

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CAMILA ISABEL PEREIRA REZENDE

**BIOINDICAÇÃO DE QUALIDADE DO SOLO DO BIOMA CERRADO SOB
DIFERENTES SISTEMAS DE USO E MANEJO**

Monte Carmelo – MG

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CAMILA ISABEL PEREIRA REZENDE

**BIOINDICAÇÃO DE QUALIDADE DO SOLO DO BIOMA CERRADO SOB
DIFERENTES SISTEMAS DE USO E MANEJO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia, *Campus* Monte Carmelo, da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Isaias de Melo

Monte Carmelo – MG

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CAMILA ISABEL PEREIRA REZENDE

**BIOINDICAÇÃO DE QUALIDADE DO SOLO DO BIOMA CERRADO SOB
DIFERENTES SISTEMAS DE USO E MANEJO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia, *Campus* Monte Carmelo, da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

Monte Carmelo, 27 de Maio de 2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Edmar Isaias de Melo
Orientador

Profa. Dra. Cinara Xavier de Almeida
Membro da Banca

Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra
Membro da Banca

**Monte Carmelo – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos ao longo desta caminhada.

Agradeço aos meus pais, José Benedito e Vilma Pereira, por todo o apoio e por me ensinarem a nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia – Campus Monte Carmelo, por me proporcionar um ambiente criativo e amigável para os estudos. Sou grata à cada membro do corpo docente pelos ensinamentos e conselhos para a vida profissional.

Agradeço o meu orientador Prof. Dr. Edmar Isaías de Melo, por todos os ensinamentos, oportunidades e paciência que teve ao longo desses cinco anos, e tornou possível a conclusão deste trabalho e desta etapa em minha vida.

Aos membros da banca avaliadora, pela disponibilidade em estarem presentes e sugerirem melhorias ao trabalho.

Meus agradecimentos aos meus amigos, Layane Carolina, Luís Fernando, Iago Radamés, Pablo Arthur, João Henrique, Larissa Bortolo, João Carlos, Gustavo de Paula, Pedro Joel e Edson Mateus, Gustavo Moreira, companheiros de trabalhos que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho e desta etapa em minha vida.

SUMÁRIO

Capítulo 1: DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DA ENZIMA UREASE NO SOLO	6
1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVO	6
3 REFERENCIAL TEÓRICO	6
4 MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1 Avaliação da atividade da urease	8
4.2 Análise por injeção em fluxo (FIA-CE).....	8
4.3 Análise colorimétrica	9
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
6 CONCLUSÕES.....	16
7 REFERÊNCIAS	16
Capítulo 2: ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA E ENZIMÁTICA COMO INDICADORES DA QUALIDADE DE SOLO DO BIOMA CERRADO SOB DIFERENTES SISTEMAS DE USO	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	22
3 REFERENCIAL TEÓRICO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Descrição das áreas de estudo e amostragem	24
4.2 Atividade da urease	24
4.3 Ponto de carga zero.....	24
4.4 Atividade microbiana.....	25
4.5 Potencial hidrogeniônico	25
4.6 Carbono lábil	26
4.7 Carbono da biomassa microbiana	26
4.8 Fósforo assimilável.....	27
4.9 Análise dos dados.....	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÕES.....	35
7 REFERÊNCIAS	35

Capítulo 1: DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DA ENZIMA UREASE NO SOLO

RESUMO

Urease é uma enzima que catalisa a hidrólise da uréia em dióxido de carbono, amônia e água, sendo que sua atividade no solo pode ser avaliada monitorando a concentração dos produtos ou reagentes dessa reação. O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de metodologia analítica para a avaliação da atividade enzimática da urease no solo, a partir da quantificação do íon amônio, produto da hidrólise da ureia, utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo com difusão gasosa e detecção condutométrica. Os resultados foram comparados com um método colorimétrico. A resposta de condutividade foi avaliada para os parâmetros de fluxo e concentração de NaOH. O método apresentou faixa linear de 0,02 a 4,0 mmol L⁻¹ de NH₄⁺, limite de quantificação de 0,07 mmol L⁻¹ e frequência analítica teórica de 28 amostras h⁻¹. O método proposto apresentou precisão e exatidão comparável ao método colorimétrico, porém a praticidade, a elevada frequência analítica são grandes atrativos para a utilização do método proposto na avaliação da atividade enzimática da uréase no solo, com relação a metodologia colorimétrica.

Palavras-chave: Sistema de análise por injeção em fluxo; Enzima; Análise colorimétrica.

1 INTRODUÇÃO

A urease é uma enzima produzida por microrganismos do solo que facilitam a quebra de moléculas de ureia, transformando em amônia, gás carbônico e água, causando perdas de nitrogênio para a atmosfera. Sabe-se da abundante presença natural desta enzima em todos os solos, entretanto esta pode ter sua atividade influenciada por inúmeros fatores, como pH, teor de matéria orgânica, textura do solo, umidade, presença de moléculas tóxicas no solo, e CTC (capacidade de troca de cátions e ânions).

Esta enzima é de difícil mensuração no solo, devido a métodos onerosos e de altos custos com reagentes de alta toxicidade. Entretanto sua mensuração em solos pode ser utilizada como um parâmetro de bioindicação de qualidade do solo, pois esta enzima é produzida por microrganismos no solo, especificamente as bactérias, assim esta população microbiana é fortemente influenciada por resíduos químicos utilizados na agricultura e pela redução de matéria orgânica do solo.

Os resíduos de inseticidas aplicados no solo provocam impacto na população microbiana do solo o que pode levar a estimulação, decréscimo ou modificação dos processos biológicos do solo como nitrificação, amonificação, respiração, ATP e outros processos essenciais à saúde do solo, fertilidade e produtividade dos campos agrícolas (VIG et al., s/d).

No solo, um dos maiores prejuízos causados pela redução de matéria orgânica e excessiva quantidade e diversidade de substâncias químicas lançadas sobre ele, é a redução da biodiversidade e a supressão de microrganismos que possuem funções importantes na quebra da matéria orgânica, fixação de nutrientes no solo e na participação da catalise do ciclo de vários nutrientes.

Neste sentido o estabelecimento de indicadores microbiológicos e bioquímicos é relevante pois a atividade microbiológica e enzimática contribuem na regulação dos processos ecológicos do solo e refletem as condições dos manejos atuais. Desta maneira são úteis para determinação dos efeitos positivos e negativos sobre a qualidade do solo e a sustentabilidade das práticas agrícolas (LOPES, 2001).

2 OBJETIVO

Objetivou-se com o presente trabalho o desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação da atividade enzimática da urease no solo, a partir da quantificação do íon amônio, produto da reação enzimática, utilizando análise por injeção em fluxo com difusão gasosa e detecção condutométrica.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

A produção de alimentos, fibras e energia são fundamentais para a sociedade, no entanto os processos produtivos devem corroborar com a manutenção da qualidade do solo, com foco na continuidade dos processos produtivos e preservação de recursos naturais. A possibilidade de pagamentos por serviços ambientais e de certificação de áreas agrícolas e produtos estão alinhados com a adoção de práticas que garantam a conservação do solo, e que tem demandado avaliações de sua qualidade utilizando atributos biológicos, associados aos atributos físico-químicos, nas análises de rotina e no estabelecimento de índices de qualidade. Vários estudos mostram que parâmetros biológicos podem ser utilizados como indicadores de qualidade do solo, sendo mais sensíveis que parâmetros físico-químicos, na detecção antecipada de alterações que possam ocorrer em virtude do uso e manejo do solo (PEIXOTO et al., 2010; LISBOA et al., 2012; DE CARVALHO MENDES et al., 2015; MENTA, C. et al., 2018).

Dentre os parâmetros utilizados como indicadores biológicos de qualidade do solo, a avaliação da atividade enzimática integra informações importantes sobre as condições microbiológicas e físico-químicas do solo (AON et al., 2001), sendo mais um parâmetro que pode avaliar o papel dos microrganismos no solo (DENG et al., 2000). Vários trabalhos têm enfatizado a importância da atividade enzimática como indicador capaz de detectar diferenças entre solos e mudanças que variam em função da influência das ações antrópicas (PAZ-FERREIRO et al., 2010; TAN et al., 2014; BOWLES et al., 2014).

Dentre as diversas enzimas presentes no solo, a urease (ureia amido-hidrolase) participa do ciclo do nitrogênio no solo, contribuindo para liberação de nitrogênio inorgânico, pois catalisa hidrólise de ureia a dióxido de carbono e amônia, os quais são assimilados por

microrganismos e plantas (UPADHYAY. 2012). A atividade dessa enzima, tem sido relatada na literatura como sendo mais sensível a presença de contaminantes do que outras enzimas presentes no solo (BÅÅTH, 1989; LIPÍNSKA et al., 2013; SHEN et al., 2006). Essa maior sensibilidade, e sua relação com a microbiota do solo, tornam a avaliação da atividade da urease um parâmetro importante na bioindicação da qualidade do solo.

As metodologias utilizadas na determinação da atividade enzimática da urease no solo, apresentam uma etapa comum, em que uma solução tamponada, contendo o substrato ureia, é colocada em contato com solo, e em seguida a mistura é incubada sob condições padronizadas por determinado período. A variação da concentração do substrato ou do produto da catálise enzimática no tempo é utilizado para avaliação da atividade enzimática, e a técnica analítica utilizada para avaliação da concentração, seja da uréia ou dos produtos da reação, tem sido a etapa que diferencia uma metodologia da outra, utilizada na determinação da atividade da urease no solo.

Muitos trabalhos reportam a avaliação do teor de nitrogênio amoniacal gerado pela catálise enzimática, frente ao substrato, onde o mesmo é separado do meio reacional por destilação com arraste de vapor e posteriormente quantificado por titulação (LONGO et al., 2005). Esse método apresenta baixa frequência de análise, baixa sensibilidade e consumo considerável de reagentes. A avaliação da atividade enzimática, também tem sido realizada por métodos espectrofotométricos (TAN, et al., 2014; YAN et al., 2013; HU et al., 2014) onde o produto da catálise enzimática reage especificamente com reagente colorimétrico, formando um produto cuja concentração é determinada espectrofotometricamente. Os métodos espectrométricos, apesar de apresentarem maior sensibilidade, apresentam desvantagens, pois utilizam reagente tóxicos, custo elevado e baixa frequência de análise, limitada pelo tempo de formação do produto da reação colorimétrica (LANNA et al., 2010).

Os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*), apresentam vantagens, dentre elas, possibilidade de automatização, menor consumo de reagentes, e elevada frequência de análise (MIRANDA et al., 2012; RAMDZAN et al., 2013). Entretanto, a avaliação da atividade da urease no solo, utilizando a análise por injeção em fluxo não foi relatada na literatura. Entretanto, vários trabalhos reportam a quantificação do íon amônio ou de ureia em várias matrizes de amostras utilizando FIA (SPINKS et al., 1990; SILVA et al., 2000; TIMOFEEVA et al., 2015). A determinação, do íon amônio, ou da ureia, por FIA, normalmente envolve a transformação do íon amônio em amônia gasosa a qual permeia por uma membrana de difusão gasosa antes da detecção condutométrica (COELHO et al., 1992; BORGES et al., 2009; KAMOGAWA et al., 2009; JAIKANG et al., 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia proposta foi aplicada na avaliação da atividade da uréase em amostras de LATOSSOLO VERMELHO Distrófico (SANTOS et al., 2013), de uma área com vegetação nativa do bioma cerrado (18°44'56,6"S 47°30'49,7"W), no mês de outubro de 2017. Foram selecionadas cinco parcelas de 100 m², onde em cada parcela foram coletadas 10 sub amostras na profundidade de 0 a 15 cm, homogeneizadas resultando em 5 amostras compostas (500 g por amostra composta; identificadas: A1, A2, A3, A4 e A5), que foram armazenadas sob refrigeração à 2,0 °C até o momento da análise.

4.1 Avaliação da atividade da urease

Cinco amostras de solo foram incubadas segundo Souza (2014), com modificações. No solo fresco (malha 2,0 mm; 10,0 g) foram adicionados 5,0 mL de solução de ureia (4,8 g L⁻¹). Em seguida a mistura foi incubada a 37°C, sob agitação, durante uma hora. Amostras de solo fresco, sem adição de solução de ureia também foram incubadas utilizando as mesmas condições. Após incubação, a reação foi interrompida com a adição de 10,0 mL da solução KCl 1,0 mol L⁻¹ e HCl 10,0 mmol L⁻¹. As suspensões foram filtradas, e o extrato aquoso foi utilizado para determinação da concentração de íon amônio pelo método de análise por injeção em fluxo com detecção condutométrica-FIA/CE (FERREIRA et al., 2013; PASQUINI et al., 1987) e pelo método colorimétrico adaptado de Martins (2015) e Oliveira (2012).

4.2 Análise por injeção em fluxo (FIA-CE)

A concentração do íon amônio do extrato aquoso, foi determinada pela análise por injeção em fluxo, utilizando o sistema em fluxo descrito na Figura 1. As soluções foram bombeadas usando a bomba peristáltica Minipuls 3 Gilson e tubos de Tygon[®].

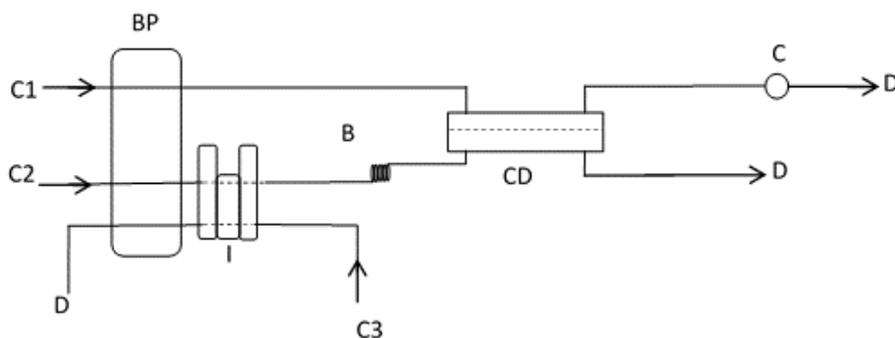


Figura 1. Sistema de análise por injeção em fluxo proposto para determinação de amônia gerada pela catálise da ureia pela urease no solo. I, injetor comutador; C₁, solução receptora (água deionizada); C₂, solução transportadora (NaOH); C₃, solução padrão ou extrato da amostra de solo; BP, bomba peristáltica; B, reator helicoidal; CD, câmara de difusão de gás; C, condutivímetro; D, descarte.

Foram avaliados os parâmetros hidrodinâmicos, vazão da solução transportadora/receptora (0,4; 0,9 e 1,2 mL min⁻¹) e volume da alça de amostragem (77; 132 e 187 μL) de forma univariada. A concentração do NaOH na solução receptora (1,0; 10,0; 100,0 e 200,0 mmol L⁻¹) também foi avaliada. A avaliação dos parâmetros hidrodinâmicos e da concentração do NaOH na solução receptores foi realizada com solução padrão de sulfato de amônio 1,6 mmol L⁻¹.

A concentração de amônia produzida pela enzima presente na amostra de solo, foi determinada na forma de íon amônio, por curva analítica, no qual foram utilizadas soluções padrões de sulfato de amônio em triplicata (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mmol L⁻¹ e 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,09 e 0,11 mmol L⁻¹ de íon NH₄⁺, para o método FIA/CE e colorimétrico, respectivamente).

4.3 Análise colorimétrica

O íon amônio, presente no extrato de solo, também foi determinado pelo método colorimétrico, utilizando o kit K047 (Bioclin®, Brasil) (MARTINS, 2015; OLIVEIRA, 2012). Foram adicionados 1,0 mL do oxidante (50 mL do reagente oxidante contendo Hidróxido de Sódio 1,5 mol L⁻¹ e Hipoclorito de Sódio 10,0 mmol L⁻¹, diluído em 450,0 mL de água) e 1,0 mL de solução trabalho (25,0 mL Tampão Fosfato, pH = 7,50 e concentração 100 mmol L⁻¹, nitroprussiato de sódio 5,0 mmol L⁻¹, salicilato de sódio 300,0 mmol L⁻¹, estabilizantes e

conservantes, em 100,0 mL de água). Também foram adicionados 100 µL de extrato de solo previamente diluído (100 µL de extrato e 100µL de água deionizada) e água deionizada originando um volume final de 2,5 mL de solução de leitura. O frasco reacional foi deixado em repouso por 15 minutos, e em seguida a absorbância a 600 nm, foi lida em espectrofotômetro da FEMTO, 700 Plus, em cubeta de vidro, caminho óptico de 10 mm, capacidade de 2,0 mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

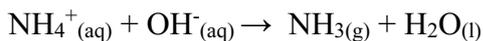
O solo possui, dentre outras enzimas, a urease, responsável pela hidrólise da ureia, que é convertida em carbonato de amônio; esse composto, por sua vez, decompõe-se facilmente em gás amônia (NH₃), CO₂ e água (Equações 1 e 2).



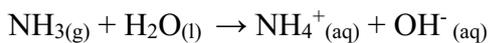
A atividade enzimática pode ser expressa em unidade de atividade cujo símbolo é U, a qual é definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa o consumo do substrato ou a formação do produto. Assim, a atividade da uréase no solo pode ser avaliada pela determinação da variação da concentração da amônia, produto da hidrólise da ureia, em relação ao tempo de incubação e quantidade de solo. Em específico, para uréase no solo, a sua atividade foi avaliada pela concentração do íon amônio produzida pela catálise enzimática, por massa de solo e por unidade de tempo, sendo expressa em mg de NH₄⁺ kg⁻¹ h⁻¹.

A concentração do íon amônio foi determinada por dois métodos, FIA-CE (método proposto neste trabalho) e pelo método colorimétrico (MARTINS, 2015; OLIVEIRA, 2012).

A resposta condutométrica do íon amônio produzido pela enzima, foi avaliado no sistema em fluxo descrito na Figura 1. Tal sistema baseia-se na reação do íon amônio com hidróxido de sódio para formação de amônia gasosa (equação 3) que permeia através de membrana polimérica de politetrafluoretileno (PTFE). A amônia difundida pela membrana reage com a água (equação 4), ionizando formando íons que são monitorados por condutividade elétrica, sendo o valor da condutividade elétrica, proporcional à concentração do íon amônio.



Equação (3)



Equação (4)

Foram avaliados os parâmetros hidrodinâmicos (Figura 2 e 3) do sistema FIA de modo a investigar as melhores condições para a resposta condutométrica.

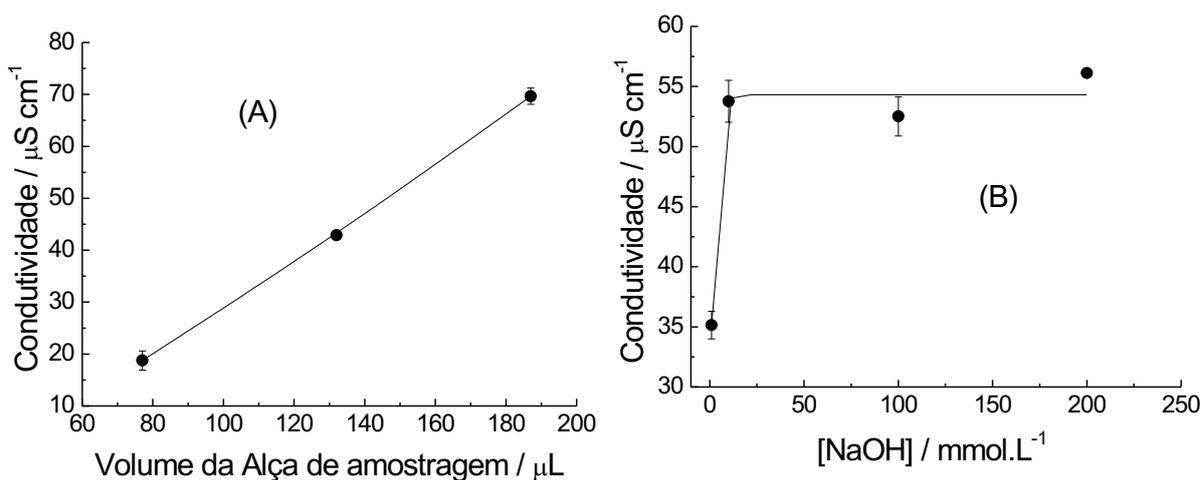


Figura 2. Resposta condutométrica em função do volume da alça de amostragem (A), concentração de NaOH (B). Vazão da solução transportadora de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$; Solução padrão de sulfato de amônio, $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ e reator helicoidal com $0,8 \text{ mm}$ de diâmetro x 85 cm de comprimento.

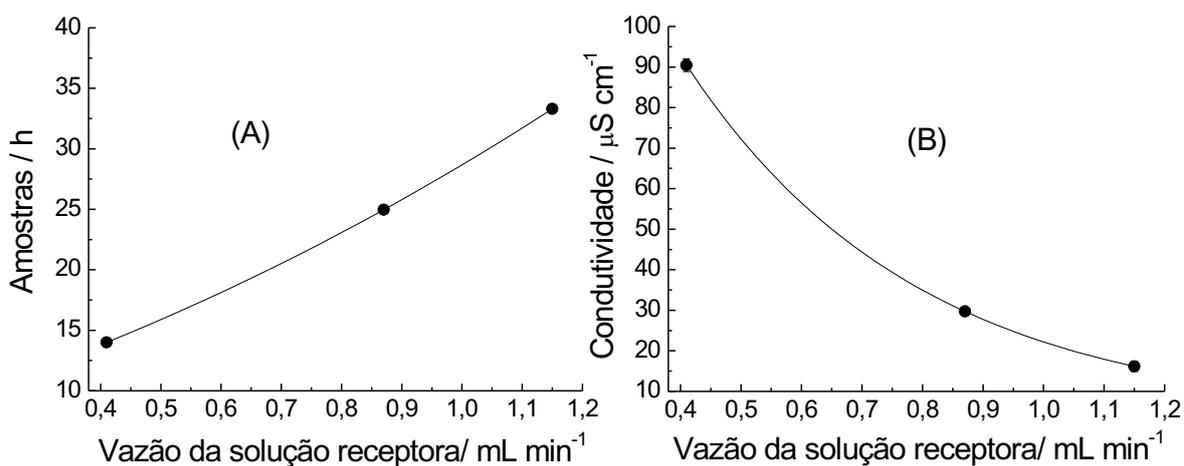


Figura 3. Frequência de amostragem (A) e resposta condutométrica em função da vazão da solução receptora (B). Condições: Solução padrão de sulfato de amônio, $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ e reator helicoidal com $0,8 \text{ mm}$ de diâmetro x 85 cm de comprimento.

Os parâmetros do sistema em fluxo foram estabelecidos, observando a magnitude do sinal analítico (resposta de condutividade elétrica) aliado a estabilidade da linha base,

sensibilidade e frequência de amostragem. Valores de alça de amostragem maiores que 187 μL repercutem em menor frequência analítica. Foram estabelecidos 187 μL , 10,0 mmol L^{-1} e 1,15 mL min^{-1} para o volume de amostragem, concentração da solução de NaOH e vazão da solução receptora, respectivamente. A vazão da solução receptora foi estabelecida em função de uma maior frequência analítica.

Após avaliação dos parâmetros de fluxos, soluções de concentrações crescentes do padrão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram injetadas em triplicata no sistema FIA. Desse modo, foi possível obter alguns parâmetros de confiabilidade analítica, como sensibilidade, faixa linear, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade). Na sequência deste estudo, o extrato aquoso de cinco amostras de solo sob vegetação nativa do bioma cerrado foram avaliadas em triplicata, pelo método FIA-CE e colorimétrico por meio da interpolação das respectivas respostas analíticas nas curvas analíticas de calibração (externa). Na figura 4 estão representados a resposta condutométrica (CE) para método FIA-CE e sua respectiva curva de analítica, bem como a curva analítica para o método colorimétrico.

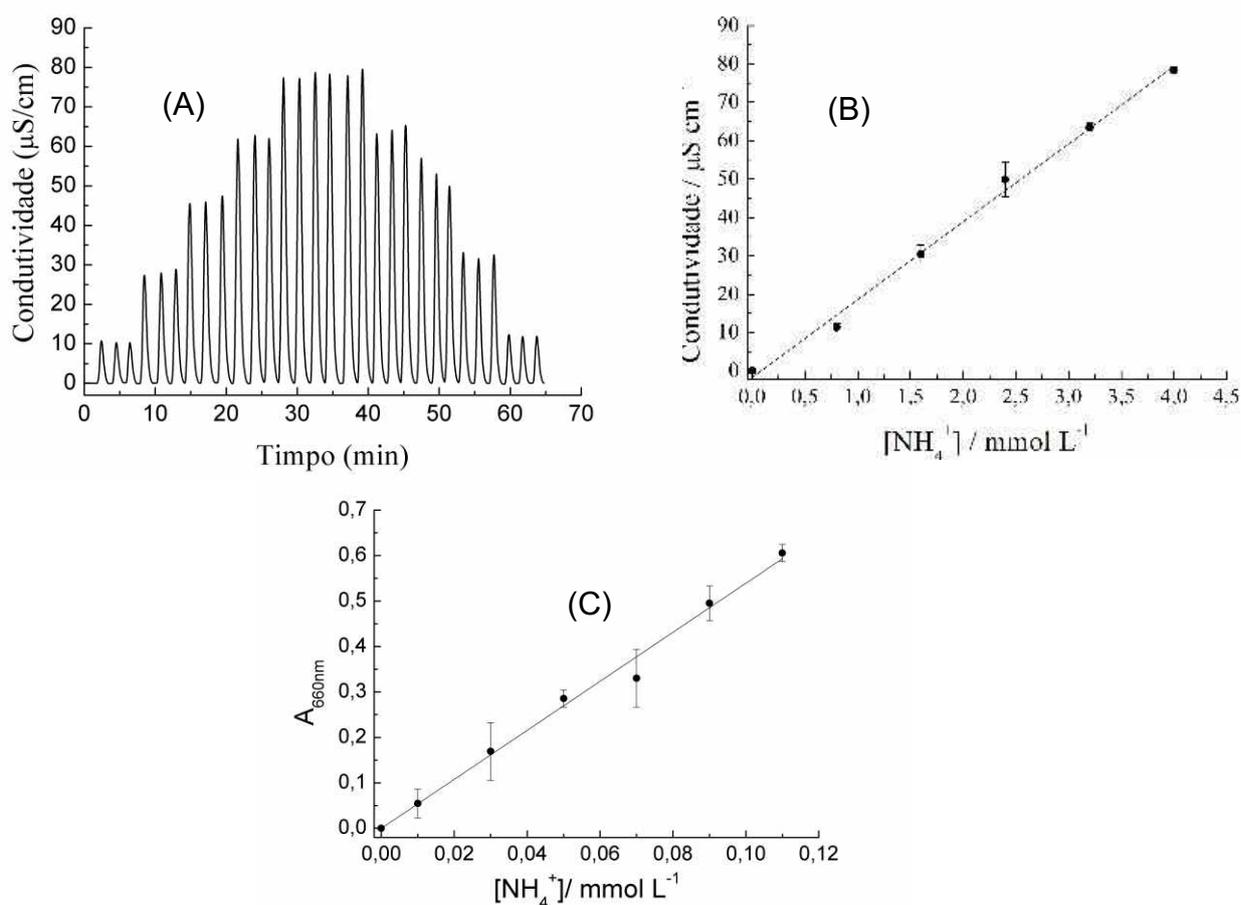


Figura 4. Resposta condutométrica de soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (A); Curva de calibração para o método FIA-CE (B) e para o método colorimétrico (C).

A partir destes resultados, foram calculadas as seguintes equações de reta: CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$) = $20,3 [\text{NH}_4^+] (\text{mmol L}^{-1}) - 1,68$ ($R = 0,994$) para o método FIA-CE; e $A = 5,5[\text{NH}_4^+] (\text{mmol L}^{-1}) + 0,00197$ ($R = 0,999$) para o método colorimétrico. A faixa linear apresentada pelo método FIA-CE (de 0,07 a 4,0 mmol L^{-1}) foi superior a faixa apresentada pelo método colorimétrico (0,0033 a 0,110 mmol L^{-1}), sendo interessante pois a concentração de amônio gerada pela atividade enzimática no solo é relativamente elevada, amenizando erros provocados por diluições dos extratos de solo, caso seja necessário. Todos estes parâmetros analíticos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros Analíticos do método FIA-CE e Colorimétrico

	FIA-CE	Colorimétrico
Faixa linear (mmol L^{-1})	0,07 – 4,0	0,0033 – 0,110
Coefficiente de correlação, R	0,998	0,999
Limite de detecção (mmol L^{-1})	0,02	0,0011
Limite de quantificação (mmol L^{-1})	0,07	0,0033
Exatidão, (%)	94,7	102,8
Precisão, CV (%)	5,3	2,5
Sensibilidade, S	$20,3 \mu\text{S cm}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}$	$5,5 \text{ U.A mmol}^{-1} \text{L}$
Tempo de resposta (s)	42	----
FAT (amostras h^{-1})	28	----

LD = $3 \times \text{DPB} / S$, LQ = $10 \times \text{DPB} / S$, DPB: desvio padrão da resposta analítica do branco; CV = $(\text{DP} / [\text{NH}_4^+]_{\text{média}}) \times 100$, onde DP: Exatidão = $([\text{NH}_4^+]_{\text{média experimental}} / [\text{NH}_4^+]_{\text{teórica}}) \times 100$; Desvio padrão; S: Sensibilidade calculada a partir da inclinação da curva analítica; FAT: Frequência Analítica Teórica;

Na Tabela 1 também pode ser comparado o desempenho entre o método FIA-CE e o método colorimétrico em função dos parâmetros analíticos apresentados para determinação do íon amônio. Observa-se que o método proposto (FIA-CE) apresentou uma maior sensibilidade, ou seja, maior mudança na resposta avaliada (Condutividade elétrica) em relação a resposta do método colorimétrico frente a variação da concentração do íon amônio. No entanto, o método FIA-CE apresentou um limite de detecção maior que o método colorimétrico, o que não inviabiliza sua utilização para avaliação da atividade da urease.

O método proposto neste trabalho, apresentou elevada frequência analítica quando comparado com o método colorimétrico, que demanda um tempo de reação para formação de complexo colorido para posterior quantificação, por espectrometria UV-Vis, do íon amônio gerado pela enzima no solo. Todas estas vantagens do método FIA-CE também se sobressaem

quando este é comparado ao método que determina o nitrogênio total por destilação com arraste de vapor e posterior quantificação por titulação.

Utilizando a resposta de condutividade solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$, $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$, $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,11 \text{ mmol L}^{-1}$, estimou-se a precisão do método FIA CE e colorimétrico, respectivamente. A precisão do método proposto ($\text{CV}= 5,3\%$) não foi maior que a precisão apresentada pelo método colorimétrico ($\text{CV}= 2,5\%$), no entanto, o método FIA CE é considerado preciso para os níveis de concentração avaliados (WOOD, 1999).

Na Tabela 1 também pode ser verificado pelo valor da sensibilidade (S) que o método proposto apresentou sensibilidade menor que o método colorimétrico. No entanto, esta característica analítica não se trata de um inconveniente e também não resulta em prejuízo na avaliação da atividade da urease no solo. O método FIA-CE, apesar de menos sensível, proporcionou uma frequência analítica maior que o método colorimétrico (demanda de um tempo de reação para formação de complexo colorido para posterior quantificação do íon amônio gerado pela enzima no solo). O método FIA-CE mostrou sensibilidade maior que o método que determina a atividade enzimática pelo teor de Nitrogênio total por arraste de vapor seguido por titulação (LONGO et al., 2005).

A eficiência do método FIA-CE foi avaliada para a determinação da atividade da uréase em cinco amostras (identificadas: A1, A2, A3, A4 e A5) de solo sob vegetação nativa do bioma cerrado. A resposta condutométrica para os extratos de solo com e sem a presença do substrato (ureia) na etapa de incubação estão apresentados na figura 5.

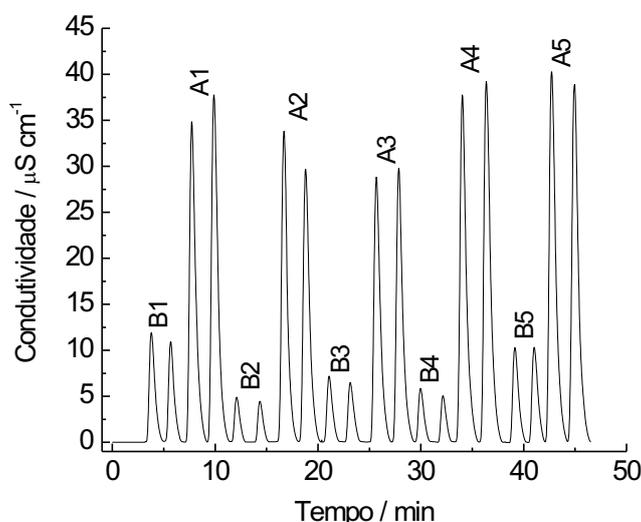


Figura 5. Resposta condutométrica de extratos de amostras de solo vegetação nativa do cerrado com adição de solução de ureia (A) e sem adição de solução de ureia (B) no procedimento de incubação.

O picos identificados como A1, A2, A3, A4 e A5, são referentes a resposta de condutividade da concentração de íons NH_4^+ , gerado pela enzima urease após a adição do substrato de ureia em função do tempo de incubação, somado a resposta de condutividade referente a concentração de íons NH_4^+ , já existente no solo que foi incubado. Subtraindo as alturas de pico das amostras incubadas com o substrato ureia, das alturas de picos das suas respectivas amostras sem adição do substrato ureia (B1, B2, B3, B4 e B5, obtém-se a concentração de íons NH_4^+ , gerado pela enzima durante o período de incubação, ou seja a variação da concentração do produto da reação enzimática em função do tempo que corresponde a atividade da enzima uréase presente nas amostras de solo, cujos os resultados estão apresentados na tabela 2. Com o objetivo de validar os resultados obtidos pelo método proposto FIA CE, a atividade da urease nas amostras também foi determinada por um método já descrito na literatura, utilizado na determinação da atividade a urease no solo (MARTINS, 2015; OLIVEIRA, 2012), e os resultados também estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Comparação entre os resultados da determinação da atividade da uréase em amostras de solo sob vegetação nativa do bioma cerrado pelo método proposto e colorimétrico.

	FIA-CE	Colorimétrico
Amostra	A.E. ($\text{mg Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) *	A.E. ($\text{mg Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)*
A1	$38,7 \pm 5,4$	$30,8 \pm 3,2$
A2	$18,3 \pm 8,7$	$31,4 \pm 2,1$
A3	$28,3 \pm 2,2$	$18,6 \pm 3,4$
A4	$40,8 \pm 2,6$	$32,7 \pm 1,4$
A5	$40,6 \pm 2,3$	$31,1 \pm 2,2$

A.E.: Atividade enzimática da urease obtidas pela variação da concentração de íon amônio gerado pela enzima, por massa de solo por hora de incubação. *Média \pm DPR (n=3)

Os resultados da atividade da urease nas amostras de solo obtidos pelo método FIA-CEA e pelo método colorimétrico foram submetidos aos teste F, onde as razões das variâncias do conjunto das análises para a metodologia proposta em relação ao método colorimétrico ($F_{\text{calculado}} = S_{\text{proposto}}^2 / S_{\text{Colorimétrico}}^2$) foi de 2,86, sendo este valor inferior ao $F_{\text{crítico}}$, 6,39 ao nível de confiança de 95 %, indicando que a precisão entre os dois métodos são estatisticamente iguais, com 95% de confiabilidade. Objetivando comparar a média, foi realizado o teste t, para amostras independentes, onde o $t_{\text{calculado}}$ foi de 0,86 inferior ao $t_{\text{tabelado}} = 2,31$ a um nível de

confiança de 95 %, indicando que as médias obtidas pelos dois métodos (Tabela 3) são iguais dentro do nível de confiança do teste.

Tabela 3. Atividade média da urease no solo determinada pelos dois métodos

Método	Atividade da Urease (mg Kg ⁻¹ h ⁻¹)
FIA-CE	29,0a
Colorimétrico	33,4a

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t, para amostras independentes a 5% de probabilidade. (n=5).

6 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou um método mais simples e rápido para determinação da atividade da uréase no solo, utilizando análise por injeção em fluxo, com membrana de difusão gasosa e detecção condutométrica do íon amônio. O sistema em fluxo com detecção condutométrica proporcionou sensibilidade de 20,3 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}$ e frequência analítica (28 amostras. h⁻¹), faixa linear de trabalho 0,07 a 4,0 mmol L^{-1} , com limite de detecção de 0,02 mmol L^{-1} e limite de quantificação de 0,07 mmol L^{-1} , com coeficiente de variação de 5,3% e recuperação de 94,7% indicando precisão e exatidão aceitáveis para níveis de concentração avaliados. Os resultados a atividade da urease de amostras de solo, determinada pelo método proposto (FIA CE) e pelo método colorimétrico, confirmaram pelo teste F e pelo teste t que o método FIA CE possuem desempenho similar, quanto a precisão e exatidão e portanto poderá ser aplicada na avaliação da atividade da urease no solo como um dos parâmetros de bioindicação da qualidade do solo.

7 REFERÊNCIAS

ANVISA. Ministério Da Saúde -MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Of. da União** 2003, 2003.

AON, M. .; COLANERI, A. . II. Temporal and Spatial Evolution of Enzymatic Activities and Physico-Chemical Properties in an Agricultural Soil. **Appl. Soil Ecol.** 2001, 18 (3), 255–270.

BÅÅTH, E. Effects of Heavy Metals in Soil on Microbial Processes and Populations (a Review). **Water. Air. Soil Pollut.** 1989, *47* (3–4), 335–379.

BACKES, R. S.; GUEDES, T. J.; SANTOS, W. T. P.; RODRIGO, A. B. **Quim. Nova.** 2017, *40* (7), 752–759.

BORGES, S. DA S.; ACEVEDO, M. S. M. S. F.; KORN, M. Sistema Multicomutado de Análise Em Fluxo Para Determinação de Amônio e Monocloramina Em Águas Residuais e Produtos de Desinfecção. **Quim. Nova** 2009, *32* (5), 1175–1179.

BOWLES, T. M.; ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; CALDERÓN, F.; JACKSON, L. E. Soil Enzyme Activities, Microbial Communities, and Carbon and Nitrogen Availability in Organic Agroecosystems across an Intensively-Managed Agricultural Landscape. **Soil Biol. Biochem.** 2014, *68*, 252–262.

COELHO, N. M. M.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H. Determinação de Amônio e Nitrato Em Solos Por Injeção Em Fluxo, Pelo Método Difusão-Conductividade. **Rev. Bras. Cienc. do Solo** 1992, *16*, 325–329.

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Effect of Cropping Systems on Nitrogen Mineralization in Soils. **Biol. Fertil. Soils** 2000, *31*, 211–218.

FERREIRA, G. DE F. T. M. Desenvolvimento de Procedimentos de Análise Por Injeção Em Fluxo Para a Determinação de Amônio e Nitrito Em Águas, Dissertação, Universidade Federal de Grande Dourados, Brasil, 2013.

HU, B.; LIANG, D.; LIU, J.; LEI, L.; YU, D. Transformation of Heavy Metal Fractions on Soil Urease and Nitrate Reductase Activities in Copper and Selenium Co-Contaminated Soil. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 2014, *110*, 41–48.

JAIKANG, P.; GRUDPAN, K.; KANYANEE, T. Conductometric Determination of Ammonium Ion with a Mobile Drop. **Talanta** 2015, *132*, 884–888.

KAMOGAWA, M. Y.; ESTADUAL, U.; GROSSO, D. M.; ITAHUN, R. D.; MS, D. Autoamostrador de Baixo Custo Para Análise Por Injeção Em Fluxo . **Quim. Nova** 2009, *32* (6), 1644–1646.

LANNA, A. C.; DA SILVEIRA, P. M.; DA SILVA, M. B.; FERRARESI, T. M.; KLIEMANN, H. J. Atividade de Urease No Solo Com Feijoeiro Influenciada Pela Cobertura Vegetal e Sistemas de Plantio. **Rev. Bras. Cienc. do Solo** 2010, *34* (6), 1933–1939.

LIPÍŃSKA, A.; KUCHARSKI, J.; WYSZKOWSKA, J. Urease Activity in Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. 2013, *22* (5), 1393–1400.

LISBOA, B. B.; VARGAS, L. K.; SILVEIRA, A. O. DA; MARTINS, A. F.; SELBACH, P. A. Indicadores Microbianos de Qualidade Do Solo Em Diferentes Sistemas de Manejo. **Rev. Bras. Ciência do Solo** 2012, *36* (1), 33–44.

LONGO, R. M.; JOSÉ DE MELO, W. J. Hidrólise Da Uréia Em Latossolos: Efeito Da Concentração de Uréia, Temperatura, PH, Armazenamento e Tempo de Incubação. **Rev. Bras. Cienc. do Solo** 2005, 29 (4), 651–657.

MENDES, I. DE C.; SOUSA, D. M. G. DE; JUNIOR, F. B. DOS R. Bioindicadores de Qualidade de Solo: Dos Laboratórios de Pesquisa Para o Campo. **Cad. Ciência Tecnol.** 2015, 32 (1/2), 185–203.

MARTINS, L. E. Absorção e Assimilação Da Ureia Por Plantas de Metabolismo Fotossintético C3 e C4, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2015.

MENTA, C.; CONTI, F. D.; PINTO, S.; BODINI, A. Soil Biological Quality Index (QBS-Ar): 15 Years of Application at Global Scale. **Ecol. Indic.** 2018, 85 (June 2017), 773–780.

MIRANDA, C. E. S.; CARRILHO, E.; GERVASIO, A. P.; GINÉ, M. F. **Sistemas Interfaceados de Análise Por Injeção Em Fluxo e Eletroforese Capilar (FIA - CE): Desafios, Aplicações e Perspectivas**; 2002; Vol. 25.

OLIVEIRA, S. MARTINS DE. Atividade Microbiana e Propriedades Bioquímicas Do Solo Sob a Adição de Composto Orgânico e Palha de Café, Dissertação, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2012.

PASQUINI, C.; DE FARIA, L. C. Flow-Injection Determination of Ammonia in Kjeldahl Digests by Gas Diffusion and Conductometry. **Anal. Chim. Acta** 1987, 193 (C), 19–27.

PAZ-FERREIRO, J.; TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRS, M. C.; SEOANE, S.; GIL-SOTRES, F. Effect of Management and Climate on Biochemical Properties of Grassland Soils from Galicia (NW Spain). **Eur. J. Soil Biol.** 2010, 46 (2), 136–143.

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** 2010, 98 (3), 403–413.

RAMDZAN, A. N.; MORNANE, P. J.; MCCULLOUGH, M. J.; MAZUREK, W.; KOLEV, S. D. Determination of Acetaldehyde in Saliva by Gas-Diffusion Flow Injection Analysis. **Anal. Chim. Acta** 2013, 786, 70–77.

SANTOS, H. G. DOS; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. DOS; OLIVEIRA, V. Á. DE; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. D. E.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. DE. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**; 2013; p 353.

SILVA, F. V.; NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B.; REIS, B. F.; ARAÚJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. M. B. S.; LIMA, J. L. F. C. Potentiometric Determination of Urea by Sequential Injection Using Jack Bean Meal Crude Extract as a Source of Urease. **Talanta** 2000, 53 (2), 331–336.

SOUSA, H. M. Atributos Microbiológicos Do Solo Em Sistemas de Integração Lavoura-Pecuária No Ecótono Cerrado- Amazônia, **Dissertação**, Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil, 2014.

SHEN, G.; LU, Y.; HONG, J. Combined Effect of Heavy Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Urease Activity in Soil. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 2006, *63* (3), 474–480.

SPINKS, T. L.; PACEY, G. E. Utilization of Adsorption-Immobilized Urease in Gas-Diffusion Flow Injection. **Anal. Chim. Acta** 1990, *237* (C), 503–508.

TAN, X.; XIE, B.; WANG, J.; HE, W.; WANG, X.; WEI, G. County-Scale Spatial Distribution of Soil Enzyme Activities and Enzyme Activity Indices in Agricultural Land: Implications for Soil Quality Assessment. **Sci. World J.** 2014, *2014*, 1–11.

TIMOFEEVA, I. I.; BULATOV, A. V; MOSKVIN, A. L.; KOLEV, S. D. A Gas-Diffusion Flow Injection Method Coupled with Online Solid-Liquid Extraction for the Determination of Ammonium in Solid Samples. **Talanta** 2015, *142*, 140–144.

UPADHYAY, L. S. B. Urease Inhibitors: A Review. **Indian J. Biotechnol.** 2012, *11* (4), 381–388.

WOOD, R. How to Validate Analytical Methods. **TrAC - Trends Anal. Chem.** 1999, *18* (9–10), 624–632

YAN, J.; QUAN, G.; DING, C. Effects of the Combined Pollution of Lead and Cadmium on Soil Urease Activity and Nitrification. **Procedia Environ. Sci.** 2013, *18*, 78–83.

Capítulo 2: ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA E ENZIMÁTICA COMO INDICADORES DA QUALIDADE DE SOLO DO BIOMA CERRADO SOB DIFERENTES SISTEMAS DE USO

RESUMO

Sabe-se que a agricultura convencional pode afetar os atributos físicos, químicos e biológicos do solo, acarretando a diminuição da qualidade desse. Diante das alterações que o manejo da agricultura pode causar no solo, objetivou-se com esse trabalho avaliar cinco áreas com diferentes manejos e coberturas de solo, buscando demonstrar alterações físico-químicas e microbiológicas do solo. Duas amostras de solo foram coletadas em áreas sob vegetação nativa do bioma cerrado e outras amostras foram coletadas em área de pastagem, área de cultivo de milho verão e área com cultivo de sorgo. Foram avaliados os atributos pH em água e CaCl_2 , fósforo assimilável ($P_{\text{Assimilável}}$), ponto de carga zero (PCZ), atividade microbiana pela respiração basal do solo (RBS), carbono da biomassa microbiana (CBM) e carbono lábil ($C_{\text{lábil}}$), e a atividade enzimática da uréase (AU). Analisando os resultados de RBS e CBM observa-se que não apresentaram diferença significativa em relação ao manejo do solo, no entanto $C_{\text{lábil}}$, $P_{\text{Assimilável}}$, pH, PCZ e AU do solo sofreram influência em relação a situação de manejo, principalmente quando comparado aos valores do solo sob vegetação nativa e área de cultivo de milho. O manejo do solo não afetou a atividade microbiana do solo, em específico, microrganismos geradores de C-CO_2 , com exceção do CBM e $C_{\text{lábil}}$. A acidez e o PCZ do solo sofreram alterações em virtude da aplicação de corretivos. O solo sob cultivo de milho foi o que apresentou resultados de bioindicação de qualidade de solo mais compatíveis com o solo sob vegetação nativa, evidenciando que o solo sob cultivo de milho apresentou os melhores resultados com relação ao fósforo assimilável.

Palavras-chave: Bioindicação; atividade bioquímica; manejo do solo

1 INTRODUÇÃO

O município de Monte Carmelo – MG está localizado na região do Alto do Paranaíba, onde se concentra forte atividade da agricultura, principalmente a cafeicultura, mas também cultivo de cereais, pastagem, entre outras culturas. Grande parte desses cultivos são intensivos, com grande utilização de insumos e mecanização agrícola. Observa-se que alguns tratamentos culturais, ou situações de manejo podem ocasionar a perda de matéria orgânica do solo, erosão e contaminação das águas subterrâneas, além de prejuízos à microbiota e seus processos bioquímicos (ARSHAD e MARTIN, 2002).

A utilização de agrotóxicos nas lavouras pode resultar em sérios problemas, pois esses são tidos atualmente como um dos principais poluidores e agentes causadores de impacto nos agroecossistemas, principalmente no solo. Eles são responsáveis pelos mais diversos tipos de interações, onde muitas levam a degradação dos recursos naturais fundamentais para a fertilidade do solo, alterações na sua estruturação e principalmente diminuem a diversidade de organismos (ZILLI et al., 2003). Sob esse aspecto, a qualidade do solo pode ser diretamente comprometida pelo uso inadequado e em excesso de agrotóxicos, principalmente na supressão de determinados organismos vivos do solo que atuam diretamente na ciclagem de nutrientes. Essa alteração na diversidade de microrganismos provoca uma eliminação de espécies sensíveis e a proliferação de outras resistentes ou mais tolerantes aos agrotóxicos, em um processo conhecido como redundância (KENNEDY, 1999).

O solo é um recurso natural vital para o funcionamento do ecossistema terrestre, e representa um balanço entre os fatores físicos, químicos e biológicos, sendo considerado um sistema natural vivo e dinâmico, regulador da produção de alimentos e fibras e do balanço global do ecossistema, além de servir como meio para o crescimento vegetal, através do suporte físico, disponibilidade de água, nutrientes e oxigênio para as raízes. Pode atuar na regulação hídrica do ambiente, transformação e degradação de compostos poluentes (DORAN; SARRANTONIO; LIEBIG, 1996).

Verificar a relação dos parâmetros bioquímicos e microbiológicos com o histórico de manejo da área, proporciona o monitoramento das alterações bioquímicas e microbiológicas do solo como bioindicador da qualidade do solo sob diferentes manejos e culturas. E proporciona a possibilidade de buscar soluções tecnológicas relacionadas ao manejo sustentável do solo em sistemas agrícolas da cafeicultura na região do Alto Paranaíba.

2 OBJETIVOS

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a atividade microbiana, enzimática e química do solo, como bioindicadores de qualidade do solo em diferentes sistemas de uso.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

A agricultura está em constante desenvolvimento e manejo intensivo do solo, o qual pode afetar os atributos físicos, químicos e biológicos, acarretando a diminuição da qualidade do solo, quando relacionado a aspectos de fertilidade aliados principalmente a inativação de enzimas, redução da atividade microbiológica e conseqüentemente influência na ciclagem de nutrientes essenciais para manutenção da qualidade do solo (ANTUNES et al., 2018). Uma das formas de avaliar as constantes modificações provocadas pela agricultura convencional é a utilização de bioindicadores de qualidade de solo (KRÜGER, 2018; GARCÍA-PÉREZ, 2016).

Observa-se cada vez mais o interesse pelo funcionamento biológico dos solos agriculturáveis, ultrapassando os limites dos ambientes acadêmicos e dos laboratórios de pesquisa. A possibilidade de pagamentos por serviços ambientais e de certificação de fazendas, estão incentivando os produtores a investir em práticas que garantam a conservação e restauração dos recursos naturais, o que tem promovido uma necessidade de avaliação de parâmetros de qualidade do solo, não apenas nos aspectos químicos e físicos, mas também parâmetros que informem aspectos biológicos da qualidade do solo. A avaliação de parâmetros de bioindicação da qualidade de solo podem verificar a população e as condições em que se encontram os microrganismos no solo, que são os responsáveis diretos pelo funcionamento do solo, atuando nos processos de gênese, decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, formação da matéria orgânica e biorremediação de áreas contaminadas por poluentes e agrotóxicos (GAMA-RODRIGUES, 2018).

As avaliações biológicas do solo, para se obter informações sobre os impactos que a agricultura pode provocar sobre a qualidade do solo é de fundamental importância, pois microrganismos possuem a capacidade de dar respostas rápidas a mudanças na qualidade do solo, característica que não é observada na avaliação de parâmetros químicos ou físicos do solo (HOFFMANN, 2018). Em alguns casos, alterações na população e na atividade microbiana

podem preceder mudanças nas propriedades químicas e físicas, refletindo uma melhoria na qualidade do solo ou na degradação do mesmo. Avaliações dos parâmetros, carbono da biomassa microbiana, carbono lábil e respiração basal do solo, atividade enzimática da uréase, aliadas a avaliações químicas, como pH, ponto de carga zero (PCZ), e fósforo assimilável podem fornecer informações reais da qualidade de um solo sob cultivo.

Os microrganismos respondem rapidamente a mudanças no manejo do solo e a medida em que se aumenta a profundidade do solo a atividade microbiana é menor pois está relacionada diretamente com a porção de matéria orgânica do solo que se encontra numa concentração maior na profundidade de 0-5 cm, além da profundidade a atividade microbiana também é afetada por fatores como a temperatura, pH do solo, umidade (TOMM, 2003). Compreender as características da população microbiana e seu comportamento no solo auxiliam a desenvolver práticas de manejo do solo menos intensivas e prejudiciais a esta população. Avaliações como carbono da biomassa microbiana (C-BMS), respiração basal (C-CO₂), quociente metabólico (qCO_2) e quociente microbiano ($qMIC$) podem explicar os processos ecológicos do ambiente (NOVAK et al., 2018).

A avaliação da atividade enzimática também é um importante parâmetro utilizado como indicador de qualidade de solo, pois está diretamente ligado com decomposição da matéria orgânica, condições físico-químicas e população microbiana do solo. Além disto este parâmetro possui alta sensibilidade de detecção e expressa a influência de ações antrópicas que ocorrem no solo (BOWLES, 2014).

Dentre as diversas enzimas presentes no solo, a uréase, cuja a avaliação da atividade enzimática pode ser utilizada como bioindicação da qualidade do solo, participa ativamente de processos envolvidos no ciclo do nitrogênio, contribuindo para liberação de nitrogênio inorgânico, pois catalisa hidrólise de ureia o dióxido de carbono e amônia, os quais são assimilados por microrganismos e plantas (UPADHYAY, 2012). Esta enzima também apresenta sensibilidade as alterações no solo e está diretamente correlacionada com a microbiota do solo, e também responde a possíveis contaminações do solo pela aplicação constante de defensivos agrícolas fatos estes que fazem da avaliação da atividade da urease um parâmetro importante na bioindicação da qualidade do solo (DE MELO et al., 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição das áreas de estudo e amostragem

Amostras de solo foram coletadas em cinco áreas (Área 1- fragmento de vegetação nativa do bioma cerrado (18°41'55,5"S 47°35'29,1"W); Área 2-Cultivo de milho verão (18°41'41,6"S 47°36'17,6"W); Área 3- Cultivo convencional de sorgo em rotação (18°46'09,4"S 47°27'38,7"W); Área 4- Pastagem (18°42'35,3"S 47°35'37,9"W); Área 5- fragmento de vegetação nativa do bioma cerrado (18°46'15,8"S 47°27'42,8"W)). Em cada área foram selecionadas quatro parcelas (P1, P2, P3, P4; de 100,0 m² cada), onde em cada parcela foram coletadas 10 sub amostras na profundidade de 0 a 20 cm que foram homogeneizadas resultando em 4 amostras compostas de cada área.

4.2 Atividade da urease

As amostras de solo foram incubadas segundo Souza (2014), com modificações. No solo fresco (malha 2,0 mm; 10,0 g) foram adicionados a 5,0 mL de solução de ureia (4,8 g L⁻¹). Em seguida a mistura foi incubada a 37°C, sob agitação, durante uma hora. Amostras de solo fresco, sem adição de solução de ureia também foram incubadas utilizando as mesmas condições. Após incubação, a reação foi interrompida com a adição de 10,0 mL da solução KCl 1,0 mol L⁻¹ e HCl 10,0 mmol L⁻¹. As suspensões foram filtradas, e o extrato aquoso foi utilizado para determinação da concentração de íon amônio pelo método de análise por injeção em fluxo com detecção condutométrica-FIA/CE com modificações (DE MELO et al., 2018).

4.3 Ponto de carga zero

A avaliação do ponto de carga zero (PCZ) foi realizada em duplicata adicionando 2,5 g de solo, e 30 mL de solução aquosa de KCl 0,1 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH inicial (1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00 10,00; 11,00; 12,00), ajustado com soluções

de HCl ou NaOH 0,1 mol L⁻¹. Após 24 h de agitação, em temperatura ambiente, as soluções foram filtradas e o pH final da solução foi avaliado (OH et al., 2012).

4.4 Atividade microbiana

A atividade microbiana do solo foi avaliada pela determinação da Respiração Basal do Solo (RBS), cujo o procedimento foi realizado conforme metodologia descrita por Dionísio (2016). Inicialmente foi determinada a capacidade de retenção de água (CRA) e posterior correção da umidade para 60,0 % da CRA, com água destilada. A massa referente a 100,00 g de solo úmido, previamente peneirado, em peneira de abertura de 2,00 mm, foi pesada em duplicata, e transferida para um frasco de vidro com tampa hermética. Dentro do frasco de vidro foi colocado um tubo de ensaio contendo 10,0 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ padronizado para capturar o CO₂ produzido e outro tubo de ensaio contendo 10,0 mL de água destilada para manter a umidade do ambiente do frasco. Para cada dez frascos de vidro a serem incubados, foi realizado uma prova em branco, que corresponde a um frasco contendo apenas um tubo de ensaio com 10 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ padronizado e outro contendo 10,0 mL de água destilada. Os frascos de vidro foram fechados hermeticamente e incubados em estufa a 28 °C por uma semana (168 h). Após o período de incubação, retirou-se dos frascos de vidro os tubos de ensaio contendo NaOH, cuja solução foi transferida para erlenmeyer de 125,0 mL, adicionando 1,0 mL de BaCl₂ (10 % m/V) e duas gotas de fenolftaleína e o excesso de NaOH foi titulado com HCl 0,5 mol. L⁻¹.

4.5 Potencial hidrogeniônico

A determinação do pH foi realizada em duplicata, em solução de cloreto de cálcio (CaCl₂), e em água de acordo EMBRAPA (2011). Foram pesadas amostras de 5 g de solo em seguidas condicionadas em frascos plásticos, após foram adicionados 12,5 ml de CaCl₂ a 0,01 mol. L⁻¹ e 12,5 ml de água para o pH em água. Após 24 horas o pH foi determinado pelo pHmetro.

4.6 Carbono lábil

A determinação do Carbono Lábil foi realizada em duplicata, segundo Blair et al. (1995), adaptado por Shang & Tiessen (1997). Pesou-se 1,0 g de terra fina seca ao ar (TFSA), que foram transferidas para tubo falcon de 50,0 mL, os quais foram envoltos com papel alumínio. Foram adicionados 25 mL da solução de KMnO_4 $0,033 \text{ mol L}^{-1}$, agitados por 1 hora, e em seguida centrifugados por 5 minutos. Após centrifugação, 40 μL do sobrenadante foi pipetado em tubos de ensaio, completando o volume de 10 ml com água. Após isso, foi feita a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 565 nm. A curva de calibração é realizada pela determinação do permanganato residual após a reação com a fração lábil da matéria orgânica presente no solo, foi construída a partir de uma solução estoque de KMnO_4 , $0,00060 \text{ mmol. L}^{-1}$. Para cada ponto da curva foram pipetadas em 5 tubos de ensaio quantidades correspondentes à: 1330; 1667; 1867; 2000; 2200 μL completando o volume de 10 mL com água destilada. A mudança na concentração de KMnO_4 foi usada para estimar a quantidade de carbono oxidado, assumindo que 1 mmol L^{-1} de KMnO_4 é consumido na oxidação de 0,75 mmol ou 9 mg de carbono.

4.7 Carbono da biomassa microbiana

A determinação da Atividade da biomassa microbiana do solo foi realizada pelo método da Respiração Induzida pelo Substrato (RIS), conforme metodologia descrita por Anderson e Domsch, (1978). Inicialmente foi determinado a capacidade de retenção de água (CRA) e posterior correção da umidade para 60,0 % da CRA, com água destilada. A massa referente a 20,00 g de solo úmido, previamente peneirado, em peneira de abertura de 2,00 mm, foi pesada em duplicata, e transferida para um frasco de vidro com tampa hermética, e adicionado 60 mg de glicose anidra diluída em água destilada, homogeneizou-se toda a solução com solo, fechou-se hermeticamente os frascos e pré-incubou por duas horas. Após as duas horas, abriu-se o frasco e colocou um tubo de ensaio contendo 10,0 mL de NaOH 0,1 N, logo após fechou-se novamente os frascos e foram levados para incubação na estufa à 22°C por quatro horas. Foi realizada uma prova em branco, que corresponde a um frasco contendo apenas um tubo de

ensaio com 10 mL de NaOH 0,1N. Após o período de incubação, retirou-se dos frascos de vidro os tubos de ensaio contendo NaOH, cuja solução foi transferida para erlenmeyer de 125,0 mL, adicionando 0,5 mL de BaCl₂ 50 % e duas gotas de fenolftaleína e o excesso de NaOH foi titulado com HCl 0,025 N.

4.8 Fósforo assimilável

A determinação dos Fósforo assimilável foi realizada de acordo com DONAGEMA, (2011). Inicialmente foram adicionadas 5 g de solo em erlenmeyer de 125 ml, e 50 mL de solução extratora (HCl 0,05 mol L⁻¹ e H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹). Logo após realizou-se agitação durante 5 minutos no agitador circular horizontal, após a agitação a solução foi colocada para decantar durante uma noite, tendo antes o cuidado de desfazer os montículos que se formam no fundo dos erlenmeyers. Pipetou, um volume do extrato da amostra, definido com base na faixa linear de resposta da curva de calibração, para tubo de ensaio com capacidade de 10,0mL, no qual foi também adicionado 3,0 mL de solução ácida de molibdato de amônio diluída e 0,2 mL de ácido ascórbico (1,5 % m/V) e completou-se o volume até 10,0 mL com a água destilada. Soluções padrões, (0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg/L), em triplicata, preparadas a partir de solução estoque de KH₂PO₄ (25,0 mg/L de P), e adição 3,0 mL de solução ácida de molibdato de amônio diluída e 0,2 mL de ácido ascórbico (1,5 % m/V), foram utilizadas para obtenção da curva calibração. Tubos de ensaio contendo as soluções padrões e as amostras foram agitadas manualmente durante 1 a 2 minutos e foram deixados em repouso por uma hora. Após esse período de tempo fez-se a leitura da absorvância, no comprimento de onda de 660 nm, em espectrofotômetro UV-Vis, da HACH, modelo DR 40000.

4.9 Análise dos dados

Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das variáveis comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %, utilizando-se o software Sisvar (FERREIRA, 2008). Todos os gráficos foram elaborados por meio do software livre *SciDAVis* (SciDavis, 2019). Os resultados também foram submetidos análise por componentes principais por meio do software R (R CORE TEAM., 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matéria orgânica do solo, mais precisamente, seu conteúdo de C, é considerado um dos principais indicadores da qualidade do solo, em regiões tropicais. Com a retirada de vegetação natural do solo para implantação de lavouras, ocorre com maior intensidade a decomposição da matéria orgânica, devido a rápida decomposição causada pelos microrganismos no solo (GAMA-RODRIGUES, 2018). A manutenção dos estoques de C do solo é essencial para à melhoria da qualidade e sustentabilidade dos sistemas de produção.

Tabela 1 - Médias para os valores de carbono lábil do solo do bioma do cerrado sob diferentes situações de manejo

Tratamento	C _{Lábil} (g Kg ⁻¹)
Pastagem	2,02 c
Sorgo	3,38 a
Milho	2,97 ab
VNBC	2,57 bc
CV(%)	22,96

Médias seguidas pela mesma letra não se difere significativamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. VNBC: Vegetação nativa do bioma cerrado.

Verifica-se que os resultados de C_{lábil} do solo sob pastagem e sob vegetação nativa do bioma cerrado não diferenciaram entre si, assim como as áreas de sorgo e milho, e essas duas áreas obtiveram maiores teores de C_{lábil} no solo, isso ocorre devido o manejo das áreas onde sempre é realizado plantio direto e constante adubação. Foram observados menores valores de C_{lábil} no solo sob pastagem, pois a mesma se encontrava degradada com pouca cobertura vegetal e conseqüentemente contribuindo pouco para a quantidade de matéria orgânica no solo.

Outro parâmetro avaliado para o solo sob diferentes sistemas de uso, foi a Respiração Basal do Solo (RBS) (Tabela 2) e o Carbono na Biomassa Microbiana (CBM) (Tabela 3).

Tabela 2- Médias para atividade microbiana do solo do bioma cerrado sob diferentes situações de manejo

Tratamento	RBS (mg C-CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)
Pastagem	12,38 a
Sorgo	12,96 a
Milho	14,59 a
VNBC	15,74 a
CV (%)	24,66

Médias seguidas pela mesma letra não se diferem significativamente entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. RBS: respiração basal do solo. VNBC: Vegetação nativa do bioma cerrado.

Tabela 3 - Médias para os valores de carbono da biomassa microbiana do solo do bioma cerrado sob diferentes situações de manejo

Tratamento	BMS(mg C g⁻¹)
Pastagem	628,45 a
Sorgo	724,18 a
Milho	713,81 a
VNBC	770,17 a
CV(%)	47,61

Médias seguidas pela mesma letra não se difere significativamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. VNBC: Vegetação nativa do bioma cerrado.

Segundo Silva et al. (2013) os resultados de RBS e CBM, que refletem a atividade microbiana do solo, e apresentam uma variação elevada e são dependentes, principalmente, da disponibilidade do substrato, umidade e temperatura, pois os microrganismos respondem rapidamente a mudanças nas condições do solo após longos períodos de baixa atividade. Por exemplo, imediatamente ao umedecimento do solo a atividade microbiana, ou os valores de RBS e CBM podem aumentar e provocar a mineralização do C e do N da matéria orgânica do solo. Neste sentido os microrganismos estão diretamente ligados a processos de decomposição, mineralização e disponibilização de nutrientes. A população microbiana do solo pode afetar diretamente a disponibilização de fósforo (P) que é o segundo nutriente mais limitante ao crescimento vegetal, sendo um elemento de menor mobilidade e, com isso, o menos disponível para absorção pelos vegetais (RAMOS et al., 2018). Neste contexto, foram avaliados os teores de fosforo assimilável ($P_{\text{assimilável}}$) (Tabela 4), que podem corroborar com os resultados da atividade microbiana.

Tabela 4 - Médias para os valores de fósforo assimilável do solo do bioma cerrado sob diferentes situações de manejo

Tratamento	[P]_{assimilável} (mg dm⁻³)
Pastagem	9,64 c
Sorgo	68,66 b
Milho	277,37 a
VNBC	7,55 c
CV(%)	46,03

Médias seguidas pela mesma letra não se difere significativamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. VNBC: Vegetação nativa do bioma cerrado.

Os teores de fósforo prontamente disponíveis no solo sob pastagem e sob vegetação nativa do bioma cerrado não se diferenciaram significativamente entre si, com base no teste de tukey, ao nível de significância de 5%, demonstrando a ausência de adubação nestes solos, o sob vegetação nativa que obviamente não recebeu adubação e o solo sob pastagem, como foi verificado *in locu*, estava bastante degradada e por consequência não recebia adubação a um

longo período. Já o solo sob cultivo de sorgo e milho, apresentaram diferenças significativas para o teor de $P_{\text{assimilável}}$, quando comparadas ao solo sob pastagem e vegetação nativa, e entre si apresentaram concentrações de $P_{\text{assimilável}}$ diferentes. O solo sob cultivo de milho apresentou uma concentração de $P_{\text{assimilável}}$ ($277,37 \text{ mg/dm}^3$) maior que a do solo sob cultivo de sorgo ($68,66 \text{ mg/dm}^3$). O motivo de tal resultado, pode ser atribuído a capacidade de acumulação de fosforo no milho, 26 kg ha^{-1} , ser menor que no sorgo que pode chegar até 50 kg ha^{-1} (SOARES, 2013; COELHO, FRANÇA, 2007). Outro fator que pode ter contribuído para maior concentração de fosforo no milho, apesar dos parâmetros que estimaram a atividade microbiana não terem se diferenciado, é o fato do solo sob cultivo do milho ter sido adubado com produto biológico, durante o período de 2 anos, o que pode ter contribuído para maior disponibilização de fosforo na forma assimilável (BUSATO et al., 2017).

Outro parâmetro de bioindicação da qualidade do solo avaliado em função dos sistemas de uso do solo, foi a atividade da enzima (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias para os valores da atividade enzimática no solo do bioma cerrado sob diferentes situações de manejo

Tratamento	AE/ $\text{mg Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$
Pastagem	38,49 c
Sorgo	53,69 b
Milho	59,35 b
VNBC	80,75 a
CV(%)	47,61

Médias seguidas pela mesma letra não se difere significativamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. VNBC: Vegetação nativa do bioma cerrado.

Os resultados da atividade da urease no solo sob cultivo de milho e sorgo não se diferenciaram, ao nível de significância de 5%, pelo teste de *tukey*, mas se diferenciaram da atividade da uréase no solo sob vegetação nativa do bioma cerrado. O fato da atividade enzimática ter sido menor no solo sob cultivo, se deve ao fato do manejo do solo, adubação, por exemplo, aplicação de fungicidas, inseticidas provocarem a inibição da atividade da uréase no solo (MICUȚI et al., 2018; WANG, et al., 2014;) sob cultivo o que já não foi observado para o solo sob vegetação nativa do bioma cerrado, onde a atividade da uréase foi maior. A redução significativa da atividade da uréase no solo sob pastagem, sugere que o potencial de mineralização do N pode estar sendo afetado pela disponibilidade deste elemento, originado pela ocupação constante dos animais e por consequência a adição constante desse nutriente presente no esterco bovino (GARCIA; NAHAS, 2007). Como o N é um nutriente limitante da produção agrícola, a redução da atividade enzimática pode indicar efeito deletério no crescimento da pastagem, o que foi observado *in locu*.

Os parâmetros, pH do solo em água e em CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ (Tabela 6), e o pH do ponto de carga zero (Figura 1, Figura 2), também foram avaliados em função dos diferentes sistemas de uso do solo, no sentido de avaliar as correlações entre estes parâmetros com as variáveis bioindicadoras de qualidade do solo (RBS, CBM e Atividade da Urease).

No processo de decomposição da matéria orgânica (MO) no solo, ocorre a mineralização, que consiste na decomposição da MO resultando em ácidos orgânicos, húmos, nitratos, fosfatos, sulfatos, formas amoniacais e água. Essas substâncias no solo promovem o aumento de cargas negativas e conseqüentemente o aumento do pH do solo (FAVARATO et al., 2015).

Tabela 6 – Médias para os valores de pH em CaCl_2 e pH em água do solo do bioma cerrado sob diferentes situações de manejo

Tratamento	pH em CaCl_2	pH em água
Pastagem	5,39 a	6,00 a
Sorgo	5,14 a	5,91 a
Milho	5,14 a	5,87 a
VNBC	4,01 b	5,06 b
CV(%)	7,18	5,35

Médias seguidas pela mesma letra não se diferem significativamente entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. VNBC: Vegetação nativa do bioma cerrado.

Observa-se que a acidez do solo apresentou diferença significativa, conforme o teste de Tukey ao nível de probabilidade de 5%, entre os solos que são manejados, e o solo sob vegetação nativa do bioma cerrado. Tal comportamento, nos valores de pH é justificado pelo fato de que os solos que estão sob cultivo, receberam corretivos para acidez

O PCZ é o ponto de referência para se avaliar o sinal da carga líquida da superfície, no pH atual do solo, ou seja, se ela está carregada positivamente, ou negativamente (BALDOTTO et al., 2015). Sabe-se também que o PCZ relacionado como pH do solo está diretamente ligado a teores de matéria orgânica e mineralogia do solo.

As figuras 1 e 2, representam o ponto de carga zero (PCZ) de cada área avaliada, observa-se que o PCZ do cerrado é de 3,67 abaixo do pH desta amostra, estudos indicam que o PCZ abaixo do pH da amostra indica alto percentual de matéria orgânica no solo, o que é explicável pois esta área de cerrado é intacta. Já nas demais áreas observa-se um PCZ por volta de 6 e sempre acima do resultado obtido para o pH das amostras, sendo áreas de agricultura e pastagem degradada podendo ser este valor relacionado a menores teores de matéria orgânica no solo e a diferença da mineralogia do solo, pois são diferentes áreas.

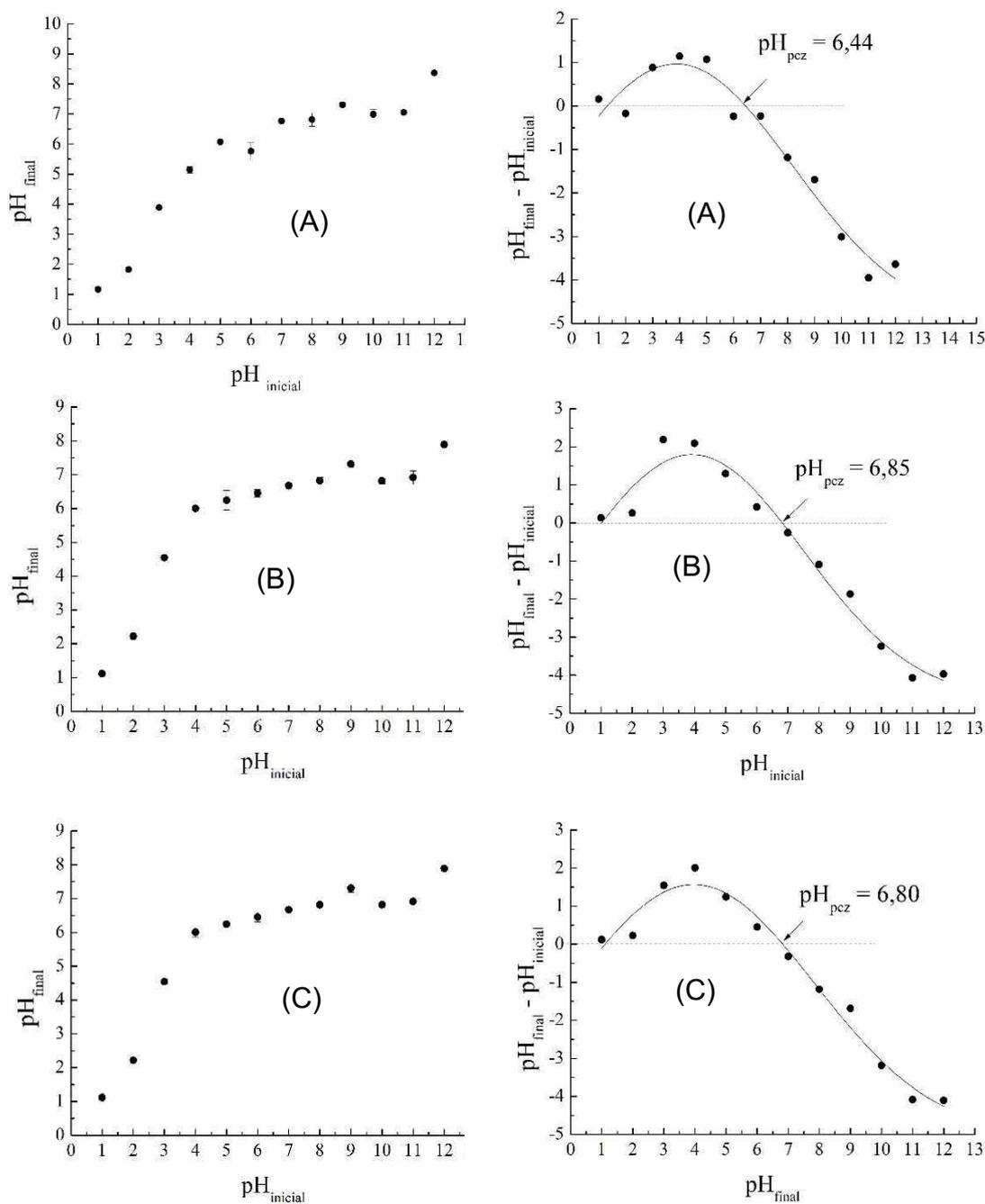


Figura 1: Ponto de carga zero: Área 4, Pastagem Pastagem (A); Área 3- Cultivo convencional de sorgo em rotação (B); Área 2-Cultivo de milho verão (C)

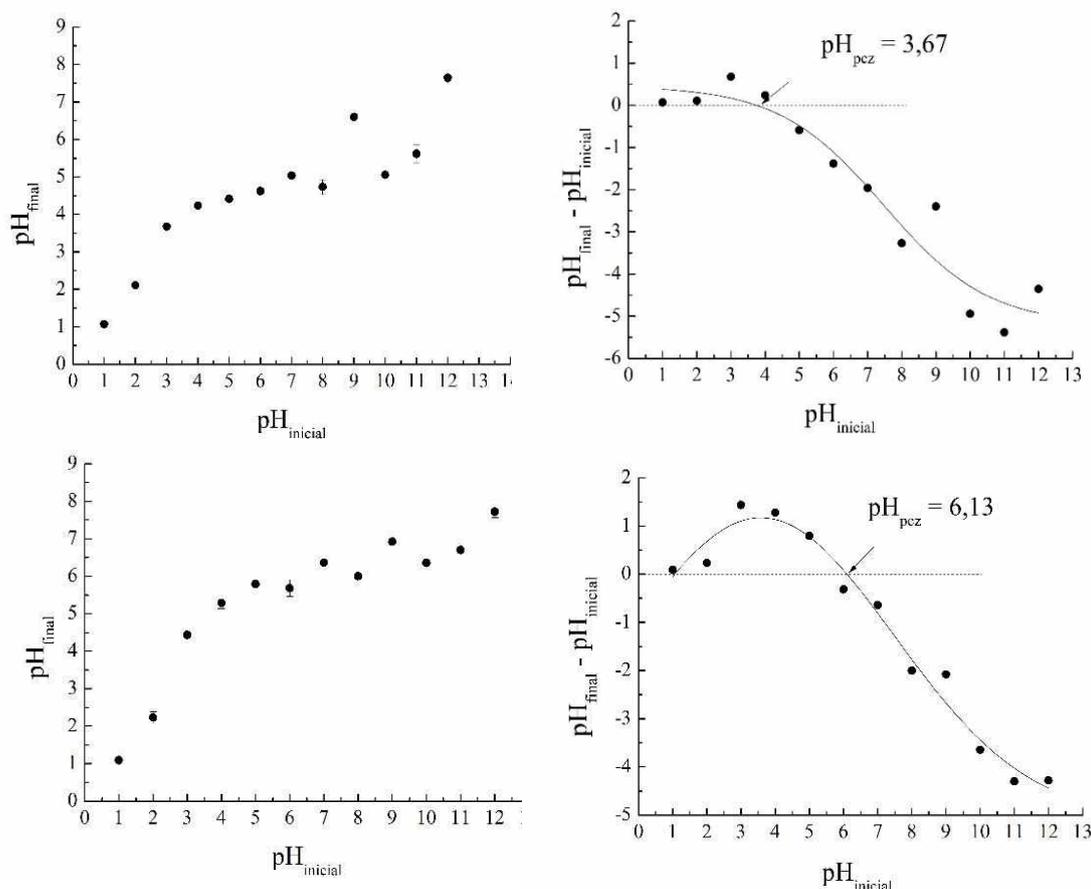


Figura 2: Ponto de carga zero do solo sob vegetação nativa do bioma cerrado: Área 1 (D); Área 5 (E)

A análise de componentes principais foi criada por Karl Pearson em 1915, a principal característica da ACP é a redução da dimensão dos dados, técnica que permite verificar padrões de dados cuja expressão sob a forma de fatores pode destacar as semelhanças e diferenças. A partir da determinação dos padrões é possível reduzir as dimensões, agrupando sem perda considerável de informação (DE PAULA SILVA, 2018). Devido à grande variabilidade dos dados e por se tratar de diferentes áreas a análise em ACP pode proporcionar uma compreensão melhor dos dados, e correlacionar todas as variáveis.

Pela análise das componentes principais, verifica-se que os atributos RBS, CBM e U e $C_{lábil}$, se correlacionaram no primeiro componente, Passimilável e pH estão diretamente relacionados com o segundo componente. O primeiro componente explica 58 % da da variância total sendo que os atributos RBS, CBM e U e $C_{lábil}$ foram os de maior correlação com este componente. O segundo componente principal explicou 25 % da variância.

Tabela 7- Variância explicada e peso das variáveis, em análise por componentes principais considerando atributos de atividade microbiana (RBS, CBM, $C_{\text{lábil}}$), atividade enzimática (U) e atributos químicos do solo (pH, $P_{\text{assimilável}}$) de áreas com diferentes coberturas vegetais

Variáveis	Componentes	
	PC1	PC2
RBS	0.50480557	-0.1156325
CBM	0.47020920	-0.3177580
$C_{\text{lábil}}$	-0.12410553	-0.5916658
$P_{\text{assimilável}}$	-0.04492869	-0.6401122
pH	-0.47810707	-0.3383722
U	0.52732106	-0.1065422
Variância (%)	58%	25%
Variância acumulada (%)	58%	84%

Método de análise por componentes principais, rotação varimax, com normalização Kaiser.

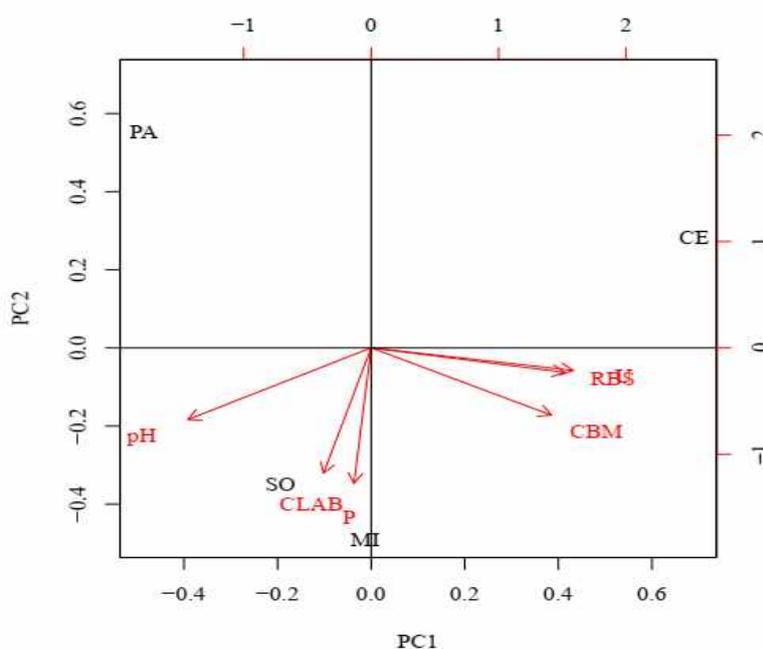


Figura 3 – Análise de componentes principais com base na atividade microbiana e enzimática do solo e atributos químicos do solo para diferentes coberturas vegetais: CE- Fragmento de vegetação nativa do bioma cerrado; MI- Cultivo conservacionista de milho verão; PA- Pastagem degradada; SO- Cultivo convencional de sorgo em rotação.

A análise de componentes principais comparando conjuntos de parâmetros CBM, RBS e U indicam comportamentos semelhantes entre si. Os atributos pH, CLAB e P, também apresentam comportamento semelhante entre si. O fósforo também está diretamente relacionado com o primeiro conjunto de atributos. Em relação ao pH observa-se comportamento

oposto ao primeiro conjunto de componentes, isto significa que com o aumento do pH temos um favorecimento da atividade dos atributos RBS, CLAB e U.

Analisando-se o Comp 1. com relação ao comportamento das áreas de estudo observa-se notável diferença entre as áreas de estudo de cerrado e pastagem, estando as duas em sentidos opostos e distantes. Já o sorgo e o milho possuem certa proximidade, possuindo características mais semelhantes de cultivo e solo.

6 CONCLUSÕES

O manejo do solo não afetou a atividade microbiana do solo, em específico, microrganismos geradores de C-CO₂, no entanto, carbono da biomassa microbiana e carbono lábil apresentaram diferenças significativas. A atividade enzimática (urease) e atributos químicos (pH, P, PCZ) também sofreram alterações de acordo com o manejo. A acidez do solo sofreu alterações em virtude da aplicação de corretivos de acidez para o cultivo. Dentre as áreas sob cultivo, a área cultivada com milho apresentou os melhores resultados com relação ao fósforo assimilável, e também apresentou resultados de bioindicação de qualidade de solo que corroboraram com os resultados de solo sob vegetação nativa.

7 REFERÊNCIAS

ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.10, p.215-221, 1978.

ANTUNES, C. H ET AL. **Avaliação da comunidade microbiana do solo em um sistema de plantio direto sob diferentes condições de calagem e aplicação de nitrogênio.** Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 2018.

BALDOTTO, MARIHUS ALTOÉ; VELLOSO, ARY CARLOS XAVIER. ELETROQUÍMICA de solos modais e de sua matéria orgânica em ambientes tropicais. **Ceres**, v. 61, n. 6, 2015.

BOWLES, TIMOTHY M. ET AL. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, p. 252-262, 2014.

BUSATO, JADER G. ET AL. Compost biofortification with diazotrophic and P-solubilizing bacteria improves maturation process and P availability. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 97, n. 3, p. 949-955, 2017.

BLAIR, G.J.; LEFROY, R.D.B.; LISLE, L. Soil carbon fractions based on their degree of oxidation, and the development of a carbon management index for agricultural systems. **Australian Journal of Agricultural Research**, 46:1459-1466, 1995.

COELHO, A. M.; FRANÇA, E. G. Nutrição e Adubação de Milho. Embrapa milho e Sorgo. **Sistema de Produção. Versão eletrônica-3ª Edição**, 2007.

DE MELO, EDMAR ISAIAS; REZENDE, CAMILA ISABEL PEREIRA; DE OLIVEIRA, FABIANO MENDOÇA. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação da atividade da urease no solo. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, 2018.

DE PAULA SILVA, JOSÉ; RAMOS, SALVADOR BOCCALETTI; DE ANDRADE, MONICA. Análise multivariada da esquistossomose no estado de Minas Gerais: análise de componentes principais. **ABCS Health Sciences**, v. 43, n. 2, 2018.

DIONÍSIO, A. P.; WURLITZER, N. J.; GOES, T. S.; BORGES, M. F.; GARRUTI, D. S.; ARAUJO, I. M. S. Estabilidade de uma bebida funcional de frutas tropicais e yacon (*Smallanthus sonchifolius*) durante o armazenamento sob refrigeração. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 66, p. 148, 2016.

DONAGEMA, GUILHERME KANGUSSÚ ET AL. Manual de métodos de análise de solo. **Embrapa Solos-Documents (INFOTECA-E)**, 2011.

FAVARATO, L. F ET AL. Atributos químicos do solo com diferentes plantas de cobertura em sistema de plantio direto orgânico. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.5, n.2., p.19-28, Dezembro, 2015.

FERREIRA, Daniel Furtado. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. In: **Revista symposium**. 2008. p. 36-41.

GAMA-RODRIGUES, EMANUELA FORESTIERI ET AL. Atributos físicos, químicos e microbiológicos dos solos sob diferentes usos em topossequências no Noroeste Fluminense. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences/Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 3, 2018.

GARCIA, MARTHA REGINA LUCIZANO; NAHAS, ELY. Biomassa e atividades microbianas em solo sob pastagem com diferentes lotações de ovinos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, p. 269-276, 2007.

GARCÍA-PÉREZ, JOSÉ ANTONIO ET AL. Impact of litter contaminated with glyphosate-based herbicide on the performance of *Pontoscolex corethrurus*, soil phosphatase activities and soil pH. **Applied Soil Ecology**, v. 104, p. 31-41, 2016.

HOFFMANN, RICARDO BEZERRA ET AL. Efeito do manejo do solo no carbono da biomassa microbiana. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 1, n. 1, p. 168-178, 2018.

KRÜGER, INKEN ET AL. Defining a reference system for biological indicators of agricultural soil quality in Wallonia, Belgium. **Ecological Indicators**, v. 95, p. 568-578, 2018.

MICUȚI, MARIA-MIHAELA; BĂDULESCU, LILIANA; ISRAEL-ROMING, FLORENTINA. Effect of Pesticides on Enzymatic Activity in Soil. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, v. 75, p. 2, 2018.

NOVAK, ELAINE ET AL. Variação temporal dos atributos microbiológicos do solo sob diferentes usos. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 3, p. 21-30, 2018.

OH, T. K. ET AL. Effect of pH conditions on actual and apparent fluoride adsorption by biochar in aqueous phase. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 7, p. 3729–3738, 2012.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.

RAMOS, RODRIGO FERRAZ ET AL. Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférico e não rizosférico em cultura de milho. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, n. 3, p. 417-427, 2018.

ScIDAVIS. Aplicativo para análise de dados de estatística. 06 abril 2017. Disponível em: <<http://scidavis.sourceforge.net/>>. Acesso em: fevereiro. 2019.

SILVA, C.A.; STRAPAÇÃO, S.; YAMANAKA, E.H.U.; BALLAO, C.; MONTEIRO, C.S. (2013) Potabilidade da água de poços rasos em uma comunidade tradicional, Curitiba - PR. **Revista Biociências**, v. 19, n. 2, p. 88-92.

SOARES, E. R. **Acúmulo de matéria seca e macronutrientes por cultivares de sorgo sacarino**. 2013. Dissertação – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo – Unesp, Jaboticabal, São Paulo.2013.

SOUZA, H.M. **Atributos microbiológicos do solo em sistemas de integração lavoura-pecuária no ecótono cerrado-amazônia**. 2014. 77 f. Dissertação - Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso. 2014.

SHANG, C. & TIESSEN, H. Organic matter lability in a tropical Oxisol: evidence from shifting cultivation, chemical oxidation, particle size, density, and magnetic fractionations. **Soil Science**, 162:795-807, 1997.

TOMM, GILBERTO OMAR ET AL. Disponibilidade de nutrientes e teor de matéria orgânica em função de sistemas de cultivo e de manejo de solo. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, 2003.

UPADHYAY, L. S. B. Urease inhibitors: A review. 2012. **Indian Journal of Biotechnology (IJBT)**. Vol 11, n.4, October 2012.

WANG, FEI ET AL. Influence of short-time imidacloprid and acetamiprid application on soil microbial metabolic activity and enzymatic activity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 17, p. 10129-10138, 2014.

WOOD, R. How to Validate Analytical Methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry** 1999, 18, 624.