincel e depois foi utilizada para compor as amostras da rizosfera (Figura 3b). As amostras da entrelinha foram realizadas em campo por meio de tradagens a 20 cm de profundidade (Figura 3c).

As amostras de solo separadas para as análises microbiológicas foram acondicionadas em tubos Eppendorf de 2 g e mantidos em freezer a -80°C até o momento das análises. As amostras de solo separadas para as análises químicas foram secas ao ar, passadas por uma peneira de 2 mm de malha e armazenadas em sacos plásticos até o momento das análises.

3.3. Histórico de operações de manejo, calagem e adubação

Desde a instalação do experimento até a safra 1999/2000 a semeadura da soja foi realizada com semeadora-adubadora tratorizada equipada com hastes sulcadoras. A partir da safra 2000/2001 até o momento, utilizou-se semeadora-adubadora tratorizada com sistema guilhotina e sulcadores para semente do tipo disco duplo desencontrado, com espaçamento entrelinhas de 45 cm. Para semeadura do trigo é utilizada semeadora-adubadora tratorizada, equipada com sulcadores do tipo disco duplo desencontrado para adubo e semente, com espaçamento entrelinhas de 17 cm (DEBIASI et al., 2013).

O sistema de preparo convencional (SPC) é realizado anualmente antecedendo a implantação da soja, no verão, por meio de aração com o uso de arado de discos de 26 polegadas que atua, em média, a 22 cm de profundidade, seguido de duas gradagens leves. No inverno, antes da semeadura do trigo, com exceção do sistema plantio direto (SPD), é realizada uma gradagem pesada seguida de uma gradagem leve (DEBIASI et al., 2013).

A calagem é realizada a cada quatro anos, com a aplicação média de 2 t ha^{-1} de calcário dolomítico visando a alcançar 60% de saturação de bases e aumentar o pH em água para aproximadamente 5.5. No SPD, o calcário é aplicado em superfície, enquanto no SPC o calcário é incorporado pelo arado (DEBIASI et al., 2013).

O manejo das culturas e os tratamentos fitossanitários e demais tratamentos culturais são realizados de acordo com as indicações técnicas para as culturas da soja e o trigo no Estado do Paraná, vigentes em cada safra avaliada. No caso do SPD, em todas as safras, as parcelas foram dessecadas após a colheita do trigo e da soja mediante a aplicação de herbicidas não seletivos (DEBIASI et al., 2013).

A adubação das culturas de soja e trigo foi realizada segundo descrito nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Data de semeadura e colheita, cultivares utilizados e quantidades de macronutrientes aplicados via adubação de base na cultura da soja, nas safras de 1987 a 2017. Adaptado de Debiasi et al. (2013).

Ano ⁽¹⁾	Cultivar	Data da semeadura	Data da colheita	Adubação	
				P ₂ O ₅	K ₂ O
				-----kg ha ⁻¹ -----	
1987	Paraná	25/11/87	17/03/88	48	24
1988	Paraná	23/11/88	16/03/89	48	24
1989	Paraná	25/11/89	20/03/90	48	24
1990	Paraná	27/11/90	18/03/91	48	24
1991	Paraná	29/11/91	19/03/92	48	24
1992	Paraná	27/11/92	17/03/93	48	24
1993	Paraná	24/11/93	22/03/94	48	24
1994	BR 37	14/11/94	21/03/95	48	24
1995	BR 37	12/11/95	18/03/96	48	24
1996	BR 37	04/11/96	17/03/97	0	0
1997	Embrapa 48	14/11/97	26/03/98	48	24
1998	BR 37	11/11/98	25/03/99	0	0
1999	Embrapa 48	07/11/99	25/03/00	34	34
2000	BRS 133	14/11/00	25/03/01	0	0
2001	BRS 133	09/11/01	26/03/02	60	60
2002	BRS 156	12/11/02	22/03/03	40	40
2003	BRS 156	14/11/03	31/03/04	56	40
2004	BRS 184	14/11/04	24/03/05	40	40
2005	BRS 232	20/11/05	31/03/06	50	50
2006	BRS 232	27/11/06	29/03/07	40	40
2007	BRS 232	06/11/07	22/03/08	50	50
2008	BRS 184	25/11/08	16/03/09	50	50
2009	BRS 255RR	29/10/09	08/03/10	50	50
2010	BRS 295RR	27/10/10	15/03/11	52	52
2011	BRS 316RR	28/10/11	13/03/11	60	60
2012	BRS 255RR	17/10/12	01/03/13	66	66
2013	BRS 360RR	19/10/13	19/02/14	54	54
2014	BRS 360RR	07/11/14	13/03/15	60	60
2015	BRS 360RR	16/10/15	13/02/16	60	60
2016	BRS 360RR	17/10/16	24/02/17	64	64
2017	BRS 1010 iprc	05/10/17	⁽⁴⁾	60	60

⁽¹⁾ As informações referentes às safras 1981/1982 a 1986/1987 não foram recuperadas. ⁽²⁾ Não foi aplicado fertilizante nitrogenado em nenhuma das safras avaliadas, sendo as sementes de soja sempre inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. ⁽³⁾ Desde a safra 1998/1999, 20 g ha⁻¹ de molibdênio na forma da molibdato de sódio e 2 g ha⁻¹ de cobalto na forma de cloreto de cobalto vem sendo aplicado nas sementes de soja. ⁽⁴⁾ Sem informação.

Tabela 5. Datas de semeadura e colheita, cultivares utilizados e quantidades de macronutrientes aplicados via adubação de base na cultura do trigo, nas safras de 1989 a 2017. Adaptado de DEBIASI et al. (2013).

Ano ⁽¹⁾	Cultivar	Data de semeadura	Data de colheita	Adubação ⁽²⁾		
				N	P ₂ O ₅	K ₂ O
				-----kg ha ⁻¹ -----		
1989	⁽³⁾	16/05/1989	14/09/1989	13	48	24
1990	⁽³⁾	14/05/1990	12/09/1990	13	48	24
1991	⁽³⁾	24/04/1991	27/08/1991	13	48	24
1992	⁽⁴⁾	⁽⁴⁾	⁽⁴⁾	⁽⁴⁾	⁽⁴⁾	⁽⁴⁾
1993	BR 23	22/04/1993	02/09/1993	13	48	24
1994	⁽⁴⁾	⁽⁴⁾	⁽⁴⁾	⁽⁴⁾	⁽⁴⁾	⁽⁴⁾
1995	BR 18	23/04/1995	22/08/1995	13	48	24
1996	Ocepar 16	17/05/1996	20/09/1996	13	48	24
1997	BR 18	20/05/1997	18/09/1997	13	45	26
1998	BR 18	08/05/1998	17/09/1998	14	50	29
1999	BR 18	12/05/1999	08/09/1999	16	56	32
2000	BR 18	23/05/2000	29/09/2000	12,8	45	26
2001	BRS 193	05/05/2001	03/09/2001	16	56	32
2002	BRS 193	23/05/2002	25/09/2002	20	70	40
2003	BRS 208	30/04/2003	15/09/2003	16	56	32
2004	BR 208	11/05/2004	15/09/2004	20	70	40
2005	BRS 208	13/05/2005	08/09/2005	16	56	32
2006	BRS 239	13/05/2006	22/09/2006	14	50	29
2007	BRS 208	21/04/2007	25/08/2007	16	56	32
2008	BRS 208	06/05/2008	08/09/2008	0	40	40
2009	BRS 208	05/05/2009	16/09/2009	20	60	38
2010	BRS 208	06/05/2010	02/09/2010	14	68	41
2011	BRS 208	03/05/2011	14/09/2011	20	70	40
2012	Tangará	25/04/2012	30/08/2012	20	40	70
2013	Pardela	05/05/2013	20/08/2013	0/21	52/52	52/52
2014	Pardela	30/04/2014	15/09/2014	24	84	48
		21/05/2014		45	0	0
2015	Galha azul	27/04/2015	03/08/2015	0	62	62
		20/05/2015		59	0	0
2016	Galha azul	03/05/2016	14/09/2016	24	84	48
2017	BRS sabiá	09/05/2017	14/09/2017	24	84	48
		14/06/2017		27	0	0

⁽¹⁾ As informações referentes às safras de 1982 a 1988 não foram recuperadas. ⁽²⁾ Não foi aplicado fertilizante nitrogenado em cobertura em nenhuma das safras avaliadas. ⁽³⁾ Sem informação. ⁽⁴⁾ Perda total de produção devido à ocorrência de seca.

3.4. Análises do solo

3.4.1. Mineralogia da fração argila

A análise mineralógica da fração argila foi realizada por difratometria de raios-X (DRX). Para preparação das amostras foram pesados 50 g de terra fina seca ao ar (TFSA) em béquer e adicionados peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para remoção da matéria orgânica e hidróxido de sódio ($NaOH$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) para promover a dispersão das partículas. Posteriormente, a fração areia foi separada em peneira de malha 0,5 mm, e as frações argila e silte separadas por sedimentação baseada na lei de Stokes (GEE, G.W.; BAUDER, 1986).

A partir da fração argila procedeu-se a extração dos óxidos de ferro (desferrificação) pelo método ditionio-citrato-bicarbonato de sódio (MEHRA, O.P.; JACKSON, 1960). Após a desferrificação foram realizados tratamentos adicionais que além de servirem para melhorar a expressão dos reflexos de alguns constituintes presentes em pequena proporção, foram necessários para identificação de argilominerais de estrutura 2:1 secundários. Esses tratamentos foram realizados segundo método proposto pela EMBRAPA, (1997): (i) Saturação com magnésio a $25^\circ C$ (diferenciação de minerais 2:1 expansíveis dos não expansíveis); (ii) Saturação com magnésio e solvatação com etilenoglicol (diferenciação de vermiculita e esmectita); (iii) Saturação com potássio e secagem a $25^\circ C$ (diferenciação de clorita e vermiculita ou esmectita com hidróxi-Al entrecamadas (VHE ou EHE) de minerais 2:1 expansíveis); e (iv) Saturação com Potássio e aquecimento, em mufla, a 350 e $550^\circ C$ (diferenciação de clorita de VHE ou EHE).

A concentração de óxidos na fração foi realizada após com adição de $NaOH$ 5 mol L^{-1} para destruição dos minerais silicatados e consequente concentração de óxidos de Fe, segundo método proposto por Norrish e Taylor, (1961).

As lâminas de argila natural e argila deferrificada foram preparadas de forma orientada, pelo método do esfregaço, visando a intensificar as reflexões dos planos cristalinos dos argilominerais. Com o auxílio de uma espátula colocou-se um pouco de amostra em estado pastoso no centro da lâmina e com a ajuda de outra lâmina promoveu-se a orientação da amostra deslizando sempre no mesmo sentido, uma lâmina sobre a outra. Os difratogramas das amostras foram obtidos usando difratômetro Rigaku Miniflex II equipado com tubo de cobre (Cu) com velocidade angular do goniômetro de $0,02^\circ 2\theta \text{ s}^{-1}$ e amplitude de 3 a $90^\circ 2\theta$.

3.4.2. Atributos químicos para fins de avaliação da fertilidade do solo

As coletas de solo foram realizadas no momento do florescimento da soja, no verão, e do trigo, no inverno. Após as coletas, as amostras de solo foram secas ao ar, destorroadas e

peneiradas em peneira de malha de 2 mm. Posteriormente, a TFSA foi acondicionada em recipientes plásticos para realização das análises químicas. As características químicas do solo foram determinadas segundo metodologia proposta por Raij et al. (2001).

O pH foi determinado em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com relação solo solução 1:2,5, o teor de carbono orgânico (CO) foi extraído com dicromato e determinado pelo método colorimétrico. Posteriormente o teor de matéria orgânica (MO) foi estimado com uso da fórmula $\text{MO} = \text{CO} \times 1,724$. O teor de fósforo (P) foi extraído com resina trocadora de íons e determinado pelo método colorimétrico, o teor de enxofre (S) foi extraído com fosfato de cálcio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e determinado por turbidimetria, enquanto os teores dos cátions trocáveis (K, Ca, Mg) foram extraídos com resina trocadora de íons, sendo o K quantificado por fotometria de emissão de chama e Ca e Mg por espectroscopia de absorção atômica, o alumínio trocável (Al) foi extraído com KCl 1 mol L^{-1} e determinado por titulação com hidróxido de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, a acidez potencial (H+Al) foi extraída com acetato de cálcio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7. Os valores de soma de bases (SB), capacidade de troca de cátions (CTC), saturação por bases (V%) e saturação por alumínio (m%) foram então calculados.

3.4.3. Ação dos extratores de fósforo

Para ambas as extrações com as soluções Mehlich 1 (HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1} + \text{H}_2\text{SO}_4$ $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$, pH 1,2) e Mehlich 3 (NH_4F $0,015 \text{ mol L}^{-1} + \text{NH}_4\text{NO}_3$ $0,25 \text{ mol L}^{-1} + \text{CH}_3\text{COOH}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1} + \text{HNO}_3$ $0,013 \text{ mol L}^{-1} + \text{EDTA}$ $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,5), foram pesados 20 g de TFSA em recipientes plásticos, separadamente para cada extração, e adicionados 200 mL da solução extratora e posterior agitação em agitador horizontal por 5 min seguida de decantação por 16 h. Posteriormente uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante foi retirada para determinação de P por colorimetria segundo Tedesco et al. (1995).

Para determinação dos teores pseudototais de P foi pesado 0,5 g de TFSA que foi transferido para tubos de teflon e adicionados 3 mL de ácido clorídrico (30% de pureza) e 9 mL de ácido nítrico (65% de pureza). Após 1 h em repouso, os tubos foram tampados e levados para o forno micro-ondas, modelo MARSXpress (CEM Corporation). A sequência de aquecimento correspondeu ao aquecimento a 175°C em 5 min a 90% da potência, seguido de mais um ciclo de 5 min a temperatura a 175°C . Após o fim dos períodos de aquecimento, os tubos permaneceram dentro do forno micro-ondas por 15 min para resfriamento parcial quando então foram transferidos para capela de exaustão, onde permaneceram em repouso durante 15 min para atingirem temperatura ambiente. Posteriormente, os extratos foram filtrados em papel filtro quantitativo, faixa azul, e foram transferidos para balões volumétricos do 100 mL, e o volume foi

completado com água ultrapura. A determinação dos teores elementares foi realizada utilizando espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), modelo, Thermo Scientific iCAP 6300 Duo.

3.4.4. Especiação iônica de fósforo da solução do solo

A solução do solo foi obtida utilizando-se o método do extrato aquoso (WOLT, 1994). Para cada extrato foi utilizada relação solo: água 1:1, adicionando-se 20 g de terra e 20 mL de água ultrapurificada em tubos de centrífuga de 50 mL, que foram agitados inicialmente por 15 min em mesa agitadora horizontal a 150 rpm, permanecendo posteriormente em repouso por 1h. Em seguida, a solução foi agitada novamente por mais 5 min e centrifugada por 30 min a 1844 x g.

Foram realizadas três extrações separadamente, para obtenção dos extratos e posterior determinação dos teores dos ânions, cátions e carbono orgânico dissolvido (COD). As soluções extraídas para determinação dos teores de ânions e cátions foram filtradas em membrana de celulose de 0.45 µm (Milipore) e em seguida foram congeladas até a determinação. A solução para determinação de carbono orgânico dissolvido foi filtrada em filtro de microfibra de vidro GF/F de 0,7 µm, previamente calcinado a 500 °C por 6 h. Posteriormente, o extrato foi acondicionado em frasco de vidro com adição de 0,1 mL de solução de HgCl₂ 30 mmol L⁻¹ para evitar proliferação de microrganismos e foi mantido sob refrigeração até determinação. Todas as filtrações foram realizadas com o auxílio de seringas plásticas de 60 mL a pressão manual.

Nos extratos filtrados foram determinados o pH por potenciometria e a condutividade elétrica (CE) por eletrometria. Os teores de cátions foram determinados por ICP-OES, os teores de ânions por cromatografia iônica e o carbono orgânico dissolvido foi determinado por analisador de carbono orgânico total (TOC-L SHIMADZU).

Após a determinação quantitativa dos teores totais de cátions, ânions e COD nos extratos a estimativa da especiação iônica da solução do solo foi determinada por meio do programa computacional Visual MINTEQ (GUSTAFSSON, 2019), que se baseia em constantes de equilíbrio das reações e no princípio de ação de massas para obtenção das atividades de metais, ligantes e complexos metal-ligantes. A simulação da complexação entre as espécies químicas com os compostos orgânicos foi baseada no modelo SHM (Stockholm Humic Model). O percentual de distribuição e a concentração das espécies de fósforo em equilíbrio na solução do solo foram estimados com base nos valores das constantes de formação e estabilidade do banco de dados do Visual MINTEQ.

3.4.5. Especificação de fósforo da fase sólida por XAS/XANES

A especificação de fósforo da fase sólida do solo foi realizada por meio de espectroscopia de absorção de raios X (XAS), por meio da análise XANES na borda K do fósforo, que foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) – Campinas/SP na linha de luz de espectroscopia de raios X moles (SXS).

Amostras de solos das quatro repetições de cada tratamento formam moídas em almofariz, passadas em peneira de malha 149 μm , misturadas e homogeneizadas para formar uma amostra composta. No total foram 12 amostras compostas: rizosfera soja SPD, linha soja SPD, entrelinha soja SPD, rizosfera soja SPC, linha soja SPC, entrelinha soja SPC, rizosfera trigo SPD, linha trigo SPD, entrelinha trigo SPD, rizosfera trigo SPC, linha trigo SPC, entrelinha trigo SPC.

As amostras foram colocadas no porta-amostras sob fita de dupla face de carbono, de aproximadamente 2 cm, formando um filme fino e posteriormente levadas para a câmara de vácuo. Os espectros XANES foram coletados sob vácuo usando um monocromador Si (111) calibrado com Bayovar ($E_0 = 4151,7 \text{ eV}$), obtidos no modo fluorescência cujo detector de fluorescência é do tipo fotodiodo de silício, modelo SuperFast SDD (AMPTEK), com resolução de energia de 125 a 155 eV. Foram obtidos cinco espectros/varreduras por amostra e três espectros/varreduras por composto padrão, com variação de energia entre 2120 a 2220 eV (Tabela 6).

Tabela 6. Faixas de energia, intervalos e tempo de aquisição dos espectros XANES

Ei (eV)	Ef (eV)	Step	Tempo de aquisição (s)
2120	2145	1	2
2145,2	2180	0,2	2
2180,5	2220	0,5	2

Ei = energia inicial; Ef = energia final

Os seguintes compostos foram utilizados como padrões para análise de combinação linear (LCF – linear combination fitting): hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$); monetita (CaHPO_4); Bruchite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$); fosfato tribásico ($\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$); fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8(\text{H}_2\text{PO}_4)6.5\text{H}_2\text{O}$); fosfato de Ca amorfo; fosfato de magnésio ($\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)2.2\text{H}_2\text{O}$); strengita ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); fosfato adsorvido a óxido de Fe (goethita e hematita); fosfato adsorvido a ferrihidrita; fosfato adsorvido a hidróxido de Al (Gibbsita); fosfato

adsorvido a Al-óxido e caulinita não cristalinos; ácido fítico, fosfato adsorvido a fitato, fosfato adsorvido DNA, PO_4 lecitina, fosfato monopotássico (KH_2PO_4); fosfato dipotássico (K_2HPO_4).

Inicialmente, os espectros dos compostos padrões e análogos minerais foram selecionados com base nas características espectrais após análise visual dos espectros P-XANES, abordagem denominada fingerprint, na qual os padrões foram selecionados por terem espectros mais semelhantes aos espectros das amostras

A segunda abordagem foi realizada segundo metodologia descrita por (MANCEAU; MARCUS; GRANGEON, 2012) que consistiu da combinação linear de cada amostra com todos padrões procedendo-se a eliminação sequencial do padrão cujo fator de ponderação foi mais baixo (geralmente o mais negativo), considerando nenhum deslocamento de energia e menores resíduos, até chegar a um conjunto final de dois a quatro padrões com fatores de ponderação maior que 0,1 (10%). O resultado dessas abordagens foi a seleção dos seguintes padrões: fosfato adsorvido a óxido de Fe (goethita e hematita); fosfato adsorvido a hidróxido de Al (Gibbsita); fosfato adsorvido a Al-óxido não cristalinos e ácido fítico. Estes padrões foram então utilizados no ajuste final e os respectivos fatores de ponderação foram renormalizados para soma de 1. O processamento de dados e o ajuste de combinação linear foram realizados com auxílio do programa computacional Athena.

3.4.6. Caracterização de fósforo orgânico por ressonância nuclear magnética – ^{31}P PRNM

A especiação de fósforo orgânico foi realizada por meio de ressonância nuclear magnética (^{31}P -RNM), que foi realizada na Embrapa Instrumentação – São Carlos/SP. Para as análises foram utilizadas quatro repetições de cada tratamento que formaram moídas em almofariz, passadas em peneira de 149 μm , misturadas e homogeneizadas para formar uma amostra composta, totalizando as mesmas 12 amostras compostas do item 2.4.5. As análises de espectroscopia de ressonância nuclear magnética (^{31}P -RNM) foi realizada após extração com NaOH-EDTA segundo adaptação método proposto por (CADE-MENUN; PRESTON, 1996) e Turner (2008). Amostras de 2 g de TFSA foram pesadas e colocadas em tubos falcon de 50 mL, adicionados 20 mL de solução NaOH 0,25 mol L^{-1} e EDTA 0,05 mol L^{-1} e permaneceram sob agitação em agitador “end-over-end” por 16 horas. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 6000 rpm durante 15 min e em seguida filtrados em papel filtro faixa azul.

Após filtração, os extratos foram congelados em freezer a -80°C durante dois dias e posteriormente foram liofilizados. Os extratos liofilizados foram homogeneizados com o auxílio de uma espátula e foram pesados 250 mg que foram acondicionados em tudo Eppendorf que

foram ressuspensos com 1 mL de água deuterada (D_2O). Após a ressuspensão com água deuterada foram adicionadas gotas de NaOH 10 mol L^{-1} até pH 11, centrifugados por 2 min. Posteriormente, os extratos foram transferidos para capilares de RMN de 10 mm de diâmetro e a determinação dos espectros foram realizados logo após o preparo das amostras (Figura 5).

Os espectros de ^{31}P -NMR foram obtidos em espectrômetro Avance III HD 600MHz/ Bruker que opera com frequência de 242,86 MHz equipado com uma sonda de 5 mm. Usou-se pulso com ângulo de 30° , tempo de aquisição de 0,34 milissegundos e tempo de relaxação de 3 s totalizando 8192 varreduras. Os deslocamentos químicos foram obtidos relativamente ao ortofosfato e foram interpretados qualitativamente, sendo agrupas em classes de compostos de P, isto é, ortofosfato, ortofosfato monoéster, ortofosfato diéster e pirofosfato, conforme Cade-Menun (2005).

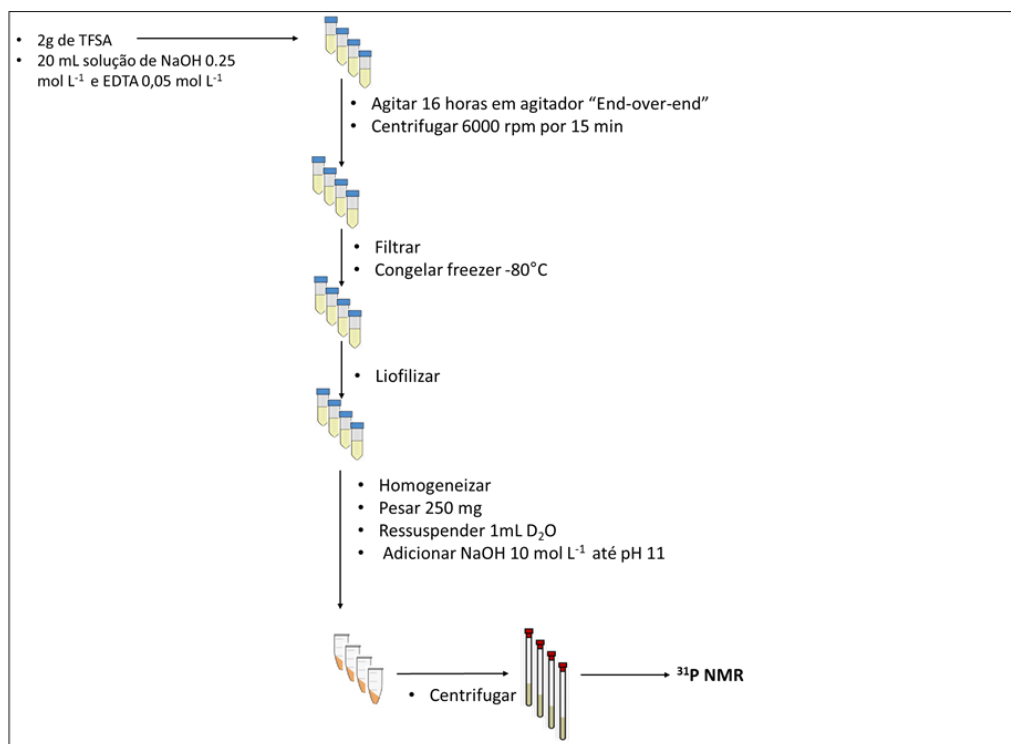


Figura 4. Esquema do método de preparo de amostras para análise ^{31}P NMR adaptado de Cade-Menun e Preston (1996) e Turner (2008).

3.4.7. Fracionamento químico de fósforo

O fracionamento químico de fósforo foi realizado segundo método proposto por Hedley et al. (1982) modificado por Condrón et al. (1985). Esse método consiste em extrações

sucessivas de fósforo, a partir de 0,5 g de solo, cujas soluções extratoras possuem força crescente de extração e atuam na extração das formas de fósforo presentes no solo (Tabela 7).

Tabela 7. Etapas de extração do fracionamento químico de fósforo proposto por Hedley et. al (1982), adaptado por Condron et al. (1985).

Extrações	Extrator/Solução extratora	Formas de P extraídas
1ª Extração	Resina trocadora de ânions (RTA)	Pi lábil
2ª Extração	Solução de bicarbonato sódio (NaHCO ₃) 0,5 mol L ⁻¹ a pH 8,5	Pi e Po lábeis
	Digestão persulfato de amônio (7,5%) e H ₂ SO ₄ (50%)	Ptotal
3ª Extração	Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L ⁻¹	Pi e Po mod. lábeis
	Digestão persulfato de amônio (7,5%) e H ₂ SO ₄ (50%)	Ptotal
4ª Extração	Solução de ácido clorídrico (HCl) 1 mol L ⁻¹	Pi mod. lábil
5ª Extração	Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 mol L ⁻¹	Pi e Po não lábeis
	Digestão persulfato de amônio (7,5%) e H ₂ SO ₄ (50%)	Ptotal
Digestão final	Solução com ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) e per. de hidrog.(H ₂ O ₂)	Pi não lábil

A determinação dos teores de fósforo nos extratos ácidos foi realizada segundo método proposto por Murphy; Riley (1962) e nos extratos alcalinos segundo Dick; Tabatabai (1977). As determinações dos teores de P total nos extratos alcalinos foram realizadas por digestão com persulfato de amônio e ácido sulfúrico em autoclave (USEPA, 1971). As frações orgânicas de P foram calculadas pela diferença entre o teor de P total e o teor de P inorgânico.

As frações de P foram agrupadas em função da labilidade de P: (i) frações lábeis (PiRTA, PiBIC, PoBIC), (ii) moderadamente lábeis (PiHID0,1, PoHID0,1 e PiHCl) e (iii) não lábeis (PiHID0,5, PoHID0,5 e Presidual) segundo Arruda Coelho et al., 2019; Rodrigues et al., 2016; Shi et al., 2015). Esta divisão das formas de P em função da labilidade é uma ferramenta didática para esclarecer se existem compartimentos de P no solo com maior ou menor capacidade de suprimento à solução do solo (GATIBONI et al., 2013).

3.5. Análises microbiológicas

3.5.1. Carbono da biomassa microbiana (CBM)

Os teores de carbono na biomassa microbiana (CBM) do solo foram obtidos pelo método de extração-fumigação (Vance et al., 1987). Cada amostra foi dividida em seis subamostras: três foram fumigadas seguidas de extração e três não fumigadas seguidas de

pesagem e posterior extração. Os valores de CBM foram corrigidos, tendo como base o solo seco a 105°C.

Foram utilizados 20 g de terra acondicionados em frascos de 100 mL que foram transferidos para um dessecador, juntamente com um frasco com água e outro contendo 10 mL de clorofórmio (CHCl_3) isento de etanol, mantidos sob fumigação em sala de incubação no escuro e temperatura controlada de 28°C por 24h. Após este período o clorofórmio foi removido por aspirações sucessivas. Posteriormente, foram acrescentados 50 mL de K_2SO_4 0,5 mol L^{-1} com pH ajustado na faixa de 6,5 a 6,8, procedendo-se a extração em agitador com movimento circular horizontal a 220 rpm por 30 min. Após a extração foi realizada decantação por 30 min e filtração em filtro de papel.

As determinações dos teores de C nos extratos fumigados e não fumigados foram realizados por dicromatometria. Foram retiradas alíquotas de 8 mL do extrato, e adicionados 2 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,066 mol L^{-1} , 10 mL de H_2SO_4 concentrado e 5 mL de H_3PO_4 concentrado. Posteriormente, a mistura foi aquecida por 5 min, seguida de resfriamento. Após o resfriamento, foram adicionados 80 mL de água destilada e três gotas de difenilamina (10 g L^{-1} em ácido sulfúrico concentrado). O dicromato em excesso foi titulado com sulfato ferroso amoniacal ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,033 mol L^{-1} . O teor de C extraído do solo foi calculado conforme a equação 1.

$$C \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = (V_b - V_a) \cdot N \cdot 0,00350 \cdot (8 \cdot P_s) - 1.106 \quad \text{Eq.1}$$

Sendo C = carbono extraído do solo; V_b (mL) = volume do sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da solução controle (branco); V_a (mL) = volume gasto na titulação da amostra; N = normalidade exata do $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; P_s (g) = massa de solo seco.

A biomassa de carbono microbiano do solo foi calculada conforme a equação 2.

$$\text{BMS (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{FC} \cdot \text{kc}^{-1} \quad \text{Eq. 2}$$

Sendo: BMS = biomassa de carbono microbiano do solo (mg kg^{-1} ou $\mu\text{g g}^{-1}$); FC = fluxo obtido da diferença entre a quantidade de C (mg kg^{-1}) recuperada no extrato da amostra fumigada e a recuperada na amostra não fumigada; kc^{-1} = fator de correção.

O fator de correção (kc^{-1}) para os solos do Brasil ainda não foi determinado, assim foi utilizado o valor 0,33 preconizado por Sparling e West (1988), a fim de expressar a fração do C da BMS recuperada após o processo de fumigação-extração.

3.5.2. Atividade de fosfatases

Foram avaliadas as atividades das enzimas fosfatase ácida e alcalina segundo método proposto por Tabatabai (1994), que se baseia na determinação colorimétrica do p-nitrofenol que é liberado pelas fosfatases encontradas no solo incubado com uma solução tamponada de p-nitrofenol fosfato.

As amostras de TFSA foram peneiradas em peneira de malha 4 mm. Pedacos de raiz, tecido de plantas e outros materiais orgânicos que pudessem interferir na determinação das análises foram retirados com auxílio de pinça. Posteriormente, 1 g de TFSA de cada amostra, em triplicata, foram acondicionados em Erlenmeyer de 50 mL com adição de 0,2 mL de tolueno, 4 mL de solução tampão MUB pH 6,5 no método da fosfatase ácida e MUB pH 11 no método da fosfatase alcalina, 1 mL de p-nitrofenol fosfato (PNF), exceto no tratamento controle. Após a adição dos reagentes iniciais, os frascos foram fechados com rolha de borracha, agitados e incubados por 1 h em banho-maria a 37°C. Após o período de incubação, foram adicionados 1 mL de CaCl_2 0,5 mol L⁻¹ e 4 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ em todas as amostras. No tratamento controle foi adicionado 1 mL de PNF após a incubação. Na última etapa do procedimento, os extratos foram agitados e filtrados em papel de filtro Whatman n° 2. A atividade das enzimas foi determinada pelo método colorimétrico em espectrofotômetro a 410 nm de absorbância. As concentrações foram obtidas a partir de uma curva padrão com os níveis de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg p-nitrofenol sendo os resultados expressos em µg p-nitrofenol/g solo seco/h.

3.5.3. Quantificação de bactérias e fungos por PCR em tempo real – qPCR

Inicialmente, as amostras de solo foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial PowerSoil DNA Isolation (MoBio laboratories, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados das extrações de DNA foram avaliados com o auxílio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA), onde foram aplicados 5 µl do extrato do DNA extraído que foi corado com solução brometo de etídeo.

Após extração do DNA das amostras de solo, a quantificação do número de cópias dos genes de interesse, por grama de solo, foi realizada por meio da metodologia de qPCR. As reações foram realizadas no equipamento iQ5 (BioRad), utilizando o sistema SYBR GreenI. Todas as reações foram realizadas em volume de 25 µl contendo 12,5 µl do kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Brasil), e os primers na concentração de 100 nM.

Para a quantificação de bactérias foram utilizados os primers P1 (5' - CCTACGGGAGGCAGCAG - 3') e P2/Eub518R (5' - ATTACCGCGGCTGCTGG - 3') (EIEN et. al., 2008; FIERER et. al., 2005; RASCHE et al., 2010), enquanto que para fungos foram usados os primers ITS1f (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e 5.8s (5'-CGCTGCGTTCTTCATCG - 3') (FIERER et. al. 2005).

As amplificações para bactérias foram realizadas com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguido de 40 ciclos de amplificação em dois passos; 95 °C por 30 s e 55 °C por 35 s, sendo realizada posteriormente uma extensão final de 72°C por 45 s (RASCHE et al., 2010). Para fungos, as amplificações foram efetuadas com um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 15 min., seguido de 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 53 °C de temperatura de anelamento por 30s e 72 °C por 1 min (FIERER et al., 2005).

Para a quantificação do número de cópias dos genes de interesse, curvas padrões foram obtidas, realizando amplificações com o número de cópias conhecidos do DNA molde adicionado nas reações. Desta maneira, os dados da amplificação do DNA extraído das amostras de solo, foram interpolados na curva padrão para determinar o número de cópias do gene de interesse.

3.5.4. Determinação da estrutura de comunidades de bactérias e fungos por T-RFLP

Para o estudo das comunidades de bactérias e fungos a metodologia utilizada foi o T-RFLP, no qual o DNA das amostras foi submetido à amplificação com os primers específicos de regiões ribossomais (16S DNAr ou ITS1), sendo feitas análises independentes para os grupos de bactérias e fungos. Os primers utilizados e a região alvo de amplificação estão de acordo Culman et. al., 2008 (bactérias) e Avis et. al., 2006 (fungos). As reações de amplificação foram realizadas misturando-se 1 µl do DNA, 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 20 pmol de cada primer, PCR buffer 1X e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase e o volume foi completado para 50 µl com água ultrapura autoclavada. As condições do termociclador foram realizadas segundo Gardes; Bruns (1993): 94°C por 1 min e 30 seg; 13 ciclos de 94°C por 35 seg; 44°C por 2 min; 72°C por 45 seg e 72°C por 10min.

As reações de PCR foram realizadas de acordo com as metodologias descritas na literatura, em triplicatas para cada reação para minimizar os efeitos de variação de PCR (Feinstein et al., 2009). Após 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 em aproximadamente 200 ng de produto de amplificação com 20 unidades de enzima, de acordo com as instruções dos fabricantes (CARSON et al., 2010;

ANGEL et. al., 2010). Para se obterem réplicas do equipamento, cada amostra foi lida duas vezes em sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems) utilizando a matriz azul e o marcador de tamanho de fragmentos 660 pb. A leitura dos eletroferogramas foram efetuadas no programa GeneMapper® 4.1 e os parâmetros considerados foram: alelos, altura, tamanho e área dos picos que deram origem a matriz de dados do T-RFLP.

3.6. Análises estatísticas

Para os resultados de solo e tecido vegetal foi realizada estatística univariada para verificar as pressuposições da análise de variância (ANOVA) seguindo o delineamento fatorial, com uso do teste de comparações múltiplas de médias por Tukey ($p < 0,05$). Foram realizadas análises de correlação simples entre variáveis.

Para os resultados microbiológicos foi realizada análise de redundância canônica (RDA) com testes de permutação de Monte Carlo ($p < 0,05$) para correlacionar as variáveis biológicas (qPCR bactéria, qPCR fungo, fosfatases ácida e alcalina e CBM) com as variáveis ambientais (pH, P, S, K, Ca, Mg, Al, H+Al, SB, CTC, V%, m%, COD e COT) e as relações de causa-efeito entre elas utilizando software Canoco v.4.5 (BRAACK; SMILAUER, 1998). As variáveis ambientais (variáveis explicativas) foram analisadas quanto à multicolinearidade, sendo selecionadas apenas variáveis com valores de inflação menores que 20. Posteriormente, foi feita a seleção das variáveis significativas ($p \leq 0,05$) quanto a explicação da distribuição dos dados (forward selection).

A matriz de similaridade de Bray-Curtis relativa aos dados de presença e ausência das espécies de bactéria e fungo (T-RFLP) foi submetida à análise de similaridade (ANOSIM) e a teste não-paramétrico de escalonamento multimensional (NMDS), para determinar a diferença estatística entre os sistemas de manejo do solo, utilizando o Programa Primer 5.

Análises de dbRDA foram realizadas para correlacionar as variáveis ambientais com os resultados de abundância de espécies microbiológicas (T-RFLP) com uso da matriz de Bray-Curtis com objetivo de identificar quais variáveis ambientais interferiram na estrutura da comunidade microbiana nos solos sob SPD e sob SPC. As variáveis ambientais (variáveis explicativas) foram analisadas quanto à multicolinearidade, sendo selecionadas apenas variáveis com valores de inflação menores que 20. Posteriormente, foi feita seleção das variáveis significativas ($p \leq 0,05$) quanto a explicação da distribuição dos resultados (forward selection).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises do solo

4.1.1. Mineralogia da fração argila

Constatou-se predomínio dos minerais caulinita cujos reflexos foram observados em 0,731, 0,445, 0,362 e 0,237 nm e hematita cujos reflexos foram observados em 0,271, 0,252, 0,221, 0,184, 0,169 e 0,160 nm. Esses são minerais esperados em solos de elevado grau de intemperismo. Foi observada também a presença de gibbsita (reflexo em 0,489 nm) e maghemita (reflexo em 0,295 nm) e traços da presença de minerais 2:1 de vermiculita ou esmectita com hidróxi entrecamadas (2:1 HE – reflexo a 1,4 nm) (Figuras 5 e 6).

O município de Londrina, onde está localizada a área experimental deste estudo, está localizado na porção sudeste da Bacia Sedimentar do Paraná, sobre as rochas da Formação Serra Geral, constituída por extensos derrames de rochas ígneas, com predomínio de rochas basálticas datadas do período Cretáceo-142 milhões de anos (MINERUPAR, 2001), rochas cujo material mineral deu origem ao Latossolo Vermelho distroférico deste trabalho.

A mineralogia da fração argila dos Latossolos é composta basicamente de caulinita, óxidos e hidróxidos de ferro (hematita e goethita) e de alumínio (gibbsita), devido a processos como a dessilicação e ferralitização (Van Breemen; Buurman, 1998) que são favorecidos em ambientes tropicais úmidos. Alguns desses óxidos podem ter dominância no pedossistema, conforme a composição mineral dominante no material de origem e os mecanismos de pedogênese (FERREIRA et al., 2003). Alguns Latossolos, formados de rochas básicas e ricas em Fe, apresentam também, na fração argila, a maghemita (GOMES et al., 2004), como observado neste estudo.

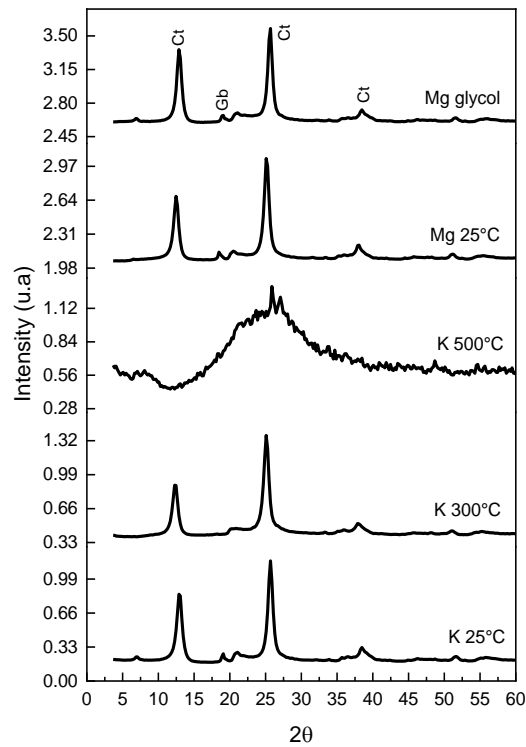


Figura 5. Difratomogramas de raios-X de amostras deferrificadas da fração argila, saturadas com potássio (K) e magnésio (Mg). Ct - Caulinita; Gb – Gibbsita.

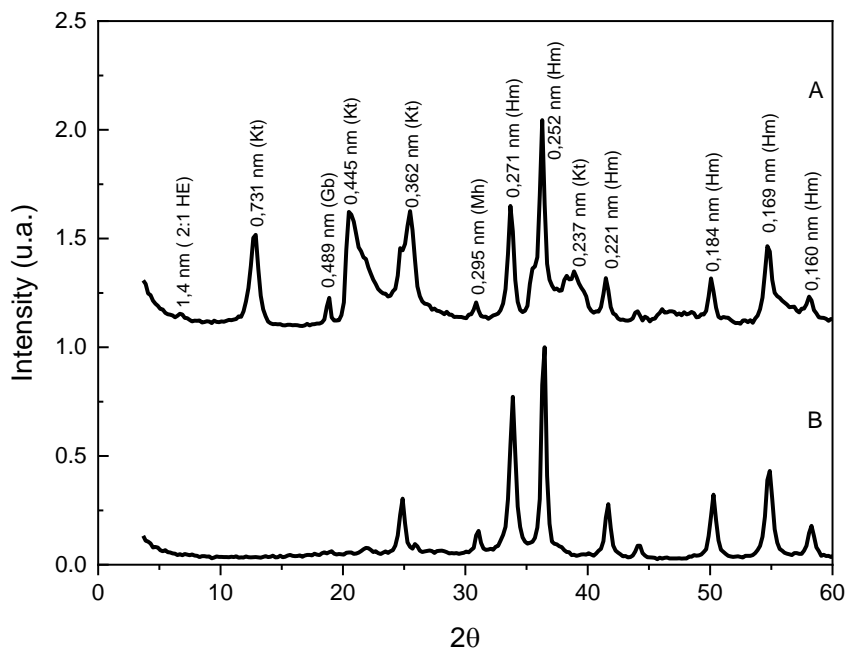


Figura 6. Difratomogramas de raios-x de amostras de solo da fração argila natural (A) e concentrada em Fe (B). HE -Mineral 2:1 hidróxi entrecamada; Kt - Caulinita; Gb - Gibbsita; Mh - Maghemita; Hm - Hematita.

Nos difratogramas que receberam tratamento com potássio e magnésio observaram-se picos intensos de caulinita em 0,731, 0,445, 0,362 e 0,237 nm, os quais foram eliminados quando houve aquecimento a 500°C. No difratograma da fração argila concentrada em óxidos observou-se predomínio de picos de hematita com reflexos em 0,271, 0,252, 0,221, 0,184, 0,169 e 0,160 nm e caulinita com reflexos em 0,362 nm (Figura 7b). A formação da hematita é favorecida pela ocorrência de altas temperaturas, enquanto a goethita é formada em condições de baixo pH, alta umidade e altas concentrações de carbono (GHIDIN et al., 2006).

Os óxidos de Fe pedogênicos foram extraídos pelo método do ditionitocitrato-bicarbonato de sódio (DCB) cujo resultado foi de 79 g kg⁻¹. O Fe e o Al constituintes dos óxidos pedogênicos de baixa cristalinidade foram extraídos pelo oxalato de amônio cujo resultado foi de 5,5 g kg⁻¹ e o Fe e Al complexados pelo húmus do solo foram extraídos pelo pirofosfato de sódio alcalino cujo resultado foi de 0,4 g kg⁻¹.

4.1.2. Atributos químicos para fins de avaliação da fertilidade do solo

Os atributos químicos que tiveram interação entre as posições de amostragem e os sistemas de manejo, para ambas as culturas foram: pH CaCl₂, matéria orgânica (M.O), carbono orgânico total (COT), cálcio (Ca), magnésio (Mg), soma de bases (SB), capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação por bases (V%) (Tabela 9).

Em geral, amostras coletadas sob SPD tiveram leve aumento do pH CaCl₂ em relação ao SPC para as três posições de amostragem de solo cultivado com soja, sendo os teores semelhantes na rizosfera e linha de semeadura e ambas diferentes da entrelinha. Para as amostras de solo cultivado com trigo, os valores de pH CaCl₂ da rizosfera e linha foram iguais para os dois sistemas de preparo do solo. Há casos em que alterações de apenas 0,1 unidade de pH ou a diminuição de 10% na saturação de Al são significativas, mas podem não ter nenhuma relevância agrônômica (TIECHER et al., 2017). Entretanto, a maior variabilidade dos índices de fertilidade do solo sob SPD, em relação ao SPC, é consequência, principalmente, do não revolvimento do solo e das aplicações localizadas de corretivos e fertilizantes (Schlindwein; Anghinoni, 2000; Anghinoni; Salet, 1998; Kray et al. 1998; Salet et al. 1996), o que pode ter ocorrido na área experimental deste trabalho, uma vez que os sistemas de manejo do solo estão consolidados no longo prazo (36 anos).

O aumento do pH das amostras de solo sob SPD é principalmente atribuído à aplicação superficial de calcário. Schlindwein e Anghinoni (2000) quantificaram a variabilidade horizontal de alguns índices de fertilidade do solo no SPD, com diferentes modos de adubação e tempos de cultivos em oito lavouras comerciais do Rio Grande do Sul e concluíram que os teores de P e K

apresentaram maior variabilidade, o de MO, variabilidade intermediária, e os valores de $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ e pH_{SMP} , menor variabilidade. Schlindwein e Anghinoni (2000) afirmaram que a distribuição superficial uniforme de calcário e da palhada das culturas no sistema plantio direto leva à baixa variabilidade horizontal nos atributos de acidez do solo e nos teores de matéria orgânica.

Tiecher et al. (2017) avaliaram a fertilidade do solo em função de sistemas de preparo do solo e culturas de cobertura sob Latossolo subtropical do sul do Brasil e concluíram que o SPD consolidado há 23 anos resultou em maior grau de fertilidade do solo superficial em comparação com o SPC, com algumas limitações de disponibilidade de nutrientes e acidez do solo abaixo de 10 cm de profundidade. Tiecher et al. (2017) afirmaram que o SPD no longo prazo cria um forte gradiente de disponibilidade de nutrientes, com a concentração de nutrientes nas camadas superficiais do solo que diminuem abruptamente com a profundidade do solo, diferentemente do sistema de preparo convencional.

Os arados utilizados no SPC promoveram a inversão da leira, e os resíduos culturais foram homogeneizados e misturados ao solo da camada arável. Assim, o menor valor de pH observado nas amostras sob SPC pode ser atribuído, em parte, à maior mineralização dos resíduos orgânicos e pela lixiviação de nutrientes da camada arável, juntamente com a erosão, propiciada pela água das chuvas (SIDIRAS; VIEIRA, 1984).

Os teores de MO e COT apresentaram valores superiores no SPD em relação ao SPC nas amostras de solo cultivados com soja e trigo. No SPD os teores de MO e COT foram semelhantes na rizosfera e linha de semeadura e ambos foram diferentes da entrelinha. Já no SPC observaram-se valores iguais entre as posições de amostragem (Tabela 8). Observamos também o efeito a longo prazo da sucessão soja/trigo nos teores de MO do solo e COT superior no SPD em relação ao SPC.

Tabela 8. Atributos químicos de um Latossolo Vermelho distroférico cultivado em sucessão de soja e trigo em sistema de preparo convencional (SPC) e sistema de plantio direto (SPD) de longo prazo.

Manejo	Posição			Posição			
	Rizosfera	Linha	Entrelinha	Rizosfera	Linha	Entrelinha	
		soja				trigo	
				pH CaCl ₂ 01 M			
SPD	5.6 Aa	5.7 Aa	4.7 Bb	5.6 Aa	5.7 Aa	4.8 Bb	
SPC	5.3 Ba	5.0 Ba	5.2 Aa	5.8 Aa	5.3 Aa	5.3 Aa	
				M.O g m ⁻³			
SPD	57 Aa	52 Ab	29 Ac	39 Aa	44 Aa	28 Ab	
SPC	29 Ba	25 Ba	27 Aa	20 Ba	25 Ba	25 Aa	
				COT g kg ⁻¹			
SPD	37 Aa	34 Aa	18 Ab	26 Aa	27 Aa	16 Ab	
SPC	18 Ba	17 Ba	16 Aa	16 Ba	15 Ba	15 Aa	
				P mg.dm ⁻³			
SPD	336	293	73	311	130	84	
SPC	235	245	72	291	80	65	
				S mg.dm ⁻³			
SPD	15	6	17	9 Ab	8 Ab	19 Aa	
SPC	10	7	16	8 Aa	8 Aa	9 Ba	
				K mmolc.dm ⁻³			
SPD	5	4	5	6	6	5	
SPC	6	5	6	7	6	5	
				Ca mmolc.dm ⁻³			
SPD	60 Aab	86 Aa	27 Ac	50 Aa	41 Aa	24 Ab	
SPC	36 Aa	31 Ba	33 Aa	28 Ba	23 Ba	29 Aa	
				Mg mmolc.dm ⁻³			
SPD	33 Ab	57 Aa	11 Ac	39 Aa	29 Aa	12 Ab	
SPC	16 Ba	14 Ba	15 Aa	17 Ba	14 Ba	17 Aa	
				Al mmolc.dm ⁻³			
SPD	1	0	3	0 Ab	0 Ab	1 Aa	
SPC	0	0	0	1 Aa	0 Aa	0 Ba	
				H+Al mmolc.dm ⁻³			
SPD	24	25	28	24 Aa	22 Aa	24 Aa	
SPC	23	22	22	25 Aa	19 Bb	18 Bb	
				SB mmolc.dm ⁻³			
SPD	98 Aa	146 Aa	43 Ab	95 Aa	75 Aa	41 Ab	
SPC	59 Aa	49 Ba	53 Aa	53 Ba	43 Ba	50 Aa	
				CTC mmolc.dm ⁻³			
SPD	122 Aab	171 Aa	71 Ac	120 Aa	96 Ab	65 Ac	
SPC	82 Aa	70 Ba	75 Aa	78 Ba	62 Ba	68 Aa	
				V %			
SPD	80 Aa	84 Aa	59 Bb	79 Aa	77 Aa	62 Bb	
SPC	72 Aa	70 Ba	71 Aa	68 Ba	69 Ba	74 Aa	
				m %			
SPD	1	0	8	0 Ab	0 Ab	3 Aa	
SPC	1	0	1	2 Aa	0 Aa	0 Ba	

Letras maiúsculas comparam sistemas de cultivo, e letras minúsculas comparam posições de amostragem. (Tukey, p<0.05).

Os sistemas convencionais de cultivo que utilizam aração e gradagens possuem alto poder de degradação do solo, resultando a redução dos teores de MO do solo. Essas perdas são favorecidas, principalmente, pelo revolvimento do solo e consequente destruição dos agregados, maior fragmentação e incorporação dos resíduos vegetais e diminuição da cobertura do solo que resultam em alterações na temperatura, umidade e aeração do solo que contribuem para aceleração da mineralização da MO do solo.

O teor de carbono orgânico do solo é aumentado como consequência de sistemas de manejo conservacionistas e rotação de culturas (BAYER et al., 2000; SCHLINDWEIN; ANGHINONI, 2000; TIEMANN et al., 2015; SONG et al., 2016). Porém, ocorre atualmente uma discussão sobre o impacto dos sistemas conservacionistas de longo prazo no teor de carbono orgânico do solo (BLANCHET et al., 2016; SONG et al., 2016; BÜCHI et al., 2017), pois as mudanças nas propriedades do solo ao longo do tempo são lentas (MALTAS et al., 2018).

Em nosso estudo foi realizada estimativa dos teores médios de carbono orgânico do solo ao longo do tempo e observou-se após 36 anos aumento de 12,5% do carbono orgânico do solo em relação ao teor de carbono orgânico do início da instalação do experimento e aumento de 12,5% em relação ao SPC (Tabela 9). Estes resultados corroboram o recente estudo de De Cárcer et al. (2019) sobre o efeito de 50 anos na sucessão de culturas, preparo do solo e clima na produção de trigo e nas propriedades do solo. De Cárcer et al. (2019) concluíram que o conteúdo de carbono orgânico em todos os tratamentos diminuiu ao longo do tempo e que durante 50 anos o teor de carbono orgânico foi em média 7% maior no SPD comparado ao SPC. Por outro lado, não houve efeito da sucessão das culturas (*Triticum aestivum* L. - *Brassica napus* L.- *Triticum aestivum* L. - *Zea mays* L.) e nem interação entre o preparo do solo e a sucessão das culturas.

No SPD, a deposição superficial de resíduos vegetais e a não incorporação desses resíduos ao solo contribuem para a diminuição das perdas de MO por erosão e mineralização microbológica (BAYER et al., 2000). Ao mesmo tempo em que as perdas diminuem, a adição contínua de resíduos vegetais à superfície do solo propicia aumentos nos teores de CO e de nutrientes. Dentre as diversas características desejáveis para seleção das plantas de cobertura do solo destacam-se a produção de fitomassa e a quantidade de nitrogênio (N) acumulado, seja pela fixação de N₂ atmosférico, seja pela reciclagem de N no sistema. Essas características, juntamente com a relação C/N, permitem avaliar a capacidade de cada espécie para manter boa cobertura vegetal sobre o solo e acumular N na palhada (OLIVEIRA; NOVAIS; ALVAREZ, 2002).

Tabela 9. Estimativa dos teores médios de carbono orgânico do solo de um Latossolo Vermelho distroférico sob sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC) de longa duração.

Manejo	10 anos ¹	13 anos ¹	23 anos ¹	36 anos ²
	g kg ⁻¹			
SPD	16	17	18	18
SPC	15	14	18	16

¹ Média das amostragens das camadas 0-8 cm, 8-16 cm e 16-24 cm (n=3) após a colheita da soja e antes das operações de preparo do solo que antecedem a semeadura do trigo segundo Debiasi et al., (2013). ² Médias das amostragens da entrelinha de semeadura (n=3) no período de florescimento da soja realizadas por meio de tradagens da camada arável.

As principais espécies vegetais utilizadas para cobertura do solo no SPD são gramíneas e leguminosas. A rotação e/ou sucessão promovem o usos de culturas que produzem menores quantidades de palha, com relação C/N mais baixa e decomposição mais rápida, como os resíduos da soja, por exemplo, alternados com outras espécies que produzem maior quantidade de palhada, com relação C/M mais elevadas e consequente decomposição mais lenta, como é o caso dos resíduos da cultura do trigo. As leguminosas são de grande importância para o suprimento de N às culturas subsequentes devido à elevada quantidade de N acumulado na matéria seca e à baixa relação C/N das leguminosas de outono/inverno. Isso ocorre, principalmente, com aquelas mais exigentes, como milho, sobretudo em solos pobres em MO e/ou em início de implementação do SPD, o que pode trazer economia de fertilizantes nitrogenados (GONÇALVES; CERETTA; BASSO, 2000; BAYER; MIELNICZUK; PAVINATO, 1998).

As espécies não-leguminosas se destacam pela elevada produção de fitomassa e elevada relação C/N, quando comparadas com as leguminosas. Apresentam, também, taxa de decomposição menor que as leguminosas, e seus resíduos persistem no solo por mais tempo (AMADO; MIELNICZUK, 2000; BERTOL et al., 1998). Assim, a rotação e ou sucessão de culturas auxiliam na recuperação dos teores de MO, principalmente em solos das regiões tropicais úmidas, onde a perda da MO do solo é favorecida, fato observado neste estudo.

Em relação aos teores de P, S e K, não observamos diferenças entre as posições de amostragem e os sistemas de manejo do solo, embora diversos autores evidenciem que exista alta variabilidade dos teores de P e K, explicada pela adição localizada de fertilizantes predominantemente nas linhas de semeadura, que se mantêm pouco alteradas com o tempo de cultivo (SCHLINDWEIN; ANGHINONI, 2000).

Os teores de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e, consequentemente, a soma de bases (SB) foram superiores no SPD em relação ao SPC nas amostras de solo cultivados com soja e trigo, que corroboram os teores superiores de MO do solo observados no SPD (Tabela 8). Com isso,

pode-se inferir que durante a evolução da transformação da MO do solo ao longo dos 36 anos do SPD, as substâncias húmicas, produtos da decomposição da MO e que possuem elevado peso molecular, promoveram aumento da capacidade de troca de cátions dependentes de pH e beneficiaram a adsorção de cátions trocáveis, como Ca, Mg e K, aumentaram a saturação por bases no complexo coloidal do solo e melhoraram o grau de fertilidade do solo. A capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação por bases (V%) também foram superiores no SPD em relação do SPC. Esses resultados eram esperados pois esses atributos secundários são intimamente relacionados ao teor de MO do solo.

4.1.3. Ação dos extratores de fósforo

Não houve interação entre os fatores sistema de manejo do solo e posição de amostragem para os teores de P extraídos por resina para ambas as culturas (Tabela 10). Resultado semelhante foi observado para os teores de P extraídos por Mehlich 1 para o solo cultivado com trigo (Tabela 10). Os teores de P extraídos pelos extratores Mehlich1 e 3 e EPA 3051a foram superiores no SPD em relação ao SPC para o solo cultivado com soja, sem diferença entre os teores na rizosfera e na linha nos dois sistemas de manejo, sendo ambos diferentes da entrelinha (Tabela 10). Resultado semelhante foi observado para os teores de P extraídos pelo extrator EPA 3051a para o solo cultivado com trigo (Tabela 10).

Os teores de P superiores observados no SPD em relação ao SPC pode ser explicado pela aplicação da adubação fosfatada na superfície do solo sem posterior incorporação, o que favorece o aumento dos teores de P total da camada superficial. Os extratores de P apresentaram coeficientes de correlações positivas superior a 0,8 para as amostras de solo cultivado com soja (Tabela 11). Os extratores RTA, Mehlich 1 e EPA 2051a apresentarem correlações superiores a 0,9 para as amostras de solo cultivado com trigo, porém o extrator Mehlich 3 correlacionou-se na ordem de 0,4 a 0,57 com os demais extratores (Tabela 13).

A eficiência dos métodos de extração de P depende da forma em que o fósforo está ligado à fase sólida do solo, uma vez que as formas de P do solo têm diferentes capacidades de dessorção e reposição da solução do solo, segundo sua natureza química e energia de ligação (GATIBONI et al., 2007). Portanto, a correlação positiva observada entre os extratores pode ser explicada também pelo uso do mesmo tipo de solo e fonte de adubação fosfatada para todos os tratamentos, isto é, embora a seletividade dos extratores seja diferente, as eficiências de extração foram correlacionadas para a mesma matriz de solo e em condições de mesma adubação para todos os tratamentos.

Tabela 10. Efeito da interação do manejo do solo com a posição de amostragem nos teores de fósforo extraídos pelos diferentes extratores.

Manejo	soja			trigo		
	Rizosfera	Linha	Entrelinha	Rizosfera	Linha	Entrelinha
P resina (mg dm ⁻³)						
SPD	336	293	73	311	130	84
SPC	235	245	72	291	80	65
P Mehlich 1 (mg.dm ⁻³)						
SPD	186 Aa	147 Aa	51 Ab	274	150	82
SPC	97 Ba	103 Ba	42 Ab	194	60	42
P Mehlich 3 (mg dm ⁻³)						
SPD	144 Aa	123 Aa	50 Ab	69 Bab	119 Aa	56 Bb
SPC	66 Ba	82 Ba	38 Ab	147 Aa	39 Bb	175 Aa
P EPA 3051a (mg kg ⁻¹)						
SPD	939 Aa	985 Aa	622 Ab	1042 Aa	870 Ab	658 Ac
SPC	706 Ba	72 Ba	555 Ab	832 Ba	627 Bb	592 Ab

Letras maiúsculas comparam sistemas de cultivo, e letras minúsculas comparam posições de amostragem. (Tukey, $p < 0.05$).

No Brasil, resina e Mehlich 1 são extratores amplamente utilizados para fósforo no solo (RAIJ, 2004). No entanto, existem outras soluções extratoras de P que possuem características e princípios diversos de extração (NOVAIS, SMYTH, 1999). Isso ocorre devido à complexidade da interação do fósforo no solo e consequente dificuldade de obtenção de um método único para a diversidade de solos e regiões (DA SILVA; VAN RAIJ, 1999).

Abboud et al. (2018) estudaram a mobilidade de P em Latossolos sob 15 anos de plantio direto sob rotação de culturas com aveia preta (*Avena strigosa Schreb.*) e trigo no inverno e soja e milho no verão após aplicações prolongadas de esterco líquido e observaram maior capacidade da resina para extrair e recuperar o fósforo aplicado em relação ao Mehlich-1 e a distribuição de P extraído no perfil foi semelhante para os dois extratores.

A adsorção de fósforo nos solos é fortemente afetada pela textura do solo (FONTES; WEED, 1996). Solos arenosos apresentam, geralmente, menor capacidade de adsorção de fosfatos quando comparados aos solos argilosos (OLIVEIRA et al. 2014). Assim, o teor de argila é um dos principais atributos do solo relacionado com a capacidade de tamponamento de fósforo do solo. A ação dos extratores de fósforo é influenciada pela textura do solo. O extrator Mehlich 1 extrai, preferencialmente, as formas de fósforo ligadas a cálcio (MEHLICH, 1978) e quantidades menores de P ligado a Fe e Al, em função das características de solubilidade dos fosfatos (OLSEN; KHASAWNEH, 1980). Além disso, subestima os teores de P em solos mais argilosos (FREITAS et al. 2013) devido à neutralização parcial da solução extratora e, ou, pela

readsorção do P extraído (KAMPRATH; WATSON, 1980) e superestima a disponibilidade de P em solos que receberam adubação com fosfatos naturais (BORTOLON et al., 2011). Assim, Mehlich 1 é o menos indicado para solos argilosos com predominância de caulinita e óxidos de Fe e Al na fração argila, como é o caso do solo deste trabalho, podendo os valores determinados por este extrator estarem subestimados, embora tenha apresentado correlação positiva com a extração por resina.

Silva; Raij (1999) revisaram 72 trabalhos sobre métodos de extração de P e concluíram que o método da resina trocadora de íons apresentou maiores correlações entre o P absorvido pelas plantas e o P extraído do solo, em relação aos demais extratores (Olsen, Bray 1, Bray 2, Mehlich 1, Troug, Morgan, Égner, Água, CaCl₂, Valor E, Valor L, Papel Fe).

A resina tem sido amplamente utilizada no Brasil, e o método é descrito por Raij et al. (1986). A extração pelo método da resina assemelha-se com o processo de absorção de P pelas plantas, mas não é adotado num maior número de laboratórios por causa de algumas dificuldades operacionais (SILVA; RAIJ, 1999). Neste trabalho, a extração por resina correspondeu aos maiores teores de P extraído, comparado com os extratores Mehlich 1 e Mehlich 3 (Tabela 11).

Tabela 11. Correlação de Spearman entre os extratores de fósforo utilizados no solo cultivado com soja e trigo

	P RTA	P M1	P M3	P EPA 3051a
soja				
P RTA	1,00	0,89**	0,87**	0,82**
P M1		1,00	0,93**	0,93**
P M3			1,00	0,93**
EPA 3051a				1,00
trigo				
P RTA	1,00	0,95**	0,57	0,90**
P M1		1,00	0,40	0,94**
P M3			1,00	0,51
EPA 3051a				1,00

4.1.4. Especificação iônica de fósforo da solução do solo

Houve predomínio da forma monovalente ($H_2PO_4^-$) em ambos os sistemas de manejo e todas as posições de amostragem de solo para ambas as culturas, isto é, as formas de fósforo na solução do solo não foram influenciadas pelo manejo do solo e não sofrem alteração em relação às posições amostradas (Tabela 12 e Figura 7). Este resultado pode ser explicado pelo efeito do pH do solo que atua diretamente na especificação de P em solução, pois as quantidades de $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} presentes na solução do solo dependem do pH (Havilin et al., 1999).

Na maioria dos solos, o fósforo inorgânico ocorre em concentrações razoavelmente baixas na solução do solo. Os íons fosfatos podem ser adsorvidos em minerais com carga

positiva, como óxidos de Fe e Al. Podem também formar uma variedade de minerais em combinação com metais como cálcio (Ca), ferro (Fe) e alumínio (Al). Os equilíbrios de adsorção/dessorção e precipitação/dissolução controlam a concentração de P na solução do solo e, portanto, sua mobilidade química e biodisponibilidade. Além da concentração de íons fosfato, os principais fatores que determinam esses equilíbrios e a especiação do solo P são: (i) o pH, (ii) as concentrações de ânions que competem com os íons P pelas reações de troca de ligantes e (iii) as concentrações de metais (Ca, Fe e Al) que podem co-precipitar com íons P (HINSINGER, 2001).

Neste trabalho, os atributos físicos e químicos do solo que influenciaram a especiação de P em solução eram homogêneos entre os tratamentos sendo, portanto, esperado o predomínio da forma H_2PO_4^- uma vez que o pH da solução do solo variou de 5,5 a 6,3 entre os tratamentos (Tabela 12).

Tabela 12. Especiação iônica de P da solução do solo.

sistema	posição	pH H ₂ O	Teor total	Espécies de P		
				HPO ₄ ⁻²	H ₂ PO ₄ ⁻	P-Outras
			mmol L ⁻¹	%		
Soja						
SPD	rizosfera	6,0	0,068 ± 0,03	8,0 ± 0,94	88,0 ± 4,73	1,0 ± 1,0
	linha	6,2	0,029 ± 0,00	12,0 ± 3,6	82,0 ± 4,4	1,0 ± 0,35
	entrelinha	5,5	0,036 ± 0,03	2,0 ± 0,46	97,0 ± 0,77	0,0 ± 0,07
SPC	rizosfera	6,0	0,033 ± 0,00	10,0 ± 5,14	87,0 ± 5,98	0,0 ± 0,14
	linha	6,0	0,017 ± 0,00	7,0 ± 0,94	92,0 ± 1,15	0,0 ± 0,06
	entrelinha	6,2	0,004 ± 0,01	10,0 ± 0,47	88,0 ± 1,15	0,0 ± 0,33
trigo						
SPD	rizosfera	6,0	0,089 ± 0,02	6,70 ± 0,94	91,0 ± 1,04	0,0 ± 0,12
	linha	6,3	0,015 ± 0,00	13,42 ± 1,36	83,0 ± 1,49	1,0 ± 0,23
	entrelinha	5,6	0,005 ± 0,00	3,02 ± 0,51	97,0 ± 0,54	0,0 ± 0,05
SPC	rizosfera	6,0	0,068 ± 0,01	6,44 ± 0,37	92,0 ± 0,10	0,0 ± 0,06
	linha	6,2	0,011 ± 0,00	9,82 ± 2,02	89,0 ± 2,02	0,0 ± 0,06
	entrelinha	6,1	0,003 ± 0,00	8,0 ± 0,28	91,0 ± 0,40	0,0 ± 0,04

N=3 ± erro padrão

O ácido fosfórico (H_3PO_4) no solo se dissocia sequencialmente em H_2PO_4^- (log K1 = 2,12), HPO_4^{-2} (log K2 = 7,20) e PO_4^{-3} (log K3 = 12,33) com liberação de íons H^+ em todas as etapas, à medida que o pH do meio aumenta. Assim, abaixo de pH 7,2 ocorre predomínio da forma H_2PO_4^- , a pH igual a 7,2 as quantidades de H_2PO_4^- e HPO_4^{-2} se equivalem e acima de pH 7,2 ocorre aumento gradual da forma HPO_4^{-2} (NOVAIS, R.F., SMYTH, 1999).

O comportamento dos íons no solo depende também da relação dinâmica entre a fase sólida e a solução do solo (SALET, 1994). Da Silva e Bohnen (2006) estudaram as relações entre nutrientes na fase sólida e solução de um Latossolo durante o primeiro ano nos sistemas plantio direto e convencional e concluíram que os valores de fósforo da solução do solo relacionaram-se positivamente com os extraídos da fase sólida de modo semelhante para os dois sistemas de preparo do solo.

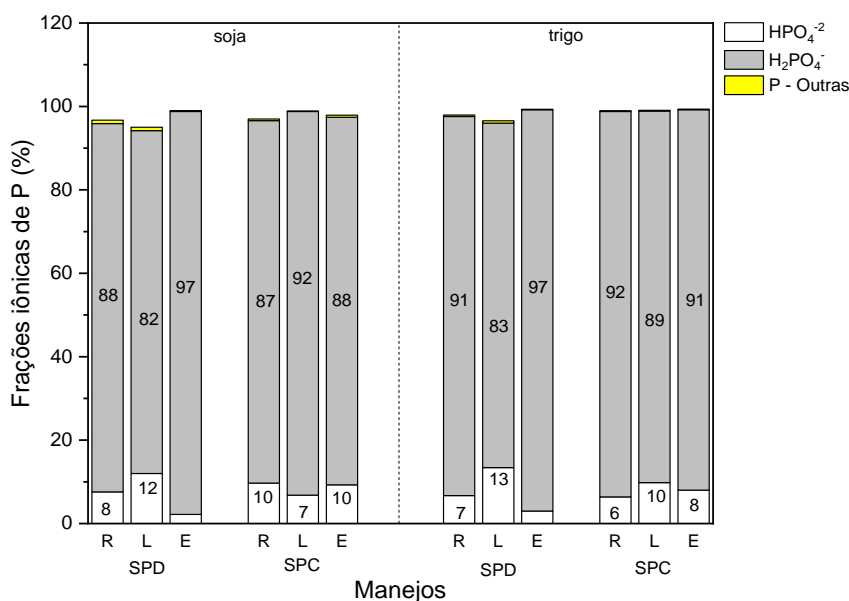


Figura 7. Especiação iônica de fósforo da solução do solo cultivado com soja e trigo sob sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC), n=4. P-Outras: H₃PO₄, MgHPO₄(aq), CaHPO₄(aq), CaH₂PO₄⁺; CaPO₄, AlHPO₄⁺, Al₂PO₄⁺³, KHPO₄, KH₂PO₄ (aq), FeH₂PO₄⁺, FeHPO₄⁺, FeHPO₄(aq) e CuHPO₄(aq).

Em estudo sobre a atividade e especiação química na solução do solo influenciadas pela adição de fósforo em Latossolo sob plantio direto em diferentes condições de acidez, Nolla e Anghinoni (2006) observaram predominância de 90% ou mais da espécie H₂PO₄⁻ em solução nas condições mais ácidas de pH 4 e 4,5 e predomínio de concentração relativa entre 70 e 80% nas condições de menor acidez (pH 6,4). Na fase inicial até os cinco primeiros anos de implantação do SPD, o P é imobilizado pelos principais constituintes da fração coloidal do solo, isto é, a matéria orgânica e os óxidos e hidróxidos de Fe e Al (Oliveira et al., 2002), que apresentam cargas elétricas variáveis com o pH e com a força iônica do meio (CASAGRANDE et al., 2003).

Após estabilização dos estoques de matéria orgânica do solo (áreas com mais de seis anos de implantação do SPD) supõe-se que o uso de P pelas plantas seja mais eficiente, devido ao

bloqueio dos sítios inorgânicos de adsorção de P por moléculas orgânicas (Stevenson, 1986), além da saturação desses sítios como resultado da aplicação superficial de fertilizantes e da maior quantidade de P-lábil superficial e P associado à biomassa microbiana, em áreas de SPD (Oliveira et al., 2002). Casagrande et al. (2003) estudaram a adsorção de fosfato e de sulfato em amostras superficiais e subsuperficiais de solos com cargas elétricas variáveis da região norte do estado de São Paulo e concluíram que a adsorção de fosfato diminuiu com elevação do pH até 5 ou 6; no entanto, em pH acima de 6 a adsorção aumentou.

4.1.5. Especificação de fósforo da fase sólida por XAS/XANES

Um dos aspectos mais importantes da análise de combinação linear (LCF) é a seleção criteriosa de padrões para o ajuste dos dados XANES do solo (Kelly et al., 2008). É importante conhecer a mineralogia do solo e, quando possível, utilizar informações complementares de outras metodologias, como fracionamento químico e ^{31}P -RMN para escolha de padrões adequados, pois o uso de padrões quimicamente incorretos pode produzir resultados equivocados (HESTERBERG, 2010).

De acordo com os resultados da mineralogia e do fracionamento químico do solo foram escolhidos padrões de P adsorvido a Fe, Al, Ca e padrões de P orgânico, isto é, padrões químicos dos principais oxihidróxidos de Fe e Al encontrados em Latossolos tropicais e que também foram encontrados no Latossolo Vermelho distroférico deste estudo.

Os padrões de fosfato adsorvido a gibbsita, goethita, hematita, alumínio amorfo e ácido fítico apresentaram os melhores ajustes para os espectros das amostras de solo de todos os tratamentos, que podem ser confirmados pela similaridade observada nos espectros XANES (Figuras 4, 5 e 6), pelos baixos valores dos resíduos - fator R e pelos valores de incertezas ajustados menores que 10% (Tabela 13).

A especificação de fósforo da fase sólida obtida por meio da espectroscopia de absorção de raios-X na borda K do P evidenciou predomínio de P associado aos oxihidróxidos de ferro e alumínio, que corrobora os resultados do fracionamento químico, com teores superiores de P nas frações NaOH 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,5 mol L⁻¹ que são formas de P inorgânico adsorvido aos oxihidróxidos de Fe e Al e argilominerais (Hedley et. al, 1982). Tendência semelhante ao acúmulo de frações de P- Fe e P-Al em amostras de solo coletadas em áreas fertilizadas foram também relatados por Koch et al. (2018), Liu et al. (2015), Liu, et al. (2013) e Hesterberg et al. (1999).

Além do intenso pico da borda de absorção, as características espectrais XANES para espécies de fosfato ligado a Al são sutis. Fosfatos de Al cristalinos e não cristalinos produzem um ombro na pré borda de absorção (HESTERBERG, 2010). Khare et al. (2007) atribuíram esse

ombro na pré-borda à excitação dos elétrons dos átomos de P do nível energético 1s dos estados de ligação P(3p)-O(2p)-Al (3p) dos minerais.

Tabela 13. Proporção relativa dos padrões de P \pm incerteza, cujas combinações produziram os melhores ajustes dos espectros XANES das amostras de solo da rizosfera, linha e entrelinha das culturas de soja e trigo no plantio direto e preparo convencional.

Sistema manejo	Posição	P -Al amorfo ¹	P-Gibbsita ¹	P-Goethita ¹	P-Hematita ¹	Ácido fítico ¹	Fator-R
		----- % -----					
soja							
SPD	Rizosfera		15,8 \pm 3,1	38,2 \pm 4,1	18,2 \pm 3,9	27,8 \pm 1,4	0,0015
SPD	Linha	27,5 \pm 1,8		42,0 \pm 4,5	11,1 \pm 2,2	19,4 \pm 0,8	0,0007
SPD	Entrelinha	13,9 \pm 2,0		11,6 \pm 5,1	56,4 \pm 2,5	18,1 \pm 8,8	0,0007
SPC	Rizosfera				77,1 \pm 0,6	22,9 \pm 0,7	0,0014
SPC	Linha		18,3 \pm 2,5	17,1 \pm 3,4	43,1 \pm 3,2	21,5 \pm 1,2	0,0009
SPC	Entrelinha		27,7 \pm 2,1	48,8 \pm 3,5		23,5 \pm 1,2	0,0014
trigo							
SPD	Rizosfera		15,3 \pm 1,7	60,2 \pm 2,8		24,5 \pm 1,0	0,0010
SPD	Linha		12,7 \pm 3,8	20,0 \pm 5,1	38,5 \pm 4,9	28,8 \pm 1,8	0,0023
SPD	Entrelinha		13,0 \pm 2,2		59,8 \pm 2,9	27,2 \pm 0,9	0,0009
SPC	Rizosfera		11,5 \pm 3,1	32,1 \pm 4,2	31,6 \pm 4,0	24,8 \pm 1,4	0,0015
SPC	Linha		15,6 \pm 4,0	48,5 \pm 5,4	12,9 \pm 5,2	22,9 \pm 1,9	0,0029
SPC	Entrelinha			33,8 \pm 3,8	41,7 \pm 2,9	24,5 \pm 0,8	0,0017

¹As proporções dos padrões foram ajustadas para totalizar 100% e o erro foi calculado pelo software Athena. ²O fator R é uma medida da qualidade do ajuste = $\sum(\text{dados} - \text{combinação})^2 / \sum(\text{dados})^2$.

A intensidade da pré borda de absorção está aparentemente relacionada ao número de ligações P-O-Al para fosfatos de Al de diferentes cristalinidades e fosfato adsorvido em óxidos de Al (HESTERBERG, 2010). As características espectrais XANES pós-borda K do fósforo (2160 e 2185 eV) tendem a ser mais distintas para minerais cada vez mais cristalinos (HESTERBERG, 2010). Portanto, podemos inferir que as espécies de P ligada a Al neste Latossolo Vermelho distroférico possuem baixa cristalinidade devido padrão similar da pós-borda observado (Figura 10, 11 e 12). A característica espectral que difere os fosfatos de Fe (III) e os fosfatos adsorvidos em óxidos de Fe (III) é um fraco pico de absorção pré-borda de absorção que ocorre a 2-5 eV (TOOR et al., 2006). Segundo Khare et al. (2007), essa característica é menos perceptível para fosfato adsorvido em óxidos de Fe (III) do que para fosfatos de Fe (III).

Em relação à especiação de P em solos, a característica da pré-borda do espectro XANES da borda K do P indica coordenação dos tetraedros PO₄ com um cátion de metal de transição. Dada a alta abundância de Fe na maioria dos solos em relação a outros metais de transição, e a maior capacidade de adsorção de fosfato em óxidos de Fe em relação aos óxidos de

Mn, essa característica da pré-borda é provavelmente atribuída ao PO_4 ligado ao Fe (III) (HESTERBERG, 2010).

O fosfato adsorvido ligado a grupos funcionais de superfície semelhantes, como Al-OH e Fe-OH em vários óxidos de Al e Fe, pode ser de difícil distinção com resoluções de energia (0,3-1 eV) das linhas de luz XAS sincrotron (HESTERBERG, 2010). Visualmente, os espectros das amostras evidenciaram característica de pré-borda semelhantes, pico principal na região de 2151.0 eV e sutis diferenças na região pós borda. O caráter pré-borda foram semelhantes aos observados nos padrões de fosfato adsorvido a goethita e aos óxidos de ferro (Figuras 09, 10, 11) corroborando os resultados de Hesterberg et al. (1999).

As características da borda de absorção de padrões orgânicos de P como ácido fítico, ATP e outros compostos orgânicos coincidem essencialmente com os de muitos fosfatos inorgânicos. Muitos desses compostos têm um pico amplo e único de energias entre 2167 e 2170 eV, o que torna mais difícil distinguir entre espécies P inorgânicas e orgânicas em uma amostra de solo (HESTERBERG, 2010). No ajuste de combinação linear, todas as amostras apresentaram combinação com o padrão de ácido fítico (Tabela 15).

O ajuste de combinação linear (LCF) dos espectros de absorção de raios-X na borda K do P indicou que o possível acúmulo de P no solo ocorreu predominantemente por adsorção de P inorgânico em superfícies de oxihidróxidos de Fe/Al. Foram observadas estimativas médias de 72 a 82% de Pi e 18 a 28% de Po nas amostras de solo cultivado com soja e 71 a 77% Pi e 23 a 29% Po nas amostras de solo cultivado com trigo (Figura 8). Schmieder et al. (2018) obtiveram acúmulo de P de 76% do P associado a Al ou Fe em solos agrícolas adubados com esterco no longo prazo e destacaram a importância das frações minerais de P ligada a Fe e Al para a retenção de P em solos fertilizados a longo prazo. Em nosso estudo, as frações minerais de P ligada a Fe e Al também foram as principais formas de retenção de P nos dois sistemas de manejo do solo e em todas as posições de amostragem, evidenciado pelos semelhantes resultados obtidos pela especiação XANES e pelo fracionamento químico.

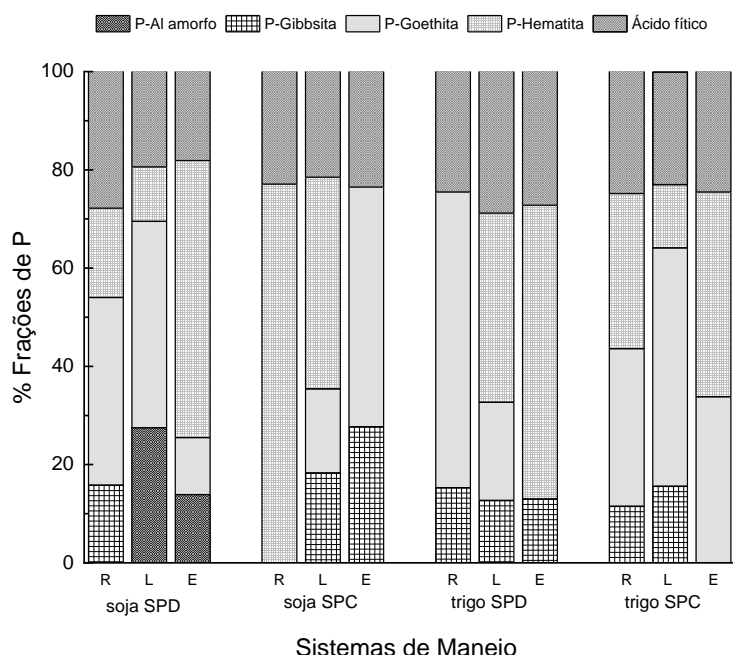


Figura 8. Porcentagem das frações de P obtidas pela combinação linear (LCF) no método de especiação por XAS/XANES.

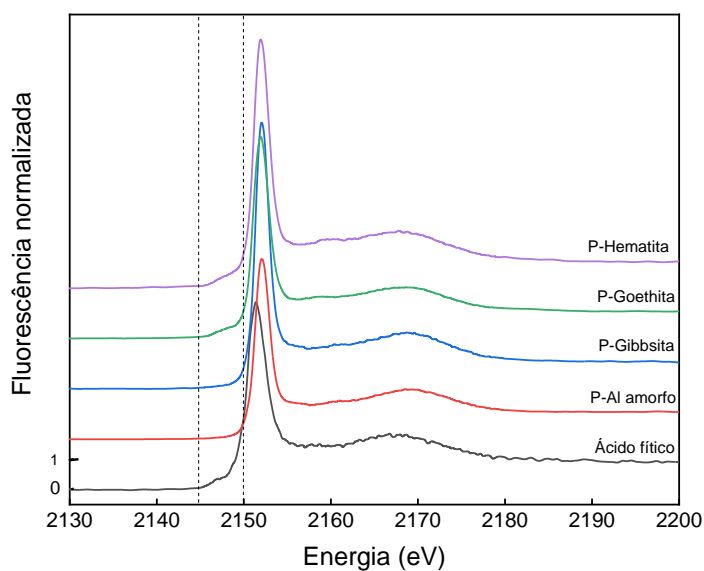


Figura 9. Espectros XANES na borda K do P dos padrões utilizados no ajuste de combinação linear com os espectros de P das amostras de solo. Obs.: as linhas verticais são guias visuais para comparar as características espectrais.

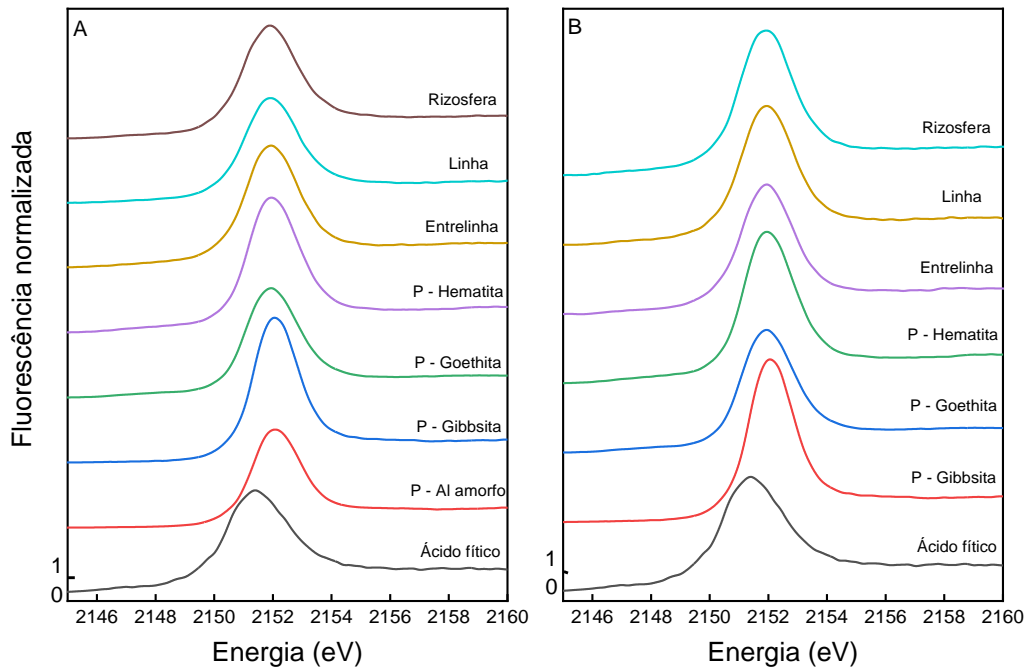


Figura 10. Espectros XANES da borda K do fósforo de amostras de solo cultivado com soja nos sistemas de plantio direto (A) e preparo convencional (B) e espectros dos padrões utilizados como referência de fósforo.

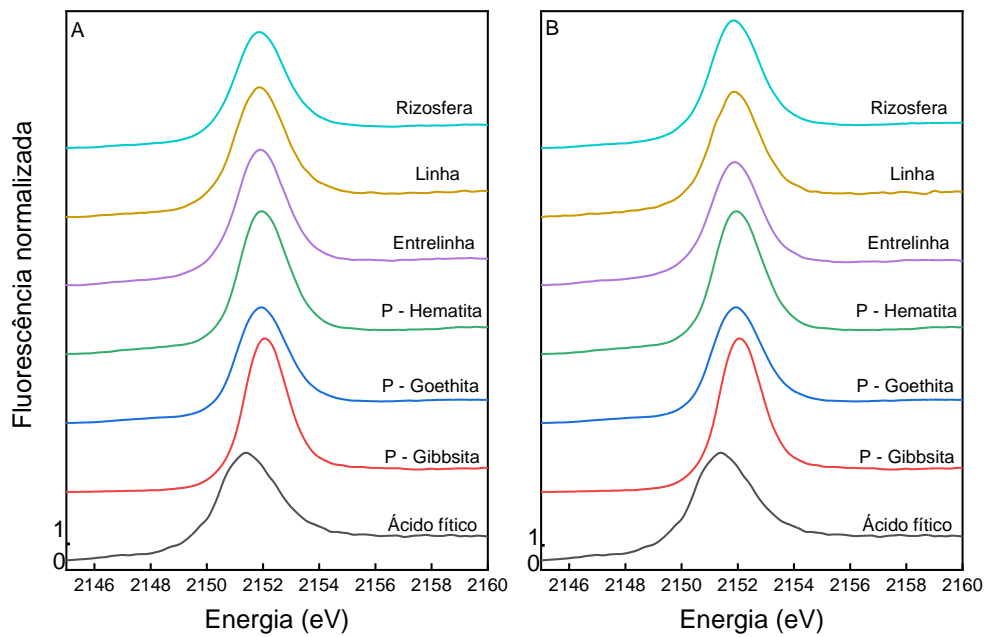


Figura 11. Espectros XANES da borda K do fósforo de amostras de solo cultivado com trigo no plantio direto (A) e preparo convencional (B) e espectros dos padrões utilizados como referência de fósforo.

4.1.6. Caracterização de fósforo orgânico por ressonância nuclear magnética - ^{31}P RNM

Nos espectros de ^{31}P RMN, a presença de ortofosfato, ortofosfato monoésteres, ortofosfato diésteres e pirofosfato em todas as posições de amostragem, em ambos os sistemas de manejo (Figura 12 e 13). Os sinais de ^{31}P RMN de compostos orgânicos e inorgânicos de interesse em estudos ambientais geralmente estão entre 25 e -25 ppm. Esses compostos são fosfonatos, com uma ligação C - P, a 20 ppm; ortofosfato a 5-7 ppm; ortofosfato monoésteres, com uma porção C por P, a 3-6 ppm; ortofosfato diésteres, com duas porções C por P, incluindo fosfolipídios e ácido desoxirribonucleico (DNA), de 2,5 a -1 ppm; pirofosfato de -4 a -5 ppm; e polifosfato a -20 ppm. Embora raramente seja relatado para amostras ambientais, um pico para o grupo P de cadeia terminal de polifosfatos também pode estar presente de -4 a -5 ppm (CADE-MENUN, 2005). Picos intensos de Pi ortofosfato (5 – 7 ppm) foram detectados em relação às demais frações de P. Assim, pode-se inferir que esta foi a fração predominante de P, o que corrobora os resultados do fracionamento químicos (Tabela 18) e XANES (Tabela 15) em que observamos predomínio da fração de P inorgânico ligado a Fe e Al.

Os grupos de fosfonatos e polifosfatos não foram encontrados em nenhuma das amostras. Por isso, os espectros foram apresentados com deslocamento químicos de -10 a 10 ppm (Figura 12 e 13). Os polifosfatos são frações com alto conteúdo de energia e são preservados em ambientes onde a atividade microbiana do solo é reduzida ou a quantidade de MOS é muito elevada (Daí et al., 1996). Nos espectros de RMN observaram-se picos definidos das frações Pi ortofosfato, Po diéster e Pi pirofosfato e picos conjugados na região da fração Po monoésteres. A presença de picos conjugados é comum em espectros de ^{31}P RMN e indicam a presença de mais de um tipo de Po monoéster (Escudéy et al., 1997). O principal Po monoéster presentes no solo são o hexafosfato inositol (Daí et. al., 1996).

Houve diferentes comportamentos de pico entre as posições de amostragem e entre os sistemas de manejo (Figura 13 e 14). No espectro da amostra de solo cultivado com soja no SPD observamos pico mais pronunciado relativo às frações monoéster na entrelinha, em relação à rizosfera e linha de semeadura. Turner; Engelbrecht (2011) avaliaram a composição do P orgânico de 19 solos contrastantes sob floresta tropical da planície do Panamá usando a extração com NaOH – EDTA e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^{31}P em solução. Os autores concluíram que a fração de fosfato monoésteres correspondeu à maior proporção do fósforo orgânico total em solos com pH mais próximos de 7 e altas concentrações de fósforo e matéria orgânica, enquanto a proporção de fosfato diésteres foi maior em solos muito ácidos e com baixo teor de fósforo e matéria orgânica. De acordo com Turner; Engelbrecht (2011), as

propriedades do solo exercem forte controle nas quantidades e formas de fósforo orgânico do solo das florestas tropicais.

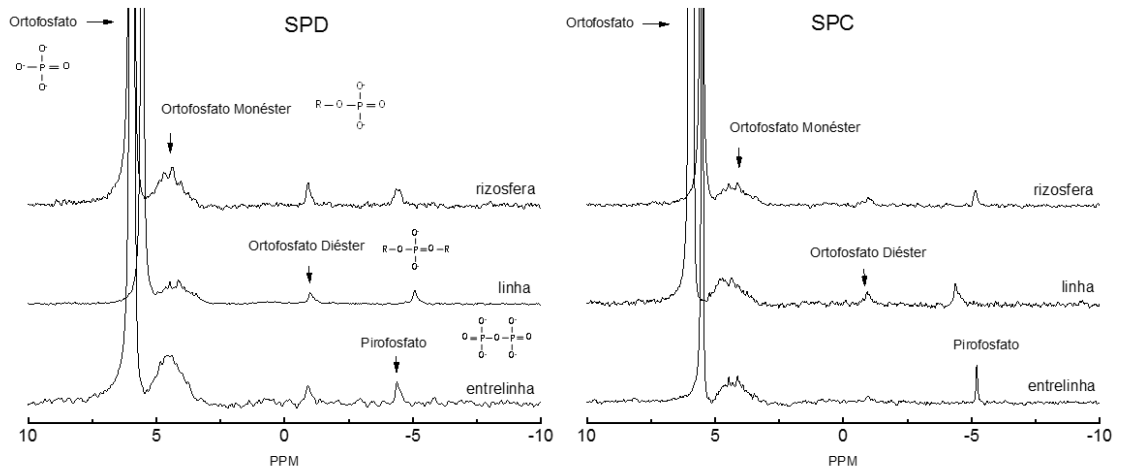


Figura 12. Espectros ^{31}P NMR das soluções do solo cultivado com soja no sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC).

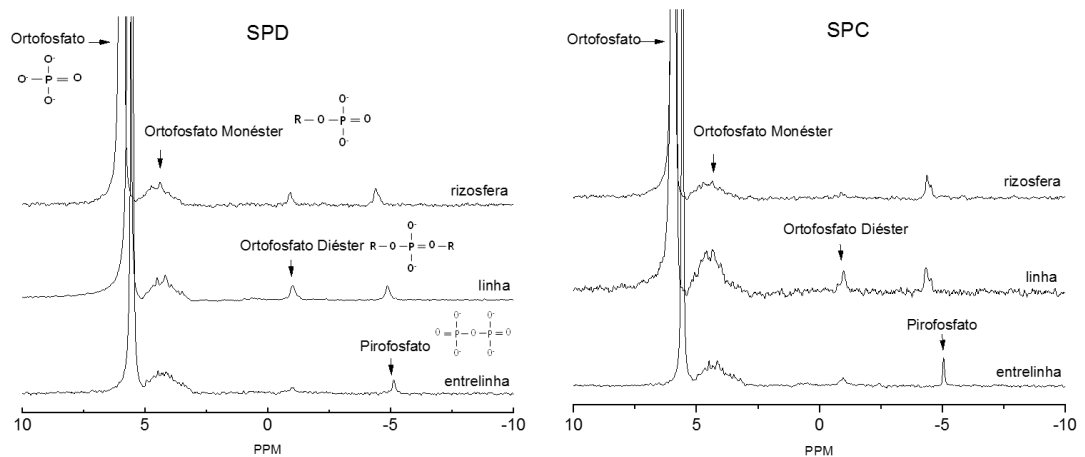


Figura 13. Espectros ^{31}P NMR das soluções do solo cultivado com trigo no sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC).

Em solos muito intemperizados e sem adubação, o Po monoéster pode estar em maior proporção em relação ao Pi ortofosfato (Guggenberger et al., 1996) devido à exportação de Pi pelas plantas ou à sua transformação em formas orgânicas (Dalal, 1977). Já o Pi ortofosfato é a fração predominante em solos adubados (RHEINHEIMER et al., 2002).

No espectro da amostra de solo cultivado com soja no SPC, comparado com o SPD, observou-se um pico mais pronunciado de pirofosfato na entrelinha, e o mesmo efeito foi evidenciado nos espectros das amostras de solo cultivado com trigo (Figura 12 e 13). Pode-se inferir que na entrelinha de ambos os manejos do solo houve aumento de P na forma inorgânica de pirofosfato, em relação a rizosfera e linha de semeadura, uma vez que o efeito da microbiota na entrelinha pode ser reduzido, o que pode contribuir para a diminuição na transformação de P em formas orgânicas. As condições químicas da rizosfera diferem consideravelmente das do solo não rizosférico, como consequência de uma série de processos induzidos diretamente pela atividade das raízes das plantas ou pela atividade da microflora da rizosfera (HINSINGER, 2001).

Formas de P orgânico no solo são afetadas, ou pelo menos correlacionadas, com uma ampla gama de fatores geoquímicos, físicos e climáticos do solo, incluindo precipitação e temperatura, que têm grandes impactos nos processos biológicos. A proporção fosfatos diésteres/monoésteres é uma métrica do solo que pode ser afetado por fatores climáticos (NASH et al., 2014).

As espécies vegetais e mineralogia do solo também podem afetar a composição orgânica de P no solo. Em estudo sobre a influência da cobertura do solo com leguminosas (*Arachis pintoii*, *Pueraria phaseoloides* e *Macroptilium atropurpureum*) no P orgânico do solo por espectroscopia de ^{31}P RMN, Canellas et al. (2004) encontraram maior quantidade de fósforo em ligações diésteres nas amostras de solo sob cobertura de leguminosas do que sob gramíneas. Canellas et al. (2004) afirmaram que a permanência da parte aérea na superfície do solo promoveu aumento na razão P diéster/monoéster e que os resultados podem ser usados para justificar o aumento da disponibilidade de fósforo para as plantas em solos cultivados com leguminosas.

Chapuis-lardy; Brossard; Quiquampoix, (2001) avaliaram o fósforo orgânico em Latossolos do Cerrado usando espectroscopia ^{31}P -NMR e encontraram proporções fosfato diésteres/monoésteres que variaram de 0,20 a 0,28, com predominância de fosfato monoésteres que foram atribuídos principalmente à mineralogia do solo argiloso, que era composta por gibbsita (50-63%), goethita (13-20%), caulinita (10-20%) e a hematita (6 a 8%). Assim, os P monoésteres são protegidos da degradação microbiana devido à rápida adsorção das frações de P aos minerais do solo e à interação com os oxi-hidróxidos do solo. A alta estabilidade dos fosfatos monoésteres contra ataques microbianos e enzimáticos resulta de suas fortes interações com os minerais do solo, devido à sua alta densidade de carga e precipitação com minerais de Fe e Al moderadamente solúveis (ANDERSON, 1980).

Em geral, as frações orgânicas de P foram semelhantes entre as posições de amostragem e entre os sistemas de manejo do solo pelo método do fracionamento químico (Tabela 18), porém as análises qualitativas de ^{31}P - NMR evidenciaram a presença de picos com comportamentos distintos em relação as frações de P orgânico P, assim é necessário novos estudos mais detalhados para investigar se quantitativamente ocorre diferença das frações de P na rizosfera das plantas.

4.1.7. Fracionamento químico de fósforo

A relação entre o fósforo total obtido pela somatória das frações e o fósforo total por digestão é uma forma de avaliar a precisão do fracionamento uma vez que pode haver perdas durante as etapas da extração sequencial. Os resultados de recuperação da soma das frações foram de 97 a 121% do fósforo total obtido por digestão para amostras de solo cultivado com soja ($R^2 = 0.92$). Para as amostras de solo cultivado com trigo as porcentagens de recuperação foram de 94 a 115% ($R^2 = 0.87$) (Figura 14).

Não houve interação entre sistema de manejo do solo x posição de amostragem nas frações de P extraído com $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ e P extraído com $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (Tabela 14). Resultado semelhante foi observado para as amostras de solo cultivado com trigo, exceto para a frações de P extraído com $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ (Tabela 14). Observou-se efeito significativo dos fatores experimentais isolados nas frações de P extraídos das amostras de solo cultivado sobre para ambas as culturas (Tabela 14).

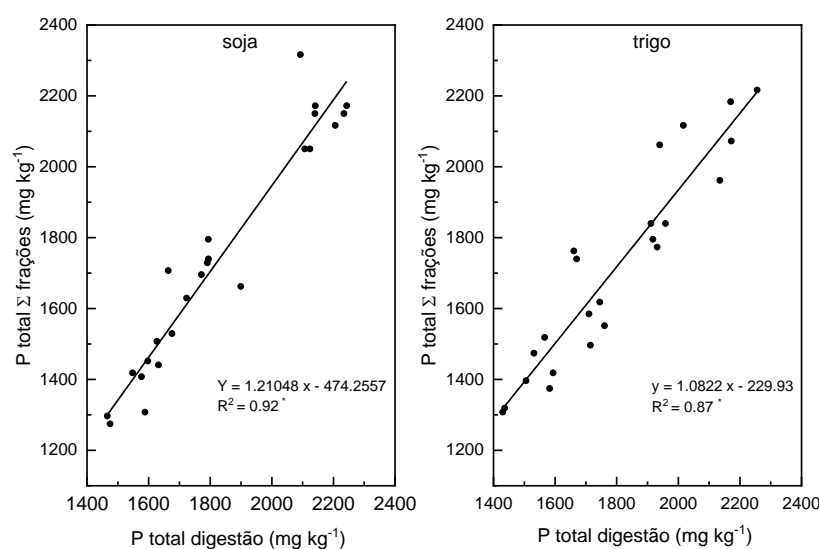


Figura 14. Relação entre o fósforo total obtido pela somatória das frações do fracionamento e o fósforo total obtido por digestão, em amostras da rizosfera, linha e entrelinha de um Latossolo Vermelho

distroférico cultivado sob longa duração em sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC) com sucessão de soja e trigo. * $p < 0,05$ teste F.

Tabela 14. Significância dos efeitos dos fatores experimentais e suas interações, como resultado da análise de variância para as frações de fósforo obtidas no fracionamento químico de amostras de solo cultivado com soja.

Frações	Sistema	Posição	
		Soja	Sistema x Posição
Pi resina	F 1,18 = 11,267 *	F 2,18 = 35,588 **	F 2,18 = 0,995 NS
Pi NaHCO ₃ 0,5 mol L ⁻¹	F 1,18 = 5,145 *	F 2,18 = 30,600 **	F 2,18 = 0,416 NS
Po NaHCO ₃ 0,5 mol L ⁻¹	F 1,18 = 2,762 NS	F 2,18 = 2,724 NS	F 2,18 = 3,191 NS
Pi NaOH 0,1 mol L ⁻¹	F 1,18 = 12,435 *	F 2,18 = 27,037 **	F 2,18 = 2,669 NS
Po NaOH 0,1 mol L ⁻¹	F 1,18 = 11,585 *	F 2,18 = 2,702 NS	F 2,18 = 2,049 NS
P HCl 1 mol L ⁻¹	F 1,18 = 288,599**	F 2,18 = 121,097 **	F 2,18 = 56,064 **
Pi NaOH 0,5 mol L ⁻¹	F 1,18 = 19,349**	F 2,18 = 15,173 *	F 2,18 = 5,820 *
Po NaOH 0,5 mol L ⁻¹	F 1,18 = 0,873 NS	F 2,18 = 0,041 NS	F 2,18 = 0,184 NS
P residual	F 1,18 = 16,943 *	F 2,18 = 5,391 *	F 2,18 = 1,483 NS
Trigo			
Pi resina	F 1,18 = 3,738 NS	F 2,18 = 33,491**	F 2,18 = 2,104 NS
Pi NaHCO ₃ 0,5 mol L ⁻¹	F 1,18 = 14,290*	F 2,18 = 54,205 **	F 2,18 = 3,265 NS
Po NaHCO ₃ 0,5 mol L ⁻¹	F 1,18 = 0,915 NS	F 2,18 = 1,401 NS	F 2,18 = 1,361 NS
Pi NaOH 0,1 mol L ⁻¹	F 1,18 = 32,991 **	F 2,18 = 42,558**	F 2,18 = 1,649 NS
Po NaOH 0,1 mol L ⁻¹	F 1,18 = 3,397 NS	F 2,18 = 12,715**	F 2,18 = 0,969 NS
P HCl 1 mol L ⁻¹	F 1,18 = 84,323**	F 2,18 = 20,341**	F 2,18 = 11,626 **
Pi NaOH 0,5 mol L ⁻¹	F 1,18 = 17,627 *	F 2,18 = 11,107*	F 2,18 = 2,532 NS
Po NaOH 0,5 mol L ⁻¹	F 1,18 = 0,25 NS	F 2,18 = 2,678 NS	F 2,18 = 0,632 NS
P residual	F 1,18 = 5,933 *	F 2,18 = 5,727*	F 2,18 = 0,492 NS

Teste de Tukey ($p < 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, NS não significativo.

Comportamento das frações lábeis de P

Os teores de fósforo inorgânico extraídos pela resina trocadora de íons (RTA - PiRTA) foram superiores no sistema plantio direto (SPD) em comparação ao preparo convencional (SPC) em ambas as culturas (Tabela 15). Esse resultado pode ser explicado pelas aplicações anuais de fertilizantes na camada superficial do solo, onde um acúmulo de nutrientes é favorecido pela presença da palhada, pela ausência de revolvimento e diminuição da taxa de erosão (GATIBONI et al., 2007). No SPD esse acúmulo de nutrientes nos centímetros superficiais, é decorrente da

aplicação dos fertilizantes sobre a superfície, da mineralização dos nutrientes presentes nos resíduos vegetais da superfície e da maior capacidade de troca catiônica (CTC) favorecida pelos maiores teores de matéria orgânica humificada (Bayer & Bertol, 1999; De Maria et al., 1999).

O revolvimento do solo realizado no SPC pelas arações e gradagens promove maior contato entre o íon fosfato e a superfície dos coloides inorgânicos o que favorece as reações de adsorção e conseqüente redução na disponibilidade às plantas.

Os teores de PiRTA não foram diferentes na rizosfera e na linha nos dois sistemas de manejo da soja, sendo ambas diferentes dos teores das amostras de solo coletadas na entrelinha. O mesmo foi observado no SPD na cultura do trigo (Tabela 18). A adubação fosfatada anual realizada no sulco de semeadura pode explicar os teores semelhantes na rizosfera e linha nos dois sistemas de manejo de solo da soja, isto é, a aplicação localizada do fertilizante fosfatado no sulco de plantio concentra o P em um menor volume de solo próximo as raízes das plantas e apresenta a vantagem de diminuir a fixação do fósforo (KOVAR; BARBER, 1989). Como conseqüência, aumenta o gradiente de concentração do nutriente entre a solução e a superfície da raiz das plantas.

Diversos autores avaliaram mudanças de pH da rizosfera e observaram que as raízes de plantas aumentam a disponibilidade e absorção de P pela protonação da rizosfera (HINSINGER et al., 2003; MARSCHNER, 1995; NYE, 1981). Quando uma planta absorve mais cátions do que ânions, os prótons são liberados do citoplasma para o apoplasto para manter a neutralidade elétrica, e esses prótons são então liberados na rizosfera, o que contribui para sua acidificação (GREGORY, 2007).

Plantas que fixam N₂ simbioticamente, como a soja, tem a origem principal do elemento na forma molecular (N₂ atmosférico), o que causa desbalanço na proporção de cátions e ânions do solo, que são menos absorvidos, o que faz a planta a absorver mais cátions e a liberar H⁺ predominantemente (MARSCHNER, 1995). Segundo Barber, (1998), este processo nas espécies leguminosas poderia aumentar a eficiência de absorção de P na rizosfera dessas espécies e por isso talvez sejam menos exigentes em fósforo do que outras espécies de plantas da família das poáceas (Poaceae), como o trigo. Isso pode explicar os teores superiores de PiRTA na rizosfera do trigo (107,0 mg kg⁻¹) em relação aos teores da rizosfera da soja (69,0 mg kg⁻¹) (Tabela 15) o que indica que a soja pode ser mais eficiente na absorção de P e seja menos exigente em P do que o trigo.

Os teores de Pi extraído por bicarbonato 0,5 mol L⁻¹ (PiBIC) não diferiram em ambos sistemas de manejo do solo na cultura da soja, com efeito semelhante ao observado nos teores de PRTA, isto é, os teores de PiBIC da rizosfera não diferiram em relação à linha, sendo ambos

diferentes dos teores na entrelinha (Tabela 15). Segundo Parfitt (1978) e Meurer et al., (2004) o extrator bicarbonato de sódio (NaHCO_3 , $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) extrai frações de Pi (PiBIC) fracamente adsorvidas aos óxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al) e argilominerais presentes no solo. Segundo Hedley et. al., (1982), Tiessen et. al., (1984) e Gatiboni et. al., (2007) a fração PiBIC são consideradas frações disponíveis as plantas.

Os teores de Po extraídos por bicarbonato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (PoBIC) não apresentaram efeito significativo na interação entre os fatores experimentais e nem efeito dos fatores isolados para ambas as culturas (Tabela 14), porém os valores percentuais de PoBIC corresponderam de 9 a 13% do percentual total do fracionamento, comparado aos percentuais de 3 a 8% de PiBIC e 2 a 6% de PRTA.

Os valores percentuais de participação de cada fração lábil de P foram: 46 a 73 % PoBIC > 16 a 32% PiBIC > 12 a 22% PiRTA. Portanto, a participação da fração PoBIC na fração de P lábil foi predominante. Segundo Bowman; Cole, (1978); Tiessen e Moir (1993) a fração PoBIC corresponde a frações de P de fácil degradação no solo, como os ácidos ribonucleicos e glicerol fosfatos, que possuem estrutura química que facilita sua decomposição, sendo facilmente mineralizáveis. Por isso, as quantidades armazenadas no solo são pequenas (DOS SANTOS; GATIBONI; KAMINSKI, 2008).

Conte et al. (2003) avaliaram as formas preferenciais de acumulação do P proveniente da adição de doses de fosfato solúvel em Latossolo Vermelho distroférico típico argiloso sob plantio direto por cinco anos e meio e concluíram que a fração orgânica de P extraída com bicarbonato (PiBIC) foi pouco afetada pela adição do fertilizante fosfatado ao solo (em torno de 24 mg kg^{-1}) e o sistema de cultivo somente alterou a fração PoBIC no solo, com valores superiores no sistema convencional. Em nosso trabalho foram observados teores médios de PoBIC médio de 190 mg kg^{-1} , isto é, superiores ao obtidos por Conte et. al. (2003), sem diferença para o plantio direto e preparo convencional por 36 anos.

Tabela 15. Frações de P lábil de amostras de um Latossolo Vermelho distroférico cultivado sob longa duração em sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC) com sucessão de soja e trigo.

Manejo	Posição			Posição		
	Rizosfera	Linha	Entrelinha	Rizosfera	Linha	Entrelinha
	Soja			Trigo		
P inorgânico extraído por resina (mg kg ⁻¹)						
SPD	69 Aa	69 Aa	33 Ab	107 Aa	67 Aa	37 Ab
SPC	50 Ba	59 Aa	25 Ab	101 Aa	41 Bb	32 Ab
P inorgânico extraído por NaHCO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ (mg kg ⁻¹)						
SPD	127 Aa	114 Aa	55 Ab	144 Aa	103 Ab	69 Ac
SPC	101 Aa	102 Aa	44 Ab	139 Aa	55 Bb	44 Ab
P orgânico extraído por NaHCO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ (mg kg ⁻¹)						
SPD	199	191	179	225	189	181
SPC	180	173	183	201	188	191

Letras maiúsculas comparam sistemas de cultivo, e letras minúsculas comparam posições de amostragem. (Tukey, p<0,05).

Comportamento das frações moderadamente lábeis de P

Em relação à fração PiHID0,1 os teores foram superiores no SPD em comparação ao SPC, em ambas as culturas, sem diferença entre a rizosfera e a linha e ambos diferentes da entrelinha (Tabela 16). Pavinato; Merlin; Rosolem (2009) obtiveram valores maiores PiHID0,1 no preparo convencional em relação ao sistema de plantio direto (dez anos) e afirmam o P adicionado como fertilizante foi adsorvida no solo e permaneceu em frações moderadamente lábeis, principalmente nas camadas superiores do solo. Pavinato; Merlin; Rosolem (2009) ressaltaram que o fertilizante fosfatado promoveu acúmulo de P nas frações menos disponíveis no solo, e o P permaneceu no solo após a colheita. Eventualmente, esse fósforo pode migrar para frações mais lábeis e estar disponível para culturas cultivadas em sucessão.

O HCl 1 mol L⁻¹ extrai frações de Pi (PiHCL) associadas a cargas positivas na superfície dos óxidos e formas associadas ao cálcio (CROSS; SCHLESINGER, 1995). A fração PiHCl foi a única fração que apresentou interação significativa entre o manejo do solo e as posições de amostragem, sendo que os teores foram superiores no SPD em comparação ao SPC em ambas as culturas, mas não diferiram entre a rizosfera e a linha, e ambos foram diferentes da entrelinha nos dois sistemas na cultura da soja e no PD do trigo.

Os valores observados de PiHCl na rizosfera e linha no SPD da soja foi em média 103 mg kg⁻¹ em relação a 30 mg kg⁻¹ no SPC e no SPD do trigo foi em média 86 mg kg⁻¹ em relação a 27 mg kg⁻¹ no SPC. Pode-se inferir que havia teores superiores de fosfato ligado a cálcio no SPD

da soja e trigo em relação ao SPC, e isso pode ser confirmado pelos resultados dos teores de cálcio no solo que foram superiores no SPD em relação os SPC em ambas as culturas (Tabela 8).

A porcentagem da fração PiHCl teve valores médios inferiores as demais porcentagens das frações inorgânicas de P total do solo (Tabela 16), e esse resultado é semelhante aos obtidos por Pavinato; Merlin; Rosolem, (2009) que também observaram valores inferiores para a fração PiHCL comparado com o P total do solo. Pavinato; Merlin; Rosolem (2009) afirmam que os fosfatos de cálcio são degradados pela ação do ácido clorídrico, o que sugere que aqueles solos não possuem altos níveis de fosfatos de cálcio, mas provavelmente possuem fosfatos ligados aos óxidos de ferro e alumínio.

O hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ extrai frações de Pi adsorvidas aos oxihidróxidos dos de Fe e Al e argilominerais que estão moderadamente adsorvidos, isto é, que podem estar ligados por meio de ligações mono e bidentadas, ou seja, ligações em que um e dois átomos de oxigênio estão ligadas aos oxihidróxidos de Fe e Al, respectivamente. A energia de ligação é crescente na seguinte ordem monodentados > bidentados > binucleados, e a possibilidade de dessorção do fosfato aumenta na ordem inversa (PARFITT, 1989). Portanto, a fração PiHID0,1 corresponde a frações de P que podem repor o P na solução do solo quando ocorre depleção pela absorção das plantas. O NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ também extrai formas precipitadas com Fe e Al com diferentes graus de estabilidade e frações orgânicas (PoHID0,1) adsorvidas aos minerais secundários ou associados aos ácidos húmicos e fúlvicos (Linguist et al., 1997).

Em relação a fração PoHID0.1 houve efeito significativo da interação entre os sistemas de manejo do solo para a cultura da soja (Tabela 14), porém os valores superiores observados no SPD em relação ao SPC não influenciaram a porcentagem de distribuição da fração orgânica neste sistema comparado ao SPC (tabela 18).

As informações disponíveis em referências bibliográficas sobre a importância do fósforo orgânico como fonte disponível em solos agrícolas são restritas, sendo que os autores que abordam o fracionamento de P em solos dão mais ênfase do P inorgânico aplicado por meio da adubação. Com isso, o conhecimento sobre a ciclagem do P orgânico ainda é limitado.

Tabela 16. Frações de P moderadamente lábil de amostras de um Latossolo Vermelho distroférico cultivado sob longa duração em sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC) com sucessão de soja e trigo.

Manejo	Posição			Posição		
	Rizosfera	Linha	Entrelinha	Rizosfera	Linha	Entrelinha
	Soja			Trigo		
	P inorgânico extraído por NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (mg kg ⁻¹)					
SPD	310 Aa	295 Aa	140 Ab	364 Aa	245 Aa	188 Ab
SPC	228 Ba	214 Ba	136 Ab	279 Ba	138 Bb	142 Ab
	P orgânico extraído por NaOH 0,1 mol L ⁻¹ (mg kg ⁻¹)					
SPD	333 Aa	349 Aa	308 Aa	207 Ab	341 Aa	296 Aa
SPC	254 Ba	308 Ba	294 Aa	207 Ab	299 Aa	236 Aab
	P inorgânico extraído por HCl 1 mol L ⁻¹ (mg kg ⁻¹)					
SPD	104 Aa	102 Aa	23 Ab	92 Aa	80 Aa	32 Ab
SPC	28 Ba	32 Ba	17 Ab	32 Ba	21 Ba	20 Aa

Letras maiúsculas comparam sistemas de cultivo, e letras minúsculas comparam posições de amostragem. (Tukey, $p < 0.05$).

Frações não lábeis de P

Os teores de Pi extraídos com hidróxido de sódio (NaOH 0,5 mol L⁻¹) foram superiores no sistema plantio direto (SPD) em comparação ao preparo convencional (PC) em ambas as culturas, sem diferença entre rizosfera e linha, sendo ambos diferentes da entrelinha nos dois sistemas de manejo (Tabela 20). O hidróxido de sódio (NaOH 0,5 mol L⁻¹) extrai as mesmas frações de Pi extraídas pelo NaOH 0,1 mol L⁻¹ porém com maior grau de estabilidades, ou seja, formas mais estáveis cujas ligações são mais específicas, como as ligações bidentadas (PARFITT, 1975).

Em solos altamente intemperizados, como o Latossolo Vermelho distroférico utilizado neste trabalho, predominam as formas de fósforo inorgânicas ligadas à fração mineral com alta energia e as formas orgânicas estabilizadas física e quimicamente, que são extraídas pelo hidróxido de sódio (0,1 e 0,5 mol L⁻¹). As porcentagens dessas frações corresponderam de 48 a 51% do P total (Tabela 21), resultado que corrobora Pavinato; Dao; Rosolem (2010); Rodrigues et al. (2016).

O NaOH 0,5 mol L⁻¹ extrai também frações de Po (PoHID0,5) os quais não apresentaram significância para os fatores experimentais. O PoHID0,5 correspondem a frações orgânicas associadas a ácidos húmicos e fúlvicos dentro dos agregados cuja proteção física leva a ser classificadas como formas não lábeis de P (CONDRON et al., 1985).

Ácido sulfúrico (H_2SO_4), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e cloreto de magnésio ($MgCl_2$) extraíram a fração residual de P, que corresponde a frações de Pi que possuem alta estabilidade com os constituintes do solo e são classificados como formas não lábeis de P. A fração residual de P representou, em média, entre 25 e 33% do P total (Tabela 21).

Um ponto importante ligado à adsorção ou fixação de P no solo é a passagem de P-lábil para P-não lábil que, com o tempo, não estará mais em equilíbrio com o P em solução. O processo de envelhecimento do P no solo, que torna o elemento indisponível ou dificilmente disponível para a planta, ocorre, em grande proporção, de maneira rápida, num curto prazo, e prossegue de maneira gradual com o tempo, principalmente nos solos mais intemperizados com maior poder de adsorção de P (NOVAIS, R.F., SMYTH, 1999), como o solo deste estudo. As formas de P não lábil competem com a planta pelo P adicionado via adubação e conseqüentemente diminui a eficiência da adubação fosfatada.

Os teores de P total não variaram muito entre os sistemas de manejo, e a a forma inorgânica de P foi a predominante, com os seguintes valores médios: i) SPD soja: 67% Pi e 33% Po; ii) SPC soja: 65% Pi e 35% de Po; iii) SPD trigo: 69% Pi e 31% Po e iv) SPC trigo: 66% Pi e 34% Po (Tabela 18 e Figura 18). Abdala et al. (2015) observaram que o P acumulou preferencialmente em formas inorgânicas (aproximadamente 80% do P total), independentemente dos sistemas de manejo, que constaram de culturas anuais sob preparo convencional e plantio direto e pastagem que receberam adubação fosfatada ao longo de 10 a 40 anos com esterco suíno e esterco de laticínios. Outros autores, porém, indicam que o sistema de plantio direto de longo prazo poderia aumentar a participação da fração orgânica na disponibilidade de P com acúmulo preferencial de P sob formas orgânicas (Rheinheimer et al., 2002; Tiecher et al., 2012).

É provável que parte das diferenças entre os sistemas SPD e SPC, quanto aos teores das frações de P, resulte da adição diferenciada de P nas camadas mais superficiais do solo, pelo efeito de diluição, embora a dose de P empregada tenha sido a mesma para os dois sistemas. Isso acontece porque no SPD o P é aplicado na superfície do solo, sem incorporação, e no SPC o P é incorporado na camada arável. Além disso, no SPD, a reciclagem de P proveniente dos resíduos vegetais tende a mobilizar P de camadas subsuperficiais para a superfície do solo o que diminuiria o P total das camadas subsuperficiais e aumentaria nas superficiais. Por outro lado, a outra parte do P orgânico mineraliza, sendo que parte do P inorgânico liberado será absorvido pelas raízes e a outra será adsorvida ao solo em camadas superficiais, aumentando as formas de Pi e, conseqüentemente, o P total nessas camadas (OLIVEIRA,NOVAIS, ALVAREZ, 2002).

Tabela 17. Frações de P não lábil de amostras de um Latossolo Vermelho distroférico cultivado sob longa duração em sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC) com sucessão de soja e trigo.

Manejo	Posição			Posição		
	Rizosfera	Linha	Entrelinha	Rizosfera	Linha	Entrelinha
	Soja			Trigo		
	P inorgânico extraído por NaOH 0.5 mol L ⁻¹ (mg kg ⁻¹)					
SPD	322 Aa	335 Aa	212 Ab	336 Aa	316 Aa	238 Ab
SPC	262 Ba	226 Ba	211 Aa	277 Ba	224 Ba	221 Aa
	P orgânico extraído por NaOH 0.5 mol L ⁻¹ (mg kg ⁻¹)					
SPD	132 Aa	125 Aa	133 Aa	102 Aa	119 Aa	116 Aa
SPC	114 Aa	124 Aa	121 Aa	84 Aa	119 Aa	129 Aa
	P residual (mg kg ⁻¹)					
SPD	581 Aa	565 Aa	539 Aa	520 Aa	584 Aa	543 Aa
SPC	548 Aa	492 Bb	507 Aab	438 Bb	555 Aa	492 Aab

Letras maiúsculas comparam sistemas de cultivo, e letras minúsculas comparam posições de amostragem. (Tukey, p<0.05).

Tabela 18. Distribuição percentual das frações do fracionamento químico.

	P _{iRTA}	P _{iBIC}	P _{OBIC}	P _{iHID0.1}	P _{O_{HID}0.1}	P _{iHCl}	P _{iHID0.5}	P _{O_{HID}0.5}	Presid	P _{tot}
SPD soja										
Rizosfera	3	6	9	14	15	5	15	6	27	100
Linha	3	5	9	14	16	5	16	6	26	100
Entrelinha	2	3	11	9	19	1	13	8	33	100
SPC soja										
Rizosfera	3	6	10	13	14	2	15	6	31	100
Linha	3	6	10	12	18	2	13	7	28	100
Entrelinha	2	3	12	9	19	1	14	8	33	100
SPD trigo										
Rizosfera	5	7	11	17	10	4	16	5	25	100
Linha	3	5	9	12	17	4	15	6	29	100
Entrelinha	2	4	11	11	17	2	14	7	32	100
SPC trigo										
Rizosfera	6	8	11	16	12	2	16	5	25	100
Linha	2	3	11	8	18	1	14	7	34	100
Entrelinha	2	3	13	9	16	1	15	9	33	100

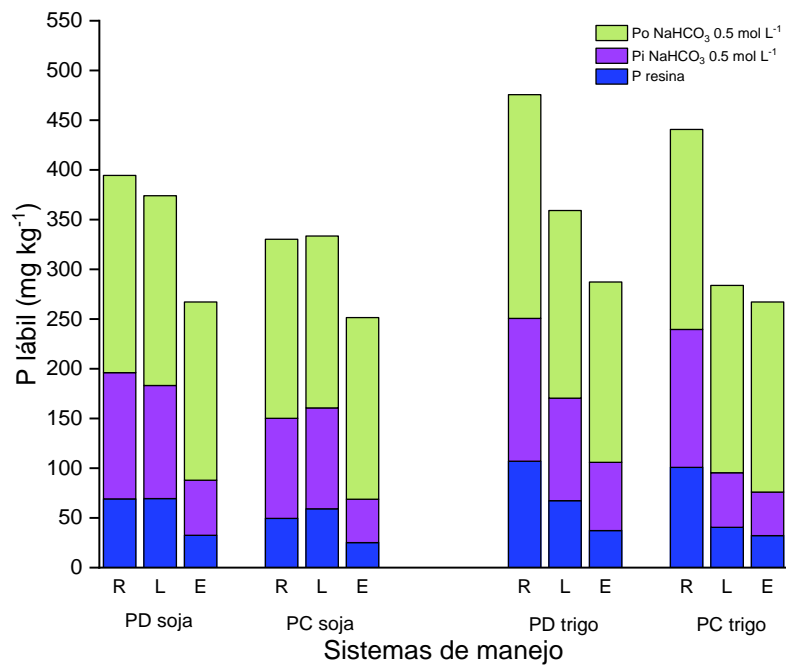


Figura 15. Frações de P lábil de amostras de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado em sucessão de soja e trigo sob longa duração em sistema plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC). (R = rizosfera; L = linha; EL = entrelinha)

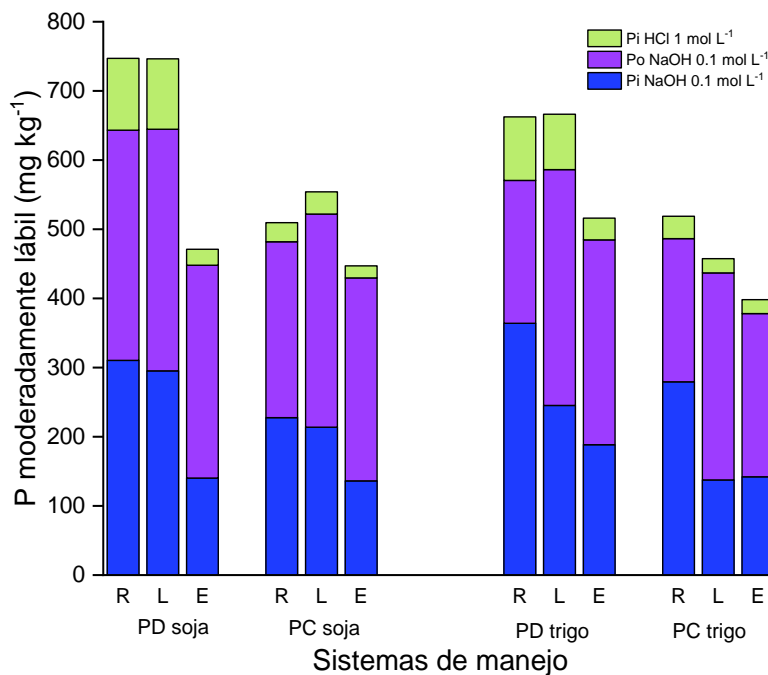


Figura 16. Frações de P moderadamente lábil de amostras de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado em sucessão de soja e trigo sob longa duração em sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (PC). (R = rizosfera; L = linha; EL = entrelinha)

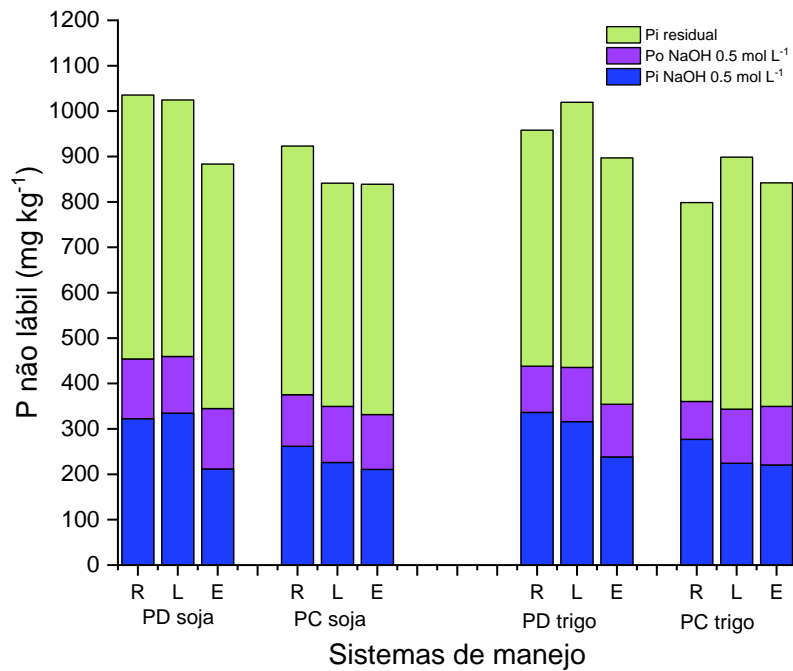


Figura 17. Frações de P não lábil de amostras de um Latossolo Vermelho distroférico cultivado em sucessão de soja e trigo sob longa duração em sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC). (R = rizosfera; L = linha; EL = entrelinha).

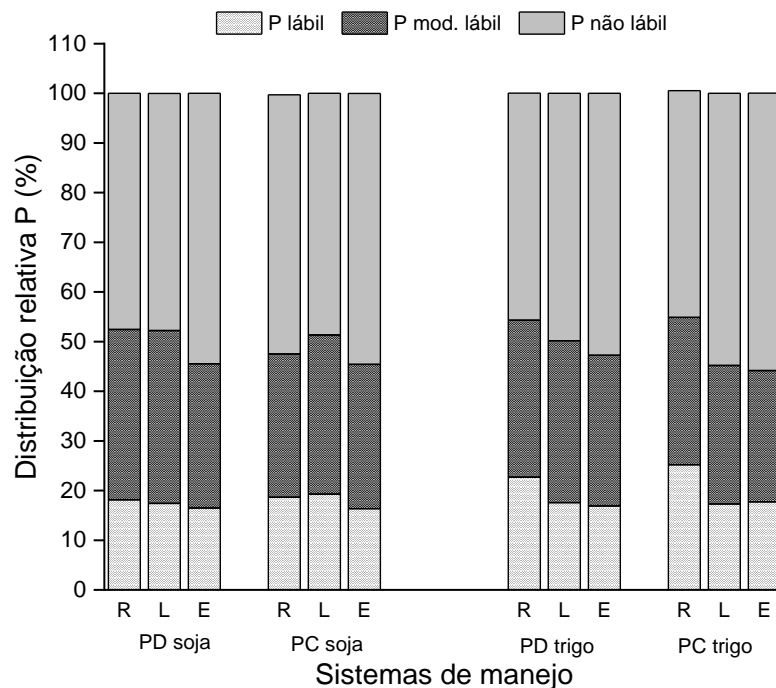


Figura 18. Distribuição relativa das frações de P lábeis, moderadamente lábeis e não lábeis em amostras de um Latossolo Vermelho distroférico cultivado em sucessão de soja e trigo sob longa duração em sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC). (R = rizosfera; L = linha; EL = entrelinha).

4.2. Análises microbiológicas

4.2.1. Carbono da biomassa microbiana

Os teores de carbono da biomassa microbiana do solo (CBM) foram superiores no SPD em relação ao SPC em ambas as culturas (Tabela 19 e Figura 19). No SPD observaram-se valores superiores de CBM na linha de semeadura, em relação à rizosfera e entrelinha, em ambas as culturas. Os valores de CBM no SPC não foram diferentes nas três posições de amostragem, em ambas as culturas (Tabela 19 e Figura 19).

Os coeficientes de correlação de Spearman entre o CBM e os atributos químicos do solo foram maiores no SPD em relação ao SPC (Tabela 20). No SPD, o CBM correlacionou positivamente com os teores de COT, pH, MO, Ca e Mg (Tabela 20). No SPD do trigo, as correlações foram de 0,72 ($p < 0,01$) com o COT, 0,91 ($p < 0,01$) com o pH, 0,86 ($p < 0,01$) com a MO, 0,61 ($p < 0,01$) com os teores Ca e 0,62 ($p < 0,01$) com os teores de Mg (Tabela 20). Assim, o SPD propiciou um microambiente na camada superficial, superficial mais estável em relação ao SPC, isto é, o não revolvimento do solo permitiu um microambiente mais equilibrado a microbiota do solo. Os microrganismos são integrantes vivos do solo influenciados por diversos fatores como a disponibilidade de carbono e nutrientes, pH, umidade e aeração etc.

O SPD propicia aumentos nos teores de carbono orgânico do solo e da biomassa microbiana na camada superficial, o que melhora a qualidade do solo (Bhattacharyya et al., 2009). Sá et. al. (2001) observaram aumento no teor de CO do solo na camada mais superficial (até 10 cm) em Latossolos do Paraná cultivados sob SPD, em comparação com a mata nativa, ocorreu devido à alta entrada de resíduos de culturas e à falta de perturbação do solo.

O sistema radicular tem influência direta na biomassa microbiana do solo. Os valores superiores da CBM na linha no SPD, de ambas as culturas (Tabela 19), podem estar relacionados também a amostragem de solo, isto é, o maior volume de sistemas radiculares na linha devido ao reduzido espaçamento entre plantas pode ter propiciado o incremento da CBM em relação às amostragens da rizosfera e a entrelinha de semeadura. Em sistemas de manejo que propiciam elevada deposição de resíduos orgânicos e grande quantidade de raízes ocorre estímulo da BMS, o que acarreta aumento populacional e aumento da atividade enzimática (Cattelan e Vidor, 1990).

No SPC, os valores da CBM semelhantes nas três posições de amostragem, em ambas as culturas (Tabela 19), o que pode ser explicado pela homogeneização da camada arável do solo como consequência do revolvimento do solo, que favorece as perdas da MOS por meio da destruição dos agregados, elevada fragmentação e incorporação dos resíduos vegetais ao solo, com consequente diminuição da cobertura do solo, que afeta diretamente a CBM (Balota et al,

1995). Arações e gradagens realizadas no SPC favorecem a diminuição do teor de MO do solo por meio do revolvimento do solo, o que afeta as propriedades químicas e fisiológicas do solo, bem como o microclima que regula os processos biológicos (ASLAM et al., 2013).

As comunidades microbianas do solo estão relacionadas a processos essenciais para a produtividade agrícola e a sustentabilidade do solo, e a estrutura dessas comunidades microbianas é simplificada em sistemas de manejo intensivo, como o SPC, resultando baixa estabilidade das funções bioquímicas no solo (FENG et al., 2003).

Balota et al. (1998) avaliaram o CBM por três anos em um Latossolo roxo distrófico sob SPD instalado há 20 anos em Londrina-PR e obtiveram aumento de 118% na CBM no SPD em relação ao SPC. Balota et al. (2003) conduziram experimento de longa duração sob SPD em Londrina-PR e inferiram que a maior quantidade de carbono imobilizado na biomassa microbiana sugere que a MO do solo sob SPD fornece níveis mais altos de formas de carbono mais lábil do que sistemas convencionais de cultivo.

Carter e Rennie (1982) estudaram uma cronossequência de solos do Canadá, formada por áreas manejadas 2, 4, 12 e 16 anos sob SPD e observaram aumento da BMS no solo em função do tempo de adoção do SPD. Matsuoka et al. (2003) detectaram que o CBM e outros indicadores biológicos foram sensíveis para indicar alterações provocadas pelos sistemas de manejo do solo em solos do Cerrado brasileiro.

Os resultados de nosso estudo corroboram resultados de diversos autores que avalaram a CBM em função dos sistemas de manejo do solo (BHATTACHARYYA et al., 2009; VENZKE FILHO et al., 2008; BALOTA et al., 1998, 2003; FENG et al., 2003; SIX et al., 2002; CARTER; RENNIE, 1982).

A palha deixada na superfície do solo no SPD favorece o acúmulo de MOS, protege a superfície do solo e, conseqüentemente, seus agregados da ação direta dos raios solares e do vento. Isso auxilia na diminuição da taxa de evaporação, o que permite o aumento da infiltração e armazenamento de água no solo e na manutenção da temperatura da camada mais superficial em relação a SPC. Assim, o SPD pode propiciar um microclima favorável a microbiota do solo em relação aos sistemas convencionais de manejo do solo.

Tabela 19. Efeito da interação do manejo do solo com a posição de amostragem sobre os teores de carbono da biomassa microbiana (CBM).

Manejo	Posição		
	Rizosfera	Linha	Entrelinha
	soja (mg kg ⁻¹)		
SPD	530 Ab	890 Aa	320 Ac
SPC	310 Ba	420 Ba	240 Aa
	trigo (mg kg ⁻¹)		
SPD	610 Ab	870 Aa	300 Ac
SPC	480 Ba	480 Ba	340 Aa

Letras maiúsculas comparam sistemas de cultivo, e letras minúsculas comparam posições de amostragem. (Tukey, $p < 0,05$).

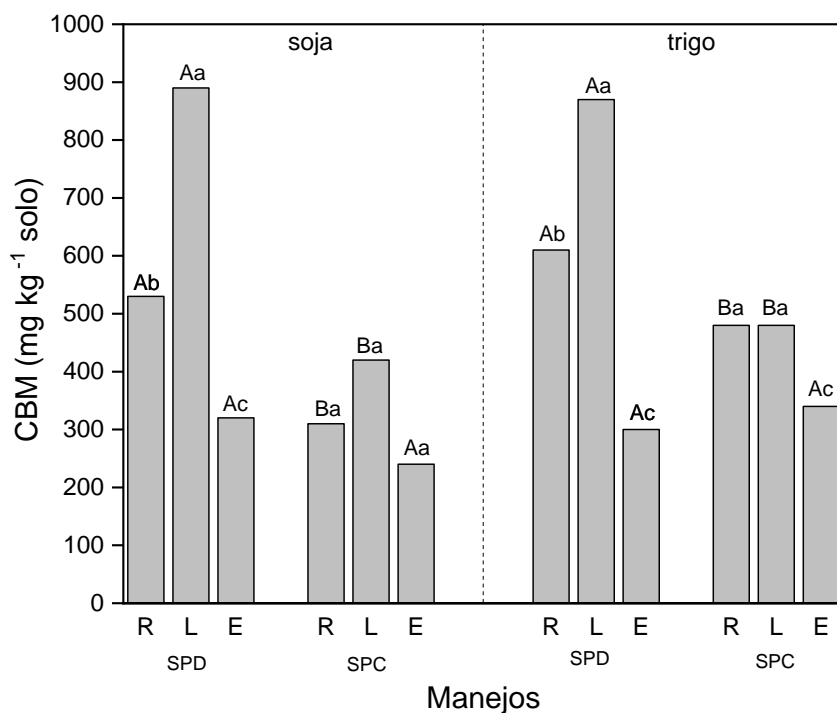


Figura 19. Carbono da biomassa microbiana de amostras de solo cultivado sob Sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC) amostrados na rizosfera (R), linha (L) e entrelinha (E) na soja (A) e trigo (B). Letras maiúsculas comparam os sistemas de manejo e as letras minúsculas comparam as posições de amostragem.

Tabela 20. Coeficientes de correlação de Spearman entre carbono da biomassa microbiana (CBM) e os atributos químicos de um Latossolo Vermelho distroférico sob sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC).

CBM	COD	COT	pH	MO	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al
Soja											
SPD	0,50	0,52	0,70*	0,30	0,33	-0,59*	-0,60*	0,63*	0,82**	-0,82**	-0,26
SPC	0,29	0,15	-0,20	-0,26	0,28	-0,62*	-0,59*	-0,51	-0,52	-0,23	-0,24
Trigo											
SPD	0,45	0,72**	0,91**	0,86**	0,54	-0,36	0,45	0,61*	0,62*	-0,50	-0,04
SPC	-0,65*	0,35	-0,03	-0,23	0,45	-0,46	0,32	-0,32	-0,03	0,20	0,39

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.2.2. Atividade de fosfatases

A atividade das fosfatases ácida e alcalina foram superiores no SPD em relação ao SPC em ambas as culturas (Tabela 21, Figuras 20 e 21). No SPD foram observados valores superiores na rizosfera e linha de semeadura e ambos diferentes da entrelinha, em ambas as culturas. No SPC os valores da atividade de ambas as enzimas não diferiram em todas as posições de amostragem de solo (Tabela 21), e esses resultados corroboram os resultados do CBM do solo (Tabela 19).

Solos cultivados com manejos conservacionistas, como preparo reduzido e sistema de plantio direto, geralmente, apresentam atividades enzimáticas mais altas em relação aos manejos convencionais que realizam o revolvimento da camada arável do solo com a utilização de arados e grades (ANGERS et al., 1993). O revolvimento do solo altera o grau de agregação do solo e aumenta a exposição da MOS ao ataque dos microrganismos. Por outro lado, os sistemas conservacionistas estimulam a formação e estabilização de agregados que atuam diretamente na proteção e manutenção da MO do solo (LOSS et al., 2015). Assim, a ação de revolvimento do solo no SPC pode explicar os valores inferiores da atividade das fosfatases em todas as posições de amostragem em relação ao SPD.

As enzimas atuam como catalisadores nas reações de hidrólise do fósforo orgânico e desempenham papéis importantes na ciclagem de fósforo, o que inclui a degradação de fosfolipídios (MATHEW et al., 2012). O fósforo pode ser liberado de compostos orgânicos no solo por três grupos de enzimas, dentre elas as fosfatases, que executam a desfosforilação das ligações fosfo-éster ou fosfoanidrida na matéria orgânica, sendo esta a principal atividade devido à presença predominante de seus substratos no solo (BEHERA et al., 2014). As enzimas

microbianas do solo são bons indicadores da qualidade do solo devido à sua resposta imediata a mudanças no manejo do solo e facilidade de medição (WEERASEKARA et al., 2016).

Observamos valores médios de atividade da fosfatase ácida de $900 \text{ mg kg}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$ de p-nitrofenol na rizosfera e linha do SPD da soja em relação a $367 \text{ mg kg}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$ de p-nitrofenol nas mesmas posições do SPC da soja (Tabela 21). Os valores também foram médios $450 \text{ mg kg}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$ de p-nitrofenol na rizosfera e linha do SPD do trigo em relação a $301 \text{ mg kg}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$ de p-nitrofenol nas mesmas posições do SPC do trigo (Tabela 21 e Figura 20). Esses valores da atividade da fosfatase ácida são semelhantes aos observados por Mathew et al. (2012), que avaliaram os efeitos de práticas convencionais de manejo e sistema de plantio direto de longo prazo na atividade enzimática do solo. Mathew et al. (2012) concluíram que os sistemas de preparo do solo influenciaram as comunidades microbianas do solo, sendo que o solo sob SPD apresentou teores superiores de fosfatases na profundidade de 0–5 cm em relação ao preparo convencional.

De modo geral, a maior atividade biológica do solo situa-se na camada de 0 a 20 cm de profundidade, devido à deposição e maior acumulação da MOS do material vegetal sob a superfície, além do efeito das raízes. Portanto, a matéria orgânica e o efeito rizosférico são função da cobertura vegetal do solo e têm influência direta sobre os microrganismos (RASCHE; CADISCH, 2013).

A produção das fosfatases é regulada por modificações bioquímicas em nível celular, desencadeadas primordialmente pela diminuição da absorção de P pelos microrganismos (RAGHOTHAMA, 1999). Em geral, as atividades das enzimas fosfatase da rizosfera são mais fortes que as enzimas fosfatase do solo não-rizosférico (CHEN; CHEN; WU, 2012). Assim, uma possível diminuição de fósforo na rizosfera e na linha de semeadura podem ter favorecido maior secreção das enzimas fosfatases, observados pelos valores superiores da atividade das enzimas fosfatases em relação à entrelinha de semeadura na cultura da soja.

Bactérias fixadoras de nitrogênio apresentam grande capacidade de produzir fosfatases, quando em condições de deficiência de P, com objetivo de manter altas concentrações de P nos nódulos em virtude da alta necessidade desse nutriente para a fixação biológica de nitrogênio (ARAÚJO; PLASSARD; DREVON, 2008). A soja possui associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (referência FBN), o que pode explicar os valores superiores da atividade das enzimas observadas na rizosfera e linha da cultura da soja, além de explicar os valores superiores observados em relação ao trigo, espécie que também possui associação com outras bactérias também capazes de fixar nitrogênio, porém sem formação de nódulos e com quantidades de N fixadas muito baixas.

Tabela 21. Efeito da interação do manejo do solo com a posição de amostragem na concentração das enzimas fosfatases ácida e alcalina.

Manejo	Posição			Posição		
	Rizosfera	linha	entrelinha	rizosfera	linha	entrelinha
	soja			trigo		
	Fosfatase ácida (mg kg ⁻¹ solo.hora)					
SPD	970 Aa	830 Aa	320 Ab	457 Aa	442 Aa	254 Ab
SPC	412 Ba	322 Ba	241 Aa	306 Ba	296 Ba	269 Aa
	Fosfatase alcalina (mg kg ⁻¹ solo.hora)					
SPD	435 Aa	390 Aa	48 Ab	202 Aa	193 Aa	68 Ab
SPC	46 Ba	72 Ba	44 Aa	47 Ba	66 Ba	74 Aa

Teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam sistemas de cultivo, enquanto as letras minúsculas comparam as posições de amostragem.

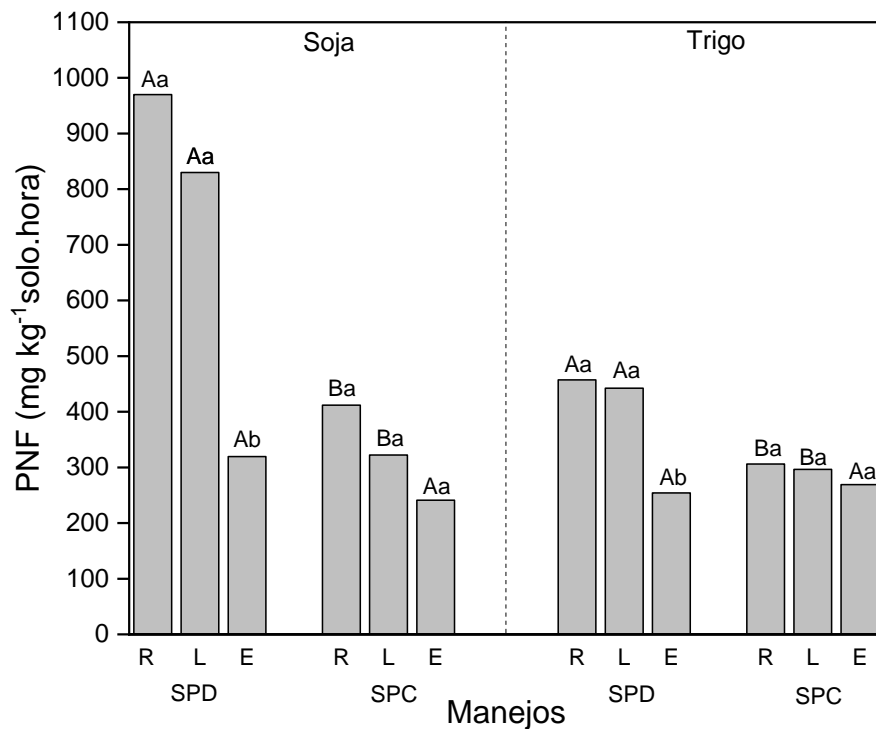


Figura 20. Fosfatase ácida de amostras de solo cultivado sob Sistema de Plantio direto (SPD) e Sistema de preparo convencional (SPC) amostrados na rizosfera (R), linha (L) e entrelinha (E) na soja (A) e trigo (B). Teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os sistemas de manejo, enquanto letras minúsculas comparam as posições de amostragem.

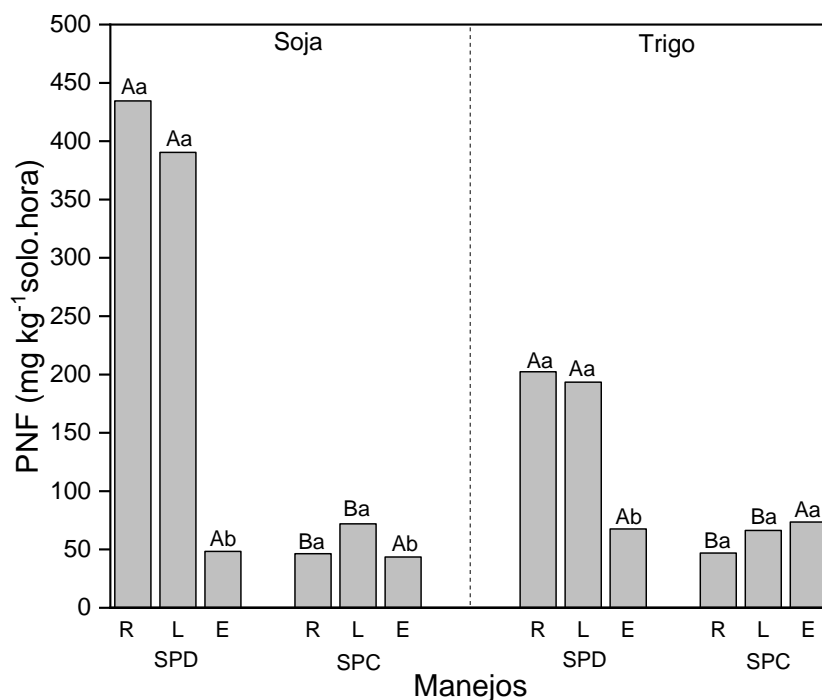


Figura 21. Fosfatase alcalina de amostras de solo cultivado sob Sistema de Plantio direto (SPD) e Sistema de preparo convencional (SPC) amostrados na rizosfera (R), linha (L) e entrelinha (E) na soja (A) e trigo (B). Teste de Tukey ($p < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os sistemas de manejo e as letras minúsculas comparam as posições de amostragem.

4.2.3. Quantificação de bactérias e fungos por PCR em tempo real – qPCR

O domínio Bacteria do solo não rizosférico (NR) e da rizosfera (R) foram quantificados por meio do número de cópias das regiões ITS1 e 5.8S específicas para este grupo em cada grama de solo. O tamanho do fragmento amplificado foi de 300 bp com uma eficiência de 102% com R2 de 0.99. Esta determinação resultou nos seguintes valores de cópias de bactérias nas amostras de solo cultivado com soja: 10^{11} (cem bilhões) na rizosfera e $9 \cdot 10^{10}$ (noventa bilhões) no solo não rizosférico sob SPD, $5 \cdot 10^{10}$ (cinquenta bilhões) na rizosfera e $4 \cdot 10^{10}$ (quarenta bilhões) no solo não rizosférico sob SPC (Figura 23). Para as amostras de solo cultivado com trigo os valores de número de cópias de bactérias obtidos foram: $2 \cdot 10^{10}$ (vinte bilhões) na rizosfera e no solo não rizosférico sob SPD e 10^{10} (dez bilhões) na rizosfera e $9 \cdot 10^9$ (nove bilhões) no solo não rizosférico sob SPC (Figura 24).

Os Fungos do solo não rizosférico (NR) e da rizosfera (R) foram quantificados por meio do número de cópias das regiões P1 (534) e P2 (341), específicas para este grupo em cada grama de solo. O tamanho do fragmento amplificado foi de 193 bp com eficiência de 93% com

R^2 de 0.99. Esta determinação resultou nos seguintes valores de cópias de fungos nas amostras de solo cultivado com soja: 2.10^8 (duzentos milhões) na rizosfera e 10^8 (cem milhões) no solo sob SPD, 2.10^8 (duzentos milhões) na rizosfera e solo sob SPC (Figura 23). Para as amostras de solo cultivado com trigo os valores de número de cópias de fungos obtidos foram: 2.10^8 (duzentos milhões) na rizosfera e 10^8 (cem milhões) no solo sob SPD e 9.10^7 (90 milhões) na rizosfera e 9.10^9 (nove bilhões) no solo sob SPC (Figura 24).

O solo é um dos ambientes mais densamente colonizados por microrganismos, com estimativa que existam 109 células microbianas por grama de solo (TORSVIK et al., 2007). Houve em nosso estudo predomínio do número de cópias de bactérias em relação aos fungos, com valores superiores no SPD em relação ao SPC em ambas as culturas (Figuras 23 e 24).

A comunidade bacteriana do solo é responsável por 25 a 30% da biomassa total e atua ativamente na decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes por meio de transformações bioquímicas específicas (MADIGAN et al., 2010). As bactérias do solo estão sujeitas a flutuações sazonais consideráveis nas condições ambientais, como temperatura, teor de água e disponibilidade de nutrientes (TORSVIK; ØVREÅS, 2002).

No SPD a semeadura é realizada sob os resíduos da cultura anterior com mobilização do solo apenas na linha de semeadura, o que promove um microclima favorável às comunidades microbianas, com manutenção dos macroagregados do solo, que são o habitat principal dos microrganismos (HUNGRIA, 2000) além da riqueza de nichos ecológicos e heterogeneidade das fontes de carbono (GRAYSTON et al., 2001). Ao contrário, as operações de aração e gradagem realizadas no SPC promovem intensa aeração e oscilação térmica e hídrica no solo que ocasionam alterações na biomassa microbiana do solo (DICK, 1992), as quais podem favorecer a diminuição da comunidade bacteriana no SPC, como observado neste estudo.

Diferentes práticas agrícolas afetam negativamente as comunidades biológicas do solo devido à perturbação induzida por fertilizantes químicos (BLANCHET et al., 2016; GEISSELER; SCOW, 2014; ZHAO et al., 2014; JANGID et al., 2008) controle de pragas (BERTRAND et al., 2015) e preparo do solo (POWLSON et al., 2011).

Experimentos de longa duração são necessários para definir atributos estáveis que podem auxiliar a sustentabilidade agrícola, bem como para avaliação criteriosa do efeito dos manejos do solo (Pereira et al., 2007). Mudanças nas comunidades microbianas do solo são frequentemente e fortemente correlacionadas com as diferenças nos atributos químicos do solo (ROUSK et al., 2010). A composição e a diversidade, em alguns casos, das comunidades bacterianas do solo estão frequentemente correlacionadas com o pH do solo (FIERER; BRADFORD; JACKSON, 2007; LAUBER et al., 2009). Os valores de pH do solo sob SPC do

nosso estudo levemente mais baixos (meio mais ácido) em comparação ao SPD nas três posições de amostragem (Tabela 8), o que pode ter influenciado a diferença de abundância das comunidades de fungos e bactérias, em relação ao SPD.

Em geral, houve maior abundância de bactérias e fungos na rizosfera em relação ao solo não rizosférico (Figuras 22 e 23). A microbiota do solo, devido a seu caráter oligotrófico, é pobre em compostos orgânicos energéticos para nutrição das plantas. Porém, secreta até 40% dos seus fotossintatos na rizosfera, o que eleva a densidade microbiana na rizosfera em relação ao solo (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). A comunidade microbiana presente na rizosfera é estruturada diferentemente da encontrada no solo, e essa diferença é motivada por dois tipos de seleção: (i) a presença de exsudatos radiculares que propicia alta disponibilidade de nutrientes; e (ii) o aumento da biomassa microbiana, que altera as condições ambientais na rizosfera (ANDREOTE; GUMIERE; DURRER, 2014). Cattelan et al. (1997) e Lynch (1984) destacaram que a rizosfera estimula diferentemente os microrganismos do solo, principalmente em função da espécie vegetal. Nas espécies leguminosas, como a soja, o estímulo é mais acentuado devido a baixa relação C/N e predomínio da comunidade bacteriana, enquanto nas gramíneas, como o trigo, a influência da rizosfera é maior devido ao abundante sistema radicular que é constantemente renovado.

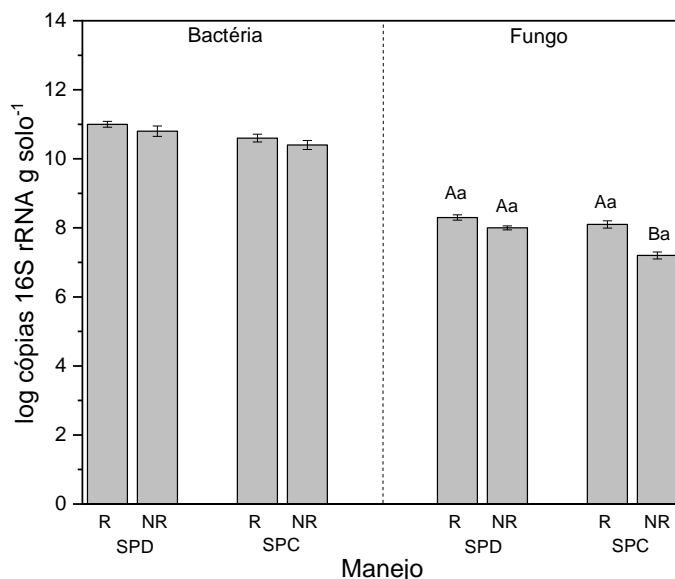


Figura 22. Número de cópias do gene 16S rRNA de Bactéria e Fungo de amostras de solo cultivado sob Sistema de Plantio Direto (SPD) e Sistema de Preparo Convencional (SPC) amostrados na rizosfera (R) e não rizosfera (NR) da soja. Letras maiúsculas comparam os sistemas de manejo, enquanto letras minúsculas comparam as posições de amostragem.

Houve semelhante abundância do número de cópias de fungos da ordem de milhões de cópias de células fúngicas, em ambos os sistemas de manejo (Figuras 23 e 24). Na cultura do trigo, no SPD, a abundância de fungos na rizosfera foi maior do que no solo (Figura 23). Hussain et al. (2011) estudaram a dinâmica temporal de comunidades oxidantes de amônia e desnitrificantes na rizosfera do arroz e encontraram abundância de fungos na rizosfera de arroz na ordem e 10^4 a 10^5 por grama de solo.

Wang et al. (2010) observaram que o SPD favoreceu a população de fungos do solo, com maiores índices de riqueza e diversidade e número total de espécies em relação aos sistemas de preparo convencionais com aração, além de evidenciarem que a rotação de culturas de trigo com soja em relação ao trigo com milho afetou a abundância relativa da comunidade fúngica.

Shukla et al. (2012) estudaram o efeito de concentrações de fósforo no solo no crescimento e colonização de fungos micorrízicos arbusculares e concluíram que houve redução na colonização de plantas por fungos micorrízicos nas doses mais altas (50 e $100 \mu\text{g g}^{-1}$) de fósforo disponível no solo, e esta diminuição foi maior em espécies não fixadoras de nitrogênio em relação às espécies fixadoras de nitrogênio. Em nosso estudo, observamos abundância de fungos semelhante entre as culturas de soja e trigo no SPD, porém no SPC a abundância de fungos na cultura do trigo foi menor do que na soja. Assim, podemos inferir que os teores de P disponíveis (média de 364 mg dm^{-3}) na rizosfera e linha de semeadura podem ter influenciado a colonização de fungos no SPC.

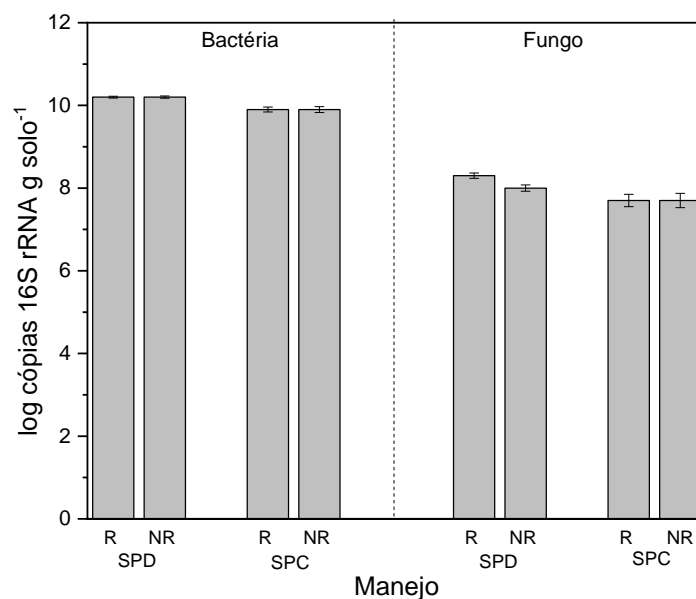


Figura 23. Número de cópias do gene 16S rRNA de bactérias (A) e fungos (B) de amostras de solo cultivado sob Sistema de Plantio direto (SPD) e Sistema de preparo convencional (SPC) amostrados na rizosfera (R) e não rizosfera (NR) do trigo.

Em relação a análise de redundância canônica (RDA) entre as variáveis biológicas e ambientais do solo sob SPD e SPC cultivado com soja (Figura 24), as variáveis ambientais que se relacionaram com as variáveis biológicas foram teores de potássio (K), alumínio (Al), matéria orgânica (MO) e carbono orgânico dissolvido (COD) ($p < 0,05$). As variáveis ambientais explicaram 69,8% da variabilidade dos dados, sendo 77,9 % explicada pelo eixo 1 e 15,3 % explicada pelo eixo 2. Pelo teste de Monte-Carlo, o primeiro eixo foi significativo ($p < 0,05$), assim como a soma de todos os eixos canônicos ($p < 0,05$), o que indica que as variáveis ambientais (K, Al, M.O e COD) tiveram influência significativa na distribuição das variáveis biológicas do solo cultivado com soja. Contudo, é importante destacar que a MO e K foram os fatores que contribuíram para separação entre os tratamentos (SPD e SPC) pela CP1 (Figura 24). A MO teve interação com a atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina, carbono da biomassa microbiana (CBM) e abundância de fungos. Contudo, a área com SPC teve maior relação com a abundância de bactéria (Figura 24).

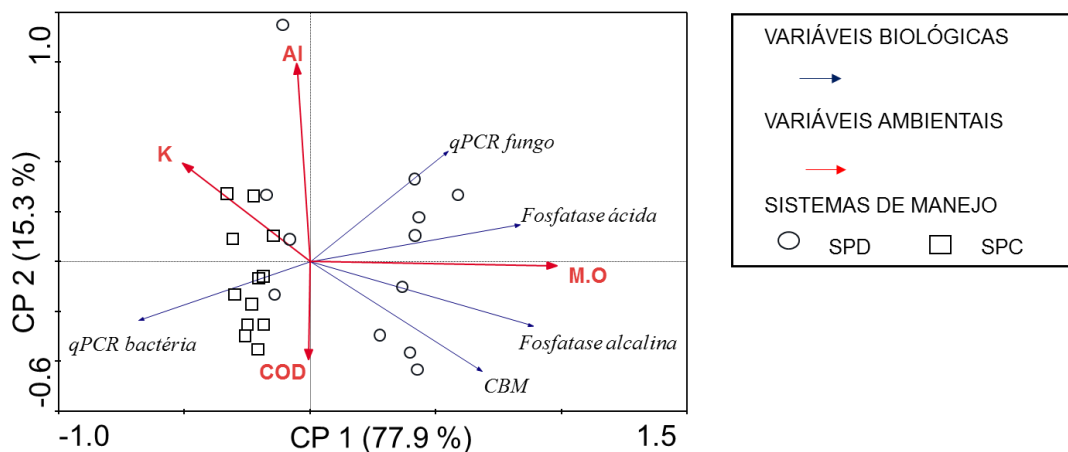


Figura 24. Análise de redundância canônica (RDA) entre as variáveis biológicas e ambientais do solo sob sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC) cultivado com soja.

A relação da MO com as variáveis biológicas no SPD era esperada, pois o crescimento e a atividade dos microrganismos do solo são limitados principalmente pela disponibilidade de carbono (DEMOLING; FIGUEROA; BÅÅTH, 2007). Observa-se, portanto, que o SPD de longa duração protege a MO da ação dos processos microbianos por meio do mínimo revolvimento do solo, o que favoreceu a relação da MO com as variáveis biológicas do solo.

Variações na abundância e diversidade microbiana podem ocorrer entre as estações do ano, que estão relacionadas em geral com o regime hídrico, clima da região, manejo do solo, teor e qualidade dos resíduos vegetais. Assim, em cada estação podem ocorrer diferentes comunidades microbianas com abundâncias diferentes entre as espécies (STRES; TIEDJE, 2006). A época de

amostragem pode ter favorecido a abundância de bactérias uma vez que as amostras foram coletadas após período intenso de chuvas do mês de janeiro de 2018. Isso ocorre porque as bactérias necessitam de água no solo para se desenvolverem mais do que a fungos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Dessa forma, a comunidade bacteriana encontrou condições adequadas para seu desenvolvimento.

Na Análise de redundância canônica (RDA) entre as variáveis do solo sob SPD e SPC cultivado com trigo (Figura 25), as ambientais que se relacionaram com as variáveis biológicas foram pH, M.O e K. As variáveis ambientais explicaram 67 % da variabilidade dados, sendo 81,9 % explicada pelo eixo 1 e 16,6 % explicada pelo eixo 2. Pelo teste de Monte-Carlo, o primeiro eixo foi significativo ($p < 0,05$), assim como a soma de todos os eixos canônicos ($p < 0,05$), o que indicando que as variáveis ambientais (pH, M.O e K) tiveram influência significativa na distribuição das variáveis biológicas do solo cultivado com trigo. De forma semelhante ao observado em soja, a MO foi o principal fator para a separação dos tratamentos pela CP1 (Figura 25). Contudo, ao contrário do observado na soja, tanto fungos quanto bactérias tiveram maior relação com o SPD na cultura do trigo.

O teor de MO do solo pode indicar o grau de fertilidade do solo e a abundância de microrganismos, isto é, tanto o aumento como a redução no teor de MO do solo podem prejudicar a sobrevivência e a atividade dos microrganismos, expressas por mudanças positivas ou negativas das propriedades agrícolas principalmente em função do manejo utilizado (MENDES; REIS JUNIOR, 2010).

O SPD é uma prática conservacionista do solo cuja premissa é reduzir as perdas de matéria orgânica. As propriedades microbianas respondem mais rapidamente às mudanças provocadas pelo preparo do solo e pela sucessão de culturas em relação aos teores totais de C e N do solo (BALOTA et al., 1998; MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2003), pois o carbono orgânico do solo é o principal substrato de alimentação das comunidades microbianas do solo (POWLSON et al., 2011). Assim, podemos inferir que a matéria orgânica do solo sob SPD auxiliou a sobrevivência e a atividade dos microrganismos na cultura do trigo, que foi observado pela correlação entre as variáveis biológicas e ambientais no SPD no eixo da componente principal, em relação ao SPC (Figura 25).

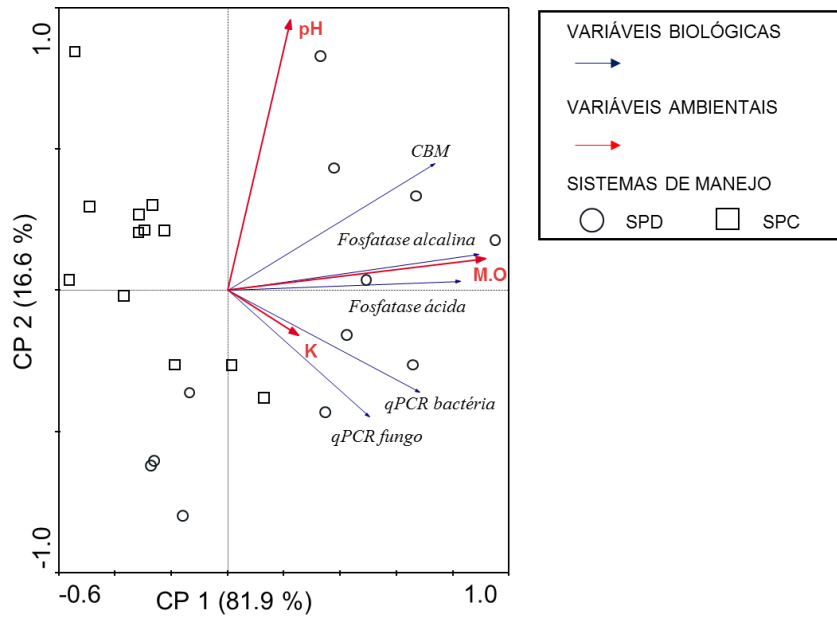


Figura 25. Análise de redundância canônica (RDA) entre as variáveis biológicas e ambientais do solo sob sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC) cultivado com trigo.

4.2.4. Estrutura de comunidades de bactérias e fungos por T-RFLP

A análise estatística não-paramétrica de escalonamento multidimensional (NMDS) e análise de similaridade (ANOSIM) com base nas unidades taxonômicas operacionais - UTOs do T-RFLP para os domínios Bactéria e Fungo evidenciaram a separação entre os sistemas de manejo do solo ($p < 0,01$) para a cultura da soja (Figura 26 a e b), apesar das sobreposições observadas ($R < 50$) (Tabela 22). Os valores de stress entre 0,05 e 0,1 indicaram boa precisão do ajuste da ordenação dos dados, isto é, os valores do stress confirmaram a confiabilidade dos dados em separar os sistemas de manejo do solo pelos dados do T-RFLP do domínio Bactéria para a cultura da soja.

De acordo com padrão estrutural mais homogêneo das UTOs observadas no SPD (Figura 26 a e b), pode-se inferir que o SPD favoreceu um ambiente mais estável aos microrganismos, ao contrário do observado no SPC, cujo padrão estrutural das UTOs foi mais disperso (Figura 26 a e b). Sistemas de manejo em que a comunidade microbiana do solo é pouco perturbada apresentam grande estabilidade, o que contribui para maior sustentabilidade (FERREIRA; WENDLAND; DIDONET, 2011) e, conseqüentemente, elevada resiliência.

As práticas agrícolas favorecem a redução da resiliência do solo pois são frequentemente correlacionadas com mudanças na estrutura das comunidades microbianas associadas às plantas. As práticas agrícolas promovem mudanças físicas e químicas na matriz do solo, o que influencia a maneira pela qual as plantas exercem a seleção de seu microbioma (ANDREOTE; GUMIERE;

DURRER, 2014), o que pode ter ocorrido neste estudo no SPC, cujo padrão estrutural das comunidades foi mais variado, quando comparado ao SPD (Figura 26 a e b).

A acumulação e, ou, diminuição de C e N orgânico é mais dinâmica nos solos arenosos, comparativamente aos mais argilosos, provavelmente pela maior capacidade de oxigenação e menor aporte de resíduos devido ao seu baixo potencial produtivo, o que lhe confere menor resiliência (Rheinheimer et al. 1998). O SPD pode conferir maior resiliência aos solos, principalmente os arenosos, mas também aos argilosos, como foi observado em nosso estudo conduzido com amostras de solo cultivado sob SPD há 36 anos, como com padrão estrutural mais homogêneo das UTOs observadas para acultura da soja (Figura 26 a e b).

A análise estatística não-paramétrica de escalonamento multidimensional (NMDS) e análise de similaridade (ANOSIM) com base nas UTOs do T-RFLP para os domínios bactéria e fungo não evidenciam a separação entre os sistemas de manejo do solo ($p < 0,01$) para a cultura do trigo (Tabela 22 e Figura 26 c e d).

Tabela 22. Valores de R da análise de similaridade (ANOSIM).

Cultura	Bactéria	Fungo
Soja	0,42 *	0,43 *
Trigo	0,088 ^{NS}	0,79 ^{NS}

* $p \leq 0,01$; ^{NS} não significativo.

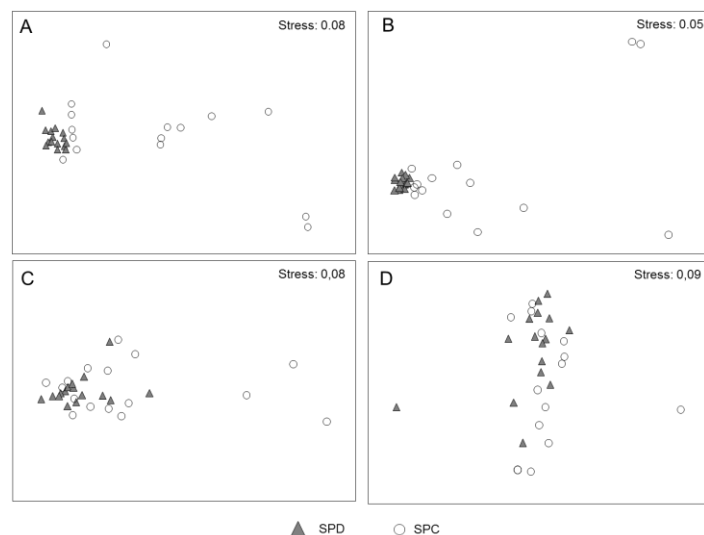


Figura 26. Teste não-paramétrico de escalonamento multidimensional (NMDS) das UTOs Bactéria soja (A), fungo soja (B), Bactéria trigo (C) e fungo trigo (D) presentes no solo sob sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC).

Na análise de redundância canônica (dbRDA) entre as variáveis ambientais e a abundância do domínio Bactéria (TRFL-P) do solo sob SPD e SPC cultivado com soja, os eixos canônicos explicam 46 % da variância, sendo que o primeiro eixo canônico explicou 48 % deste total e o segundo eixo 19.9 %. Pelo teste de Monte-Carlo, o primeiro eixo foi significativo ($p < 0,05$), assim como a soma de todos os eixos canônicos ($p < 0,05$) (Figura 27). As variáveis ambientais que favoreceram a separação entre SPD e SPC pela CP1 foram os teores de P ($\lambda = 0,08$ $p < 0,05$) e K ($\lambda = 0,16$ $p < 0,05$), e o teor de P teve correlação com o SPD e o teor de K correlação com o SPC.

O solo é um ambiente oligotrófico, isto é, com baixa disponibilidade de nutrientes, e apresenta zonas que possuem uma elevada atividade biológica devido à presença de fontes nutricionais biodisponíveis (MOREIRA; SIQUEIRA 2009). A biota do solo desempenha papel importante na redução das perdas de nutrientes pela imobilização temporária de nutrientes na biomassa. Além disso, comunidades biológicas específicas melhoram a absorção de nutrientes das plantas, como os fungos micorrízicos arbusculares (BLANCHET et al., 2016). As células microbianas são predominantemente compostas de C e N, mas também necessitam de fósforo (P) e enxofre (S), para função estrutural. Esses elementos são utilizados pela biomassa microbiana do conteúdo biodisponível no solo (KERTESZ; FROSSARD, 2015), como observado neste estudo pela relação entre os nutrientes e os sistemas de manejo do solo.

Na análise de redundância canônica (dbRDA) entre as variáveis ambientais e a abundância do domínio Bactéria (TRFL-P) do solo sob SPD e SPC cultivado com trigo, no teste de Monte-Carlo não foi observado diferença significativa entre as variáveis ambientais para separar os sistemas de manejo do solo, o primeiro eixo canônico não foi significativo ($p = 0,1760$), efeito semelhante foi observado nas análises de dbRDA com os dados de fungo (TRFLP) para ambas as culturas (soja e trigo) em que o teste de Monte-Carlo também não mostrou diferença significativa entre as variáveis ambientais para separar os sistemas de manejo do solo.

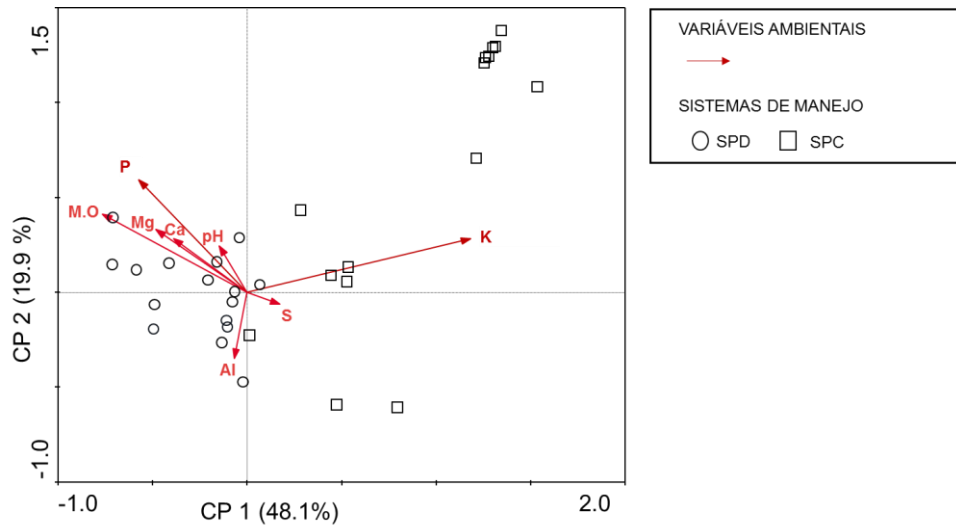


Figura 27. Análise de redundância canônica (dbRDA) entre as variáveis ambientais e a abundância do domínio Bactéria (TRFL-P) do solo sob sistema de plantio direto (SPD) e sistema de preparo convencional (SPC) cultivado com soja.

5. CONCLUSÕES

- Teores de P foram superiores no SPD em relação ao SPC, independentemente dos extartores.

- Houve predomínio da forma monovalente ($H_2PO_4^-$) na solução do solo em todos os tratamentos.

- O fósforo esteve ligado predominantemente a Al amorfo, gibbsita, goethita, hematita e ácido fítico.

- As frações de P na rizosfera e na linha de semeadura foram, em geral, semelhantes e superiores às frações de P na entrelinha de semeadura, devido ao efeito rizosférico e/ou do processo de amostragem do solo.

- Não houve variação entre a distribuição das formas P lábil, moderadamente lábil e não lábil entre todos os tratamentos.

- Os teores de carbono da biomassa microbiana do solo foram maiores no SPD, sendo superiores na linha de semeadura, em relação à rizosfera, em ambas as culturas.

- As atividades das fosfatases ácida e alcalina foram maiores no SPD, com teores semelhantes na rizosfera e na linha de semeadura, e maiores do que na entrelinha devido à proximidade do sistema radicular.

- O predomínio da abundância de bactérias em relação aos fungos nos dois sistemas de manejo do solo pode estar relacionado ao ambiente químico do solo mais favorável ao domínio Bactéria.

- O teor de matéria orgânica do solo foi o principal fator que contribuiu para distinção entre os manejos do solo, o que pode ter proporcionado ambiente mais estável à microbiota do solo da cultura da soja.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, F. Y. et al. Phosphorus mobility and degree of saturation in oxisol under no-tillage after long-term dairy liquid manure application. **Soil and Tillage Research**, v. 177, p. 45–53, 2018.
- AJIBOYE, B. et al. Phosphorus Speciation of Sequential Extracts of Organic Amendments Using Nuclear Magnetic Resonance and X-ray Absorption Near-Edge Structure Spectroscopies. **Journal of Environment Quality**, v. 36, n. 6, p. 1563, 2007.
- ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 74, n. 1–3, p. 19–31, 1999.
- ANDREOTE, F. D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, 2014.
- ARAÚJO, A. P.; PLASSARD, C.; DREVON, J. J. Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1–2, p. 129–138, 2008.
- ARRUDA COELHO, M. J. et al. Soil phosphorus fractions and legacy in a corn-soybean rotation on Mollisols in Kansas, USA. **Geoderma Regional**, v. 18, p.228, 2019.
- BALOTA, E. L. et al. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, n. 4, p. 641–649, 1998.
- BALOTA, E. L. et al. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 1, p. 15–20, 2003.
- BARBER, S. A. **Future prospects for soil chemistry**. Boyd, SP. ed. Soil Science Society of America, 1998. v. 96.
- BAYER, C. et al. Organic matter storage in a sandy clay loam Acrisol affected by tillage and cropping systems in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 54, n. 1–2, p. 101–109, 2000.
- BEARE, M. H. et al. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant and Soil**, v. 170, n. 1, p. 5–22, 1995.
- BEHERA, B. C. et al. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** Elsevier, 2014.
- BERTRAND, M. et al. Earthworm services for cropping systems. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 553–567, 2015.

- BHATTACHARYYA, R. et al. Soil aggregation and organic matter in a sandy clay loam soil of the Indian Himalayas under different tillage and crop regimes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 132, n. 1–2, p. 126–134, 2009.
- BLANCHET, G. et al. Responses of soil properties and crop yields to different inorganic and organic amendments in a Swiss conventional farming system. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 230, p. 116–126, 2016.
- BORKERT, C.M.; YORINORI, J.T.; CORREA-FERREIRA, B.S.; ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; SFREDO, G.J. **Seja o doutor da sua soja**. In: Informações Agronômicas, Piracicaba, n.66, Junho de 1994. 16p.
- BOWMAN, R. A.; COLE, C. V. An exploratory method for fractionation of organic phosphorus from grassland soils. **Soil Science**, v. 125, n. 2, p. 95–101, 1978.
- BÜCHI, L. et al. Long and short term changes in crop yield and soil properties induced by the reduction of soil tillage in a long term experiment in Switzerland. **Soil and Tillage Research**, v. 174, p. 120–129, 2017.
- BULGARELLI, D. et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013.
- CADEMENUN, B. Characterizing phosphorus in environmental and agricultural samples by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Talanta**, v. 66, n. 2, p. 359–371, 2005.
- CADE-MENUN, B. J. Characterizing phosphorus forms in cropland soils with solution ³¹P-NMR: past studies and future research needs. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 19, 2017.
- CADE-MENUN, B. J.; PRESTON, C. M. A comparison of soil extraction procedures for ³¹P nmr spectroscopy. **Soil Science**, v. 161, n. 11, p. 770–785, 1996.
- CADE-MENUN, B. J.; PRESTON, C. M. A COMPARISON OF SOIL EXTRACTION PROCEDURES FOR ³¹P NMR SPECTROSCOPY. **Soil Science**, v. 161, n. 11, p. 770–785, 1996.
- CADE-MENUN, B.; LIU, C. W. Solution phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy of soils from 2005 to 2013: A review of sample preparation and experimental parameters. *Soil Science Society of America Journal*. **Anais...**2014.
- CANELLAS, L. P. et al. Phosphorus analysis in soil under herbaceous perennial leguminous cover by nuclear magnetic spectroscopy. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 6, p. 589–596, 2004.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2016.

- CARTER, M. R.; RENNIE, D. A. Changes in soil quality under zero tillage farming systems: distribution of microbial biomass and mineralizable C and N potentials. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 62, n. 4, p. 587–597, 1982.
- CASAGRANDE, J. C. et al. Adsorção de fosfato e sulfato em solos com cargas elétricas variáveis. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 1, p. 51–59, 2003.
- CHAPUIS-LARDY, L.; BROSSARD, M.; QUIQUAMPOIX, H. Assessing organic phosphorus status of Cerrado oxisols (Brazil) using ^{31}P -NMR spectroscopy and phosphomonoesterase activity measurement. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 81, n. 5, p. 591–601, 2001.
- CHEN, Z. H.; CHEN, L. J.; WU, Z. J. Relationships among persistence of *Bacillus thuringiensis* and Cowpea trypsin inhibitor proteins, microbial properties and enzymatic activities in rhizosphere soil after repeated cultivation with transgenic cotton. **Applied Soil Ecology**, v. 53, n. 1, p. 23–30, 2012.
- CHUNG JONG BAE; ZASOSKI, R. J. Ammonium-potassium and ammonium-calcium exchange equilibria in bulk and rhizosphere soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 58, n. 5, p. 1368–1375, 1994.
- 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**, v. 36, n. 2, p. 199–207, 1985.
- CONTE, E.; ANGHINONI, I.; RHEINHEIMER, D. S. Frações de fósforo acumuladas em Latossolo argiloso pela aplicação de fosfato no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 5, p. 893–900, 2003.
- CROSS, A. F.; SCHLESINGER, W. H. A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. **Geoderma**, v. 64, n. 3–4, p. 197–214, 1995.
- DA SILVA, F. C.; VAN RAIJ, B. Disponibilidade de fósforo em solos avaliada por diferentes extratores. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 267–288, 1999.
- DE BONA, F.; DE MORI, C.; WIETHÖLTER, S. Manejo nutricional da cultura do trigo. International Plant Nutrition Institute- **IPNI**, 2017.
- DE CÁRCER, P. S. et al. Long-term effects of crop succession, soil tillage and climate on wheat yield and soil properties. **Soil and Tillage Research**, v. 190, p. 209–219, 2019.
- DEBIASI, H. et al. Sistemas de preparo do solo: trinta anos de pesquisas na Embrapa Soja. In: 1a edição ed. Londrina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / **Embrapa Soja**, 2013. p. 72.

- DEMOLING, F.; FIGUEROA, D.; BÅÅTH, E. Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 2485–2495, 2007.
- DICK, W. A.; TABATABAI, M. A. Determination of Orthophosphate in Aqueous Solutions Containing Labile Organic and Inorganic Phosphorus Compounds1. **Journal of Environment Quality**, v. 6, n. 1, p. 82, 1977.
- DORAN, J. W. et al. **Defining and Assessing Soil Quality**. In: Defining soil quality for a sustainable environment. Proc. symposium, Minneapolis, MN, SSSA/ASA; Special Publication, 35, 1994. p. 3–21.
- DOS 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**, v. 38, n. 2, p. 576–586, 2008.
- EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. Embrapa, 2017.
- OLIVEIRA, R.F. NOVAIS, V.H. ALVAREZ V., R. B. C. N. F. B. Fertilidade do Solo no Sistema Plantio direto. In: V. ALVAREZ, VÍCTOR HUGO; SCHAEFER R.G., CARLOS ERNESTO; BARROS DE FÉLIX, NAIRAM; MELLO V. WILSON, JAIME; COSTA MARCIANO, L. Tópicos em Ciência do solo Volume II - 2002. Viçosa: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2002. p. 692.
- FENG, Y. et al. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 12, p. 1693–1703, 2003.
- FERREIRA, E. P. DE B.; WENDLAND, A.; DIDONET, A. D. Microbial biomass and enzyme activity of a Cerrado Oxisol under agroecological production system. **Bragantia**, v. 70, n. 4, p. 899–907, 2011.
- FIERER, N.; BRADFORD, M. A.; JACKSON, R. B. TOWARD AN ECOLOGICAL CLASSIFICATION OF SOIL BACTERIA. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1354–1364, jun. 2007.
- FONTES, M. P. F.; ALLEONI, L. R. F. Electrochemical attributes and availability of nutrients, toxic elements, and heavy metals in tropical soils. *Scientia Agricola*, v. 63, n. 6, p. 589–608, 2006.
- GATIBONI, L. C. et al. Biodisponibilidade de formas de fósforo acumuladas em solo sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 31, n. 4, p. 691–699, 2007.
- GEE, G.W. AND BAUDER, J. W. Particle-Size Analysis. In: Klute, A., Ed., *Methods of Soil Analysis, Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. In: 2nd Editio ed. Madison: American Society of Agronomy/**Soil Science Society of America**, 1986. p. 383–411.
- GEISSELER, D.; SCOW, K. M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 75, p. 54–63, 2014.

- GRAYSTON, S. J. et al. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 4–5, p. 533–551, 2001.
- GREGORY, J. P. Plant Roots: Growth, Activity and Interaction with Soils. In: GREGORY, P. J. (Ed.). **Plant Roots: Growth, Activity and Interaction with Soils**. p. 1–318. 2006.
- GUSTAFSSON, J. P. **Visual MINTEQ | Visual MINTEQ** – a free equilibrium speciation model. Disponível em: <<https://vminteq.lwr.kth.se/>>. Acesso em: 13 mai. 2019.
- H. TIESSEN AND J. O. MOIR, “Characterization of Available P by Sequential Extraction,” In: M. R. Carter, Ed., **Soil Sampling and Methods of Analysis**, Lewis Publishers, Boca Raton, 1993, p. 75-86.
- HARGER, N. Faixas de suficiência para teores foliares de nutrientes em soja, definidas pelo uso do método DRIS, para solos de origem basáltica. 2008. 88 p. **Tese** (Doutorado em agronomia) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.
- HASHIMOTO, Y.; WATANABE, Y. Combined applications of chemical fractionation, solution ³¹P-NMR and P K-edge XANES to determine phosphorus speciation in soils formed on serpentine landscapes. **Geoderma**, v. 230–231, p. 143–150, 2014.
- HAYNES, R. J. Effects of liming on phosphate availability in acid soils. **Plant and Soil**, v. 68, n. 3, p. 289–308, 1982.
- 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 Incubations1. **Soil Science Society of America Journal**, v. 46, n. 5, p. 970, 1982.
- HESTERBERG, D. Macroscale Chemical Properties and X-Ray Absorption Spectroscopy of Soil Phosphorus. In: **Developments in Soil Science**. Elsevier, 2010. v. 34p. 313–356.
- HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. **Plant and Soil**, v. 237, n. 2, p. 173–195, 2001.
- HINSINGER, P. et al. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. **Plant and Soil**, v. 248, n. 1–2, p. 43–59, 2003.
- HUNGRIA, M. Características biológicas em solos manejados sob plantio direto. In: REUNIÓN DE LA RED LATINOAMERICANA DE AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 5., Florianópolis, 1999. **Anais**. Florianópolis, EPAGRI, 2000. CD-ROOM.
- HUSSAIN, Q. et al. Temporal dynamics of ammonia oxidizer (amoA) and denitrifier (nirK) communities in the rhizosphere of a rice ecosystem from Tai Lake region, China. **Applied Soil Ecology**, v. 48, n. 2, p. 210–218, 2011.

- JANGID, K. et al. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2843–2853, 2008.
- KÄMPF, N.; SCHEINOST, A. C.; SCHULZE, D. G. Oxide minerals. In: SUMNER, M. E. (Ed.). **Handbook of soil science**. University of Georgia, Athens, GA, USA: CRC Press, 2000. p. 125-168
- KELLY, S. D. et al. **Analysis of Soils and Minerals Using X-ray Absorption Spectroscopy**. In: *Methods of Soil Analysis*. Madison: Soil Science Society of America, 2008.
- KERTESZ, MICHAEL A; FROSSARD, E. Biological Cycling of Inorganic Nutrients and Metals in Soils and Their Role in Soil Biogeochemistry. In: **Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry**. Eldor A. P ed. London, UK: Elsevier, 2015. p. 582.
- KIZEWSKI, F. et al. Spectroscopic approaches for phosphorus speciation in soils and other environmental systems. **Journal of Environmental Quality**, v. 40, n. 3, p. 751–766, 2011.
- KOCHHANN, R. A, DENARDIN, J. E. E MANEJO DO SISTEMA PLANTIO DIRETO **Implantação e Manejo do Sistema Plantio Direto**. Passo Funfo - RS: Embrapa Trigo, 2000.
- KOVAR, J. L.; BARBER, S. A. Reasons for differences among soils in placement of phosphorus for maximum predicted uptake. **Soil Science Society of America Journal**, v. 53, n. 6, p. 1733–1736, 1989.
- LANTMANN F., ÁUREO; CASTRO, C. **Resposta da soja à adubação fosfatada**. In: YAMADA, TSUIOSHI; ABDALLA STIPP, S. R. (Ed.). *Fósforo na Agricultura Brasileira*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 2004. p. 726.
- LAUBER, C. L. et al. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5111–5120, 2009.
- LILLENFEIN, J. et al. Chemical fractionation of phosphorus, sulphur, and molybdenum in Brazilian savannah Oxisols under different land use. **Geoderma**, v. 96, n. 1–2, p. 31–46, 2000.
- LOMBI, E.; SUSINI, J. Synchrotron-based techniques for plant and soil science: Opportunities, challenges and future perspectives. **Plant and Soil**, 2009.
- LOSS, A. et al. Carbono orgânico total e agregação do solo em sistema de plantio direto agroecológico e convencional de cebola. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, p. 1212–1224, 2015.

- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C. & OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba, Potafos, 1997. 319p.
- MALTAS, A. et al. The effects of organic and mineral fertilizers on carbon sequestration, soil properties, and crop yields from a long-term field experiment under a Swiss conventional farming system. **Land Degradation & Development**, v. 29, n. 4, p. 926–938, 2018.
- MANCEAU, A.; MARCUS, M. A.; GRANGEON, S. Determination of Mn valence states in mixed-valent manganates by XANES spectroscopy. **American Mineralogist**, v. 97, n. 5–6, p. 816–827, 2012.
- MARSCHNER, H. **The Soil-Root Interface (Rhizosphere) in Relation to Mineral Nutrition**. Elsevier, 1995.
- MATHEW, R. P. et al. Impact of No-tillage and conventional tillage systems on soil microbial communities. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2012, 2012.
- MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 3, p. 425–433, 2003.
- MCDOWELL, R. W. et al. Processes controlling soil phosphorus release to runoff and implications for agricultural management. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 59, n. 3, p. 269–284, 2001.
- MEHRA, O.P.; JACKSON, M. L. Iron Oxide Removal from Soils and Clays by a Dithionite-Citrate System Buffered with Sodium Bicarbonate. **Clays and Clay Minerals**, v. 7, n. 1, p. 317–327, 1960.
- MENDES, I. C. et al. Bioindicadores para Avaliação da Qualidade dos Solos Tropicais: utopia ou realidade? Documentos, 246, v. 1, p. 32, 2009.
- MENDES, I. C. ; REIS JUNIOR, F. B. **Bioindicadores em sistemas de plantio direto e convencional**. Parte I. 29. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010.
- MENDES, I. D. C.; REIS JÚNIOR, F. B. DOS. Microorganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos Solos: uma análise crítica. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 26, 2003.
- MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

- MEURER, E.L.; RHEINHEIMER, D.S.; BISSANI, C.A. **Fenômenos de sorção em solos**. In: MEURER, E.J. (Ed.) Fundamentos de química do solo. 2.ed. Porto Alegre: Gênese, 2004. p.131-179.
- MOIR, J.; TIESSEN, H. **Characterization of Available P by Sequential Extraction**. In: Soil Sampling and Methods of Analysis, Second Edition. [s.l.] CRC Press, 2007. p. 75–86.
- MOORE, J. M.; KLOSE, S.; TABATABAI, M. A. Soil microbial biomass carbon and nitrogen as affected by cropping systems. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, n. 3–4, p. 200–210, 2000.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, n. C, p. 31–36, 1962.
- N. SIDIRAS; M. J. VIEIRA. Comportamento de um Latossolo Roxo Distrófico, compactado pelas rodas do trator na semeadura rendimentos de três culturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 10, p. 1285–1293, 1984.
- NASH, D. M. et al. Using organic phosphorus to sustain pasture productivity: A perspective **Geoderma**. Elsevier, 2014.
- NOLLA, A.; ANGHINONI, I. Atividade e especiação química na solução afetadas pela adição de fósforo em latossolo sob plantio direto em diferentes condições de acidez. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 6, p. 955–963, 2006.
- NORRISH, K.; TAYLOR, R. M. The isomorphous replacement of iron by aluminium in soil goethites. **Journal of Soil Science**, v. 12, n. 2, p. 294–306, set. 1961.
- NOVAIS, R.F., SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Univesidade Federal de Viçosa, 1999.
- NYE, P. H. Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. **Plant and Soil**, v. 61, n. 1–2, p. 7–26, 1981.
- OLIVEIRA, J. R. A.; MENDES, I. C.; VIVALDI, L. Carbono da biomassa microbiana em solos de cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo: avaliação dos métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 4, p. 863–871, 2001.
- PARFITT, R. L. Anion adsorption by soils and soil materials. In: BRADY, N.C. (Ed.) **Advances in Agronomy**, v.30. New York: Academic Press, Inc., 1978. p.01-46.
- PAVINATO, P. S.; MERLIN, A.; ROSOLEM, C. A. Phosphorus fractions in Brazilian Cerrado soils as affected by tillage. **Soil and Tillage Research**, v. 105, n. 1, p. 149–155, 2009.
- POWLSON, D. S. et al. Implications for Soil Properties of Removing Cereal Straw: Results from Long-Term Studies. **Agronomy Journal**, v. 103, n. 1, p. 279, 2011.

- PRASHAR, P.; KAPOOR, N.; SACHDEVA, S. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 13, n. 1, p. 63–77, 2014.
- RAGHOTHAMA, K. G. PHOSPHATE ACQUISITION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 50, n. 1, p. 665–693, 1999.
- RAIJ, B. VAN; ANDRADE, J.C.; CANTARELA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: IAC, 2001.
- RASCHE, F.; CADISCH, G. The molecular microbial perspective of organic matter turnover and nutrient cycling in tropical agroecosystems - What do we know? **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 3, p. 251–262, 2013.
- REBELLO, C.; TURETTA, A. P. D. Ferramentas para avaliação do potencial à prestação de serviços ambientais pelo sistema plantio direto. Comunicado Técnico 75. Rio de Janeiro: **Embrapa Solos**, 2017.
- RHEINHEIMER, D. D. S.; ANGHINONI, I. Distribuição do fósforo inorgânico em sistemas de manejo de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 1, p. 151–160, 2001.
- RHEINHEIMER, D. S. et al. Modificações em atributos químicos de solo arenoso sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, n. 4, p. 713–721, 1998.
- RODELLA, A. A. Introdução à especiação iônica em solução aquosa. Piracicaba. FEALQ, 2006.
- RODRIGUES, M. et al. Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical oxisols of the Brazilian savanna. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 1050–1061, 2016.
- ROSSI, C. et al. Efeito residual de fertilizantes fosfatados para o arroz: avaliação do fósforo na planta e no solo por diferentes extratores. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 1, p. 39–46, 1999.
- ROUSK, J. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME Journal**, v. 4, n. 10, p. 1340–1351, 2010.
- SÁ, J.C.M.; CERRI, C.C.; DICK, W.A.; LAL, R.; VENZKE FILHO, S.P.; PICCOLO, M.C. & FEIGL, B.E. Organic matter dynamic and carbon sequestration rates for a tillage chronosequences in a Brazilian Oxisol. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, 65:1486-1499, 2001.
- SANTOS, E. DE A.; KLIEMANN, J. H. DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO DE FOSFATOS NATURAIS EM SOLOS DE CERRADO E SUA AVALIAÇÃO POR EXTRATORES QUÍMICOS. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 3, p. 139–146, 2005.
- SAYERS, D. E.; STERN, E. A.; LYTTLE, F. W. New Technique for Investigating Noncrystalline Structures: Fourier Analysis of the Extended X-Ray—Absorption Fine Structure. **Physical Review Letters**, v. 27, n. 18, p. 1204–1207, 1971.

- SCHLINDWEIN, J. A.; ANGHINONI, I. Variabilidade horizontal de atributos de fertilidade e amostragem do solo no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 1, p. 85–91, 2000.
- SCHMIEDER, F. et al. Phosphorus speciation in a long-term manure-amended soil profile – Evidence from wet chemical extraction, ³¹P-NMR and P K-edge XANES spectroscopy. **Geoderma**, v. 322, p. 19–27, 2018.
- SHAHZAD, M. et al. Impact of different crop rotations and tillage systems on weed infestation and productivity of bread wheat. **Crop Protection**, v. 89, p. 161–169, 2016.
- SHI, Y. C. et al. Soil Phosphorus Fractions Change in Winter in a Corn-Soybean Rotation with Tillage and Phosphorus Fertilization. **Pedosphere**, v. 25, n. 1, p. 1–11, 2015.
- SHI, Y. C. et al. Soil Phosphorus Fractions Change in Winter in a Corn-Soybean Rotation with Tillage and Phosphorus Fertilization. *Pedosphere*, v. 25, n. 1, p. 1–11, 2015.
- SHUKLA, A. et al. Phosphorus threshold for arbuscular mycorrhizal colonization of crops and tree seedlings. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 1, p. 109–116, 2012.
- SIX, J. et al. Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils - Effects of no-tillage. **Agronomie**, v. 22, n. 7–8, p. 755–775, 2002.
- SONG, K. et al. Influence of tillage practices and straw incorporation on soil aggregates, organic carbon, and crop yields in a rice-wheat rotation system. **Scientific Reports**, v. 6, 4 nov. 2016.
- STRES, B.; TIEDJE, J. M. New Frontiers in Soil Microbiology: How to Link Structure and Function of Microbial Communities? In: **Nucleic Acids and Proteins in Soil**. Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 1–22.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. rev ed. Porto Alegre: UFRGS, Departamento de Solos, 1995.
- TIECHER, T. et al. Formas de fósforo inorgânico no solo sob diferentes preparos de solo e culturas de inverno por um longo período. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 1, p. 271–281, 2012.
- TIECHER, T. et al. Soil fertility and nutrient budget after 23-years of different soil tillage systems and winter cover crops in a subtropical Oxisol. **Geoderma**, v. 308, p. 78–85, 2017.
- TIEMANN, L. K. et al. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. **Ecology Letters**, v. 18, n. 8, p. 761–771, 2015.
- TURNER, B. L.; ENGELBRECHT, B. M. J. Soil organic phosphorus in lowland tropical rain forests. **Biogeochemistry**, v. 103, n. 1–3, p. 297–315, 2011.

- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Methods of chemical analysis for water and wastes**. Cincinnati, 1971.
- VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703–707, 1987.
- VENZKE FILHO, S. D. P. et al. Biomassa microbiana do solo em sistema de plantio direto na região de campos gerais - Tibagi, PR. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 32, n. 2, p. 599–610, 2008.
- VEZZANI, F. M.; MIELNICZUK, J. Uma visão sobre qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 33, n. 4, p. 743–755, 2009.
- WANG, Y. et al. Tillage, residue burning and crop rotation alter soil fungal community and water-stable aggregation in arable fields. **Soil and Tillage Research**, v. 107, n. 2, p. 71–79, 2010.
- WIETHÖLTER, S. **Fósforo no solo e a cultura do trigo**. In: YAMADA, TSUISHI; ABDALA STIPP, S. R. (Ed.). **Fósforo na Agricultura Brasileira**. Piracicaba-SP: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 2004. p. 726.
- WOLT, J. D. **Soil solution chemistry: applications to environmental science and agriculture**. Wiley, 1994.
- ZAMBROSI, F. C. B.; ALLEONI, L. R. F.; CAIRES, E. F. Liming and ionic speciation of an Oxisol under no-till system. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 2, p. 190–203, 2008.
- ZAMUNER, E. C.; PICONE, L. I.; ECHEVERRIA, H. E. Comparison of phosphorus fertilization diagnostic methods for wheat under no-tillage. **Soil and Tillage Research**, v. 89, n. 1, p. 70–77, 2006.
- ZHAO, S. et al. Responses of soil properties, microbial community and crop yields to various rates of nitrogen fertilization in a wheat-maize cropping system in north-central China. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 194, p. 29–37, 2014.
- ZIBILSKÉ, L.; BRADFORD, J.; SMART, J. Conservation tillage induced changes in organic carbon, total nitrogen and available phosphorus in a semi-arid alkaline subtropical soil. **Soil and Tillage Research**, v. 66, n. 2, p. 153–163, 2002.