Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Diversificação de sistemas de cultivo sob plantio direto e bioindicadores de qualidade do solo nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil

Caio Vinícius Cintra Diniz

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

Piracicaba
2019

Caio Vinícius Cintra Diniz
Engenheiro Agrônomo

Diversificação de sistemas de cultivo sob plantio direto e bioindicadores de qualidade do solo nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

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

Piracicaba
2019

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

Diniz, Caio Vinícius Cintra

Diversificação de sistemas de cultivo sob plantio direto e bioindicadores de qualidade do solo nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil / Caio Vinícius Cintra Diniz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

64 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Agricultura conservacionista 2. Rotação de culturas 3. Plantas de cobertura 4. Indicadores microbiológicos 5. Saúde do solo I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha filha Joana, que nasceu em meados deste curso de mestrado, desejando que a saúde dos solos seja um tema cada vez mais interessante para a sua e as próximas gerações.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria José e Aguinaldo, pelos valores e educação que me permitiram evoluir como pessoa e profissional.

À minha esposa Mayra e aos meus familiares, sobretudo Silvia e Plácido, por todo o incentivo e apoio que tornaram possível conquistar este tão sonhado objetivo.

Aos meus colegas de pós-graduação e do Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ/USP, especialmente Ana Luísa, Antonio Marcos, Armando, Betânia, Bruna, Caio César, Cátia, Danielle, Denise, Dorotéia, Felipe, Felipe Martins, Fernando Baldesin, Kelly, Marcos, Marcus (Polé), Rodrigo Taketani, Simone, Shilton, Sonia, Tobias, Victor e Yasmin, pela amizade e ajuda nas diversas etapas desde a elaboração do plano de pesquisa até a redação desta dissertação, passando pelas análises laboratoriais e estatísticas.

À Dra. Ana Paula do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, pelo apoio na realização das análises de T-RFLP.

Ao Prof. Fernando, por toda a atenção, ensinamento e incentivo durante o processo de orientação.

Ao Prof. Otto e aos meus colegas Acácio e Thales, pela parceria nesta pesquisa e apoio na coleta das amostras de solo.

À Profª. Elke, pelo acolhimento e encorajamento inicial.

À Dona Duda e à família Mata-Burro, pelo carinho e amizade muito além da graduação.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, pela boa estrutura e oportunidade de cursar este mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pelo suporte e confiança depositada em meu trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 147421/2017-9).

À Fundação Agrisus, pelo apoio financeiro que viabilizou a realização desta pesquisa (Projeto nº 2251/17).

Ao IPNI Brasil, à Fundação MT e à Fundação ABC, por colocarem à disposição suas equipes e áreas experimentais.

BIOGRAFIA

Natural de Franca - SP e filho de família mineira, viveu e estudou em algumas cidades do interior paulista até se mudar para Piracicaba - SP, onde cursou o bacharelado em Engenharia Agronômica pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP. Durante a graduação, interessou-se cada vez mais por temas relacionados à agricultura sustentável, participando de grupos de estágio ligados ao Departamento de Produção Vegetal e à Comissão de Cultura e Extensão Universitária da ESALQ/USP (GPF, PACES e Casa do Produtor Rural), assim como no Centro de Pesquisa Mokiti Okada - CPMO. Iniciou sua vida profissional em 2011 trabalhando como inspetor em uma certificadora de produtos orgânicos, chegando ao cargo de diretor. Em paralelo, continuou seus estudos por meio de um aperfeiçoamento em Agricultura Biodinâmica pelo Instituto Elo e um certificado em Ciências Holísticas e Economia para a Transição pelo Schumacher College. Desde 2016, trabalha como consultor em produção orgânica e sustentável, com foco em cafeicultura e saúde do solo.

EPÍGRAFE

"Quanto mais sabemos, melhor entendemos a vastidão de nossa ignorância e mais perguntas somos capazes de fazer, perguntas que, previamente, nem poderiam ter sido sonhadas."

Marcelo Gleiser

SUMÁRIO

RESUMO **8**

ABSTRACT **9**

LISTA DE FIGURAS **10**

LISTA DE TABELAS **12**

1. INTRODUÇÃO **13**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **15**

2.1. PRINCÍPIOS DA AGRICULTURA CONSERVACIONISTA 15
2.2. PRÁTICAS CONSERVACIONISTAS E ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO 17
2.3. BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO E PRODUTIVIDADE DOS CULTIVOS 19
2.4. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DO SOLO 21
2.4.1. Biomassa microbiana *21*
2.4.2. Atividade enzimática *22*
2.4.3. Estrutura da comunidade microbiana por T-RFLP *22*

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS **25**

3.1. HIPÓTESE 25
3.2. OBJETIVO GERAL 25
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25

4. MATERIAL E MÉTODOS **27**

4.1. DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS 27
4.2. COLETA, PREPARO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE SOLO 30
4.3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DO SOLO 30
4.3.1. Biomassa microbiana *31*
4.3.2. Atividade enzimática *31*
4.3.3. Estrutura da comunidade microbiana por T-RFLP *32*
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS 34

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **35**

5.1. EXPERIMENTO DE ITIQUIRA - MT 35
5.1.1. Atividade enzimática e biomassa microbiana *35*
5.1.2. Estrutura da comunidade microbiana por T-RFLP *45*
5.2. EXPERIMENTO DE PONTA GROSSA - PR 47
5.2.1. Atividade enzimática e biomassa microbiana *47*
5.2.2. Estrutura da comunidade microbiana por T-RFLP *53*
5.3. EXPERIMENTOS DE AMBAS AS REGIÕES 55

6. CONCLUSÕES **57**

REFERÊNCIAS **59**

RESUMO

Diversificação de sistemas de cultivo sob plantio direto e bioindicadores de qualidade do solo nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil

Um grande desafio enfrentado pela humanidade hoje é aumentar a produção agrícola e, ao mesmo tempo, minimizar seus impactos ambientais. A agricultura conservacionista, baseada nos princípios de revolvimento mínimo e cobertura permanente do solo, junto com a diversificação de culturas, é um modelo promissor de intensificação ecológica. No Brasil, tais princípios são colocados em prática desde os anos 1970 através do sistema plantio direto (SPD), atualmente adotado na maior parte das áreas de cultivo do país. Estudos mostram que a adoção de práticas conservacionistas melhora os atributos microbiológicos do solo, cuja qualidade é fundamental para se elevar a produtividade dos cultivos e a eficiência no uso de água e insumos. Entretanto, a adoção parcial do SPD é usual, deixando-se de lado a diversificação de culturas. Assim, esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos da diversificação de sistemas de cultivo sob plantio direto nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil sobre alguns atributos microbiológicos propostos como bioindicadores de qualidade do solo: carbono da biomassa microbiana (CBM), atividade enzimática (β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase) e estrutura da comunidade microbiana por T-RFLP. Amostras de solo foram coletadas nas profundidades de 0 - 10 cm, 10 - 20 cm e 20 - 40 cm, na fase de pós-colheita, em experimentos de média duração localizados em Itiquira - MT e Ponta Grossa - PR comparando diferentes sistemas de cultivo de grãos sob plantio direto denominados agrossistema regional (T1N3) e intensificação ecológica (T3N3), este último com maior diversidade de espécies vegetais. Em Itiquira - MT, também foram avaliados tratamentos de um experimento de média duração em área adjacente com monoculturas de soja sob plantio direto (RCS T1) e preparo convencional (RCS T8), assim como uma área próxima sob vegetação nativa (MATA). Além disso, em Ponta Grossa - PR, avaliaram-se tratamentos correspondentes sem adubação nitrogenada em cobertura no milho (T1N1 e T3N1). No experimento de Itiquira - MT, considerando a camada de 0 - 10 cm, a atividade da β-glicosidase foi maior no tratamento T3N3; a atividade da fosfatase ácida foi maior na área MATA, seguida por T3N3; a atividade da arilsulfatase foi mais elevada nos tratamentos T3N3 e T1N3. O CBM, considerando os valores médios das profundidades amostradas, foi maior na área MATA e no tratamento T1N3. Pela análise de T-RFLP da camada 0 - 10 cm, o tratamento T3N3 apresentou uma estruturação diferenciada das comunidades bacteriana e fúngica do solo em relação ao T1N3. Em Ponta Grossa - PR, a atividade média da β-glicosidase foi superior no tratamento T3N1, o qual apresentou, pela análise de T-RFLP da camada 0 - 10 cm, uma diferenciação na estrutura das comunidades bacteriana e fúngica do solo em relação ao T1N1. Conclui-se que, em Itiquira - MT, a diversificação de culturas promove aumento nas atividades de β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase na camada 0 - 10 cm, bem como uma diferenciação na estrutura da comunidade microbiana nessa camada. Em Ponta Grossa - PR, pode-se concluir que a diversificação de culturas, sem a adubação nitrogenada em cobertura no milho, promove aumento na atividade da β-glicosidase na média das profundidades amostradas, assim como uma estruturação diferenciada da comunidade microbiana na camada 0 - 10 cm.

Palavras-chave: Agricultura conservacionista; Rotação de culturas; Plantas de cobertura; Indicadores microbiológicos; Saúde do solo

ABSTRACT

Diversification of cropping systems under no-tillage and bioindicators of soil quality at the Midwest and South regions of Brazil

A major challenge facing mankind today is to increase agricultural production and, at the same time, minimize its environmental impacts. Conservation agriculture, based on the principles of minimum tillage and permanent soil cover, along with crop diversification, is a promising model of ecological intensification. In Brazil, such principles are put into practice since the 1970s through the no-tillage system (NT), currently adopted in most of the country's cropping areas. Studies show that the adoption of conservation practices improves the microbiological attributes of the soil, whose quality is key to raising crop productivity and use efficiency of water and inputs. However, the partial adoption of NT is usual, leaving aside crop diversification. Thus, this research aims to evaluate the effects of the diversification of cropping systems under no-tillage at the Midwest and South regions of Brazil on some microbiological attributes proposed as bioindicators of soil quality: microbial biomass carbon (MBC), enzymatic activity (β-glucosidase, acid phosphatase and arylsulfatase) and microbial community structure by T-RFLP. Soil samples were collected from 0 - 10 cm, 10 - 20 cm and 20 - 40 cm depths, at post-harvest stage, in mid-term experiments located at Itiquira - MT and Ponta Grossa - PR comparing different grain cropping systems under no-tillage called farmer practice (T1N3) and ecological intensification (T3N3), the latter with greater plant species diversity. At Itiquira - MT, treatments of a mid-term experiment on adjacent area with soybean monocultures under no-tillage (RCS T1) and conventional tillage (RCS T8), as well as a nearby area under native vegetation (MATA), were also evaluated. Moreover, at Ponta Grossa - PR, corresponding treatments without nitrogen topdressing in maize (T1N1 and T3N1) were evaluated. In the Itiquira - MT experiment, considering the 0 - 10 cm layer, β - glucosidase activity was higher in T3N3 treatment; acid phosphatase activity was higher in MATA area, followed by T3N3; arylsulfatase activity was higher in T3N3 and T1N3 treatments. The MBC, considering the average values of the sampled depths, was higher in MATA area and T1N3 treatment. By the T-RFLP analysis of the 0 - 10 cm layer, T3N3 treatment presented a differentiated structuring of soil bacterial and fungal communities in relation to T1N3. In Ponta Grossa - PR, the average β-glucosidase activity was superior in T3N1 treatment, which presented, in the T-RFLP analysis of the 0 - 10 cm layer, a differentiation in the structure of soil bacterial and fungal communities in relation to T1N1. It is concluded that, at Itiquira - MT, crop diversification promotes increased activities of β-glucosidase, acid phosphatase and arylsulfatase in the 0 - 10 cm layer, as well as a differentiation in the structure of the microbial community in this layer. At Ponta Grossa - PR, it can be concluded that crop diversification, without the nitrogen topdressing in maize, promotes an increase in the β-glucosidase activity in the average of the sampled depths, as well as a differentiated structuring of the microbial community in the 0 - 10 cm layer.

Keywords: Conservation agriculture; Crop rotation; Cover crops; Microbiological indicators; Soil health

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução do SPD no Brasil (DE FREITAS; LANDERS, 2014). 16

Figura 2. Atividade média de β-glicosidase em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT. Barras com as mesmas letras minúsculas, referentes à comparação entre tratamentos na mesma profundidade de amostragem, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....37

Figura 3. Atividade média de fosfatase ácida em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT. Barras com as mesmas letras minúsculas, referentes à comparação entre tratamentos na mesma profundidade de amostragem, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 37

Figura 4. Atividade média de arilsulfatase em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT. Barras com as mesmas letras minúsculas, referentes à comparação entre tratamentos na mesma profundidade de amostragem, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....38

Figura 5. Teor médio de carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos sob diferentes tratamentos considerando-se os valores médios das profundidades de amostragem em Itiquira - MT. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....38

Figura 6. Teor médio de carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Itiquira - MT. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....39

Figura 7. Atividade média de β-glicosidase obtida no experimento de Itiquira - MT, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, comparada com os limites críticos (LC) propostos por Lopes et al. (2018) para plantio direto (T1N3, T3N3 e RCS T1) e preparo convencional (RCS T8). 41

Figura 8. Atividade média de fosfatase ácida obtida no experimento de Itiquira - MT, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, comparada com os limites críticos (LC) propostos por Lopes et al. (2018) para plantio direto (T1N3, T3N3 e RCS T1) e preparo convencional (RCS T8). 42

Figura 9. Atividade média de arilsulfatase obtida no experimento de Itiquira - MT, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, comparada com os limites críticos (LC) propostos por Lopes et al. (2018) para plantio direto (T1N3, T3N3 e RCS T1) e preparo convencional (RCS T8). 42

Figura 10. Teor médio de carbono da biomassa microbiana (CBM) obtido no experimento de Itiquira - MT, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, comparado com os limites críticos (LC) propostos por Lopes et al. (2018) para plantio direto (T1N3, T3N3 e RCS T1) e preparo convencional (RCS T8).....43

Figura 11. Gráfico de dispersão obtido pela PCoA com índice de similaridade Bray-Curtis entre os diferentes tratamentos e profundidades de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade bacteriana do solo por T-RFLP em Itiquira - MT. 45

Figura 12. Gráfico de dispersão obtido pela PCoA com índice de similaridade Bray-Curtis entre os diferentes tratamentos e profundidades de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade fúngica do solo por T-RFLP em Itiquira - MT. 46

Figura 13. Atividade média de β-glicosidase em solos sob diferentes tratamentos considerando-se os valores médios das profundidades de amostragem em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 49

Figura 14. Atividade média de β-glicosidase em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....49

Figura 15. Atividade média de fosfatase ácida em solos sob diferentes tratamentos considerando-se os valores médios das profundidades de amostragem em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 50

Figura 16. Atividade média de fosfatase ácida em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 50

Figura 17. Atividade média de arilsulfatase em solos sob diferentes tratamentos considerando-se os valores médios das profundidades de amostragem em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 51

Figura 18. Atividade média de arilsulfatase em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 51

Figura 19. Teor médio de carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 52

Figura 20. Teor médio de carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 52

Figura 21. Gráfico de dispersão obtido pela PCoA com índice de similaridade Bray-Curtis entre os diferentes tratamentos e profundidades de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade bacteriana do solo por T-RFLP em Ponta Grossa - PR. 53

Figura 22. Gráfico de dispersão obtido pela PCoA com índice de similaridade Bray-Curtis entre os diferentes tratamentos e profundidades de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade fúngica do solo por T-RFLP em Ponta Grossa - PR..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes de interpretação para bioindicadores em Latossolo Vermelho argiloso do Cerrado, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, em função do teor de carbono orgânico do solo. Amostras de solo coletadas na fase de floração (LOPES et al., 2018). 20

Tabela 2. Tratamentos do experimento GMP instalado em Itiquira - MT. 28

Tabela 3. Tratamentos do experimento GMP instalado em Ponta Grossa - PR. 28

Tabela 4. Resumo da análise de variância para as variáveis β-glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e carbono da biomassa microbiana (CBM) em resposta a diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT. 35

Tabela 5. Análise de desdobramento com valores médios de atividade enzimática em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT. 36

Tabela 6. Valores médios para carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT. 36

Tabela 7. Classificação dos valores de bioindicadores obtidos no experimento de Itiquira - MT, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, de acordo com as classes de interpretação propostas por Lopes et al. (2018). 41

Tabela 8. Valores de *p* obtidos pela ANOSIM com índice de similaridade Bray-Curtis entre cada tratamento e profundidade de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade bacteriana do solo por T-RFLP em Itiquira - MT, significância não corrigida. 45

Tabela 9. Valores de *p* obtidos pela ANOSIM com índice de similaridade Bray-Curtis entre cada tratamento e profundidade de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade fúngica do solo por T-RFLP em Itiquira - MT, significância não corrigida. 46

Tabela 10. Resumo da análise de variância para as variáveis β-glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e carbono da biomassa microbiana (CBM) em resposta a diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Ponta Grossa - PR. 47

Tabela 11. Valores médios para β-glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Ponta Grossa - PR. 48

Tabela 12. Valores de *p* obtidos pela ANOSIM com índice de similaridade Bray-Curtis entre cada tratamento e profundidade de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade bacteriana do solo por T-RFLP em Ponta Grossa - PR, significância não corrigida. 54

Tabela 13. Valores de *p* obtidos pela ANOSIM com índice de similaridade Bray-Curtis entre cada tratamento e profundidade de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade fúngica do solo por T-RFLP em Ponta Grossa - PR, significância não corrigida. 54

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios enfrentados pela humanidade nos dias atuais é aumentar a produção de alimentos, fibras e energia para atender à crescente demanda mundial e, ao mesmo tempo, reduzir os impactos ambientais causados pela agricultura, em um cenário de incertezas econômicas e mudanças climáticas globais. A disseminação da agricultura conservacionista, baseada nos princípios de (1) revolvimento mínimo do solo, (2) cobertura permanente do solo com biomassa vegetal e (3) diversificação do sistema de cultivo, tem sido apresentada como um dos caminhos mais promissores frente a esse desafio de promover uma intensificação ecológica da produção agrícola (BOMMARCO; KLEIJN; POTTS, 2013; SCOPEL et al., 2013; PITTELKOW et al., 2015).

No Brasil, os princípios da agricultura conservacionista são colocados em prática desde a década de 1970 por meio do sistema plantio direto (SPD), hoje adotado em mais de 50% da área de grãos do país (DE FREITAS; LANDERS, 2014). Diversos estudos realizados em diferentes partes do mundo demonstram que a adoção de práticas conservacionistas promove efeitos positivos em atributos microbiológicos do solo, alguns dos quais têm sido propostos como bioindicadores de qualidade do solo (CARDOSO et al., 2013; BALOTA et al., 2014; HENNERON et al., 2014; MENDES, 2016; ZUBER; VILLAMIL, 2016; LOPES et al., 2018; NUNES et al., 2018). A comunidade microbiana desempenha funções de extrema importância no solo (ex.: formação e estabilização de agregados, ciclagem e mobilização de nutrientes) e, por isso, é um componente fundamental para se atingir o necessário aumento de produtividade nos sistemas de produção com maior eficiência no uso de água e insumos, ou seja, para que o agricultor possa produzir com melhor rendimento (BENDER; WAGG; VAN DER HEIJDEN, 2016).

Uma questão preocupante é que o SPD tem sido adotado apenas de forma parcial em grande parte dos casos, sendo a diversificação do sistema de cultivo, por meio da rotação e/ou consorciação de culturas, assim como o uso de plantas de cobertura, a prática menos adotada nas principais regiões produtoras de grãos do país (DEBIASI et al., 2015; GARCIA, 2016). Em vista disso, esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos da diversificação de sistemas de cultivo sob plantio direto sobre indicadores microbiológicos de qualidade do solo em experimentos de média duração nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil, sob condições de clima tropical e subtropical. Mais especificamente, este projeto busca avaliar o efeito da diversificação de culturas sobre a microbiota do solo por meio de métodos independentes de cultivo, quais sejam: o carbono da biomassa microbiana, as atividades das enzimas β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase e a estrutura das comunidades bacteriana e fúngica do solo pela técnica de *fingerprinting* denominada T-RFLP.

Espera-se que os tratamentos sob intensificação ecológica, ou seja, com maior diversidade de culturas no SPD, apresentem melhoria nos atributos microbiológicos do solo, evidenciada pelo aumento no teor de carbono da biomassa microbiana e na atividade enzimática, além de uma diferenciação na estrutura de sua comunidade microbiana. Consequentemente, esse melhor funcionamento biológico do solo poderá

levar a uma diminuição na resposta do milho à adubação nitrogenada, reduzindo assim a necessidade de aplicação de elevadas doses de nitrogênio para a obtenção de altas produtividades. Estes resultados são esperados de acordo com a literatura consultada, que aponta a ocorrência de valores mais elevados de biomassa, atividade e diversidade microbiana em sistemas que possuem maior diversidade de culturas em rotação. Isso ocorre, entre outros fatores, devido ao maior aporte de matéria orgânica pelo conjunto de plantas cultivadas no sistema, associado à maior diversidade de fontes de carbono orgânico disponibilizadas à biota do solo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Princípios da agricultura conservacionista

Nos primórdios da agricultura, praticava-se o mínimo revolvimento de solo. Os incas e os antigos egípcios, assim como a maioria das sociedades ditas primitivas em todo o mundo, praticavam uma espécie de "plantio direto" usando pedaços de madeira para fazer um buraco no solo, colocando as sementes com as mãos e cobrindo o buraco com os pés. No entanto, há aproximadamente 6.000 anos, agricultores já utilizavam arados de tração animal para expandir suas colheitas na Europa e na China. Mas foi somente nos séculos XVIII e XIX que o arado se tornou uma ferramenta cada vez mais sofisticada e, devido à sua eficácia no controle de plantas daninhas e ao posterior surgimento dos tratores, seu uso foi amplamente difundido nas potências europeias e, em seguida, nas colônias ao redor do mundo. Demorou décadas para se descobrir que a mesma ferramenta que trouxe relativa abundância de alimentos para a Europa provocaria erosão e degradação do solo em outras regiões, principalmente naquelas de clima mais quente (DERPSCH, 2004).

Na agricultura moderna, o cultivo sem o preparo mecânico do solo foi possível somente a partir do final da década de 1940 com o surgimento dos primeiros herbicidas, os quais possibilitaram a realização do controle químico de plantas daninhas em substituição ao controle efetuado pelo revolvimento do solo (TOLIVER et al., 2012). Estudos sobre preparo de solo conservacionista começaram nos Estados Unidos na década de 1930 em resposta a graves eventos de erosão eólica conhecidos como *Dust Bowl*, no entanto, essas pesquisas se intensificaram somente a partir dos anos 1960, quando o plantio direto (*no-tillage*) era adotado por agricultores pioneiros no estado do Kentucky (DERPSCH, 2004).

Após relevante contribuição de outros países como o Brasil, desenvolveu-se o conceito de agricultura conservacionista, o qual consiste em sistemas de produção agrícola que aplicam uma combinação de três princípios: (1) minimizar o revolvimento do solo, (2) manter o solo sempre coberto por plantas ou resíduos vegetais e (3) diversificar o sistema de cultivo através da rotação e/ou consorciação de culturas, incluindo o uso de plantas de cobertura (SCOPEL et al., 2013; HENNERON et al., 2014; LAL, 2015; FAO, 2019). Esse conceito se espalhou pelo mundo e, na safra 2015/2016, era adotado em 78 países em uma área de 180 milhões de hectares (KASSAM; FRIEDRICH; DERPSCH, 2019).

No Brasil, os princípios da agricultura conservacionista têm sido colocados em prática por meio do sistema plantio direto (SPD), originado na região Sul do país no início da década de 1970, especificamente nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, devido à ocorrência de severas perdas de solo por erosão hídrica e adotado de forma exponencial em diferentes regiões a partir dos anos 1990, com destaque para a região Centro-Oeste (Figura 1) (CASÃO JUNIOR; ARAÚJO; FUENTES LLANILLO, 2012; DE FREITAS; LANDERS, 2014; MENDES, 2016). As práticas conservacionistas inicialmente desenvolvidas para as condições de clima subtropical da região Sul do Brasil foram rapidamente adaptadas para o clima tropical do bioma Cerrado, favorecendo o processo de expansão da fronteira agrícola nessa região (DE FREITAS;

LANDERS, 2014). Na safra 2015/2016, a produção brasileira de grãos ocupava uma área de aproximadamente 58,3 milhões de hectares, sendo mais de 50% dessa área (32 milhões de hectares) dedicada ao SPD (CONAB, 2016; KASSAM; FRIEDRICH; DERPSCH, 2019). Na safra atual, a produção de grãos ocupa uma área superior a 63 milhões de hectares, concentrada em duas culturas, soja e milho, que correspondem a cerca de 84% da área total de grãos semeada no país (CONAB, 2019).

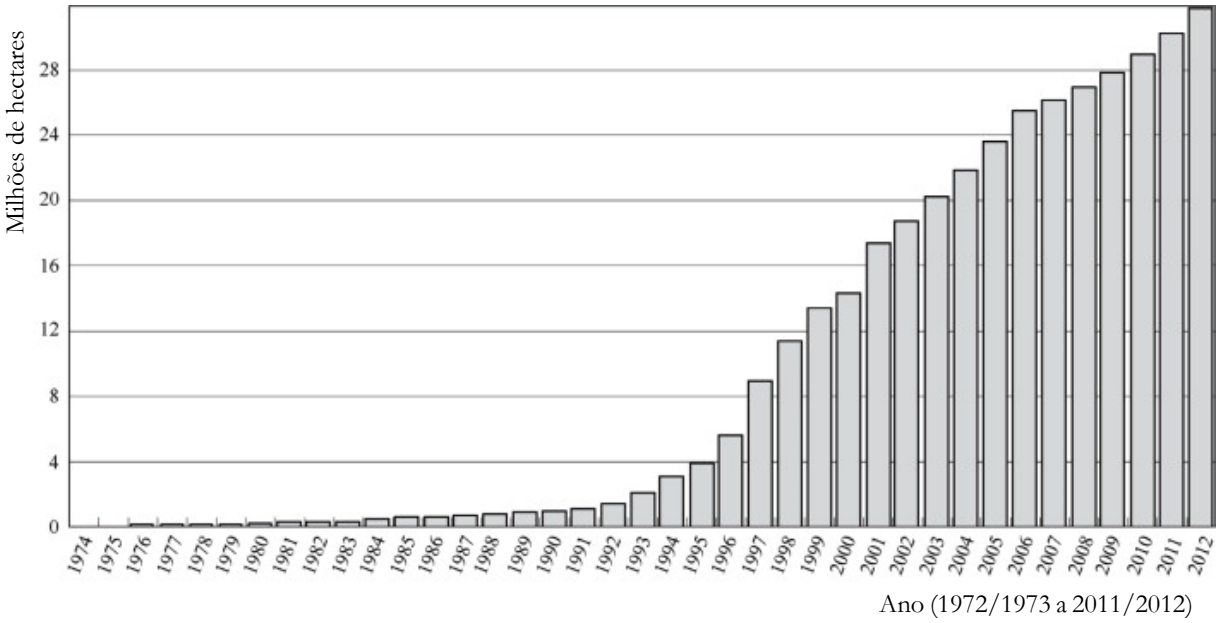

Figura 1. Evolução do SPD no Brasil (DE FREITAS; LANDERS, 2014).

De acordo com descrição apresentada no Plano ABC (BRASIL, 2012, p. 100–101)

> O Sistema Plantio Direto (SPD) consiste em um complexo de processos tecnológicos destinados à exploração de sistemas agrícolas produtivos, compreendendo 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. Esse sistema deve estar associado à agricultura conservacionista de forma a contribuir para conservação do solo e da água, aumento da eficiência da adubação, incremento do conteúdo de matéria orgânica do solo, aumento na relação benefício/custo, redução do consumo de energia fóssil e do uso de defensivos agrícolas, promovendo a mitigação da emissão dos gases de efeito estufa e contribuindo para o aumento da resiliência do solo.

No entanto, considerando os três princípios da agricultura conservacionista, a diversificação de culturas é a prática menos adotada no Brasil, o que pode limitar os benefícios proporcionados pelo SPD. Atualmente, nas principais regiões agrícolas do país, os sistemas de cultivo de grãos baseiam-se na sucessão (e não na rotação) de culturas, com destaque para: soja seguida de trigo e soja seguida de milho 2ª safra (DEBIASI et al., 2015; GARCIA, 2016). De acordo com Debiasi et al. (2015, p. 10) "A rotação de culturas é definida como sendo a alternância ordenada de diferentes culturas, em determinado espaço de tempo

(ciclo), na mesma área e na mesma estação do ano. Já a sucessão de culturas consiste no ordenamento de duas culturas na mesma área agrícola por tempo indeterminado, cada uma cultivada em uma estação do ano". Assim, sistemas de cultivo onde se pratica a rotação de culturas são mais complexos e possuem maior diversificação de espécies vegetais relativamente à sucessão de culturas. A monocultura, ou mesmo a contínua sucessão de uma limitada diversidade de culturas, simplifica demasiadamente o agroecossistema e provoca perdas na qualidade do solo e na produtividade dos cultivos, além de proporcionar condições mais favoráveis ao desenvolvimento de pragas, doenças e plantas invasoras (EMBRAPA, 2013). A diversificação do sistema de cultivo também pode ser obtida por meio da consorciação de culturas. Segundo Debiasi et al. (2015, p. 11) "A consorciação de culturas envolve o cultivo de duas ou mais espécies vegetais numa mesma área agrícola e em um mesmo período de tempo". No bioma Cerrado, por exemplo, o milho 2ª safra pode ser consorciado com forrageiras tropicais como a braquiária (ex.: *Urochloa ruziziensis*) com o objetivo de aumentar a cobertura do solo e a incorporação de biomassa vegetal (DEBIASI et al., 2015).

A adoção completa dos princípios conservacionistas que fundamentam o SPD traz comprovados benefícios para a sustentabilidade da agricultura como a mitigação da erosão e degradação do solo e a redução do custo de produção (principalmente pela ausência do preparo mecânico de solo), além da possibilidade de realizar mais safras durante o ano (SCOPEL et al., 2013; GILLER et al., 2015). Apesar do aumento de produtividade ser um benefício comumente associado à adoção do SPD, uma meta-análise realizada por Pittelkow (2015) demonstrou que somente a ausência do preparo mecânico de solo impacta negativamente na produtividade dos sistemas de cultivo (-9,9%) e que esse impacto é minimizado quando os demais princípios também são adotados (-2,5%). Esse estudo também mostrou que em cultivos de sequeiro sob clima "seco" (índice de aridez abaixo de 0,65) apenas o não revolvimento do solo provoca uma queda de produtividade (-11,9%), no entanto, quando os três princípios são adotados em conjunto, a produtividade é mais elevada (7,3%). Esses resultados demonstram a importância de se adotar o SPD de forma completa para atenuar possíveis quedas de produtividade, principalmente no caso de cultivos não irrigados em regiões com chuvas insuficientes ou irregulares.

2.2. Práticas conservacionistas e atributos microbiológicos do solo

A fração viva do solo, composta por uma ampla diversidade de organismos, desempenha funções de suma importância nos (agro)ecossistemas, como a decomposição de resíduos orgânicos, a fixação biológica de nitrogênio e o auxílio às plantas na absorção de nutrientes (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Além disso, destaca-se o papel da microbiota e da fauna edáfica na agregação do solo, o que contribui para a formação de poros, a circulação de ar e água e o desenvolvimento radicular (SALTON; MIELNICZUK; BAYER, 2008). No entanto, a intensificação agrícola, caracterizada pelo frequente preparo mecânico do solo, a baixa diversidade de plantas e o intensivo uso de insumos, interfere na estruturação da fração viva do solo e limita suas funcionalidades por criar condições desfavoráveis a inúmeros organismos que habitam

esse ambiente. Por outro lado, a intensificação ecológica é apresentada como um novo paradigma agrícola que se baseia na substituição do uso de insumos artificiais por uma melhor gestão dos processos ecológicos, a fim de contar mais eficientemente com a autorregulação do agroecossistema (HENNERON et al., 2014).

Tanto em condições tropicais como em temperadas, a atividade e a diversidade biológica do solo apresentam-se melhor estruturadas em sistemas de cultivo que adotam práticas conservacionistas (SCOPEL et al., 2013). Além disso, a minimização do revolvimento do solo, associada ao aumento do retorno de resíduos culturais no SPD, diminui a erosão e aumenta o teor e a diversificação das formas de carbono orgânico do solo (BALOTA et al., 2014). A rotação e/ou consorciação de culturas e o uso de plantas de cobertura também são práticas importantes, as quais podem alterar as condições do ambiente edáfico, afetando a disponibilidade de nutrientes, a profundidade de enraizamento, a quantidade e a qualidade dos resíduos orgânicos, a agregação do solo e o habitat para as comunidades microbianas, podendo assim estimular a atividade e a diversidade microbiana do solo (BALOTA et al., 2014). Isso tudo resulta em um melhor funcionamento biológico do sistema e um aprimoramento nos processos de promoção do crescimento de plantas e suprimento de suas necessidades pela atividade de distintos organismos do solo.

Uma meta-análise realizada por Zuber e Villamil (2016) demonstrou que a biomassa microbiana e a atividade enzimática do solo são, em geral, maiores em sistemas de cultivo nos quais não se realiza o preparo mecânico do solo (*no-tillage*) em relação ao sistema de preparo convencional (SPC). Além disso, diversos estudos analisados por McDaniel, Tiemann e Grandy (2014) mostram que a inclusão de uma ou mais culturas em rotação a uma monocultura provoca um aumento substancial (20,7%) no teor de carbono da biomassa microbiana do solo. Esse resultado é corroborado por Chen et al. (2019) que constataram um aumento na biomassa microbiana de solos com maior diversidade de plantas em estudos realizados em diferentes ecossistemas, incluindo florestas naturais e plantadas, pastagens cultivadas, lavouras e recipientes plantados. Em outra meta-análise, Venter, Jacobs e Hawkins (2016) verificaram que solos sob uma maior diversidade de culturas em rotação apresentam valores mais elevados de riqueza e diversidade microbiana.

No Brasil, os primeiros estudos comparando atributos microbiológicos de solos sob SPD e SPC foram realizados a partir da década de 1980 e, no período de 2000 a 2014, foram publicados 58 artigos abordando aspectos relacionados à biomassa, atividade e diversidade microbiana de solos sob SPD (MENDES, 2016). Por exemplo, em Latossolo argiloso no Cerrado, Mendes et al. (2003) observaram maior teor de carbono da biomassa microbiana e maiores atividades das enzimas β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase em agregados de solo sob SPD em relação ao SPC. Vale destacar que tais atributos, dentre outros, podem ser interpretados como indicadores microbiológicos (bioindicadores) de qualidade do solo (CARDOSO et al., 2013; MENDES; SOUSA; REIS JUNIOR, 2015). A biomassa e a atividade microbiana do solo são importantes não apenas como indicadores, já que desempenham um papel fundamental na ciclagem e fornecimento de nutrientes às plantas. A biomassa microbiana imobiliza quantidades significativas de nutrientes e, consequentemente, reduz o potencial de perda desses elementos, por exemplo, inibindo perdas de nitrogênio por lixiviação ou desnitrificação. Isso sugere que um dos benefícios do uso de plantas de cobertura é incrementar a biomassa microbiana e, assim, utilizá-la como uma substancial reserva de nutrientes para as culturas agrícolas (BALOTA et al., 2014). Além disso, conforme destacado por

Wittwer et al. (2017), vários estudos indicam que as plantas de cobertura poderiam substituir o uso de insumos e melhorar a produtividade dos sistemas de cultivo.

2.3. Bioindicadores de qualidade do solo e produtividade dos cultivos

De acordo com definição de Doran e Parkin (1994, 1996), qualidade do solo é "a capacidade de um solo funcionar, dentro dos limites de um ecossistema natural ou manejado, para sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde de plantas e animais" (BÜNEMANN et al., 2018). Nesse contexto, torna-se cada vez mais evidente a importância da biota edáfica para o funcionamento dos solos agrícolas e a consequente maximização da produtividade dos cultivos, minimizando-se o uso de recursos externos (BENDER; WAGG; VAN DER HEIJDEN, 2016).

Entre os parâmetros utilizados para caracterizar o componente biológico dos solos, destacam-se as avaliações de biomassa, atividade e diversidade microbiana (MENDES et al., 2011). Alguns desses atributos microbiológicos, como o teor de carbono da biomassa microbiana e as atividades das enzimas β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase, têm sido propostos como bioindicadores de qualidade do solo, os quais permitem detectar, com maior antecedência que os atributos químicos e físicos, alterações que ocorrem no solo devido a seu uso e manejo (CARDOSO et al., 2013; MENDES; SOUSA; REIS JUNIOR, 2015). Até o momento, foram realizados alguns estudos pioneiros relacionando níveis críticos de cada um desses bioindicadores ao rendimento acumulado de grãos e ao teor de carbono orgânico do solo, especificamente no âmbito da produção de soja e milho em Latossolos de textura argilosa no Cerrado brasileiro (Tabela 1) (LOPES et al., 2013, 2018). Necessita-se, portanto, de um maior número de estudos para a definição de classes de interpretação de bioindicadores (ex.: baixo, moderado e adequado) para as diferentes culturas agrícolas e ambientes edafoclimáticos.

Tabela 1. Classes de interpretação para bioindicadores em Latossolo Vermelho argiloso do Cerrado, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, em função do teor de carbono orgânico do solo. Amostras de solo coletadas na fase de floração (LOPES et al., 2018).

	Classes de interpretação		
Bioindicador	**Baixo**	**Moderado**	**Adequado**
	Plantio Direto		
CBM	≤ 245	246 – 440	> 440
β-Glicosidase	≤ 90	91 – 225	> 225
Fosfatase ácida	≤ 700	701 – 1260	> 1260
Arilsulfatase	≤ 25	26 – 145	> 145
	Preparo Convencional		
CBM	≤ 235	236 – 375	> 375
β-Glicosidase	≤ 100	101 – 185	> 185
Fosfatase ácida	≤ 660	661 – 940	> 940
Arilsulfatase	≤ 45	46 – 105	> 105

Valores de carbono da biomassa microbiana (CBM) expressos em mg C kg^{-1} solo; valores de atividade enzimática expressos em mg *p*-nitrofenol kg^{-1} solo h^{-1}.

Em relação à diversidade microbiana, primeiramente vale ressaltar que as plantas selecionam microrganismos específicos para ocuparem sua rizosfera, os quais são caracterizados principalmente pelo genótipo da planta e atributos do solo, importantes moduladores da estrutura da comunidade microbiana na rizosfera (BERG; SMALLA, 2009). Assim, comunidades microbianas presentes na rizosfera de diferentes espécies vegetais cultivadas em um mesmo tipo de solo são diferenciadas. Isso indica que as plantas são capazes de moldar a composição da microbiota em sua rizosfera, notadamente através da secreção ativa de compostos, os quais estimulam ou reprimem especificamente alguns membros da comunidade microbiana do solo (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Uma alta diversidade microbiana está relacionada à ocorrência de uma alta diversidade de plantas e/ou resíduos orgânicos incorporados ao sistema de produção. Considerando a prática da diversificação de culturas, a estrutura diferenciada de sistemas radiculares, a exsudação distinta de cada espécie vegetal e as fontes diversificadas de matéria orgânica tendem a resultar em solos com maior diversidade microbiana. A aplicação de resíduos orgânicos também pode favorecer o aumento da diversidade microbiana, ao mesmo tempo em que fornece nutrientes para as plantas cultivadas (ANDREOTE; PEREIRA E SILVA, 2017). Acredita-se que a ocorrência de uma maior diversidade microbiana no solo proporcione melhores condições para o adequado funcionamento da seleção exercida pelas plantas em sua rizosfera, levando a um melhor desempenho das culturas agrícolas e, assim, resultando em produtividades mais elevadas (ANDREOTE; PEREIRA E SILVA, 2017). Além disso, estudos têm demonstrado que uma maior biodiversidade aumenta

a produtividade, a eficiência no uso de recursos e a disponibilidade de nutrientes, promovendo maior estabilidade do agroecossistema (TIEMANN et al., 2015). Por outro lado, Dias, Dukes e Antunes (2015) consideram que mais importante do que visar a diversidade microbiana do solo por si só, é identificar os principais microrganismos (incluindo espécies-chave) ou consórcios microbianos que têm influência positiva ou negativa sobre a produtividade vegetal.

2.4. Métodos de avaliação da microbiota do solo

Estudos sobre a microbiota do solo podem ser realizados por meio do cultivo de microrganismos e de métodos independentes de cultivo. No entanto, considerando a enorme diversidade microbiana que ocorre no solo, um ambiente altamente heterogêneo que proporciona distintas condições de adaptação aos diferentes grupos de organismos, apenas uma pequena fração da microbiota pode ser facilmente cultivada em condições de laboratório (STALEY; KONOPKA, 1985; AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Por isso, os métodos independentes de cultivo, incluindo as técnicas moleculares, permitem uma avaliação mais abrangente da microbiota do solo, por meio da medição de variáveis diretamente das amostras de solo.

2.4.1. Biomassa microbiana

A biomassa microbiana é a parte viva e mais ativa da matéria orgânica do solo que, entre outras funções, regula a ciclagem de nutrientes no solo. Essa biomassa é constituída principalmente por fungos, bactérias e arqueias, contendo de 0,5% a 2% do carbono orgânico total de solos agrícolas no bioma Cerrado (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010; MENDES et al., 2011). Mudanças significativas na biomassa microbiana podem ser detectadas com maior antecedência em relação a alterações na matéria orgânica do solo (POWLSON; BROOKES; CHRISTENSEN, 1987) e, por isso, a biomassa microbiana tem sido proposta como um indicador do estado da matéria orgânica do solo e sugerida como uma medida sensível das tendências de aumento ou diminuição em seus teores (MENDES et al., 2011).

Entre os métodos mais utilizados para a determinação do carbono da biomassa microbiana, destacam-se os de clorofórmio-fumigação-incubação (CFI) (JENKINSON; POWLSON, 1976) e clorofórmio-fumigação-extração (CFE) (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987), ambos baseados na esterilização parcial (fumigação) de amostras de solo com clorofórmio. No método CFI, o tamanho da biomassa é estimado com base no fluxo de CO_2 liberado das amostras de solo fumigadas e não fumigadas após um período de incubação de 7 a 10 dias. Já no CFE, essa determinação é feita a partir da extração do carbono orgânico das amostras fumigadas e não fumigadas utilizando um extrator fraco como o sulfato de potássio. Principalmente pela maior praticidade, o menor tempo e trabalho em análises e a boa repetibilidade

dos ensaios, o método CFE foi escolhido por pesquisadores brasileiros que trabalham no estabelecimento dos bioindicadores de qualidade do solo (OLIVEIRA; MENDES; VIVALDI, 2001; MENDES et al., 2011).

2.4.2. Atividade enzimática

As enzimas do solo desempenham um papel fundamental atuando como catalizadoras de várias reações que resultam, por exemplo, na decomposição de resíduos orgânicos e na ciclagem de nutrientes. A atividade enzimática do solo é o resultado do somatório das atividades das enzimas de organismos vivos (notadamente microrganismos) e das enzimas abiônticas, as quais se encontram associadas à fração não viva e se acumulam no solo protegidas da ação de proteases pela sua ligação a partículas de argila ou à matéria orgânica (MENDES et al., 2011). Resumidamente, as enzimas de solo podem se encontrar no interior de células ou ligadas externamente a membranas celulares, na solução do solo, adsorvidas à superfície de minerais de argila ou substâncias húmicas, em partição ou polimerizadas com substâncias húmicas ou no espaço interlamelar de minerais de argila (BALOTA et al., 2013).

A determinação da atividade enzimática é feita por meio de ensaios simples e rápidos, baseados na adição de substratos específicos para cada enzima a uma amostra de solo suspensa em uma solução tampão. Após um curto período de incubação, as amostras são filtradas e é realizada a determinação do produto da atividade da enzima por colorimetria. Quanto maior a intensidade da coloração, maior a quantidade de produto formado e, consequentemente, maior a atividade da enzima (MENDES et al., 2011). Para avaliar as atividades das enzimas de solo associadas ao ciclo do carbono (ex.: β-glicosidase), do fósforo (ex.: fosfatase ácida) e do enxofre (ex.: arilsulfatase), são comumente utilizados os métodos descritos por Tabatabai (1994), os quais se baseiam na determinação colorimétrica do *p*-nitrofenol (coloração amarela) formado após a adição de substratos incolores específicos a cada enzima avaliada (MENDES et al., 2003). Tal metodologia foi consagrada como uma maneira eficiente de se avaliar a qualidade biológica de solos agrícolas ao ser demonstrada a correlação entre os valores de atividade enzimática e a produtividade de sistemas de cultivo (LOPES et al., 2013).

2.4.3. Estrutura da comunidade microbiana por T-RFLP

A microbiota do solo pode ser avaliada por meio de técnicas moleculares que geram informações sobre a estrutura das comunidades microbianas alvos de estudo (técnicas de *fingerprinting*) ou a composição taxonômica dos organismos presentes nessas comunidades (sequenciamento de marcadores filogenéticos) (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Em geral, os estudos sobre a diversidade genética de comunidades microbianas são baseados na extração de DNA de amostras de solo, seguida pela amplificação dos genes que codificam para o RNA ribossomal (rRNA) pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (MENDES et al., 2011). As técnicas de *fingerprinting*, que permitem analisar perfis de DNA, baseiam-se na

separação eletroforética de um produto de PCR, a qual pode ocorrer de algumas formas diferentes, destacando-se a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e o polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição terminal (T-RFLP) (ANDREOTE; PEREIRA E SILVA, 2018).

A técnica de T-RFLP permite analisar comunidades microbianas complexas a partir da extração do DNA total de amostras ambientais (LIU et al., 1997). No T-RFLP, regiões específicas do DNA são amplificadas pela técnica de PCR com o uso de iniciadores (*primers*) marcados por fluorescência e, em seguida, digeridas com enzimas de restrição. Os fragmentos de restrição terminal (TRFs) são assim marcados e seus tamanhos medidos com extrema precisão por instrumentos como sequenciadores de DNA por eletroforese capilar (AVIS; DICKIE; MUELLER, 2006). A vantagem desta técnica sobre versões anteriores de RFLP ou ARDRA é que apenas os TRFs são detectados, devido à marcação fluorescente de um dos iniciadores usados na PCR, resultando em perfis mais robustos (ANDREOTE; PEREIRA E SILVA, 2018).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1. Hipótese

A diversificação de sistemas de cultivo sob plantio direto promove melhoria nos indicadores microbiológicos de qualidade do solo nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil, evidenciada pelo aumento no teor de carbono da biomassa microbiana e nas atividades das enzimas β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase, assim como pela estruturação diferenciada da comunidade microbiana do solo.

3.2. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da diversificação de sistemas de cultivo sob plantio direto sobre indicadores microbiológicos de qualidade do solo nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil.

3.3. Objetivos Específicos

De forma a atingir o objetivo geral deste estudo, podem ser descritos os seguintes objetivos específicos:

I. Avaliar o efeito da diversificação de culturas sobre o teor de carbono da biomassa microbiana do solo.
II. Avaliar o efeito da diversificação de culturas sobre as atividades das enzimas de solo β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase.
III. Avaliar o efeito da diversificação de culturas sobre a estrutura das comunidades bacteriana e fúngica do solo por T-RFLP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido em parceria entre o *International Plant Nutrition Institute* (IPNI) e o Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP. Foram avaliadas amostras de solo coletadas em dois experimentos do IPNI, um deles instalado na Estação Experimental "CAD Sul" da Fundação MT (Itiquira - MT) e o outro na Estação Experimental da Fundação ABC (Ponta Grossa - PR), ambos pertencentes à rede de estudos denominada *Global Maize Project* (GMP). Em Itiquira - MT, também foram avaliadas amostras de solo coletadas em um experimento instalado em área adjacente na mesma estação experimental intitulado Sistemas de produção de grãos - Rotação de culturas para soja (RCS), assim como em uma área próxima sob vegetação nativa de Cerrado.

O experimento GMP de Itiquira - MT tem como objetivo compreender o efeito da intensificação ecológica e o impacto da adubação nitrogenada nas frações da MOS, nos estoques de carbono (C) e nitrogênio (N) e nos atributos biológicos do solo em experimento de média duração. Já o experimento GMP de Ponta Grossa - PR tem o objetivo de verificar se a intensificação ecológica promove mudanças nas frações lábeis e nos estoques de C e N, nos atributos biológicos do solo e na resposta do milho à adubação nitrogenada em experimento de média duração. No momento da coleta das amostras de solo, os experimentos GMP e RCS de Itiquira - MT e o experimento GMP de Ponta Grossa - PR tinham duração de, respectivamente, nove, dez e oito anos.

4.1. Descrição dos experimentos

Os experimentos GMP foram instalados sob o delineamento de blocos completos casualizados com parcelas subdivididas e quatro repetições. Nas parcelas principais foram alocados os sistemas de cultivo, enquanto as doses de N em cobertura no milho foram alocadas nas subparcelas. As parcelas experimentais possuem dimensões de 18,2 m de largura e 49 m de comprimento, sendo que as subparcelas têm 12,25 m de comprimento.

O experimento GMP de Itiquira - MT foi instalado na Estação Experimental "CAD Sul", pertencente à Fundação MT (17°9'18"S, 54°45'15"O, 490 m). O clima da região é do tipo Aw segundo a classificação de Köppen, denominado clima tropical, com inverno seco. O solo é classificado como Latossolo Vermelho distrófico de classe textural muito argilosa. A área está sob SPD desde 2007 e, a partir da safra 2009/2010, as parcelas receberam os seguintes tratamentos:

- **T1 - Agrossistema regional I:** soja seguida de milho 2ª safra.
- **T3 - Intensificação ecológica:** Ano 1) soja seguida de milho 2ª safra consorciado com braquiária; Ano 2) soja seguida de leguminosa como planta de cobertura; Ano 3) milho 1ª safra consorciado com braquiária.

O experimento GMP de Ponta Grossa - PR foi instalado na Estação Experimental da Fundação ABC (25°00'46"S, 50°09'06"O, 885 m). O clima na região é do tipo Cfb de acordo com a classificação de Köppen, denominado clima oceânico, sem estação seca, com verão temperado. O solo é classificado como Latossolo Vermelho eutrófico com teor de argila aumentando de 324 a 447 g kg^{-1} até 1 m de profundidade. A área está sob SPD desde 2007 e, a partir da safra 2011/2012, as parcelas receberam os seguintes tratamentos:

- **T1 - Agrossistema regional I:** Ano 1) trigo seguido de soja; Ano 2) aveia-preta como planta de cobertura seguida de milho.
- **T3 - Intensificação ecológica:** Ano 1) ervilha como planta de cobertura seguida de milho; Ano 2) aveia-preta como planta de cobertura seguida de soja; Ano 3) ervilha como planta de cobertura seguida de milho; Ano 4) trigo seguido de soja.

Em ambos os experimentos foram aplicadas diferentes doses de N (ureia) em cobertura no milho como tratamento alocado nas subparcelas, a saber: N1) controle (sem aplicação de N); N2) dose inferior de N; N3) dose moderada de N; N4) dose superior de N. A quantidade de N em cada dose foi diferente para milho 1ª safra, milho 2ª safra e milho (verão), pois a produtividade esperada e a demanda de N pelo milho são distintas para cada situação. Em Itiquira - MT, foram avaliados somente os tratamentos na dose moderada de N (N3 = 140 kg ha^{-1} de N para milho 1ª safra e N3 = 80 kg ha^{-1} de N para milho 2ª safra) (Tabela 2), enquanto em Ponta Grossa - PR avaliaram-se os tratamentos sem aplicação de N (N1) e com aplicação de dose moderada de N (N3 = 140 kg ha^{-1} de N para milho) (Tabela 3).

Tabela 2. Tratamentos do experimento GMP instalado em Itiquira - MT.

	Pré	Ciclo 1			Ciclo 2			Ciclo 3		
Trat.	**2008/2009**	**2009/2010**	**2010/2011**	**2011/2012**	**2012/2013**	**2013/2014**	**2014/2015**	**2015/2016**	**2016/2017**	**2017/2018**
T1N3	S/M2	S/M2	S/M2	S/M2	S/M2	S/M2	S/M2	S/M2	S/M2	S/M2
T3N3	S/M2	S/Cs	M1+B	S/M2+B	S/Co	M1+B	S/M2+B	S/G	M1+B	S/M2

S/M2 = soja seguida de milho 2ª safra; S/M2+B = soja seguida de milho 2ª safra consorciado com braquiária (*Urochloa ruziziensis*); S/Cs = soja seguida de *Crotalaria spectabilis*; S/Co = soja seguida de *Crotalaria ochroleuca*; S/G = soja seguida de guandu (*Cajanus cajan*); M1+B = milho 1ª safra consorciado com braquiária (*Urochloa ruziziensis*).

Tabela 3. Tratamentos do experimento GMP instalado em Ponta Grossa - PR.

	N cob.	Ciclo 1				Ciclo 2			
Trat.	**no milho**	**2011**	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**
T1N1	0	AP/M	T/S	AP/M	T/S	AP/M	T/S	AP/M	T/S
T1N3	140	AP/M	T/S	AP/M	T/S	AP/M	T/S	AP/M	T/S
T3N1	0	E/M	AP/S	E/M	T/S	E/M	T/S	E/M	T/S
T3N3	140	E/M	AP/S	E/M	T/S	E/M	T/S	E/M	T/S

AP/M = aveia-preta no inverno seguida de milho no verão; E/M = ervilha no inverno seguida de milho no verão; T/S = trigo no inverno seguido de soja no verão; AP/S = aveia-preta no inverno seguida de soja no verão.

Em 2018 e 2019, pesquisadores parceiros realizaram análises para a caracterização química e física dos solos dos experimentos GMP de Itiquira - MT (Tabelas 4 e 5) e Ponta Grossa - PR (Tabelas 6 e 7).

Tabela 4. Caracterização química do solo do experimento GMP de Itiquira - MT.

Prof.	pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	m
(cm)	KCl	(g kg^{-1})	(mg kg^{-1})				(mmolc kg^{-1})				(%)	
0 - 10	4,6	39	14	1,4	32	14	4	75	47,4	122,4	39	8
10 - 20	4,5	34	10	1,6	18	8	4	67	27,6	94,6	29	13
20 - 40	4,6	32	7	1,3	15	7	2	58	23,3	81,3	29	8

Métodos: pH em KCl 1 mol L^{-1}; matéria orgânica (M.O.) determinação por titulometria; fósforo (P) extração com Mehlich 1 e determinação por colorimetria; potássio (K) extração com Mehlich 1 e determinação em espectrofotômetro de emissão atômica; cálcio (Ca) e magnésio (Mg) extração com KCl 1 mol L^{-1} e determinação em espectrofotômetro de absorção atômica; alumínio (Al) extração com KCl 1 mol L^{-1} e determinação por titulometria; acidez potencial (H+Al) extração com acetato de cálcio e determinação por titulometria.

Tabela 5. Caracterização física do solo do experimento GMP de Itiquira - MT.

Prof.	Areia total	Silte	Argila (c/ disp.)
(cm)		(g kg^{-1})	
0 - 10	294	72	634
10 - 20	270	63	667
20 - 40	263	90	647

Tabela 6. Caracterização química do solo do experimento GMP de Ponta Grossa - PR.

Prof.	pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	m
(cm)	$CaCl_2$	(g dm^{-1})	(mg dm^{-1})				(mmolc dm^{-1})				(%)	
0 - 10	4,7	35	54	3,6	23	11	6	52	37,6	89,6	42	14
10 - 20	4,5	26	60	1,9	12	3	2	58	16,9	74,9	23	11
20 - 40	4,7	22	8	1,3	7	3	4	47	11,3	58,3	19	26

Métodos: pH em $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}; matéria orgânica (M.O.) determinação por titulometria; fósforo (P) extração com resina trocadora de íons e determinação por colorimetria; potássio (K) extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de emissão atômica; cálcio (Ca) e magnésio (Mg) extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de absorção atômica; alumínio (Al) extração com KCl 1 mol L^{-1} e determinação por titulometria; acidez potencial (H+Al) extração com tampão SMP e determinação por titulometria.

Tabela 7. Caracterização física do solo do experimento GMP de Ponta Grossa - PR.

Prof.	Areia total	Silte	Argila (c/ disp.)
(cm)		(g kg^{-1})	
0 - 10	660	16	324
10 - 20	598	27	376
20 - 40	576	23	402

Adicionalmente ao experimento GMP de Itiquira - MT, foram avaliadas, em parte das análises, amostras de solo coletadas em alguns tratamentos do experimento RCS, instalado em área adjacente na mesma estação experimental, assim como em área de Cerrado próxima à estação. O experimento RCS de Itiquira - MT foi implantado sob o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições, cujas parcelas têm dimensões de 20 m de largura por 30 m de comprimento. Neste experimento, instalado na safra 2008/2009, foram amostrados os seguintes tratamentos devido à ausência de rotação e/ou consorciação de culturas:

- **RCS T1 - Monocultivo de soja sob plantio direto:** soja seguida de pousio (sem revolvimento do solo na entressafra)
- **RCS T8 - Monocultivo de soja sob preparo convencional:** soja seguida de pousio (com revolvimento do solo na entressafra)

Na área sob vegetação nativa de Cerrado, as amostras de solo foram coletadas em quatro locais no interior do fragmento (evitando-se efeitos de borda), considerados como parcelas (repetições) do seguinte tratamento:

- **MATA - Cerrado:** tipo fitofisionômico Cerradão (RIBEIRO; WALTER, 2008).

4.2. Coleta, preparo e armazenamento das amostras de solo

Foram coletadas amostras de solo nas camadas de 0 - 10 cm, 10 - 20 cm e 20 - 40 cm de profundidade em cada parcela dos tratamentos. Cada amostra foi composta por oito subamostras coletadas nas linhas e entrelinhas dentro da área útil da parcela. As amostras foram coletadas em Itiquira - MT e Ponta Grossa - PR na fase de pós-colheita da soja, respectivamente, em março e abril de 2018. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, transportadas para o laboratório e armazenadas a 4 °C até o momento das análises de biomassa microbiana e atividade enzimática do solo, realizadas dentro de quatro semanas. No laboratório, o preparo das amostras consistiu apenas no peneiramento (malha de 2 mm), analisando-se as amostras na umidade do campo (*field-moist*). Para a análise da estrutura da comunidade microbiana do solo por T-RFLP, alíquotas de cada amostra foram armazenadas em tubo de Eppendorf a -20 °C por um período mais longo, até a extração do DNA.

4.3. Métodos de avaliação da microbiota do solo

A biomassa microbiana e a atividade enzimática do solo foram analisadas por meio de amostras de solo coletadas nas camadas de 0 - 10 cm, 10 - 20 cm e 20 - 40 cm de profundidade nos seguintes tratamentos: T1N3, T3N3, RCS T1, RCS T8 e MATA em Itiquira - MT e T1N1, T1N3, T3N1 e T3N3 em Ponta Grossa - PR. Já a estrutura da comunidade microbiana do solo foi avaliada por T-RFLP com base nas amostras de solo coletadas nas camadas de 0 - 10 cm e 10 - 20 cm de profundidade somente nos

tratamentos a seguir, os quais apresentaram resultados em pelo menos três repetições: T1N3 e T3N3 em Itiquira - MT e T1N1 e T3N1 em Ponta Grossa - PR.

4.3.1. Biomassa microbiana

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi determinado pelo método clorofórmio-fumigação-extração (CFE) proposto por Vance, Brookes e Jenkinson (1987). De cada amostra de solo, foram retiradas duas alíquotas de 10 g para determinação do CBM, além de uma alíquota de 10 g para análise do teor de umidade da respectiva amostra. Com base no método CFE, metade das amostras foi fumigada (F) por 24 h em dessecador contendo béquer com 25 mL de clorofórmio livre de etanol. Nesse período, as amostras não fumigadas (NF) foram mantidas em condição ambiente. Após a fumigação, o CBM foi extraído pela adição de 40 mL de K_2SO_4 0,5 M às amostras de solo que foram, em seguida, submetidas à agitação horizontal (200 rpm) por 30 min. Depois disso, as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 2. Após transferir-se 8 mL do extrato filtrado para tubo digestor, foram adicionados 2 mL de $K_2Cr_2O_7$ 66,7mM e 15 mL de uma mistura 1:2 (v/v) de H_2SO_4/H_3PO_4, efetuando-se a digestão em banho-maria a 100 °C por 30 min. A solução foi então resfriada e transferida para um frasco de Erlenmeyer de 125 mL, adicionando-se água destilada até completar 50 mL de solução. O dicromato de potássio residual foi medido por titulação com uma solução de $(NH_4)_2Fe(SO_4).6H_2O$ 33,3 mM em H_2SO_4 concentrado, na presença do indicador ferroína. Determinou-se o carbono pela redução do dicromato de potássio dos extratos filtrados. A quantidade de CBM foi determinada pela diferença entre o carbono orgânico extraído das amostras de solo F e NF utilizando-se um fator de correção (k_{EC}) de 0,33 (SPARLING; WEST, 1988; OLIVEIRA; MENDES; VIVALDI, 2001).

4.3.2. Atividade enzimática

As atividades das enzimas de solo associadas ao ciclo do carbono (β-glicosidase), do fósforo (fosfatase ácida) e do enxofre (arilsulfatase) foram avaliadas utilizando-se os métodos descritos por Tabatabai (1994). Tais métodos são baseados na determinação colorimétrica do *p*-nitrofenol (coloração amarela) formado após a adição de substratos incolores específicos para cada enzima avaliada, quais sejam: *p*-nitrofenil β-D-glicopiranosídeo (PNG) para a avaliação da β-glicosidase, *p*-nitrofenil fosfato (PNF) para a fosfatase ácida e *p*-nitrofenil sulfato (PNS) no caso da arilsulfatase (MENDES et al., 2003).

Mais detalhadamente, alíquotas de 1 g de cada amostra de solo foram colocadas em tubos de ensaio, sendo uma para cada enzima avaliada e mais uma por tratamento como controle (branco). Para a avaliação da β-glicosidase, foram adicionados 4 mL de tampão universal modificado (MUB) pH 6 e 1 mL de PNG 0,025 M. No caso da fosfatase ácida, 4 mL de MUB pH 6,5 e 1 mL de PNF 0,05 M. Já para a

arilsulfatase, 4 mL de tampão acetato 0,5 M pH 5,8 e 1 mL de PNS 0,05 M. Após agitar em *vortex* e tampar os tubos de ensaio com rolhas de borracha, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 1 h. Logo após a incubação, foram adicionados 1 mL de $CaCl_2$ 0,5 M e 4 mL de NaOH 0,5 M (4 mL de THAM 0,1 M pH 12 no caso da β-glicosidase). Só então, adicionou-se 1 mL de substrato (PNG, PNF ou PNS) aos respectivos controles (brancos). Em seguida, as amostras foram agitadas em *vortex* e filtradas em papel de filtro Whatman nº 2. Por fim, realizou-se a diluição das amostras em cubetas com água destilada e a leitura da coloração amarela em espectrofotômetro a 410 nm (420 nm para a β-glicosidase). Os cálculos para determinação da atividade enzimática foram realizados com base nos valores de absorbância (x) e em curva-padrão previamente estabelecida (y = 80,432 x), subtraindo-se os valores de absorbância dos controles (brancos) de cada tratamento e ajustando-se a diluição das amostras.

4.3.3. Estrutura da comunidade microbiana por T-RFLP

A estrutura das comunidades bacteriana e fúngica das amostras de solo foi avaliada por meio de uma técnica de *fingerprinting* denominada polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição terminal (T-RFLP), um método comparativo que permite analisar comunidades microbianas complexas (LIU et al., 1997).

4.3.3.1. Extração de DNA das amostras de solo

Uma alíquota de 0,4 g de cada amostra de solo foi submetida à extração de DNA utilizando-se o *PowerSoil® DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories), conforme instruções do fabricante. O extrato de DNA foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1X, corado com solução de *GelRed®* e visualizado em transluminador de luz ultravioleta (UV), sendo posteriormente armazenado a -20 °C (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

4.3.3.2. T-RFLP

Primeiramente, regiões específicas do DNA foram amplificadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com o uso de *primers* marcados por fluorescência. Para analisar a comunidade bacteriana, foi realizada a amplificação do gene 16S rRNA utilizando-se os *primers* FAM-8fm (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 926r (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (SCHÜTTE et al., 2009). A análise da comunidade fúngica foi realizada pela amplificação da região ITS do rDNA com o uso dos *primers* FAM-ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (AVIS; DICKIE; MUELLER, 2006).

As reações para a amplificação do gene 16S rRNA incluíram 1 µL de extrato de DNA, 0,1 µL de cada *primer* (100 pmol/µL), 0,2 µL de Taq polimerase (5 U/µL), 4 µL de dNTPs (2,5 mM), 6 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 5 µL de tampão de PCR (10X) e 33,6 µL de água deionizada esterilizada, resultando em um volume final de 50 µL. As condições de amplificação em termociclador foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C por 4 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 57 °C por 30 s e 72 °C por 45 s e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Para a amplificação da região ITS, as reações incluíram 1 µL de extrato de DNA, 0,2 µL de cada *primer* (100 pmol/µL), 0,5 µL de Taq polimerase (5 U/µL), 4 µL de dNTPs (2,5 mM), 6 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 5 µL de tampão de PCR (10X) e 33,1 µL de água deionizada esterilizada, tendo como resultado um volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 1 min e 30 s, 13 ciclos de 94 °C por 35 s, 55 °C por 55 s e 72 °C por 45 s, 13 ciclos de 94 °C por 35 s, 55 °C por 2 min e 72 °C por 45 s, 9 ciclos de 94 °C por 35 s, 55 °C por 3 min e 72 °C por 45 s e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Após as reações, o tamanho dos fragmentos foi confirmado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1X, corados com *GelRed*® e visualizados em luz ultravioleta (UV).

Após a amplificação, as amostras referentes à análise da comunidade bacteriana foram diretamente para a etapa de digestão, sem passar pela purificação. As amostras relativas à comunidade fúngica foram purificadas com a adição de 200 µL de isopropanol em cada produto de PCR de 50 µL, seguido de incubação a -20 °C por 2 h. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 4.000 rpm por 1 h e 30 min; descarte de sobrenadante; centrifugação com a placa invertida por alguns segundos até atingir 500 rpm; adição de 250 µL de etanol 70%; centrifugação a 4.000 rpm por 1 h e 30 min; descarte de sobrenadante; centrifugação com a placa invertida por alguns segundos até atingir 500 rpm e secagem das placas à temperatura ambiente por 30 min. O produto purificado foi então diluído em 25 µL de água deioinizada esterilizada e avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com *GelRed*® e visualizado em luz ultravioleta (UV).

Na etapa de digestão, a reação para a restrição do produto de amplificação do gene 16S rRNA foi constituída de 18 µL de água deionizada esterilizada, 2 µL de tampão *Tango* (10X), 1 µL da enzima *HhaI* (10 U/µL) (Thermo Fisher Scientific) e 10 µL do produto de amplificação. A reação para a restrição da região ITS foi constituída de 2,5 µL de água deionizada esterilizada, 2,0 µL de tampão *Red* (10X), 0,5 µL da enzima *BsuRI (HaeIII)* (10 U/µL) e 15 µL do produto de amplificação purificado. As reações foram realizadas em termociclador a 37 °C durante 3 h.

Posteriormente, realizou-se a precipitação das amostras com a adição de 2 µL de EDTA (125 mM), 2 µL acetato de sódio (3 M) e 50 µL de etanol 100%, seguida por incubação à temperatura ambiente por 15 min, centrifugação a 2.128 x *g* a 4 °C por 30 min, descarte de sobrenadante e centrifugação com a placa invertida a 185 x *g* por 30 s. Então, realizou-se a adição de 70 µL de etanol 70%, seguida por centrifugação a 2.128 x *g* a 4 °C por 20 min, descarte de sobrenadante, centrifugação com a placa invertida a 185 x *g* por 1 min e, ao final, armazenamento a -20 °C. No momento da leitura, as amostras foram submetidas à ressuspensão em 9,5 µL de *Hi-Di™ Formamide* e 0,5 µL de *GeneScan™ 1200 LIZ® Size Standard*

(Thermo Fisher Scientific). A leitura das soluções finais foi realizada em sequenciador automático *Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer* (Thermo Fisher Scientific).

4.4. Análise estatística dos dados

Os resultados das avaliações de biomassa microbiana e atividade enzimática do solo foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste de Scott-Knott a 5% para comparação de médias de probabilidade no software Sisvar (FERREIRA, 2011). O experimento de Itiquira - MT foi analisado conforme o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 5 × 3, sendo os tratamentos representados por quatro sistemas de cultivo e uma área de vegetação nativa, em três profundidades de amostragem de solo, com quatro repetições cada. O experimento de Ponta Grossa - PR foi analisado de acordo com o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 4 × 3, sendo os tratamentos representados por dois sistemas de cultivo, cada um deles sem e com a aplicação de N em cobertura no milho, em três profundidades de amostragem, com quatro repetições cada.

No caso do T-RFLP, a ocorrência e a intensidade de picos com fragmentos de diferentes tamanhos foram comparadas no programa *GeneMapper®*, o qual fornece matrizes com informações dos picos gerados pelos fragmentos de restrição terminal (TRFs). Foram gerados 152 picos para as leituras de fragmentos do gene 16S rRNA e 273 picos oriundos das leituras dos fragmentos da região ITS. A matriz composta da ocorrência e áreas desses picos foi utilizada para análises no programa PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). A comparação das matrizes foi realizada pela análise de coordenadas principais (PCoA), utilizando-se o índice de similaridade Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957) para observação da estruturação dos tratamentos. A confirmação da semelhança ou distinção entre os grupos gerados foi feita pela análise de similaridade (ANOSIM) (CLARKE, 1993), por meio da qual obtiveram-se valores de p que foram assim interpretados: $p < 0{,}05$ significa que os grupos representados são totalmente distintos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento de Itiquira - MT

5.1.1. Atividade enzimática e biomassa microbiana

Os resultados das análises de atividade enzimática (β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase) e carbono da biomassa microbiana (CBM) dos solos de Itiquira - MT foram submetidos à análise de variância, obtendo-se os valores apresentados na Tabela 8. No caso da atividade enzimática, houve interação entre as fontes de variação (tratamentos e profundidades de amostragem) e, por isso, realizou-se a análise de desdobramento, cujos resultados encontram-se na Tabela 9. Já para o CBM, por não ter havido interação entre as fontes de variação, foram apresentados os valores médios para cada tratamento e profundidade de amostragem na Tabela 10. Os mesmos resultados estão apresentados por meio de gráficos nas Figuras 2 a 6.

Tabela 8. Resumo da análise de variância para as variáveis β-glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e carbono da biomassa microbiana (CBM) em resposta a diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT.

FV	GL	β-Glicosidase	Fosfatase ácida	Arilsulfatase	CBM
Tratamentos	4	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0004*
Profundidades	2	0,0000*	0,0019*	0,0000*	0,0000*
Blocos	3	0,1634^{ns}	0,0037*	0,1954^{ns}	0,4274^{ns}
Trat. x Prof.	8	0,0000*	0,0000*	0,0002*	0,1910^{ns}
Erro	42	-	-	-	-
CV (%)	-	24,10	12,05	42,12	26,15

* = significância a 5% de probabilidade; ^{ns} = não significativo; CV = coeficiente de variação; GL = graus de liberdade; FV = fonte de variação.

Tabela 9. Análise de desdobramento com valores médios de atividade enzimática em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT.

Profundidade (cm)	**β-Glicosidase**				
	T1N3	**T3N3**	**RCS T1**	**RCS T8**	**MATA**
0 - 10	75 Ab	92 Aa	30 Ad	29 Ad	52 Ac
10 - 20	41 Ba	43 Ba	31 Ab	25 Ab	29 Bb
20 - 40	29 Ba	29 Ca	17 Ba	21 Aa	18 Ba
	Fosfatase ácida				
	T1N3	**T3N3**	**RCS T1**	**RCS T8**	**MATA**
0 - 10	417 Ac	509 Ab	318 Ad	327 Bd	634 Aa
10 - 20	397 Aa	420 Ba	334 Ab	346 Bb	464 Ba
20 - 40	379 Aa	385 Ba	362 Aa	422 Aa	389 Ca
	Arilsulfatase				
	T1N3	**T3N3**	**RCS T1**	**RCS T8**	**MATA**
0 - 10	50 Aa	62 Aa	15 Ac	16 Ac	36 Ab
10 - 20	22 Ba	19 Ba	11 Aa	16 Aa	28 Aa
20 - 40	13 Ba	15 Ba	7 Aa	6 Aa	12 Ba

Valores de atividade enzimática expressos em mg *p*-nitrofenol kg^{-1} solo h^{-1}; médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 10. Valores médios para carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT.

	T1N3	**T3N3**	**RCS T1**	**RCS T8**	**MATA**
CBM	258 a	178 b	212 b	181 b	267 a
	Profundidade (cm)				
	0 - 10		**10 - 20**		**20 - 40**
	267 a		217 b		174 c

Valores de CBM expressos em mg C kg^{-1} solo; médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

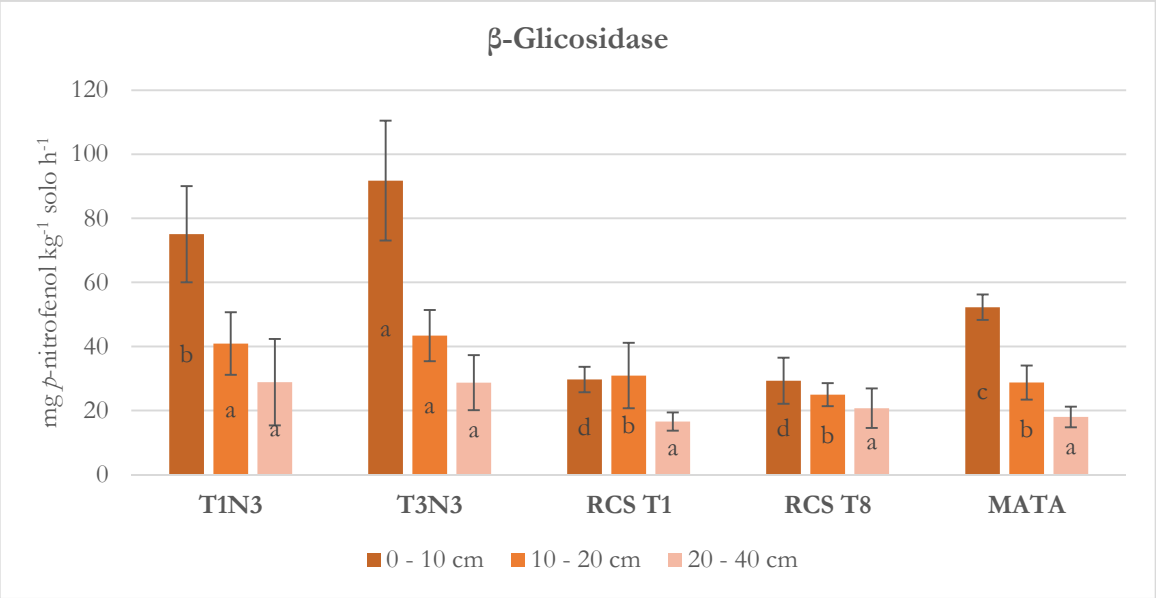

Figura 2. Atividade média de β-glicosidase em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT. Barras com as mesmas letras minúsculas, referentes à comparação entre tratamentos na mesma profundidade de amostragem, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

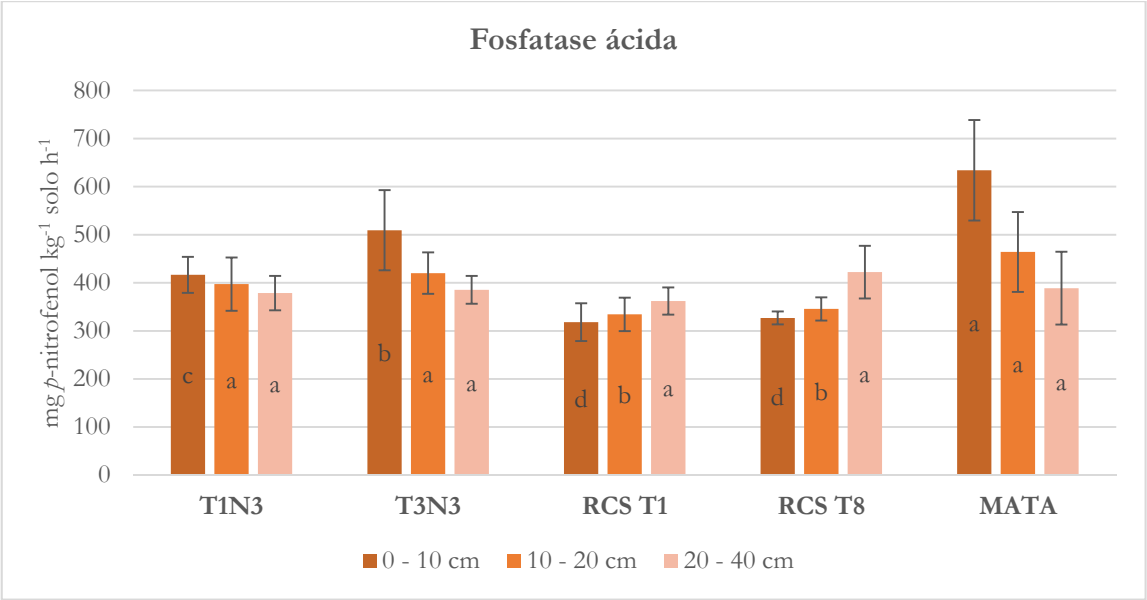

Figura 3. Atividade média de fosfatase ácida em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT. Barras com as mesmas letras minúsculas, referentes à comparação entre tratamentos na mesma profundidade de amostragem, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

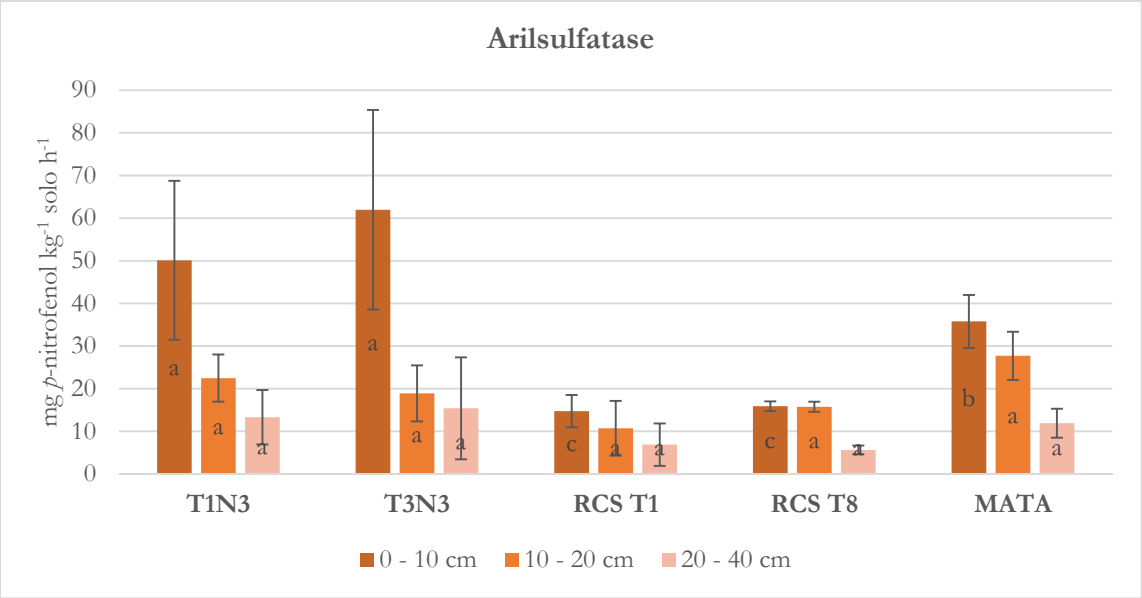

Figura 4. Atividade média de arilsulfatase em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Itiquira - MT. Barras com as mesmas letras minúsculas, referentes à comparação entre tratamentos na mesma profundidade de amostragem, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

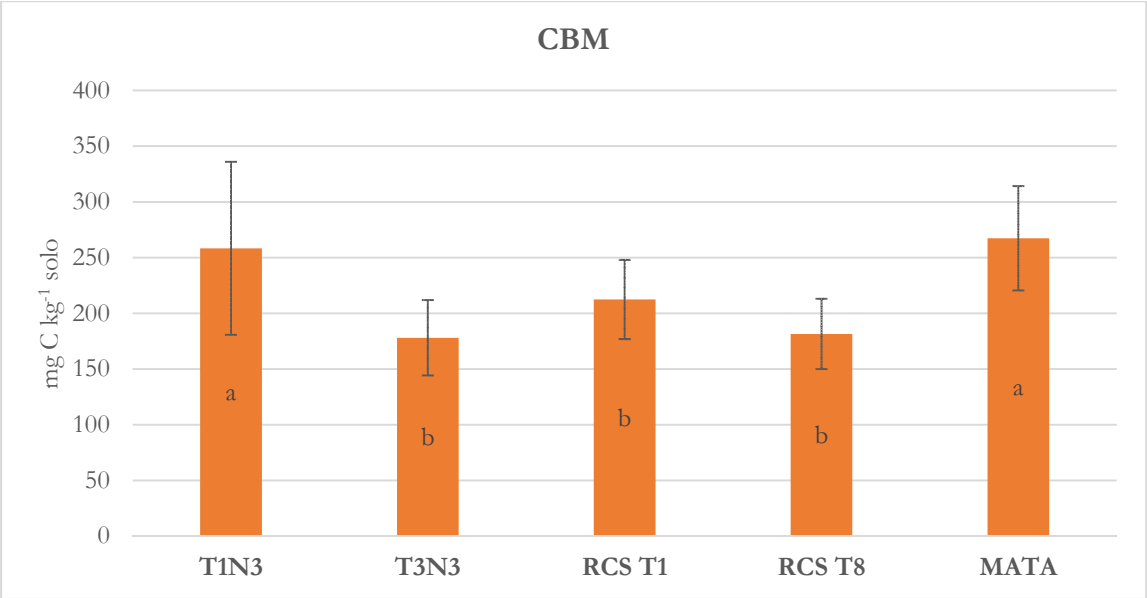

Figura 5. Teor médio de carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos sob diferentes tratamentos considerando-se os valores médios das profundidades de amostragem em Itiquira - MT. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

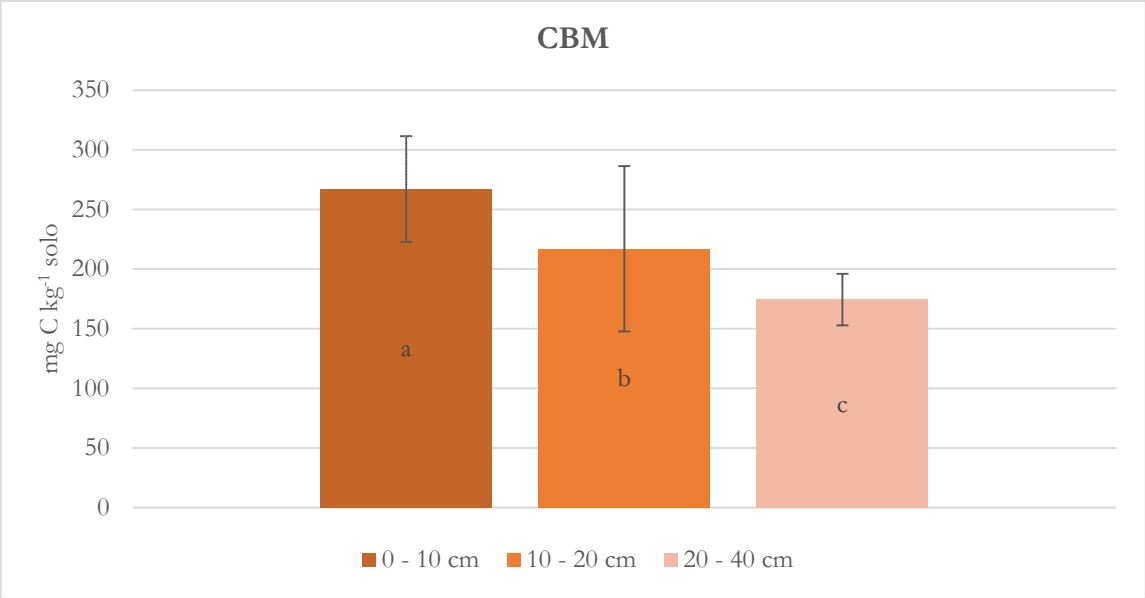

Figura 6. Teor médio de carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Itiquira - MT. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em Itiquira - MT, a atividade da β-glicosidase, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, foi maior no tratamento sob intensificação ecológica (T3N3), o qual possui maior diversificação de culturas no sistema plantio direto. Em segundo lugar, está o agrossistema regional (T1N3), com a sucessão de apenas duas culturas sob plantio direto (soja e milho 2ª safra). Na terceira posição, encontra-se a área sob vegetação nativa de Cerrado (MATA), seguida pelos monocultivos de soja em plantio direto (RCS T1) e preparo convencional (RCS T8), ambos em quarto lugar.

No caso da fosfatase ácida, sua atividade na camada de 0 - 10 cm foi maior na área sob vegetação de Cerrado (MATA). Em segundo lugar, encontra-se o tratamento sob intensificação ecológica (T3N3) e, em terceiro, o agrossistema regional (T1N3). Na quarta posição, estão os monocultivos sob plantio direto (RCS T1) e preparo convencional (RCS T8).

A atividade da arilsulfatase, na camada de 0 - 10 cm, foi 23,7% superior no tratamento sob intensificação ecológica (T3N3) em comparação ao agrossistema regional (T1N3). No entanto, ambos os tratamentos ocupam juntos a primeira posição, já que não diferiram estatisticamente entre si. Em segundo lugar, encontra-se a área de Cerrado (MATA), seguida pelos monocultivos em plantio direto (RCS T1) e preparo convencional (RCS T8), ambos ocupando a terceira posição.

Já o CBM, considerando os valores médios das profundidades amostradas, foi maior na área de Cerrado (MATA) e no agrossistema regional (T1N3). Em segundo lugar, encontram-se os monocultivos em plantio direto (RCS T1) e preparo convencional (RCS T8), assim como o tratamento sob intensificação ecológica (T3N3). Esse resultado foi diferente do esperado, já que o sistema de cultivo mais diversificado sob plantio direto (T3N3) obteve valores de CBM similares aos monocultivos em plantio direto (RCS T1)

e preparo convencional (RCS T8). No entanto, conforme levantado por Mendes (2016), em parte dos trabalhos que avaliaram o CBM em solos agrícolas no bioma Cerrado, esse parâmetro não foi capaz de detectar diferenças entre o SPD e o SPC (D'ANDRÉA et al., 2002; SOUZA et al., 2006; LOURENTE et al., 2010; PEIXOTO et al., 2010; SILVA et al., 2010).

Comparando os resultados entre as diferentes profundidades de amostragem, o tratamento sob intensificação ecológica (T3N3) e a área de Cerrado (MATA) obtiveram valores mais elevados de atividade enzimática na camada mais superficial do solo (0 - 10 cm) em relação às camadas mais profundas (10 - 20 cm e/ou 20 - 40 cm). Já os tratamentos sob monocultivo em plantio direto (RCS T1) e preparo convencional (RCS T8), no geral, não apresentaram diferença significativa de atividade enzimática entre as camadas. No caso do monocultivo em preparo convencional (RCS T8), isso pode ser explicado pelo revolvimento anual do solo com grade aradora realizado durante a entressafra.

Os valores dos bioindicadores de qualidade do solo avaliados no experimento de Itiquira - MT (β-glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e CBM) foram comparados com as classes de interpretação propostas por Lopes et al. (2018) para amostras de solo coletadas na camada de 0 - 10 cm de profundidade, na fase de floração do milho (Tabela 1), obtendo-se a classificação apresentada na Tabela 7 e os gráficos nas Figuras 7 a 10. A única ressalva a ser feita nessa comparação é que, no presente estudo, as amostras de solo foram coletadas na fase de pós-colheita e não na fase de floração da cultura. Em ambos os estudos, as amostras foram analisadas na umidade do campo (*field-moist*). Outro estudo realizado por Mendes (2019), comparando determinações entre amostras coletadas na fase de floração com solo úmido (*field-moist*) e amostras coletadas na fase de pós-colheita com solo seco ao ar (*air-dried*), verificou reduções significativas na atividade das enzimas β-glicosidase (55%), fosfatase ácida (54%), arilsulfatase (49%) e desidrogenase (46%) e no teor de CBM (11%) na amostragem realizada na fase de pós-colheita com solo seco ao ar, no entanto, isso não afetou o ranqueamento dos tratamentos.

Pode-se destacar que o tratamento sob intensificação ecológica em sistema plantio direto (T3N3) apresentou valores mais elevados de atividade enzimática que o agrossistema regional sob plantio direto (T1N3), seguido pelos monocultivos sob plantio direto (RCS T1) e preparo convencional (RCS T8), sendo a atividade da β-glicosidase classificada como "moderada" nesse primeiro tratamento (T3N3) e "baixa" nos demais (T1N3, RCS T1 e RCS T8). Já o CBM apresentou valores diferentes do esperado, pois o tratamento sob intensificação ecológica (T3N3) obteve valor similar ao do monocultivo sob preparo convencional (RCS T8), classificados como "baixos", enquanto o agrossistema regional (T1N3) e o monocultivo sob plantio direto apresentaram valores classificados como "moderados".

Tabela 11. Classificação dos valores de bioindicadores obtidos no experimento de Itiquira - MT, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, de acordo com as classes de interpretação propostas por Lopes et al. (2018).

Bioindicador	T1N3	T3N3	RCS T1	RCS T8
		Plantio Direto		Preparo Convencional
β-Glicosidase	75 (Baixo)	92 (Moderado)	30 (Baixo)	29 (Baixo)
Fosfatase ácida	417 (Baixo)	509 (Baixo)	318 (Baixo)	327 (Baixo)
Arilsulfatase	50 (Moderado)	62 (Moderado)	15 (Baixo)	16 (Baixo)
CBM	300 (Moderado)	214 (Baixo)	258 (Moderado)	200 (Baixo)

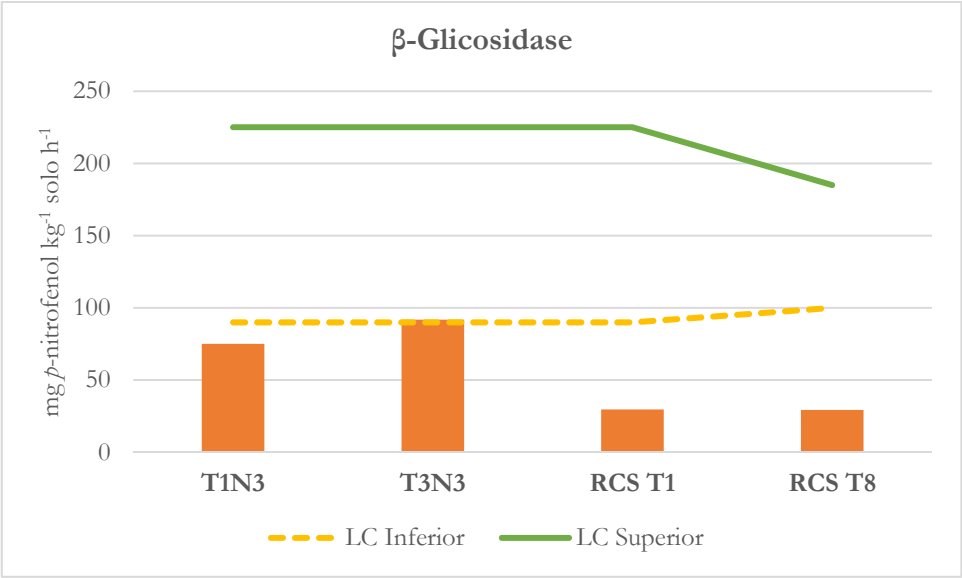

Figura 7. Atividade média de β-glicosidase obtida no experimento de Itiquira - MT, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, comparada com os limites críticos (LC) propostos por Lopes et al. (2018) para plantio direto (T1N3, T3N3 e RCS T1) e preparo convencional (RCS T8).

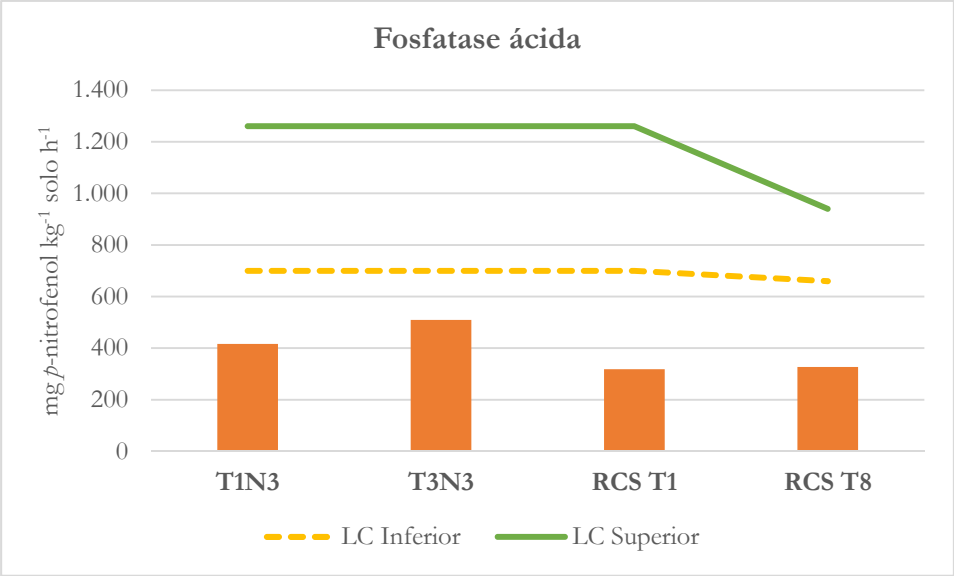

Figura 8. Atividade média de fosfatase ácida obtida no experimento de Itiquira - MT, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, comparada com os limites críticos (LC) propostos por Lopes et al. (2018) para plantio direto (T1N3, T3N3 e RCS T1) e preparo convencional (RCS T8).

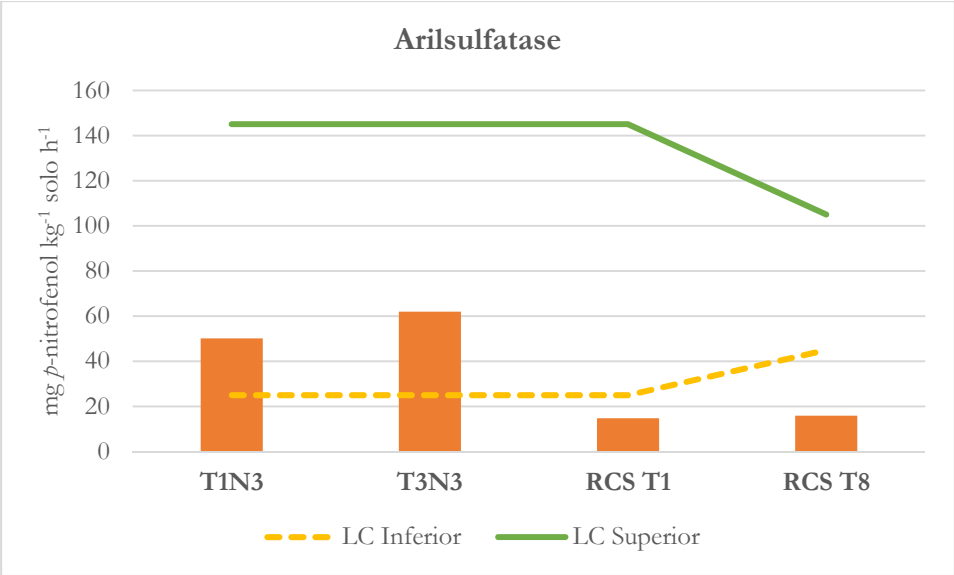

Figura 9. Atividade média de arilsulfatase obtida no experimento de Itiquira - MT, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, comparada com os limites críticos (LC) propostos por Lopes et al. (2018) para plantio direto (T1N3, T3N3 e RCS T1) e preparo convencional (RCS T8).

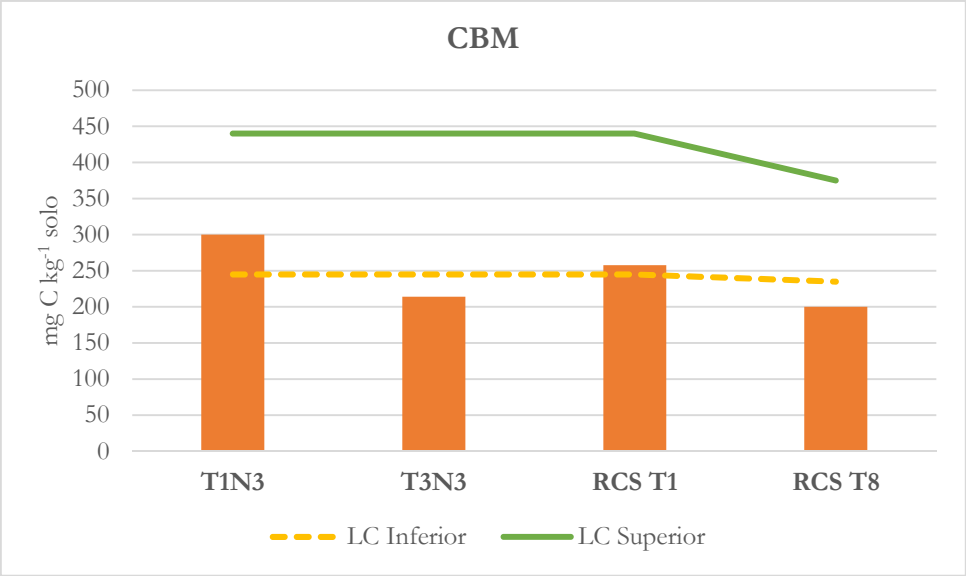

Figura 10. Teor médio de carbono da biomassa microbiana (CBM) obtido no experimento de Itiquira - MT, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, comparado com os limites críticos (LC) propostos por Lopes et al. (2018) para plantio direto (T1N3, T3N3 e RCS T1) e preparo convencional (RCS T8).

Os resultados dos bioindicadores também podem ser relacionados com as determinações de carbono orgânico do solo (COS) realizadas por Sattolo[1] a partir de amostras de solo coletadas na camada de 0 a 10 cm de profundidade, que obteve, pelo método de combustão, um valor médio 57% superior de COS no tratamento sob intensificação ecológica (T3N3) em relação ao agrossistema regional (T1N3), conforme apresentado na Figura 11 (informação pessoal). Isso corrobora os resultados de atividade enzimática mais elevados no tratamento sob intensificação ecológica comparado ao agrossistema regional, já que um teor de COS mais alto significa uma maior oferta de matéria orgânica para a microbiota do solo, a qual libera enzimas que atuam na decomposição desses substratos.

[1] SATTOLO, T. M. S. **C orgânico - Itiquira.** Mensagem recebida por <caio.diniz@usp.br> em 30 maio 2019.

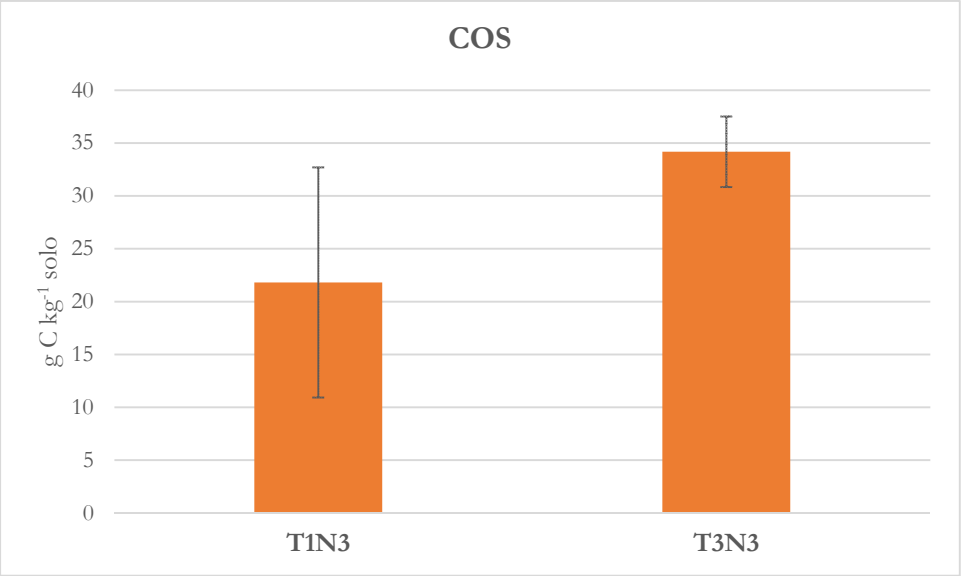

Figura 11. Valores médios de carbono orgânico do solo (COS) a partir de amostras de solo coletadas na camada de 0 a 10 cm de profundidade.

Avaliando-se dados fornecidos por Francisco[2] sobre a produção de matéria seca pelas culturas e plantas de cobertura em nove safras (2009/2010 a 2017/2018), foi possível constatar que a adição de fitomassa sobre a superfície do solo (parte área) foi 21% superior no tratamento sob intensificação ecológica (T3N3) em relação ao agrossistema regional (T1N3), conforme Tabela 13 (informação pessoal). Isso evidencia um maior aporte de resíduos vegetais sobre o solo pelo conjunto de plantas cultivadas no sistema, associado a uma maior diversidade de fontes de carbono orgânico disponibilizadas à biota do solo.

Tabela 12. Produção acumulada de matéria seca de parte área pelas culturas e plantas de cobertura de 2009/2010 a 2017/2018 (sem contabilizar a produção de grãos e sabugos).

Cultura ou planta de cobertura	**Matéria seca (kg ha^{-1})**	
	T1N3	**T3N3**
Soja	56.837	42.049
Milho 1ª safra	-	36.132
Milho 2ª safra	63.027	23.598
Leguminosa	-	12.864
Braquiária	-	30.550
Total	**119.864**	**145.193**

[2] FRANCISCO, E. A. B. **Dados GMP.** Mensagem recebida por <caio.diniz@usp.br> em 29 abr. 2019.

5.1.2. Estrutura da comunidade microbiana por T-RFLP

Os dados obtidos pela análise de T-RFLP das comunidades bacteriana e fúngica dos solos de Itiquira - MT foram submetidos à análise de coordenadas principais (PCoA), dando origem aos gráficos de dispersão apresentados, respectivamente, nas Figuras 12 e 13. A confirmação da semelhança ou distinção entre os grupos foi realizada pela análise de similaridade (ANOSIM), cujos valores de *p* encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 13 e 14.

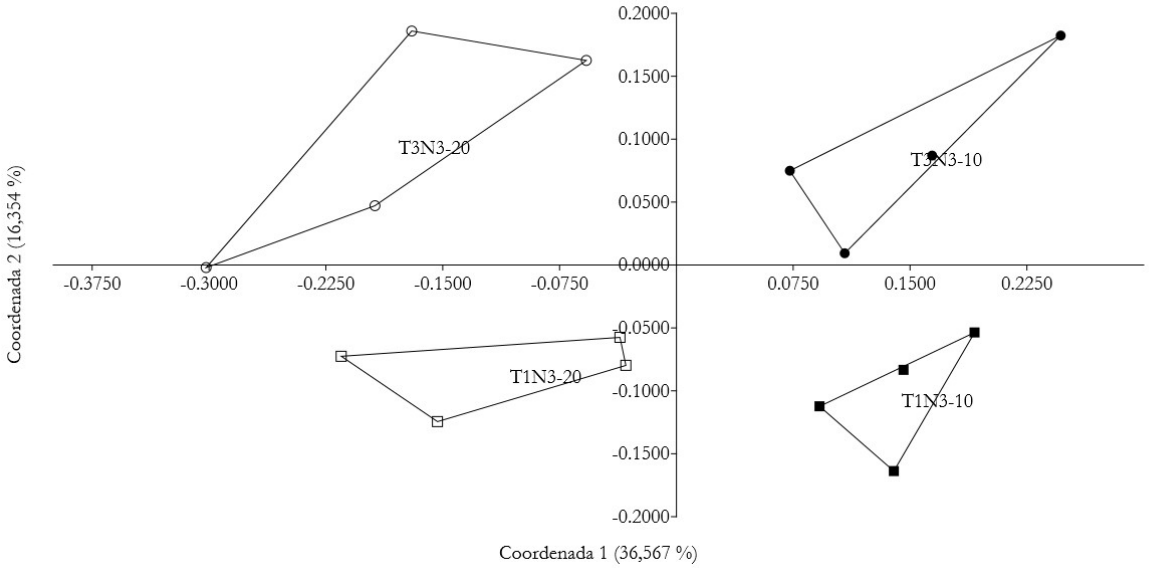

Figura 12. Gráfico de dispersão obtido pela PCoA com índice de similaridade Bray-Curtis entre os diferentes tratamentos e profundidades de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade bacteriana do solo por T-RFLP em Itiquira - MT.

Tabela 13. Valores de *p* obtidos pela ANOSIM com índice de similaridade Bray-Curtis entre cada tratamento e profundidade de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade bacteriana do solo por T-RFLP em Itiquira - MT, significância não corrigida.

	T1N3-10	**T1N3-20**	**T3N3-10**	**T3N3-20**
T1N3-10		0,03*	0,0275*	0,0294*
T1N3-20	0,03*		0,0271*	0,0827
T3N3-10	0,0275*	0,0271*		0,0289*
T3N3-20	0,0294*	0,0827	0,0289*	

* = $p < 0,05$; 10 = 0 - 10 cm; 20 = 10 - 20 cm.

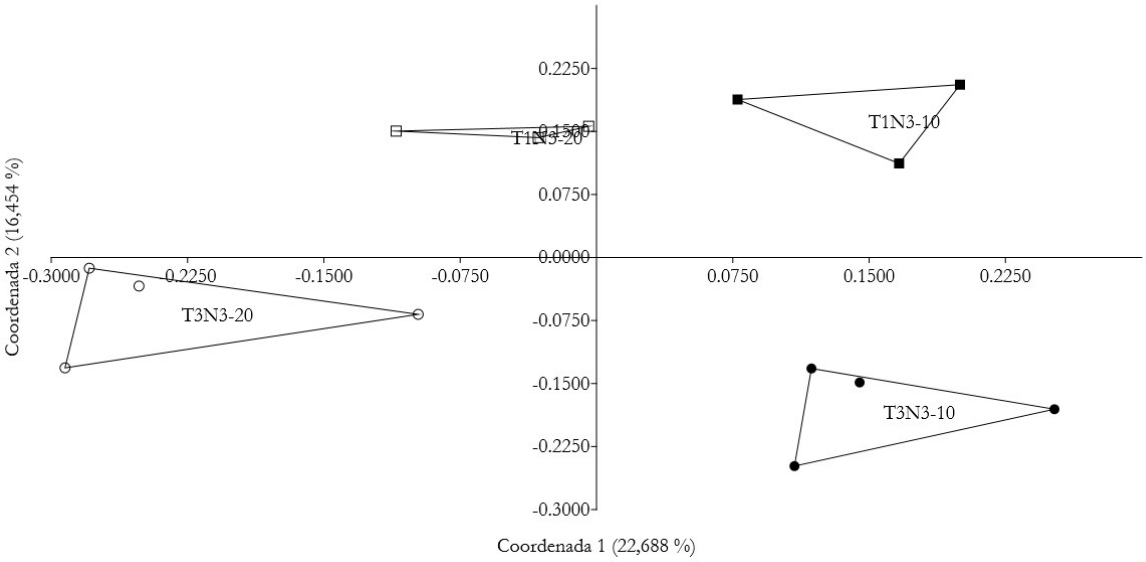

Figura 13. Gráfico de dispersão obtido pela PCoA com índice de similaridade Bray-Curtis entre os diferentes tratamentos e profundidades de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade fúngica do solo por T-RFLP em Itiquira - MT.

Tabela 14. Valores de *p* obtidos pela ANOSIM com índice de similaridade Bray-Curtis entre cada tratamento e profundidade de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade fúngica do solo por T-RFLP em Itiquira - MT, significância não corrigida.

	T1N3-10	**T1N3-20**	**T3N3-10**	**T3N3-20**
T1N3-10		0,0958	0,0294*	0,0271*
T1N3-20	0,0958		0,0288*	0,4037
T3N3-10	0,0294*	0,0288*		0,0313*
T3N3-20	0,0271*	0,4037	0,0313*	

* = $p < 0,05$; 10 = 0 - 10 cm; 20 = 10 - 20 cm.

Em relação ao perfil da comunidade microbiana, considerando somente a camada de 0 - 10 cm de profundidade, o tratamento sob intensificação ecológica (T3N3) apresentou uma estruturação diferenciada das comunidades bacteriana e fúngica do solo em relação ao agrossistema regional (T1N3). Além disso, foi observada uma diferenciação na estrutura da comunidade microbiana entre as camadas de 0 - 10 cm e 10 - 20 cm nos tratamentos avaliados, exceto para a comunidade fúngica no agrossistema regional (T1N3). Considerando a camada de 10 - 20 cm, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Tais resultados somam-se à ocorrência de valores mais elevados de atividade enzimática, na camada de 0 - 10 cm de profundidade, no tratamento sob intensificação ecológica (T3N3) em relação ao agrossistema regional (T1N3), indicando que a maior atividade microbiana pode estar relacionada a uma estruturação diferenciada na comunidade de bactérias e fungos do solo.

5.2. Experimento de Ponta Grossa - PR

5.2.1. Atividade enzimática e biomassa microbiana

Os resultados das análises de β-glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e CBM dos solos de Ponta Grossa - PR foram submetidos à análise de variância, obtendo-se os valores apresentados na Tabela 15. Não houve interação entre as fontes de variação (tratamentos e profundidades de amostragem) em nenhum dos atributos avaliados e, por isso, foram apresentados os valores médios para cada tratamento e profundidade de amostragem na Tabela 16. Tais resultados estão apresentados em gráficos nas Figuras 14 a 21.

Tabela 15. Resumo da análise de variância para as variáveis β-glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e carbono da biomassa microbiana (CBM) em resposta a diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Ponta Grossa - PR.

FV	GL	β-Glicosidase	Fosfatase ácida	Arilsulfatase	CBM
Tratamentos	3	0,0031*	0,2751^{ns}	0,3185^{ns}	0,2251^{ns}
Profundidades	2	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Blocos	3	0,4886^{ns}	0,0661^{ns}	0,3547^{ns}	0,7970^{ns}
Trat. x Prof.	6	0,0990^{ns}	0,4876^{ns}	0,4472^{ns}	0,5994^{ns}
Erro	33	-	-	-	-
CV (%)	-	12,59	9,11	19,93	25,50

* = significância a 5%; ^{ns} = não significativo; CV = coeficiente de variação; GL = graus de liberdade; FV = fonte de variação.

Tabela 16. Valores médios para β-glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase e carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos sob diferentes tratamentos e profundidades de amostragem em Ponta Grossa - PR.

	T1N1	**T1N3**	**T3N1**	**T3N3**
β-Glicosidase	33 b	31 b	38 a	33 b
Fosfatase ácida	319 a	326 a	342 a	333 a
Arilsulfatase	94 a	83 a	82 a	84 a
CBM	176 a	168 a	198 a	203 a

	Profundidade (cm)		
	0 - 10	**10 - 20**	**20 - 40**
β-Glicosidase	70 a	20 b	12 c
Fosfatase ácida	524 a	261 b	204 c
Arilsulfatase	165 a	56 b	36 c
CBM	258 a	154 b	147 b

Valores de atividade enzimática expressos em mg *p*-nitrofenol kg^{-1} solo h^{-1}; valores de CBM expressos em mg C kg^{-1} solo; médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

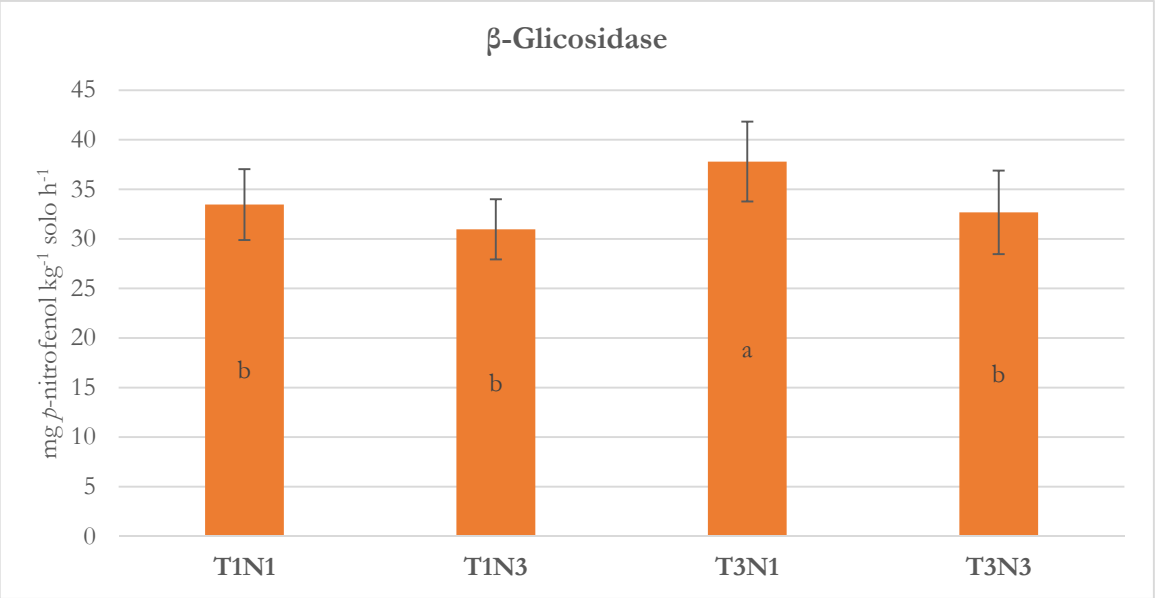

Figura 14. Atividade média de β-glicosidase em solos sob diferentes tratamentos considerando-se os valores médios das profundidades de amostragem em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

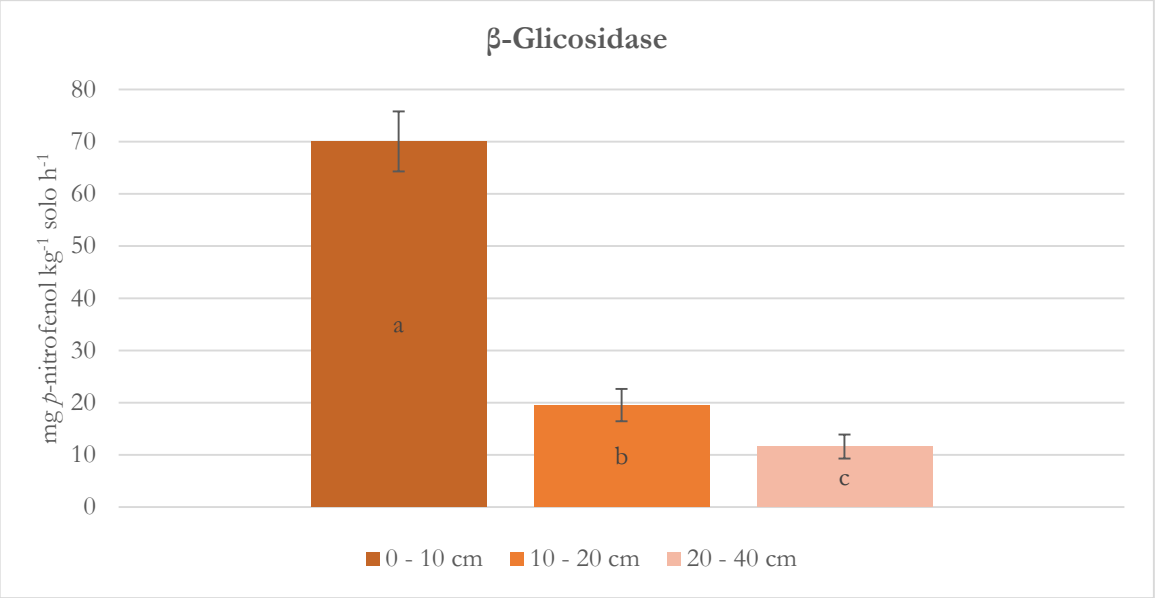

Figura 15. Atividade média de β-glicosidase em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

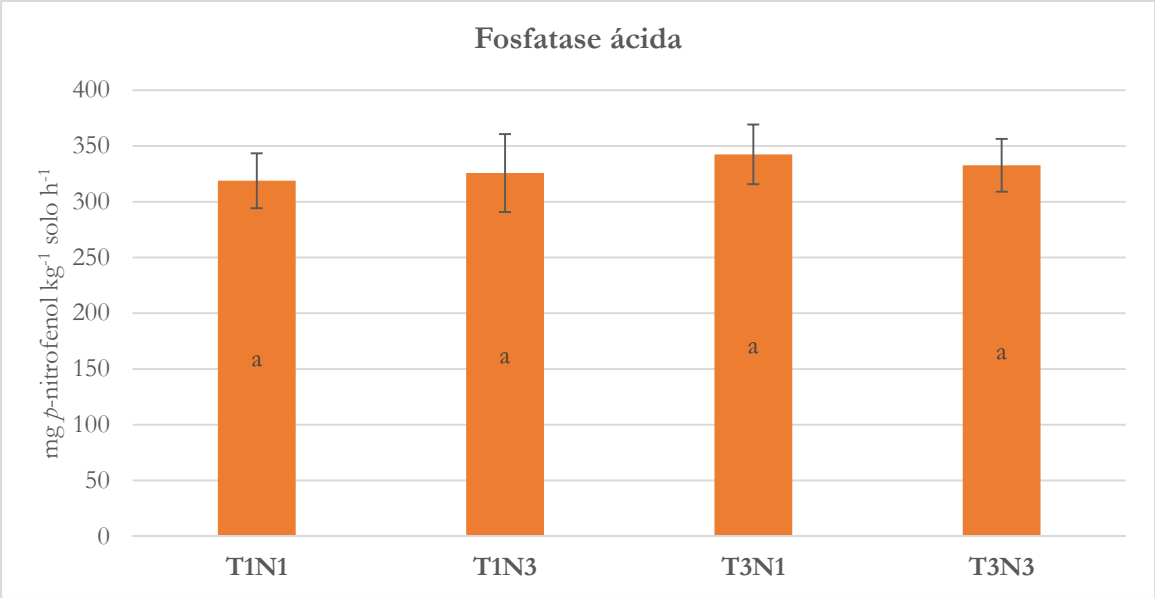

Figura 16. Atividade média de fosfatase ácida em solos sob diferentes tratamentos considerando-se os valores médios das profundidades de amostragem em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

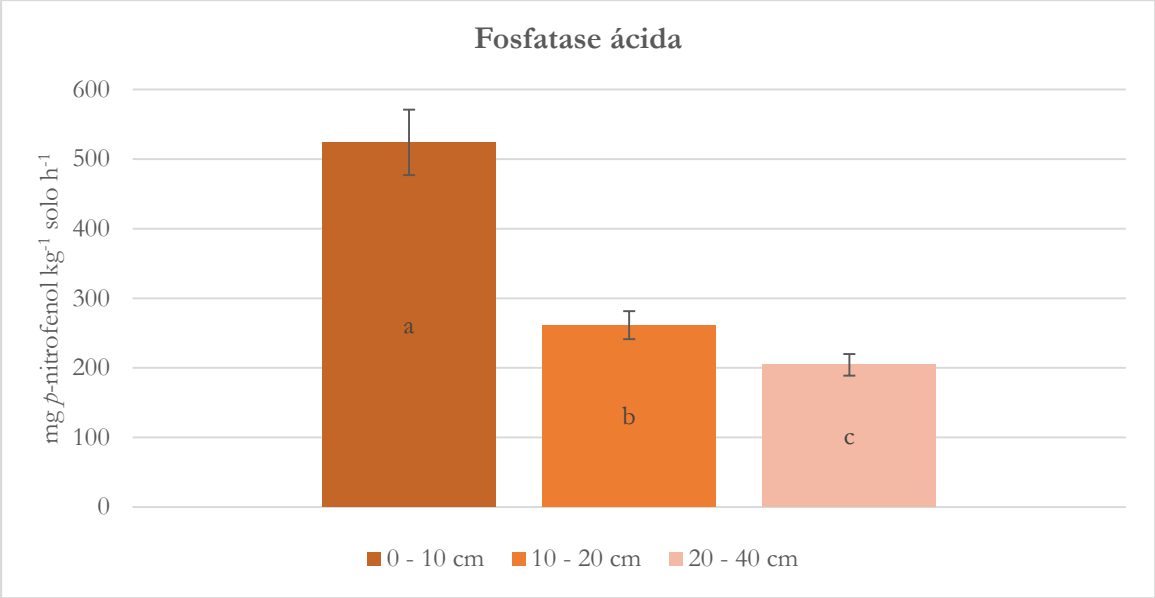

Figura 17. Atividade média de fosfatase ácida em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

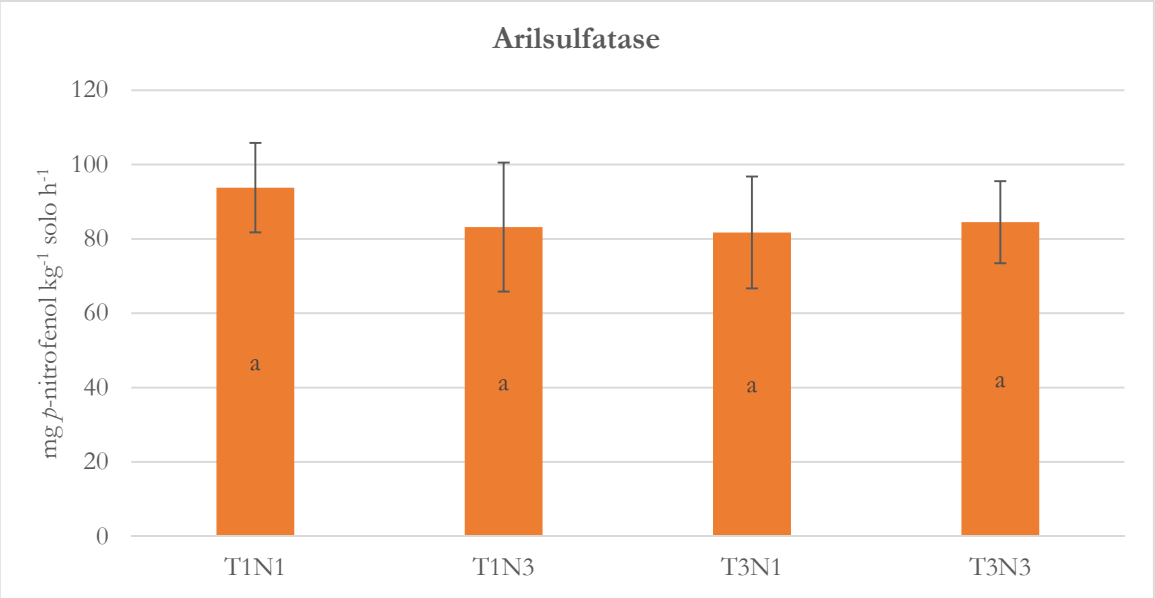

Figura 18. Atividade média de arilsulfatase em solos sob diferentes tratamentos considerando-se os valores médios das profundidades de amostragem em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

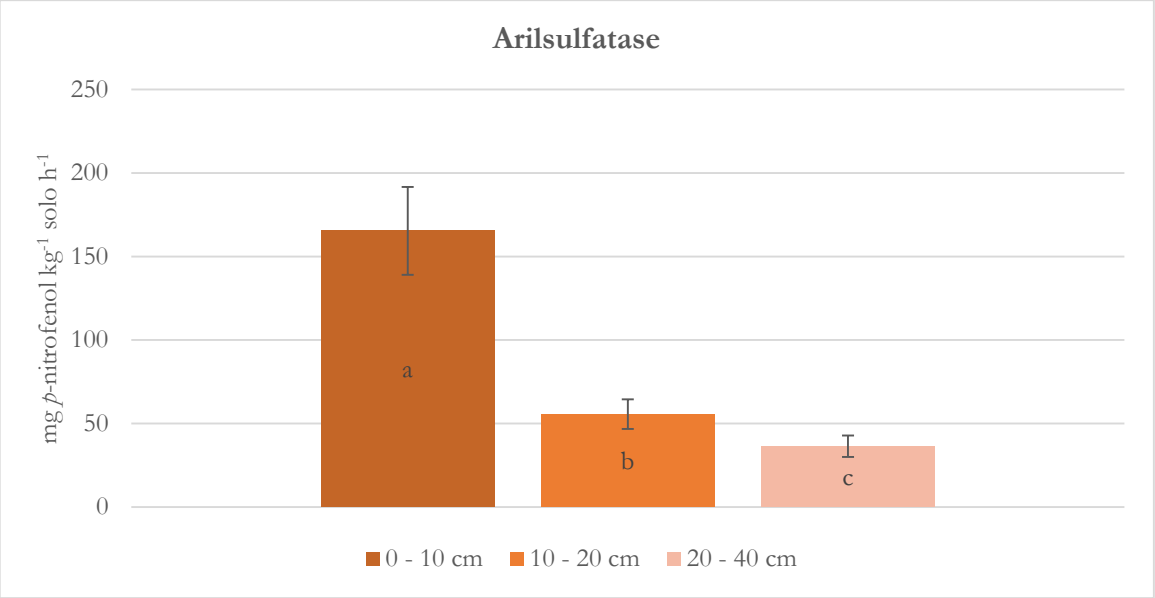

Figura 19. Atividade média de arilsulfatase em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

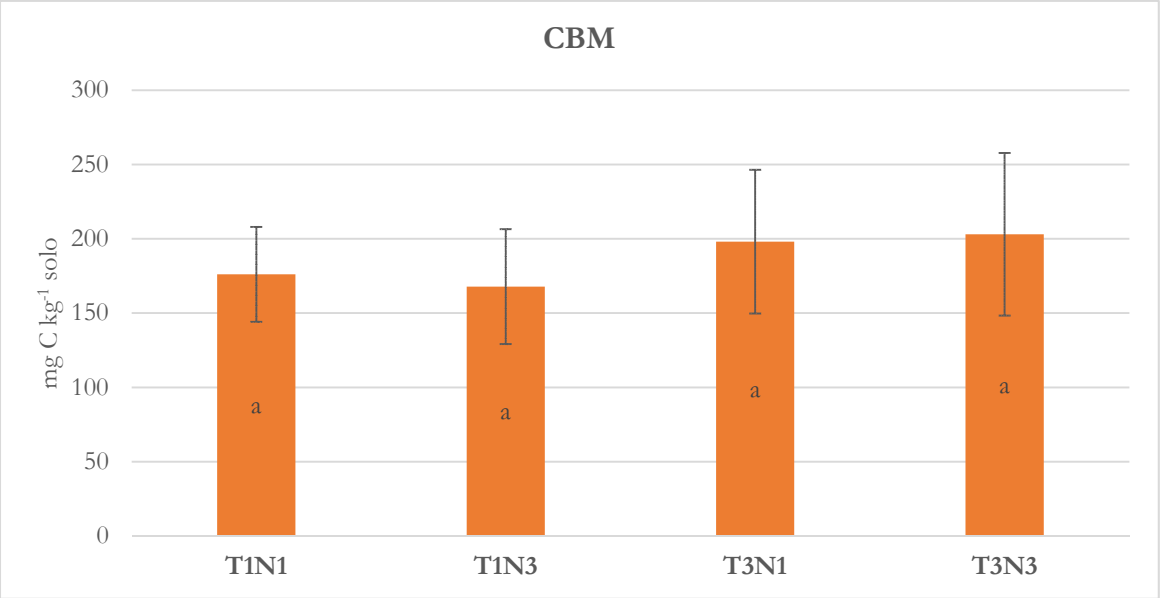

Figura 20. Teor médio de carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

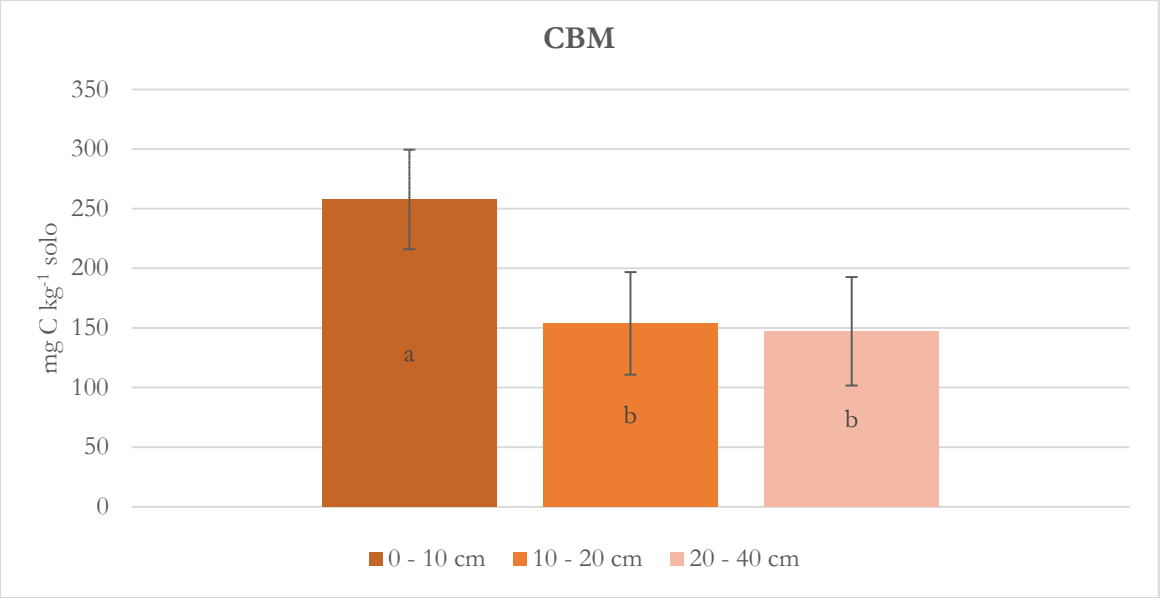

Figura 21. Teor médio de carbono da biomassa microbiana (CBM) em solos nas diferentes profundidades de amostragem considerando-se os valores médios dos tratamentos em Ponta Grossa - PR. Barras com as mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em Ponta Grossa - PR, considerando os valores médios das profundidades amostradas, a atividade da β-glicosidase foi estatisticamente superior somente no tratamento sob intensificação ecológica e sem a aplicação de N em cobertura no milho (T3N1). Isso indica que o efeito da inclusão de uma leguminosa como planta de cobertura (ervilha) na rotação de culturas sobre a atividade dessa enzima é mais pronunciado no tratamento que recebe menor adubação nitrogenada (T3N1) do que naquele que recebe uma aplicação adicional de 140 kg ha^{-1} ano^{-1} de N como adubação de cobertura no milho (T3N3). Esse

resultado é corroborado pelo trabalho de Wittwer et al. (2017), o qual conclui que a inclusão de plantas de cobertura fornece oportunidade adicionais de aumentar a produtividade de sistemas de produção menos intensivos (ex.: agricultura orgânica, que restringe o uso de fertilizantes sintéticos) e contribuir para a intensificação ecológica. As atividades das demais enzimas e o CBM, também considerando os valores médios das profundidades amostradas, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

Na comparação dos resultados entre as diferentes profundidades de amostragem, considerando os valores médios dos tratamentos, a atividade das enzimas avaliadas e o CBM apresentaram valores mais elevados na camada mais superficial do solo (0 - 10 cm) em relação às camadas mais profundas (10 - 20 cm e 20 - 40 cm). Esse resultado é esperado de acordo com a literatura consultada, já que a ausência do preparo mecânico e a manutenção dos resíduos vegetais sobre o solo no sistema plantio direto promovem maior atividade enzimática e teores mais elevados de CBM na camada superficial do solo.

5.2.2. Estrutura da comunidade microbiana por T-RFLP

Os dados obtidos pelo T-RFLP das comunidades bacteriana e fúngica das amostras de solo coletadas em Ponta Grossa - PR foram submetidos à PCoA, dando origem aos gráficos de dispersão apresentados, respectivamente, nas Figuras 22 e 23. A confirmação da semelhança ou distinção entre os grupos foi realizada pela ANOSIM, cujos valores de *p* encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 17 e 18.

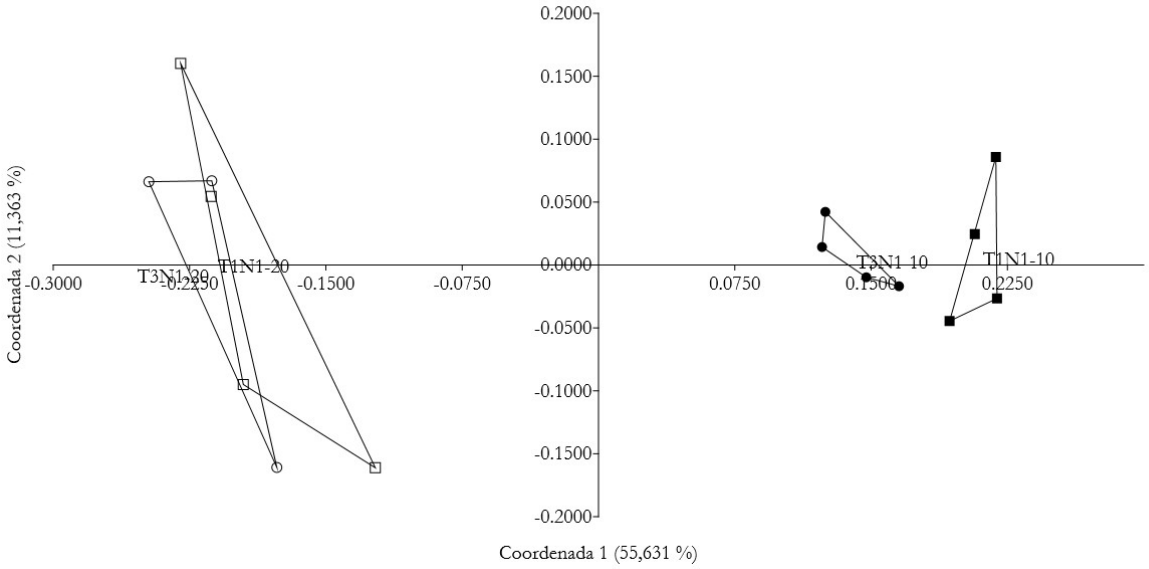

Figura 22. Gráfico de dispersão obtido pela PCoA com índice de similaridade Bray-Curtis entre os diferentes tratamentos e profundidades de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade bacteriana do solo por T-RFLP em Ponta Grossa - PR.

Tabela 17. Valores de *p* obtidos pela ANOSIM com índice de similaridade Bray-Curtis entre cada tratamento e profundidade de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade bacteriana do solo por T-RFLP em Ponta Grossa - PR, significância não corrigida.

	T1N1-10	**T1N1-20**	**T3N1-10**	**T3N1-20**
T1N1-10		0,029*	0,0285*	0,0275*
T1N1-20	0,029*		0,0255*	0,6265
T3N1-10	0,0285*	0,0255*		0,0307*
T3N1-20	0,0275*	0,6265	0,0307*	

* = $p < 0,05$; 10 = 0 - 10 cm; 20 = 10 - 20 cm.

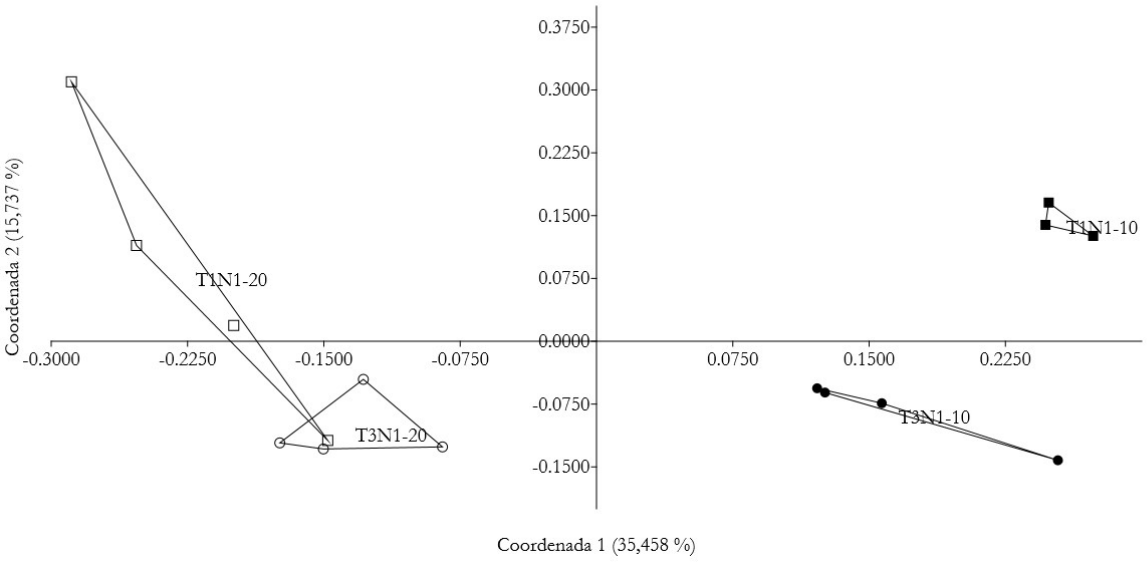

Figura 23. Gráfico de dispersão obtido pela PCoA com índice de similaridade Bray-Curtis entre os diferentes tratamentos e profundidades de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade fúngica do solo por T-RFLP em Ponta Grossa - PR.

Tabela 18. Valores de *p* obtidos pela ANOSIM com índice de similaridade Bray-Curtis entre cada tratamento e profundidade de amostragem na avaliação da estrutura da comunidade fúngica do solo por T-RFLP em Ponta Grossa - PR, significância não corrigida.

	T1N1-10	**T1N1-20**	**T3N1-10**	**T3N1-20**
T1N1-10		0.0281*	0.0265*	0.0287*
T1N1-20	0.0281*		0.0272*	0.1156
T3N1-10	0.0265*	0.0272*		0.0275*
T3N1-20	0.0287*	0.1156	0.0275*	

* = $p < 0,05$; 10 = 0 - 10 cm; 20 = 10 - 20 cm.

Em relação ao perfil da comunidade microbiana, considerando somente a camada de 0 - 10 cm de profundidade, o tratamento sob intensificação ecológica sem a aplicação de N em cobertura no milho

(T3N1) apresentou uma estruturação diferenciada das comunidades bacteriana e fúngica do solo em relação ao agrossistema regional sem a adubação nitrogenada em cobertura no milho (T1N1). Além disso, foi observada uma diferenciação na estrutura das comunidades bacteriana e fúngica na comparação entre as camadas de 0 - 10 cm e 10 - 20 cm dos tratamentos avaliados. Considerando a camada de 10 - 20 cm, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Tais resultados somam-se à ocorrência de valores mais elevados de atividade enzimática e CBM na camada de 0 - 10 cm em relação à camada de 10 - 20 cm de profundidade, indicando que tais valores podem estar relacionados a uma estruturação diferenciada na comunidade de bactérias e fungos nessa camada mais superficial do solo.

5.3. Experimentos de ambas as regiões

Comparando os resultados obtidos nos experimentos de Itiquira - MT e Ponta Grossa - PR, primeiramente vale destacar que a resposta dos bioindicadores de qualidade do solo à diversificação dos sistemas de cultivo sob plantio direto foi mais pronunciada em Itiquira - MT do que em Ponta Grossa - PR. Por exemplo, considerando a atividade da β-glicosidase na média das profundidades amostradas no experimento de Itiquira - MT, os valores médios expressos em mg *p*-nitrofenol kg^{-1} solo h^{-1} variaram de 26 no tratamento com monocultivo de soja sob plantio direto (RCS T1) a 55 no tratamento sob intensificação ecológica (T3N3). Já em Ponta Grossa - PR, esses valores variaram de 33 no agrossistema regional (T1N1) a 38 no tratamento sob intensificação ecológica (T3N1), ambos sem a adubação nitrogenada em cobertura no milho. Ou seja, em Itiquira - MT, a atividade dessa enzima foi mais que o dobro no tratamento com a rotação/consorciação de quatro espécies vegetais a cada ciclo de três anos (T3N3) em relação à monocultura (RCS T1), enquanto em Ponta Grossa - PR, a variação de apenas 13% na atividade dessa enzima entre os tratamentos com quatro culturas em rotação bienal (T1N1) e cinco culturas em rotação quadrienal (T3N1), apesar de estatisticamente válida, representa pouca mudança do ponto de vista biológico. Isso pode ser explicado pelo fato da diferença entre os níveis de diversificação de culturas dos tratamentos contrastantes ter sido maior em Itiquira - MT do que em Ponta Grossa - PR, onde houve a inclusão de apenas uma cultura no esquema de rotação.

Uma diversificação ainda maior dos sistemas de cultivo poderia ser obtida por meio do consórcio (coquetel ou mix) de plantas de cobertura em ambas as regiões. A adubação verde, realizada no presente estudo com o monocultivo de espécies leguminosas, poderia abranger uma maior diversidade de plantas, combinando, preferencialmente, diferentes famílias vegetais. Por exemplo, nas regiões de clima tropical, onde a luminosidade e a temperatura são comumente elevadas, o consórcio de plantas de cobertura incluindo gramíneas tropicais (metabolismo C4) levaria a um melhor aproveitamento de recursos como a luz solar e, consequentemente, um maior aporte de biomassa vegetal no sistema solo. Além disso, a performance de uma mistura de plantas de cobertura pode superar a média da performance individual devido a interações positivas entre as espécies (WENDLING et al., 2017). Acredita-se, portanto, que essa

maior quantidade e diversidade de matéria orgânica disponível para os organismos do solo poderia resultar em melhorias mais expressivas nos indicadores microbiológicos de qualidade do solo nos tratamentos sob intensificação ecológica.

No que diz respeito à caracterização química e física do solo dos experimentos de Itiquira - MT e Ponta Grossa - PR, os teores mais elevados de matéria orgânica e argila em Itiquira - MT pode ter favorecido um maior acúmulo de enzimas abiônticas, isto é, adsorvidas nos complexos húmico-argilosos do solo, explicando a maior atividade média da β-glicosidase no experimento GMP dessa região em comparação a Ponta Grossa - PR (51 vs. 34). No entanto, a atividade média da arilsulfatase teve um comportamento inverso, sendo mais elevada no experimento GMP de Ponta Grossa - PR do que Itiquira - MT (86 vs. 30). Os demais atributos não apresentaram diferenças relevantes que justificassem alterações nos bioindicadores de qualidade do solo entre as regiões.

6. CONCLUSÕES

No experimento de Itiquira - MT, conclui-se que a intensificação ecológica por meio de uma maior diversificação do sistema de cultivo sob plantio direto promove aumento nas atividades das enzimas β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase na camada de 0 - 10 cm de profundidade, assim como uma diferenciação na estrutura das comunidades bacteriana e fúngica do solo nessa mesma camada. Na comparação dos resultados entre as diferentes profundidades de amostragem, as atividades das enzimas avaliadas, no tratamento sob intensificação ecológica e na área sob vegetação nativa, e o CBM, considerando os valores médios dos tratamentos, apresentaram valores mais elevados na camada mais superficial do solo (0 - 10 cm) em relação às camadas mais profundas (10 - 20 cm e/ou 20 - 40 cm). Além disso, foi observada uma estruturação diferenciada da comunidade bacteriana do solo na comparação entre as camadas de 0 - 10 cm e 10 - 20 cm de profundidade.

Em relação ao experimento de Ponta Grossa - PR, pode-se concluir que a intensificação ecológica por meio da diversificação de culturas no SPD, sem a adubação nitrogenada em cobertura no milho, promove aumento na atividade da enzima β-glicosidase na média das profundidades amostradas, assim como uma diferenciação na estrutura das comunidades bacteriana e fúngica do solo na camada de 0 - 10 cm de profundidade. Na comparação dos resultados entre as diferentes profundidades de amostragem, as atividades das enzimas avaliadas e o CBM, considerando os valores médios dos tratamentos, apresentaram valores mais elevados na camada mais superficial (0 - 10 cm) em relação às camadas mais profundas do solo (10 - 20 cm e 20 - 40 cm). Além disso, foi observada uma estruturação diferenciada da comunidade microbiana do solo comparando-se as camadas de 0 - 10 cm e 10 - 20 cm.

Em conjunto, estes resultados reforçam a importância da diversificação de espécies vegetais no âmbito da exploração dos solos agrícolas, sugerindo este ser um dos pilares mais importantes para uma agricultura mais sustentável nas regiões de clima tropical e subtropical.

REFERÊNCIAS

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–69, mar. 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535888>. Acesso em: 6 set. 2019.

ANDREOTE, F. D.; PEREIRA E SILVA, M. de C. Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 29–34, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527417300140?via%3Dihub>.

ANDREOTE, F. D.; PEREIRA E SILVA, M. de C. Diversidade microbiana: causas e consequências - como acessá-las. In: **Biotecnologia microbiana ambiental**. Maringá: Eduem, 2018. p. 61–81.

AVIS, P. G.; DICKIE, I. A. N. A.; MUELLER, G. M. A 'dirty' business: testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 3, p. 873–882, 2006. Disponível em: <http:https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02842.x>.

BALOTA, E. L.; CALEGARI, A.; NAKATANI, A. S.; COYNE, M. S. Benefits of winter cover crops and no-tillage for microbial parameters in a Brazilian Oxisol: A long-term study. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 197, p. 31–40, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2014.07.010>.

BALOTA, E. L.; NOGUEIRA, M. A.; MENDES, I. de C.; HUNGRIA, M.; FAGOTTI, D. S. L.; MELO, G.; SOUZA, R. C.; MELO, W. J. **Enzimas e seu papel na qualidade do solo**. [s.l: s.n.]v. 8

BENDER, S. F.; WAGG, C.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 6, p. 440–452, 1 jun. 2016. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0169534716000616/1-s2.0-S0169534716000616-main.pdf?_tid=6fa7b8a6-be46-11e7-a3b4-00000aab0f02&acdnat=1509459719_71c6a83705c8877e8ee9f42a8b4c2634>. Acesso em: 31 out. 2017.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1–13, 1 abr. 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>. Acesso em: 14 maio. 2019.

BOMMARCO, R.; KLEIJN, D.; POTTS, S. G. Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, n. 4, p. 230–238, 1 abr. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016953471200273X>. Acesso em: 22 mar. 2019.

BRASIL. **Plano Setorial de Mitigação e Adaptação às Mudanças Climáticas para Consolidação da Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura – Plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono)**. [s.l: s.n.]

BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 27, n. 4, p. 325–349, 1 fev. 1957. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2307/1942268>. Acesso em: 6 mar. 2018.

BÜNEMANN, E. K.; BONGIORNO, G.; BAI, Z.; CREAMER, R. E.; DE DEYN, G.; DE GOEDE, R.; FLESKENS, L.; GEISSEN, V.; KUYPER, T. W.; MÄDER, P.; PULLEMAN, M.; SUKKEL, W.; VAN GROENIGEN, J. W.; BRUSSAARD, L. Soil quality – A critical review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 120, p.

105–125, maio 2018. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071718300294>. Acesso em: 25 fev. 2018.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016.

CARDOSO, E. J. B. N.; VASCONCELLOS, R. L. F.; BINI, D.; MIYAUCHI, M. Y. H.; SANTOS, C. A. dos; ALVES, P. R. L.; PAULA, A. M. De; NAKATANI, A. S.; PEREIRA, J. de M.; NOGUEIRA, M. A. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? **Scientia Agricola**, v. 70, n. 4, p. 274–289, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162013000400009&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

CASÃO JUNIOR, R.; ARAÚJO, A. G. de; FUENTES LLANILLO, R. **Plantio direto no Sul do Brasil: Fatores que facilitaram a evolução do sistema e o desenvolvimento da mecanização conservacionista**. Londrina: IAPAR, 2012.

CHEN, C.; CHEN, H. Y. H.; CHEN, X.; HUANG, Z. Meta-analysis shows positive effects of plant diversity on microbial biomass and respiration. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1332, 22 dez. 2019. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41467-019-09258-y>. Acesso em: 20 maio. 2019.

CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, v. 18, n. 1, p. 117–143, 1993. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>. Acesso em: 31 jan. 2018.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2015/2016Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2015/2016**BrasíliaConab, , 2016. . Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2018/2019Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2018/2019**BrasíliaConab, , 2019. . Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

D'ANDRÉA, A. F.; SILVA, M. L. N.; CURI, N.; SIQUEIRA, J. O.; CARNEIRO, M. A. C. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no sul do estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 4, p. 913–923, dez. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832002000400008&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 9 set. 2019.

DE FREITAS, P. L.; LANDERS, J. N. The Transformation of Agriculture in Brazil Through Development and Adoption of Zero Tillage Conservation Agriculture. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 2, n. 1, p. 35–46, 1 mar. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095633915300125?via%3Dihub>. Acesso em: 24 abr. 2019.

DEBIASI, H.; FRANCHINI, J. C.; JUNIOR, A. A. B.; CONTE, O. Diversificação de espécies vegetais como fundamento para a sustentabilidade da cultura da soja. **Documentos 366**, p. 60, 2015.

DERPSCH, R. History of crop production, with and without tillage. **Leading Edge**, v. 3, n. 1, p. 150–154, 2004.

DIAS, T.; DUKES, A.; ANTUNES, P. M. Accounting for soil biotic effects on soil health and crop productivity in the design of crop rotations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 3, p. 447–454, 1 fev. 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6565>. Acesso em: 20 maio. 2019.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and Assessing Soil Quality. In: **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**. SSSA Special Publication SV - 35. Madison, WI: Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, 1994. p. 1–21.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Quantitative Indicators of Soil Quality: A Minimum Data Set. In: **Methods for**

Assessing Soil Quality. SSSA Special Publication SV - 49. Madison, WI: Soil Science Society of America, 1996. p. 25–37.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014**. 1. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2013.

FAO. **Conservation Agriculture**. Disponível em: <http://www.fao.org/conservation-agriculture/en/>. Acesso em: 1 maio. 2019.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, dez. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542011000600001&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 21 mar. 2019.

GARCIA, R. A. **Diversificação do sistema produtivo: estratégia para superar entraves da sucessão de culturas**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/14364329/artigo---diversificacao-do-sistema-produtivo-estrategia-para-superar-entraves-da-sucessao-de-culturas>. Acesso em: 26 abr. 2019.

GILLER, K. E.; ANDERSSON, J. A.; CORBEELS, M.; KIRKEGAARD, J.; MORTENSEN, D.; ERENSTEIN, O.; VANLAUWE, B. Beyond conservation agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 870, 28 out. 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00870/abstract>. Acesso em: 1 maio. 2019.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS. **Palaeontologia Electronica 178kb. T. Harper. Geological Museum**, v. 4, n. 4, p. 5–7, 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org>. Acesso em: 31 jan. 2018.

HENNERON, L.; BERNARD, L.; HEDDE, M.; PELOSI, C.; VILLENAVE, C.; CHENU, C.; BERTRAND, M.; GIRARDIN, C.; BLANCHART, E. Fourteen years of evidence for positive effects of conservation agriculture and organic farming on soil life. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 1, p. 169–181, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13593-014-0215-8>.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V: A method for measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 209–213, 1 jan. 1976. Disponível em: <http://www-sciencedirect-com.ez67.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/0038071776900055?via%3Dihub>. Acesso em: 24 set. 2017.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071709003095?via%3Dihub>. Acesso em: 20 maio. 2019.

KASSAM, A.; FRIEDRICH, T.; DERPSCH, R. Global spread of Conservation Agriculture. **International Journal of Environmental Studies**, v. 76, n. 1, p. 29–51, 2 jan. 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00207233.2018.1494927>. Acesso em: 23 abr. 2019.

LAL, R. Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. **Sustainability**, v. 7, n. 5, p. 5875–5895, 13 maio 2015. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2071-1050/7/5/5875/>. Acesso em: 30 ago. 2017.

LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4516–4522, 1 nov. 1997. Disponível em:

<http://aem.asm.org/content/63/11/4516.abstract>.

LOPES, A. A. de C.; SOUSA, D. M. G.; DOS REIS, F. B.; FIGUEIREDO, C. C.; MALAQUIAS, J. V.; SOUZA, L. M.; MENDES, I. de C. Temporal variation and critical limits of microbial indicators in oxisols in the Cerrado, Brazil. **Geoderma Regional**, v. 12, p. 72–82, 1 mar. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235200941730130X>. Acesso em: 27 ago. 2018.

LOPES, A. A. de C.; SOUSA, D. M. G. de; CHAER, G. M.; REIS JUNIOR, F. B. dos; GOEDERT, W. J.; MENDES, I. de C. Interpretation of Microbial Soil Indicators as a Function of Crop Yield and Organic Carbon. **Soil Science Society of America Journal**, v. 77, p. 461, 2013. Disponível em: <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/77/2/461>.

LOURENTE, E. R. P.; MARCHETTI, M. E.; DE SOUZA, L. C. F.; DE SOUZA, C. M. A.; GONÇALVES, M. C.; MERCANTE, F. M.; SILVA, M. A. G. Crop rotation and soil biochemical and microbiological characteristics and corn crop yield. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 31, n. 4, p. 829–842, 2010.

MCDANIEL, M. D.; TIEMANN, L. K.; GRANDY, A. S. Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? A meta-analysis. **Ecological Applications**, v. 24, n. 3, p. 560–570, 1 abr. 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1890/13-0616.1>. Acesso em: 28 fev. 2018.

MENDES, I. C.; SOUZA, L. M.; SOUSA, D. M. G.; LOPES, A. A. C.; REIS-JUNIOR, F. B.; LACERDA, M. P. C.; MALAQUIAS, J. V. Critical limits for microbial indicators in tropical Oxisols at post-harvest: The FERTBIO soil sample concept. **Applied Soil Ecology**, v. 139, p. 85–93, 1 jul. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139318312253?via%3Dihub>. Acesso em: 25 abr. 2019.

MENDES, I. C.; SOUZA, L. V.; RESCK, D. V. S.; GOMES, A. C. Propriedades biológicas em agregados de um Latossolo Vermelho-Escuro sob plantio convencional e direto no Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 3, p. 435–443, jun. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832003000300005&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 23 set. 2017.

MENDES, I. de C. Indicadores biológicos de qualidade de solo em sistemas de plantio direto no Brasil: Estado atual e perspectivas futuras. In: MOREIRA, F. M. DE S.; KASUYA, M. C. M. (Ed.). **Fertilidade e biologia do solo: integração e tecnologia para todos**. 1. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016. p. 309–334.

MENDES, I. de C.; REIS JUNIOR, F. B. dos; HUNGRIA, M.; FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M.; MERCANTE, F. M.; ZILLI, J. É. Microbiologia do solo e sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. DE; REIS JUNIOR, F. B. DOS (Ed.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1. ed. [s.l.] Embrapa Cerrados, 2011. p. 218–242.

MENDES, I. de C.; SOUSA, D. M. G. de; REIS JUNIOR, F. B. dos. Bioindicadores de qualidade de solo: dos laboratórios de pesquisa para o campo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 32, n. 1/2, p. 185–203, 2015. Disponível em: <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/cct/article/view/23311/13164>. Acesso em: 5 set. 2017.

NUNES, M. R.; VAN ES, H. M.; SCHINDELBECK, R.; RISTOW, A. J.; RYAN, M. No-till and cropping system diversification improve soil health and crop yield. **Geoderma**, v. 328, p. 30–43, 15 out. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706118300077>. Acesso em: 16 abr. 2019.

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, dez. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832001000400009&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 24 set. 2017.

PEIXOTO, R. S.; CHAER, G. M.; FRANCO, N.; REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; ROSADO, A. S. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 403–413, out. 2010.

PITTELKOW, C. M.; LIANG, X.; LINQUIST, B. A.; VAN GROENIGEN, K. J.; LEE, J.; LUNDY, M. E.; VAN GESTEL, N.; SIX, J.; VENTEREA, R. T.; VAN KESSEL, C. Productivity limits and potentials of the principles of conservation agriculture. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 365–368, 22 jan. 2015. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature13809>. Acesso em: 18 abr. 2019.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 159–164, 1 jan. 1987. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038071787900769>. Acesso em: 22 maio. 2019.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. DE; RIBEIRO, J. F. (Ed.). **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 151–212.

SALTON, J. C.; MIELNICZUK, J.; BAYER, C. Agregação e estabilidade de agregados do solo em sistemas agropecuários em Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 32, p. 11–21, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v32n1/02.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHÜTTE, U. M. E.; ABDO, Z.; BENT, S. J.; WILLIAMS, C. J.; SCHNEIDER, G. M.; SOLHEIM, B.; FORNEY, L. J. Bacterial succession in a glacier foreland of the High Arctic. **The ISME Journal**, v. 3, n. 11, p. 1258–1268, 9 nov. 2009. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ismej200971>. Acesso em: 12 mar. 2019.

SCOPEL, E.; TRIOMPHE, B.; AFFHOLDER, F.; DA SILVA, F. A. M.; CORBEELS, M.; XAVIER, J. H. V.; LAHMAR, R.; RECOUS, S.; BERNOUX, M.; BLANCHART, E.; DE CARVALHO MENDES, I.; DE TOURDONNET, S. Conservation agriculture cropping systems in temperate and tropical conditions, performances and impacts. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 1, p. 113–130, 2013.

SILVA, R. R. da; SILVA, M. L. N.; CARDOSO, E. L.; MOREIRA, F. M. de S.; CURI, N.; ALOVISI, A. M. T. Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica Campos das Vertentes - MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 5, p. 1584–1592, out. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832010000500011&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 9 set. 2019.

SOUZA, E. D. de; CARNEIRO, M. A. C.; PAULINO, H. B.; SILVA, C. A.; BUZETTI, S. Frações do carbono orgânico, biomassa e atividade microbiana em um Latossolo Vermelho sob cerrado submetido a diferentes sistemas de manejos e usos do solo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 3, 10 fev. 2006.

SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: calibration in situ using microbial respiration and 14C labelled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 3, p. 337–343, 1 jan. 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038071788900144>. Acesso em: 22 maio. 2019.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 321–346, out. 1985. Disponível em:

<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541>. Acesso em: 6 set. 2019.

TABATABAI, M. A. Soil Enzymes. In: **Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties**. SSSA Book Series SV - 5.2. Madison, WI: Soil Science Society of America, 1994. p. 775–833.

TIEMANN, L. K.; GRANDY, A. S.; ATKINSON, E. E.; MARIN-SPIOTTA, E.; MCDANIEL, M. D. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. **Ecology Letters**, v. 18, n. 8, p. 761–771, 2015. Disponível em: <http:https://doi.org/10.1111/ele.12453>.

TOLIVER, D. K.; LARSON, J. A.; ROBERTS, R. K.; ENGLISH, B. C.; DE LA TORRE UGARTE, D. G.; WEST, T. O. Effects of No-Till on Yields as Influenced by Crop and Environmental Factors. **Agronomy Journal**, v. 104, n. 2, p. 530, 2012. Disponível em: <https://www.agronomy.org/publications/aj/abstracts/104/2/530>. Acesso em: 24 abr. 2019.

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, jan. 1987. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038071787900526/pdf?md5=d83cad5dfb3434f521771d2ad4b161ca&pid=1-s2.0-0038071787900526-main.pdf>. Acesso em: 11 set. 2017.

VENTER, Z. S.; JACOBS, K.; HAWKINS, H.-J. The impact of crop rotation on soil microbial diversity: A meta-analysis. **Pedobiologia**, v. 59, n. 4, p. 215–223, 1 jul. 2016. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0031405616300117/1-s2.0-S0031405616300117-main.pdf?_tid=8519ed08-b8ec-11e7-80b5-00000aab0f6b&acdnat=1508871345_435fa237712d786bfe23e2b5ab8a72d5>. Acesso em: 24 out. 2017.

WENDLING, M.; BÜCHI, L.; AMOSSÉ, C.; JEANGROS, B.; WALTER, A.; CHARLES, R. Specific interactions leading to transgressive overyielding in cover crop mixtures. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 2017.

WITTWER, R. A.; DORN, B.; JOSSI, W.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Cover crops support ecological intensification of arable cropping systems. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41911, 3 fev. 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep41911>. Acesso em: 5 abr. 2018.

ZUBER, S. M.; VILLAMIL, M. B. Meta-analysis approach to assess effect of tillage on microbial biomass and enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 97, 2016. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0038071716300190/1-s2.0-S0038071716300190-main.pdf?_tid=7e8b6668-d365-11e7-ad1d-00000aacb35f&acdnat=1511782033_6616746497dc330042575031a3aadc19>. Acesso em: 27 nov. 2017.