

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

ANDRÉ LEANDRO GONÇALVES SANT'ANA

IMPLICAÇÕES DA ADIÇÃO DE FONTES DE FÓSFORO SOB INDICADORES
MICROBIANOS E BIOQUÍMICOS DO SOLO

Uberlândia - MG
2023

ANDRÉ LEANDRO GONÇALVES SANT'ANA

IMPLICAÇÕES DA ADIÇÃO DE FONTES DE FÓSFORO SOB INDICADORES
MICROBIANOS E BIOQUÍMICOS DO SOLO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Agronomia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Engenheiro
Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Adão de Siqueira
Ferreira

Uberlândia – MG
2023

ANDRÉ LEANDRO GONÇALVES SANT'ANA

IMPLICAÇÕES DA ADIÇÃO DE FONTES DE FÓSFORO SOB INDICADORES
MICROBIANOS E BIOQUÍMICOS DO SOLO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Agronomia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Engenheiro
Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 06 de janeiro de 2023

Prof. Dr. Adão de Siqueira Ferreira
Orientador

Prof. Dra. Araújo Hulmann Batista
Membro da banca

Ma. Jéssica Mieke Ota Alves
Membro da banca

RESUMO

O fósforo é um nutriente vital à biota terrestre devido sua importância no metabolismo celular. Solos altamente intemperizados possuem baixa disponibilidade de P na solução do solo devido à adsorção de fosfato na matriz do solo, tais como, óxidos de ferro e alumínio. A microbiota do solo é preponderante na disponibilidade de P na solução do solo devido à dinâmica de imobilização e mineralização e rápida ciclagem. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da adição de diferentes fontes de P sobre indicadores microbianos e bioquímicos do solo (Atividade respiratória microbiana (ARM); Carbono da biomassa microbiana (CBM); Quociente metabólico do solo (qCO_2); FDA; atividade de fosfatase ácida). O trabalho foi realizado em amostra de um Latossolo Vermelho distrófico, coletado em Uberlândia, MG. O experimento foi instalado em frasco de vidro (600 mL) com 100 g de solo e adicionado 300 mg de P kg^{-1} de solo. Os tratamentos com quatro repetições, foram montados para avaliar a fonte de P: 1- controle, 2- monofosfato de potássio ($KHPO_4$), 3- superfosfato simples, 4- pó de rocha fosfatada, 5- ácido fítico, 6- inositol. Os resultados mostram que, ácido fítico, aumentou significativamente a ARM em comparação às demais fontes, sendo observado um menor valor no tratamento com $KHPO_4$ das fontes fosfatadas. A adição de P, independente da fonte, tende a diminuir CBM no solo comparando com tratamento controle, levando a um aumento do qCO_2 nos tratamentos com adição de P. A adição de fontes de P afeta significativamente a atividade de FDA, com os maiores valores encontrados no tratamento com adição de $KHPO_4$. A menor atividade de FDA foi encontrada no tratamento com ácido fítico. Os tratamentos com P não afetaram a atividade de fosfatase no solo quando comparado com tratamento controle. Conclui-se que a adição de fontes de fósforo altera o metabolismo do solo diferencialmente, contudo essa alteração pode ser específica a um bioindicador do solo.

Palavras – chave: Bioindicadores. Fósforo. Fontes.

ABSTRACT

Phosphorus is a vital nutrient for terrestrial organism due to its importance in cellular metabolism. Highly weathered soils have low availability of P in the soil solution due to the adsorption of phosphate in the soil matrix, such as iron and aluminum oxides. The soil microbiota is preponderant in the availability of P in the soil solution due to the dynamics of immobilization and mineralization and rapid cycling. The objective of this work was to evaluate the impact of the addition of different P sources on soil microbial and biochemical indicators (Soil microbial respiration (SMR); Microbial Biomass Carbon (MBC); Soil Metabolic Quotient (qCO_2); FDA; acid phosphatase activity). The work was carried out on a sample of a Oxisoil, collected in Uberlândia, MG. The experiment was installed in a glass flask (600 mL) with 100 g of soil and 300 mg of P kg^{-1} of soil was added. The treated with four replications were assembled to evaluate the source of P: 1- control, 2- potassium monophosphate ($KHPO_4$), 3- simple superphosphate, 4- phosphate rock dust, 5- phytic acid, 6- inositol. The results show that phytic acid had a significant increase compared to the other sources, with a lower SMR value being observed in the treatment with $KHPO_4$ of the phosphate sources. The addition of P, regardless of the source, tends to decrease MBC in the soil compared to the control treatment, leading to an increase in qCO_2 in the treatments with P addition. The addition of P sources significantly affects the FDA activity, with the highest values found in the treatment with the addition of $KHPO_4$. A lower FDA activity was not found in the phytic acid treatment. Treatments with P did not affect the phosphatase activity in the soil when compared to the control treatment. Concluded that the addition of phosphorus sources differentially alters soil metabolism, but this alteration may be specific to a soil bioindicator.

Keywords: Bioindicators. Phosphorus. Sources.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Amostragem de solo	11
3.2 Quantificação do P disponível presente nas fontes fosfatadas.....	12
3.3 Instalação do ensaio	12
3.4 Atividade respiratória microbiana (ARM).....	13
3.5 Carbono da biomassa microbiana (CBM)	13
3.6 Quociente metabólico (qCO_2).....	14
3.7 Atividade de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA).....	14
3.8 Atividade da fosfatase.....	14
3.9 Análise estatística	14
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO.....	21
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um elemento essencial para toda a biota terrestre, atuando metabolicamente nos processos da fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, divisão e crescimento celular. No solo, o P pode ser encontrado em formas orgânicas e inorgânicas. Solos altamente intemperizados, como Latossolos, predominante em regiões tropicais, apresentam uma alta capacidade de adsorção de P, devido à presença de óxidos de Fe e Al na matriz do solo. Adsorção de P nos Latossolos podem ser superiores a 2 mg cm^{-3} de P (KER, 1995), correspondendo a 4000 kg ha^{-1} de P (9200 kg ha^{-1} de P_2O_5) na profundidade de 20 cm.

Devido esse caráter drenado do solo, quantidades elevadas deste nutriente são aplicadas anualmente de forma a garantir o crescimento vegetal. Contudo, a adubação química não é muito eficiente, pois apenas uma pequena quantidade é efetivamente absorvida pelos vegetais. Assim, o aumento da fração orgânica de P e na biomassa microbiana do solo pode melhorar a disponibilidade de P no sistema solo. Práticas conservacionista, tais como plantio direto e adubação verde de cobertura, podem mudar a disponibilidade de P no solo.

Os microrganismos do solo desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes e no fluxo de energia em sistema agrícolas, além de serem sensíveis indicadores de qualidade do solo, pois a comunidade microbiana é facilmente influenciada por diversos fatores como: manejo do solo, tipo e aplicação de fertilizantes, estágio de desenvolvimento de plantas e cultivares utilizadas além da aplicação de agroquímicos (FERREIRA et al., 2009). Além de propriedades do solo como: temperatura, pH, umidade, CTC, material de origem etc. Apesar de haver um consenso sobre a importância da avaliação de indicadores de qualidade do solo, existe um número e tipo de indicadores muito grande e não é unânime entre grupos de pesquisas quais indicadores a serem usados, sendo necessária uma avaliação local de quais indicadores são mais apropriados para determinada avaliação a ser realizada, relacionando os indicadores com as reações no solo a serem estudadas.

Um indicador interessante, é a atividade respiratória microbiana, estimada pela liberação de dióxido de carbono (CO_2) tem tido destaque em vários estudos. Isso se deve, em parte, pela facilidade do teste e a rápida resposta da microbiota às alterações do meio.

(BODDY et al., 2007; CLEVELAND et al., 2002; KAISER et al., 2010; ILSTEDT et al., 2006).

Outro indicador é o carbono da biomassa microbiana (CBM), estimado por processo de Colorimetria com difenilcarbazida, é capaz de quantificar o carbono imobilizado na biomassa microbiana, juntamente com o quociente metabólico do solo (qCO_2), razão entre a atividade respiratória e o CBM, representam a capacidade de aproveitamento do carbono mineralizado no crescimento microbiano. A atividade enzimática do solo também é usada para avaliar o metabolismo e processos de decomposição e mineralização de compostos orgânicos no solo. Por exemplo, a hidrólise do diacetato de fluoresceína está fortemente associada com processos oxidativos de moléculas orgânicas e reflete o estado metabólico do solo (FERNÁNDEZ et al., 2009; NANNIPIERI et al., 1983; TRASAR-CEPEDA et al., 2008). A atividade da fosfatase é importante indicador para avaliar a ciclagem do fósforo devido sua atividade catalisadora na transformação de P-orgânico em P-inorgânico.

Vários estudos já demonstraram a importância do P no metabolismo microbiano em regiões tropicais e subtropicais, devido seu caráter limitante, dito isso o objetivo do presente trabalho foi avaliar a respostas de diferentes bioindicadores de qualidade do solo à adição de diferentes fontes de fósforo. A hipótese é que os indicadores avaliados apresentam respostas distintas em relação à fonte de P adicionada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O fósforo (P) é um elemento essencial ao metabolismo microbiano, possui função estrutural, presente em ácidos nucleicos (DNA e RNA) e na membrana citoplasmática. O elemento tem papel fundamental em processos energéticos, com a molécula de ATP, responsável por acoplar energia de reações exergônicas e ceder para reações endergônicas do catabolismo e anabolismo celular, respectivamente.

Os sedimentos oceânicos representam a fração mais significativa do fósforo distribuído no planeta Terra, estimado em $84 \cdot 10^{16}$ kg de P. Entretanto, o solo é o segundo maior reservatório seguido por rochas mineráveis na escala de 10^{13} kg de P e a biota terrestre com $2,6 \cdot 10^{12}$ kg, sendo 1,8 estocado na biomassa e 0,8 na biomassa microbiana. Contudo, o P estocado da biomassa é mais dinâmico (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O teor total médio de P na litosfera é de 2,8 g kg⁻¹ de P₂O₅; contudo, muitos solos contêm de 0,2 a 0,8 g kg⁻¹ de P (FASSBENDER, 1994). Com o aumento no grau de intemperismo, há uma mudança gradual de características de um solo, no sentido de torná-lo menos eletronegativo e, como consequência, mais eletropositivo, com mudanças, diretas ou indiretamente, ligadas a esse perfil de carga. Sua capacidade de troca catiônica (CTC efetiva) cai, a adsorção aniônica aumenta, diminui a saturação por bases, enquanto aumenta, gradualmente, a retenção de ânions como o fosfato, o sulfato etc. (NOVAIS et al., 2007).

Devido a essa condição, os solos passam gradualmente de fonte para dreno de P. Em condições extremas de intemperismo, como acontece em alguns Latossolos do cerrado, o solo é um forte dreno de P. De modo a torná-lo fonte, são necessárias grandes quantidades de fertilizantes fosfatados. Solos como esses podem adsorver mais de 2 mg cm⁻³ de P (KER, 1995), valor equivalente a 4000 kg ha⁻¹ de P (9200 kg ha⁻¹ de P₂O₅) incorporado de 0-20 cm de profundidade. Enquanto plantas de cultivo anual, como a soja, imobilizam em toda sua biomassa aproximadamente 20 kg ha⁻¹ de P.

O solo pode imobilizar ou fixar 200 vezes mais em formas “não trocáveis”, ou não lábeis. Esses solos contêm teores elevados de óxidos, de Fe e de Al, e em condições de acidez, a superfície desses óxidos está carregada positivamente, atraindo ânions, estes formam complexos de superfície esfera-interna com os óxidos de Fe, principalmente, o que diminui acentuadamente a disponibilidade deste nutriente na solução do solo (SANCHEZ e UEHARA, 1980; NOVAIS e SMYTH, 1999)

O fósforo no solo, P-total, compreende as frações de P na solução do solo ou na fase sólida do solo, sendo estas P inorgânico (Pi) e P orgânico (Po). O primeiro é caracterizado pelas formas de P-solúvel, P-lábil (P-disponível) e P-não lábil (P-indisponível). O P-solúvel, assimilável pela biota do solo, encontra-se na solução do solo na forma de ácido fosfórico (H₃PO₄), ácido ortofosfórico (H₂PO₄⁻¹), ácido metafosfórico (HPO₄⁻²) e íon fosfato (PO₄⁻³), sendo que a presença e predominância de cada uma é dependente do pH da solução do solo. Nos solos de Cerrado, a concentração de P na solução do solo é muito baixa, comumente, inferior a 0,1 mg dm⁻³ (GOEDERT et al., 1986).

O Pi consiste em fosfatos minerais insolúveis e ânions fosfatos adsorvidos a óxidos de Fe e Al, silicatos de Al e carbonatos de Ca, sendo encontrado em maior quantidade na forma de fosfatos de alumínio e ferro. (NAHAS, 2002). Estima-se que Po

represente de 5% até 40% do P total do solo (NAHAS et al., 1994; RHEINHEIMER e ANGHINONI, 2003; TISDALE et al., 1993; RODRIGUES e FRAGA., 1999; SANTOS et al., 2008).

O fósforo orgânico é oriundo dos resíduos vegetais depositados no solo, da biomassa microbiana e dos produtos de sua decomposição (MARTINAZZO et al., 2007). No solo dentre as principais formas de Po identificadas, destacam as moléculas como fosfatos diésteres (ácidos nucleicos e fosfolipídios), facilmente mineralizável pelos microrganismos do solo e representam uma fonte lábil de P. Compostos com alta carga residual, como os fosfatos monoésteres (fosfatos de inositol) são fortemente adsorvidos aos colóides inorgânicos (óxidos de Fe, Al e Ca) e permanecem protegidos física e quimicamente do ataque microbiano, dificultando a mineralização e acumulando no solo (HINSINGER, 2011; STEWART e TISSEM, 1987;).

O fósforo microbiano (P-mic) é uma fração muito variável do fósforo orgânico no solo, representa em média, de 1 a 10% do P-total (RICHARDSON, 1994) e de 2 a 24% do Po (BROOK et al., 1984).

A biomassa microbiana é considerada matéria orgânica de rápida ciclagem (KASCHUK et al., 2010) e pode ser fonte ou dreno de P, mesmo o P-mic não seja prontamente disponível para as plantas, este representa um reservatório dinâmico de P nos solos e o predomínio da mineralização de Po sobre a imobilização de Pi do solo, depende da concentração de P do resíduo orgânico disponível para a respiração dos microrganismos. A concentração crítica é de 2 g kg⁻¹ de P no resíduo, mantém os processos de mineralização e imobilização em equilíbrio. Acima de 0,2% predomina a mineralização; abaixo, a imobilização. Em condições naturais, a contribuição de formas orgânicas de P à nutrição das plantas é significativa, representando em até 80% da demanda por este nutriente (DALAL, 1977).

Os microrganismos possuem papel preponderante na dinâmica do P no solo não apenas pela mineralização de compostos orgânicos, mas também pela imobilização de fosfato, prevenindo a sorção de P pelos colóides inorgânicos do solo (NZIGUHEBA e BUNEMANN, 2005), que posteriormente, com a morte e lise celular, é liberado de forma mais sincronizada com a demanda das plantas (MARTINAZZO et al., 2007). A biomassa microbiana do solo (BMS) é um importante reservatório de P lábil e é capaz de suprir a demanda das plantas por este nutriente em pastagens naturais (OLIVEIRA et al., 2011). É definida como a parte da matéria orgânica constituída pelos organismos vivos com

volume menor que $5 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$ e engloba principalmente organismos de Archaea, Bacteria, Fungi e Protistas, mas também alguns do Reino Animalia, como os nematoides. A BMS é geralmente expressa como μg de carbono por grama de solo seco, sendo avaliada por diversos métodos (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

A mineralização do Po no solo é um processo enzimático regido por um grupo de fosfatases que catalisam reações hidrolíticas de grupos fosfatos provendo assim Pi para a solução do solo em uma faixa de pH ótimo, sendo classificadas como ácidas (pH ótimo em torno de 6,5) ou alcalinas (pH ótimo em torno de 11) (CRIQUET e BRAUD, 2008; NANNIPIERI et al., 1982; NASTO et al., 2017; NEBLE et al., 2007; TABATABAI et al., 1994; REJSEK et al., 2012; STONE e PLANTE, 2014).

Os tipos de fosfatases são identificados de acordo com o composto que essas enzimas hidrolisam como fosfomonoesterases (fitases), fosfodiesterases, fosfotriesterases, metafosfatases, pirofosfatase etc. (EIVAZI e TABATABAI, 1977). As fosfatases apresentam relação inversamente proporcional com a disponibilidade de Pi, os trabalhos Yun e Kaeppler, (2001), Nanamori et al., (2004) e Dick et al., (1998) encontraram correlações positivas de atividade de fosfatase com C orgânico, o que justifica o decréscimo da atividade enzimática em camadas mais profundas do perfil de solo e com a diminuição da população microbiana ou ainda com a concentração de Mg na solução do solo, um ativador enzimático (CROUSE, 1996; HARRISSON, 1983; TARAFDAR e JUNGK, 1987). A atividade da fosfatase em solos tropicais é um indicador bioquímico de qualidade do solo pois possui sensibilidade quanto a diferentes usos da terra. (DICK, 1997; FERREIRA et al., 2016; HOU et al., 2015; STONE e PLANTE, 2014; VINHAL-FREITAS et al., 2013; VINHAL-FREITAS et al., 2017).

A resposta da microbiota vem sendo usada como um indicador do estado funcional do solo em diferentes tipos de manejo. Entre as respostas metabólica, a respiração microbiana do solo (RMs), estimada pela liberação de dióxido de carbono (CO_2), tem destaque em vários estudos, principalmente pela facilidade do teste e rápida respostas dos microrganismos às alterações do meio (BODDY et al. 2007; CLEVELAND et al., 2002; ILSTEDT et al., 2006; KAISER et al. 2010; PAUSTIAN et al. 2000;).

A adição de P tem sido preferida nos estudos devido a fortes evidências do caráter limitante deste nutriente na regulação da atividade microbiana do solo em ecossistemas tropicais e subtropicais (EHLERS et al. 2010; ILSTEDT et al. 2003; ILSTEDT e SINGH 2005; ILSTEDT et al., 2006; OLIVEIRA e SIQUEIRA, 2014; VINHAL-FREITAS et al.,

2012,). Em ambientes agrícolas a RMs vem sendo associada ao fluxo de energia e a capacidade de armazenamento de carbono (C) nos ecossistemas terrestres (EDWARD, HAYES E CIAVATTA 2007; PENG et al. 2009; SMITH et al. 2000).

A atividade enzimática do solo é usada para avaliar o metabolismo e os processos de decomposição e mineralização de compostos orgânicos no solo. A hidrólise de diacetato fluoresceína (FDA) está fortemente associada a processos oxidativos de moléculas orgânicas e reflete o estado metabólico do solo (FERNÁNDEZ et al., 2009; NANNIPIERI et al., 1983; OLIVEIRA e SIQUEIRA, 2014; TRASAR-CEPEDA et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem de solo

A amostra de solo foi constituída de 4 subamostras coletadas em uma área de 600 cm² (30x20 cm) até profundidade de 10 cm, selecionadas aleatoriamente em área em pousio com braquiária. Área localizada na fazenda do Glória pertencente Universidade Federal de Uberlândia em Uberlândia, Minas Gerais. A localização apresenta coordenadas de ϕ : -18° 57' 34" e λ : -48° 12' 13". A coleta foi realizada na estação seca do ano em meados de maio de 2022. O solo classificado como Latossolo Vermelho distrófico, segundo Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2013). Após destorroad, a amostra foi homogeneizada e peneirada em malha de 2 mm, e retirado o excesso de resíduo vegetal presente e acondicionada em saco plástico e armazenada sob refrigeração (aproximadamente 4°C). Análise química foi realizada no Laboratório de Análise de solo (LABAS) da Universidade Federal de Uberlândia (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização química do solo coletada na profundidade de 10 cm.

pH	P-Mehlich 1	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	t	T	C-org
água	mg dm ⁻³			cmolc dm ⁻³					dag kg ⁻¹		
5,7	2,99	143,6	*	2,07	2,03	0	1,55	4,46	4,46	6,01	1,27
MO	S	B	Zn	Cu	Mn	Fe	V	m	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
dag kg ⁻¹	mg dm ⁻³			%							
2,19	17,31	0,42	1,49	0,72	7,63	21,07	74,2	0	1	5,6	5,5

3.2 Quantificação do P disponível presente nas fontes fosfatadas

O teor de P solúvel nas fontes fosfatadas foi determinado segundo Tedesco (1995), utilizando 30 mL de solução extratora P.A. e 3 g das fontes fosfatadas. Após agitação à 150 RPM durante 5 minutos, o extrato foi deixado em repouso por 12 horas. Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi transferida para copos descartáveis, adicionado 3 mL de solução P.B. e 0,2 mL de solução indicadora P.C. Após 15 minutos para reação, as amostras foram lidas no espectrofotômetro (BIOMATE 3) a 660 nm, sendo a quantificação de P no solo estimada por uma curva padrão de P.

3.3 Instalação do ensaio

Os ensaios de incubação foram montados em frascos de vidros hermeticamente vedados com 100 g de solo fresco e adicionados 300 mg P kg⁻¹ de solo seco para cada tratamento, após a determinação da umidade do solo. As fontes de P foram usadas para constituírem os tratamentos, a saber: 1- Controle, sem adição de P; 2- Monofosfato de potássio, KHPO₄; 3- Superfosfato simples; 4- Rocha fosfatada; 5- ácido fítico; 6- nositol. O experimento foi montado com 4 repetições de laboratório, resultando em uma unidade experimental de 24 frascos. A umidade foi corrigida para 60% da capacidade de retenção de água do solo determinada segundo Tedesco (1995). Os tratamentos foram incubados a 25°C durante 21 dias no escuro em estufa de incubadora (BOD).

3.4 Atividade respiratória microbiana (ARM)

A ARM foi determinada pela metodologia proposta por Stotzky (1995), quantificando CO₂ liberado. Nos frascos preparados anteriormente, utilizaram-se copos descartáveis (40 mL) com 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH, 1 mol L⁻¹) para captura do CO₂ liberado. As quantificações de CO₂ foram realizadas aos 3, 7, 14 e 21 dias de incubação. Em cada tempo de incubação, os copos de NaOH foram retirados e adicionados 5 mL de BaCl₂.2H₂O (1 mol L⁻¹) para cessar a reação e algumas gotas de indicador de pH fenolftaleína 1%. O excesso de hidróxido de sódio foi titulado com HCl (0,5 mol L⁻¹) com auxílio de agitador magnético. A atividade respiratória microbiana foi calculada com a equação:

$$C - CO_2 = [(B - A) \times Mc \times MHCl] \div Ms \times 2 \dots\dots\dots^1$$

B: branco (sem solo);

A: Amostra;

Mc: Massa atômica do carbono (12);

MHCl: Molaridade do ácido clorídrico;

Ms: Massa do solo seco;

C-CO₂ é expresso em mg C-CO₂ kg⁻¹ solo seco.

3.5 Carbono da biomassa microbiana (CBM)

O CBM foi determinado pelo método de irradiação-extração proposto por (FERREIRA et al., 1999). Uma porção de 20 g de solo em duplicatas, sendo uma irradiada por 2 minutos em forno micro-ondas e a outra sem irradiação (controle). O carbono de ambas as amostras foi extraído com 50 mL de sulfato de potássio (K₂SO₄, 0,5 mol L⁻¹) sob agitação por 30 minutos à 180 RPM. Após 2 horas decantando, retirou-se uma alíquota de 30 mL do sobrenadante de cada amostra e centrifugado por 6 minutos a 3000 RPM. O carbono no extrato foi estimado em solução de dicromato de potássio em processo de Colorimetria, usando a difenilcarbazida para quantificar o excesso Cr⁺⁶ nas amostras após o aquecimento por 1h a 130 °C. O carbono da biomassa microbiana foi quantificado pela subtração entre amostra irradiada e não irradiada e um fator de conversão para solos tropicais de 0,33, sendo expresso µg C g⁻¹ de solo seco.

3.6 Quociente metabólico (qCO_2)

O quociente metabólico do solo foi calculado através da razão entre ARM e CBM sendo adimensional (ANDERSON e DOMSCH, 1993).

3.7 Atividade de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA)

A atividade de FDA foi medida de acordo com metodologia proposta por Adam e Duncan (2001). Amostras de solo (1 g) foram colocadas em tubos falcons e incubadas por 1 hora a 30°C em 5 mL de tampão fosfato de potássio (1 mol L^{-1} , pH 7,6), contendo fluoresceína de diacetado do sódio (FDA). A fluoresceína liberada foi extraída com clorofórmio-metanol e posteriormente centrifugado a 9000 RPM por 4 minutos. A absorbância das amostras foi medida com espectrofotômetro (BIOMATE 3) a 490 nm, sendo realizada uma curva padrão com fluoresceína.

3.8 Atividade da fosfatase

A atividade da fosfatase foi medida usando fosfato de P-nitrofenil (pNPP) de acordo com Tabatabai e Bremner (1969). Uma porção de 1 g de cada amostra de solo foi colocada em um tubo falcon de 50 mL e, em sequência foram adicionados e agitados por alguns segundos: 4 mL de tris-hidroximetil aminometano (TMU) com ácidos cítrico, maleico e bórico; Tampão (pH 4,0); 1 mL de solução de pNPP. Os frascos foram então colocados em uma incubadora a 37°C. Após 1 hora de incubação, foram adicionados 4 mL de NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e 1 mL de $CaCl_2$ ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e agitados por alguns segundos de modo a parar a reação. Em seguida foi centrifugado a 9000 RPM por 4 minutos e medida a absorbância em espectrofotômetro (BIOMATE 3) à 405 nm.

3.9 Análise estatística

O software SISVAR foi utilizado para análise de variância e usado o teste de Fisher ($p < 0,05$) para comparação das médias, considerando um modelo de delineamento

inteiramente casualizado (DIC) e a elaboração dos gráficos foi realizada no software SigmaPlot 12.0.

4. RESULTADOS

A adição de P levou a um aumento significativo na ARM independente da fonte adicionada se comparado ao tratamento controle que obteve os menores valores de ARM (Figura 1). O tratamento com ácido fítico resultou nos maiores valores de ARM diferenciando estatisticamente das demais fontes de P. O tratamento com monofosfato de potássio foi significativamente inferior aos outros tratamentos com P. Os tratamentos com rocha fosfatada e superfosfato simples apresentaram valores intermediários e não diferiram entre si. O tratamento com Inositol aumentou significativamente a ARM se comparado ao tratamento controle e monofosfato de potássio e significativamente inferior ao tratamento com ácido fítico, apresentando valores intermediários que não apresentaram diferença significativa para os demais tratamentos.

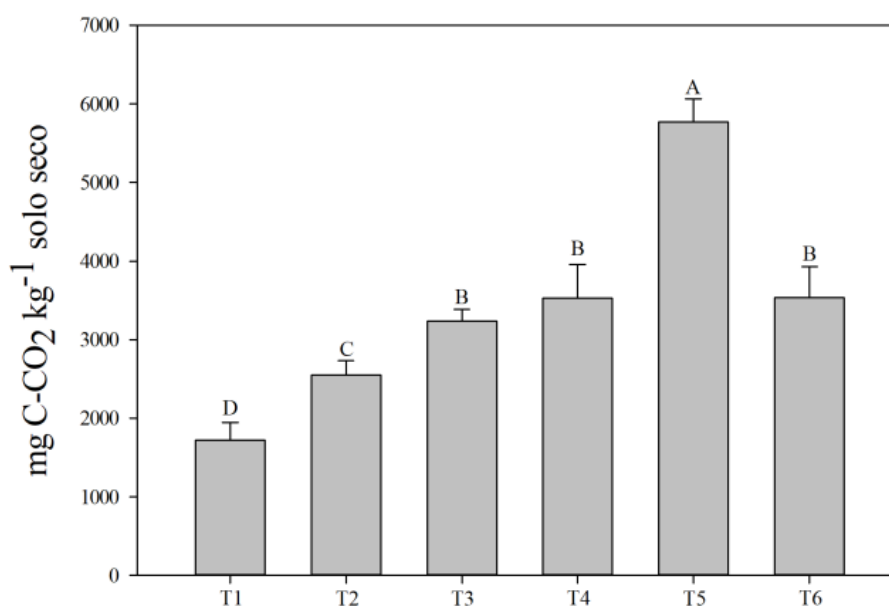


Figura 1: ARM acumulada (21 dias) sob adição de fontes de P. T1: Controle; T2: KHPO₄; T3: Superfosfato simples; T4: Rocha fosfatada; T5: Ácido fítico; T6: Inositol. As barras indicam o desvio padrão de cada amostra (n=4). Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher ($p < 0,05$).

Os valores de CBM variaram significativamente com a fonte de P adicionado (Figura 2). O tratamento controle apresentou os maiores valores de CBM sendo

significativamente maiores que os tratamentos com rocha fosfatada e Inositol, estes sendo significativamente inferiores aos demais tratamentos com adição de P. Os tratamentos com KHPO_4 e ácido fítico não apresentaram diferença significativa se comparado ao tratamento controle.

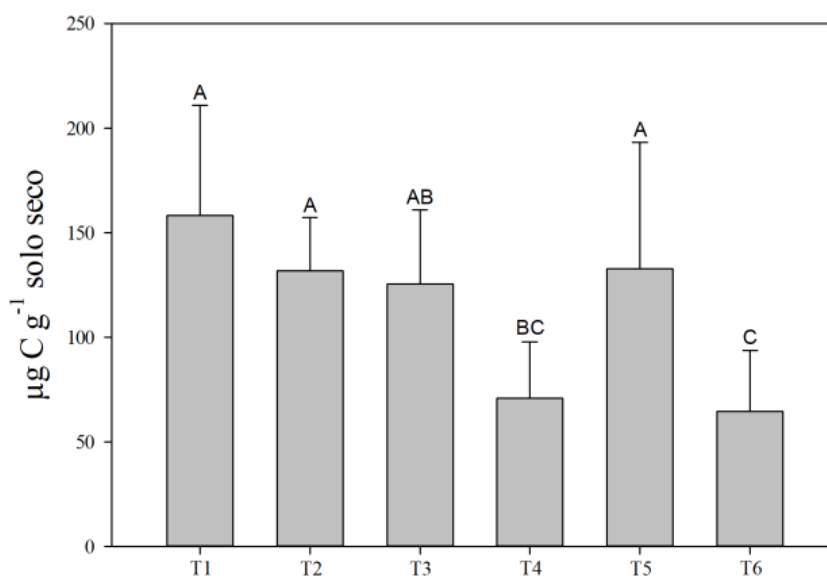


Figura 2: CBM após 21 dias de incubação sob adição de fontes de P. T1: Controle; T2: KHPO_4 ; T3: Superfosfato simples; T4: Rocha fosfatada; T5: Ácido fítico; T6: Inositol. As barras indicam o desvio padrão de cada amostra (n=4). Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher ($p < 0,05$).

A adição de P independente da fonte não afetou significativamente o quociente metabólico (Figura 3). O tratamento com Inositol resultou nos maiores valores de qCO_2 significativamente maiores que os tratamentos controle, superfosfato simples e KHPO_4 e estatisticamente igual aos tratamentos com ácido fítico e rocha fosfatada.

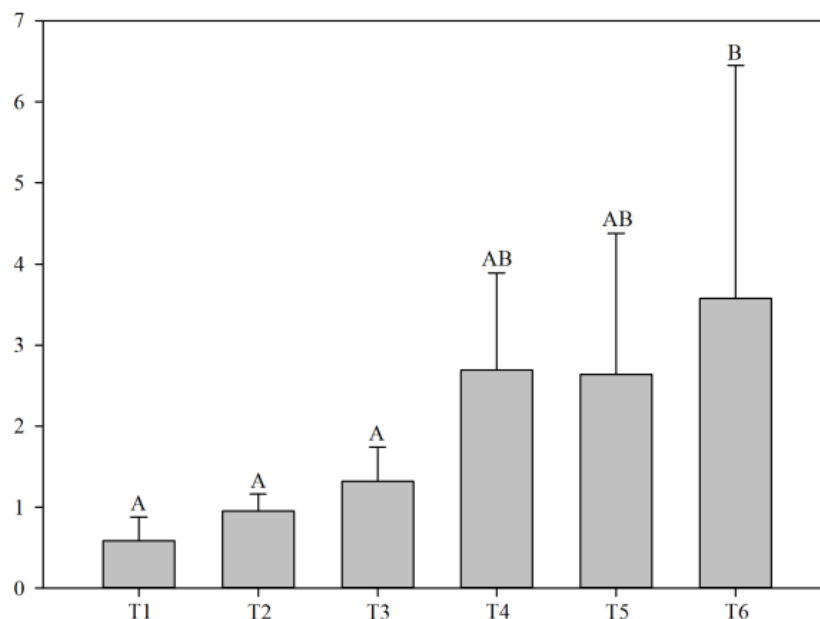


Figura 3: Quociente metabólico do solo sob após 21 dias de incubação sob adição de fontes de P. T1: Controle; T2: KHPO_4 ; T3: Superfosfato simples; T4: Rocha fosfatada; T5: Ácido fítico; T6: Inositol. As barras indicam o desvio padrão de cada amostra (n=4). Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher ($p < 0,05$).

A hidrólise de diacetato de fluoresceína foi afetada significativamente em função da fonte adicionada (Figura 4). O tratamento com KHPO_4 apresentou os maiores valores de FDA e significativamente superior aos tratamentos com rocha fosfatada e ácido fítico. A adição de ácido fítico diminuiu a FDA significativamente se comparado ao tratamento controle e apresentou os menores valores entre os tratamentos com adição de P com diferença estatística para os tratamentos com superfosfato simples e KHPO_4 e estatisticamente igual ao tratamento com rocha fosfatada. O tratamento controle não diferiu estatisticamente dos tratamentos com KHPO_4 e superfosfato simples. A FDA no tratamento com inositol não apresentou diferença estatística para os tratamentos com rocha fosfatada e ácido fítico.

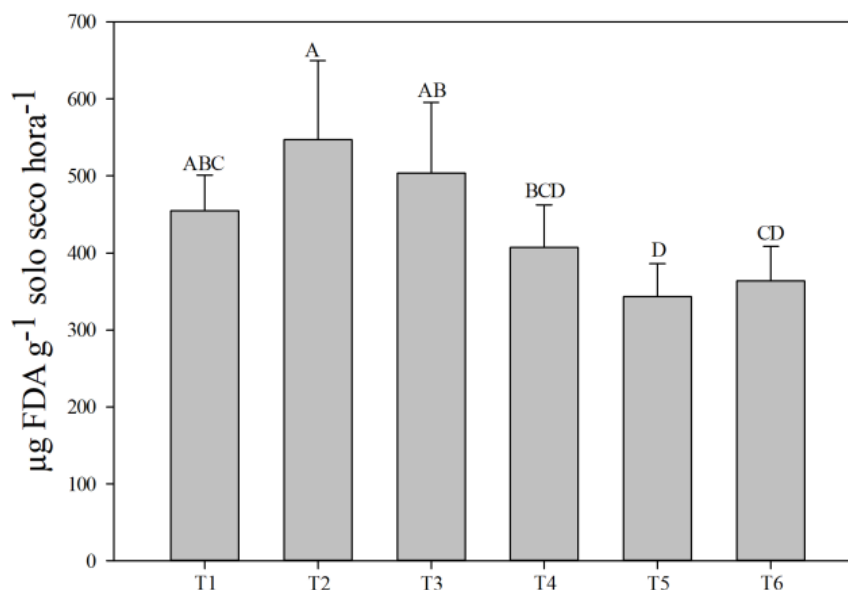


Figura 4: FDA após 21 dias de incubação sob adição de fontes de P. T1: Controle; T2: KHPO₄; T3: Superfosfato simples; T4: Rocha fosfatada; T5: Ácido fítico; T6: Inositol. As barras indicam o desvio padrão de cada amostra (n=4). Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher ($p < 0,05$).

A atividade da fosfatase não foi afetada significativamente quanto à fonte de P em relação ao controle (Figura 5). O tratamento com inositol foi significativamente superior aos demais tratamentos.

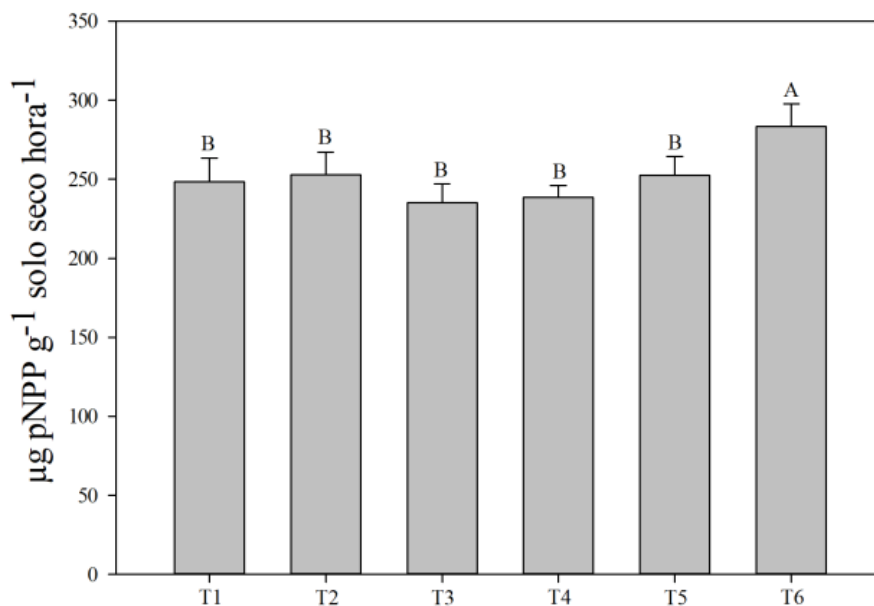


Figura 5: Atividade da fosfatase após 21 dias de incubação sob adição de fontes de P. T1: Controle; T2: KHPO_4 ; T3: Superfosfato simples; T4: Rocha fosfatada; T5: Ácido fítico; T6: Inositol. As barras indicam o desvio padrão de cada amostra (n=4). Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Fisher ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A adubação fosfatada é uma prática indispensável na agricultura tropical, no entanto, a eficiência é muito baixa devido ao caráter drenoso dos solos tropicais, altas doses são necessárias de modo a garantir a produção vegetal. A disponibilidade de P na solução do solo depende de vários fatores e a microbiota do solo desempenha papel fundamental na ciclagem deste nutriente. Os indicadores bioquímicos e microbianos do solo são fundamentais para o esclarecimento da dinâmica da microbiota do solo e estes são influenciados pela fonte de P adicionada.

A fonte orgânica de P se mostrou mais impactante na mineralização da matéria orgânica do solo, resultados semelhantes foram observados em outros estudos (FERREIRA et al., 2007; OLIVEIRA e FERREIRA., 2014; VINHAL-FREITAS et al., 2012). A fonte solúvel de P apresentou os menores incrementos na ARM e isso se deve a maior solubilidade da fonte e o caráter drenoso do solo, tornando o nutriente indisponível a microbiota do solo. Quando se aplica uma fonte solúvel de P num solo, frequentemente mais de 90% do aplicado é adsorvido na primeira hora de contato com o solo (GONÇALVES et al., 1985).

A adição de P independente da fonte impactou negativamente o carbono da biomassa microbiana, esse efeito negativo também foi observado por (PENG et al., 2017; SHAH et al., 2022). Estudos anteriores relataram que o incremento de CBM pela adição de P depende do ecossistema (HUANG et al. 2016; LIU et al. 2012; LI et al. 2014) e da concentração de P disponível no solo (HEUCK et al., 2015) implicando que a microbiota do solo estudado não é limitada por este nutriente.

Segundo Bardgett e Sagar (1994) o quociente metabólico do solo (qCO_2) é utilizado como indicador de estresse microbiano e interpretado como eficiência microbiana, assim o tratamento com inositol tornou a microbiota menos eficiente no aproveitamento do carbono mineralizado. O inositol foi adicionado como uma fonte de carbono para comparar com o ácido fítico que tem a mesma estrutura de carbono.

A hidrólise de diacetato de fluoresceína é um método de avaliação da atividade hidrolítica indiscriminada (SCHUNÜNER e ROSSWALL, 1982). E tem sido utilizado para avaliar a atividade microbiana (ALENCAR e COSTA, 2000). As fontes resultaram em impactos distintos para FDA, sendo a fonte orgânica com os menores valores para atividade hidrolítica. As fontes de fósforo alteraram significativamente os valores de FDA, demonstrando que o P tem efeito na hidrólise de FDA. A atividade de FDA mensurada é resultante da ação hidrolíticas de protease, lipase e esterase. Os resultados indicam que adição de P tem efeito sobre estas enzimas no período de incubação.

A atividade de fosfatase não apresentou diferenças significativas para os tratamentos com adição de P. Olander e Vitousek (2000) observaram que a adição de P diminui a atividade da fosfatase. No solo, o aumento da atividade de fosfatase está positivamente correlacionada com a matéria orgânica do solo. O tratamento com ácido fítico não alterou a atividade de fosfatase, mas aumentos da atividade da fosfatase seria esperado devido à estrutura orgânica ligada ao grupo PO_4 . A ausência do aumento da atividade da fosfatase pode ter ocorrido pelo curto período de incubação. Isso decorre da hidrólise do grupo fosfato da ácido fítico, liberando P na solução e este inibe a reação de hidrólise das fosfatases no solo (OLANDER e VITOUSEK, 2000). No entanto, o tratamento com adição de inositol levou um aumento da atividade de fosfatase, indicando um aumento na síntese de mais fosfatase. Turner & Wright (2014) relataram alta atividade da fosfatase em ambientes com limitação de P.

6. CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa mostram que a adição de fontes de P no solo pode alterar o catabolismo e anabolismo do solo. Um aumento da atividade respiratória da microbiota do solo foi observado pela adição de P e pela fonte do nutriente, mostrando um aumento do catabolismo do solo. No entanto, os resultados mostram que o carbono da biomassa microbiana não foi alterado com adição de P, não mostrando efeito sobre anabolismo do solo. A atividade microbiana medida pela atividade de FDA não foi alterada com adição P inorgânica, mas um aumento foi observado com ácido fítico adicionado no solo. A atividade de fosfatase não foi alterada com adição de P no solo. Os resultados mostram que a fonte de P adicionado tem efeito sobre o metabolismo do solo e indicadores bioquímicos do solo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, G.; DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 33, n. 7-8, p. 943-951, 2001.

ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient of CO₂ (q CO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental condition, such as pH, on the microbial of forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.

BARDGETT, R.D.; SAGGAR, S. Effects of heavy metal contamination on the short-term decomposition of labeled C-14 glucose in a pasture soil. **Soil Biology. & Biochemistry**, v. 26, p. 727-733, 1994.

BODDY, E.; ROBERTS, P.; HILL, P.W.; FARRAR, J.; JONES, D.L. Turnover of low molecular weight dissolved organic C (DOC) and microbial C exhibit different temperature sensitivities in Arctic tundra soils. **Soil Biology Biochemistry**, v. 40, p. 1557-1566, 2008.

CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R.; SCHMIDT, S.K. Phosphorus Limitation of Microbial Processes in Moist Tropical Forests: evidence from short-term laboratory incubations and field studies. **Ecosystems**, v. 5, n. 7, p. 680-691, 2002.

DICK, R.P. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. **Biological Indicators of Soil Health**. p. 121-156, 1997.

EHLERS, K.; BAKKEN, L.R.; FROSTEGÅRD, Å.; FROSSARD, E.; BÜNEMANN, E.K. Phosphorus limitation in a Ferralsol: impact on microbial activity and cell internal P pools. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 558-566, 2010.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M.A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 20, p. 601-606, 1988.

FENG, J.; ZHU, B. A global meta-analysis of soil respiration and its components in response to phosphorus addition. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 135, p. 38-47, 2019.

FERNÁNDEZ, J.M.; PLAZA, C.; GARCÍA-GIL, J.C.; POLO, A. Biochemical properties and barley yield in a semiarid Mediterranean soil amended with two kinds of sewage sludge. **Applied soil ecology**, v. 42, n. 1, p. 18-24, 2009.

FERREIRA, A.S.; CAMARGO, F.A.O.; VIDOR, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, n. 4, p. 991-996, 1999.

FERREIRA, A.S.; SANTOS, M.A.; CORRÊA, G.F. Soil microbial response to glucose and phosphorus addition under agricultural systems in the Brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 1, p. 395-403, 2013.

HUANG, J.; HU, B.; QI, K.; CHEN, W.; PANG, X.; BAO, W.; TIAN, G. Effects of phosphorus addition on soil microbial biomass and community composition in a subalpine spruce plantation. **European Journal Of Soil Biology**, v. 72, p. 35-41, 2016.

ILSTEDT, U.; SINGH, S. Nitrogen and phosphorus limitations of microbial respiration in a tropical phosphorus-fixing Acrisol (Ultisol) compared with organic compost. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 1407–1410, 2005.

ILSTEDT, U.; SINGH, S.; NORDGREN, A. Using perlite as a substrate carrier for measuring microbial available phosphorus by respiration kinetics in soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, p.503–510, 2007.

JING, X.; YANG, X.; REN, F.; ZHOU, H.; ZHU, B.; HE, Jin-Sheng. Neutral effect of nitrogen addition and negative effect of phosphorus addition on topsoil extracellular enzymatic activities in an alpine grassland ecosystem. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 205-213, 2016.

KAISER, M.; WIRTH, S.; ELLERBROCK, R.H.; SOMMER, M. Microbial respiration activities related to sequentially separated, particulate, and water-soluble organic matter fractions from arable and forest topsoils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p.418–428, 2010.

LI, J.; YANG, Y.; LI, B.; LI, W.; WANG, G.; KNOPS, J. M. Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on soil carbon fractions in alpine meadows on the Qinghai-Tibetan Plateau. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e103266, 2014.

LIU, L.; GUNDERSEN, P.; ZHANG, T.; MO, J., 2012. Effects of phosphorus addition on soil microbial biomass and community composition in three forest types in tropical China. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 44, p.31–38, 2012.

MARINARI, S.; MASCIANDARO, G.; CECCANTI, B.; GREGO, S.; Kinetics of acid phosphatase in calcium chloride extractable soil organic matter. **Soil Biology. Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2076-2078, 2008.

MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NANNIPIERI, P.; MUCCINI, L.; CIARDI, C. Microbial biomass and enzyme activities: Production and persistence. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, p. 679–685, 1983.

NEBLE S.; CALVERT, V.; LE PETIT, J.; CRIQUET, S. Dynamics of phosphatase activities in a cork oak litter (*Quercus suber* L.) following sewage sludge application. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 2735-2742, 2007.

NORDGREN, A. A method for determining microbially available N and P in an organic soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 13, p. 195–199, 1992.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais.**

Viçosa: UFV, 1999. 399 p.

NZIGUHEBA, G.; MERCKX, R.; PALM, C.A.; RAO, M.R. Organic residues affect phosphorus availability and maize yields in a Nitisol of western Kenya. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, p. 328–339, 2000.

OLANDER, L.P.; VITOUSEK, P.M. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. **Biogeochemistry**, v. 49, p. 175-191, 2000.

OLIVEIRA, S.M.; FERREIRA, A.S. Change in soil microbial and enzyme activities in response to the addition of rock-phosphate-enriched compost. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 45, n. 21, p. 2794-2806, 2014.

PENG, S.; PIAO, S.; WANG, T.; SUN, J.; SHEN, Z. Temperature sensitivity of soil respiration in different ecosystems in China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1008–1014, 2009.

RER, J.S.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1256-1261, 1982.

SPOHN, M.; SCHLEUSS, Per-Marten. Addition of inorganic phosphorus to soil leads to desorption of organic compounds and thus to increased soil respiration. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 130, p. 220-226, 2019.

STEWART, J.W.B., TIESSEN, H. Dynamics of soil organic phosphorus. **Biogeochemistry**, v. 4, p. 41–57, 1987.

STOTZKY, G. Microbial Respiration. **American Society of Agronomy, Soil Science Society of America**, v. 9, p. 1550-1572, 2016.

TABATABAI, M. A. Soil Enzymes. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, J.S.; BOTTOMLEY, P.S. (Eds.). **Methods of Soil Analysis: Microbiological and Biochemical Properties**. Madison, WI: Soil Science Society of America, 1994. p. 775-833.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, p. 301–307, 1969.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 1995. 174p.

TRASAR-CEPEDA, C., M. C. LEIRÓS, e F. GIL-SOTRES. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils: Some implications for their use as indicators of soil quality. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2146–2155, 2008.

TURNER, B.L.; WRIGHT, S.J. The response of microbial biomass and hydrolytic enzymes to a decade of nitrogen, phosphorus, and potassium addition in a lowland tropical rain forest. **Biogeochemistry**, v. 117, n. 1, p. 115-130, 2013.

UEHARA G, GILLMAN G. **The mineralogy, chemistry, and physics of tropical soils with variable charge clays**. Boulder (CO): Westview Press, 1981, 170 p.

VINHAL-FREITAS, I.C.; FERREIRA, A.S.; CORRÊA, G.F.; WENDLING, B. Land use impact on microbial and biochemical indicators in agroecosystems of the Brazilian Cerrado. **Vadose Zone Journal**, v.12, p. 1–8, 2013.