

845 328210

**COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO E SUA
RELAÇÃO COM A DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO PARA A CULTURA
DO MILHO**

**Luciano Kayser Vargas
(Tese)**

Porto Alegre
2002



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO E SUA
RELAÇÃO COM A DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO PARA A CULTURA
DO MILHO**

LUCIANO KAYSER VARGAS
Engenheiro-Agrônomo (UFRGS)

Tese apresentada como
um dos requisitos à obtenção do
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Janeiro de 2002

LUCIANO KAYSER VARGAS
Engenheiro Agrônomo - UFRGS
Mestre em Ciência do Solo - UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

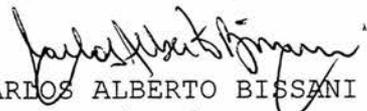
DOCTOR EM CIÊNCIA DO SOLO

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 10/01/2002
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 06/02/2002
Por

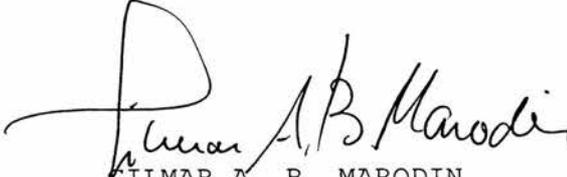

PEDRO ALBERTO SELBACH
Orientador-PPG-Ciência do Solo


CARLOS ALBERTO BISSANI
Coordenador do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo


CIMÉLIO BAYER
PPG-Ciência do Solo


CELSO AITA
UFSM


ROBERTO LUIZ SALET
UNICRUZ


GILMAR A. B. MARODIN
Diretor da Faculdade
de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Ao professor Pedro Alberto Selbach pelo incentivo, pela troca constante de idéias e pela orientação dedicada, não medindo esforços para que este trabalho fosse realizado.

Ao professor João Ruy Jardim Freire, pela confiança em mim depositada ao me conceder a oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao professor João Mielniczuk, que gentilmente permitiu o uso da área experimental para a realização deste trabalho.

Ao professor e amigo Roberto Luiz Salet (UNICRUZ), cujas idéias foram o ponto de partida para o presente trabalho.

Ao professor Enilson Luiz Saccol de Sá, pela colaboração inestimável nas etapas finais de meu projeto de pesquisa, pelo incentivo e pela amizade.

Ao professor Dércio Scholles e aos bolsistas de iniciação científica Cobausc Lima dos Santos, Juliana Rodrigues Trinca e Josué Calixto Verba, amigos e colaboradores em projetos de pesquisa ao longo destes anos.

À FEPAGRO, em especial à Veterinária Eliane Villamil Bangel e à Bióloga Andréia Mara Rotta de Oliveira pela utilização do equipamento de fotodocumentação.

À professora Gertrudes Corção e seu orientado Francisco C.F. Koller, pela ajuda com a PCR.

Ao colega José Antônio Kroeff Schmitz, companheiro na árdua tarefa de encher o laboratório de amostras, resíduos de solo e frascos de incubação. Obrigado pela ajuda com a urease.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo, pelo convívio ao longo destes anos.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Solos pela amizade e auxílio.

À Fátima Miranda D'Ávila Pereira pelo carinho, companheirismo e cumplicidade.

À minha família, especialmente à minha mãe, Maria de Lourdes, pelo seu apoio e pela valorização constante do meu esforço.

A Santo Expedito, Santa Edwiges, São Judas Tadeu e demais santos de causas perdidas, impossíveis, improváveis e desesperadoras, sem os quais nada disso teria sido possível!

COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO E SUA RELAÇÃO COM A DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO PARA A CULTURA DO MILHO^{1/}

Autor: Luciano Kayser Vargas
Orientador: Prof. Pedro Alberto Selbach

RESUMO

No sistema plantio direto, freqüentemente, há uma menor absorção de nitrogênio por cereais, em comparação com o sistema convencional, o que é atribuído à imobilização microbiana. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a quantidade de N imobilizado, a sua remineralização e as mudanças na comunidade microbiana induzidas pela adubação nitrogenada e pelos sistemas de manejo. Para tal, foram coletadas amostras da camada de 0-5 cm de solo semeado com milho em sucessão à aveia preta, sob os sistemas convencional e plantio direto, no dia da semeadura do milho e 46, 62, 88 e 112 dias após. Amostras da parte aérea das plantas de milho foram coletadas nas mesmas épocas, com exceção da primeira, e avaliadas quanto à produção de massa seca, teor e quantidade de nitrogênio acumulado. As amostras de solo foram avaliadas quanto à quantidade de nitrogênio mineral no solo, de nitrogênio imobilizado, de nitrogênio e carbono potencialmente mineralizáveis, à atividade potencial de urease e à composição da comunidade microbiana. A composição da comunidade microbiana foi estimada por meio de relações entre C:N, C:N-Nin e C:CHO da biomassa microbiana e por meio de PCR, com *primers* específicos para bactérias e fungos.

A imobilização microbiana do nitrogênio foi maior no sistema plantio direto, levando a uma menor quantidade de nitrogênio mineral no solo e resultando em menor acúmulo de nitrogênio na parte aérea do milho ao final do seu ciclo neste sistema, em comparação com o convencional. Não foi observada remineralização do nitrogênio imobilizado, indicando que a biomassa microbiana atuou mais como agente da mineralização de nitrogênio orgânico do que como fonte de nitrogênio potencialmente mineralizável.

A composição da comunidade microbiana modificou-se ao longo do período de avaliações em função da presença de resíduos vegetais de aveia preta e da adubação nitrogenada. A presença de resíduos de aveia beneficiou a população fúngica, enquanto a aplicação do fertilizante nitrogenado favoreceu a população bacteriana, a qual respondeu mais rapidamente à aplicação do fertilizante nitrogenado no sistema plantio direto. A relação C:CHO mostrou-se um indicador menos adequado do que as relações C:N e C:N-Nin para monitorar alterações na composição da comunidade microbiana.

^{1/} Tese de Doutorado em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. (103 p.) - Janeiro, 2002.

SOIL MICROBIAL COMMUNITY COMPOSITION AND ITS RELATIONSHIP WITH NITROGEN AVAILABILITY TO CORN^{1/}

Author: Luciano Kayser Vargas
Adviser: Prof. Pedro Alberto Selbach

ABSTRACT

Nitrogen uptake by cereals in no-till system is frequently lower than in conventional tillage. This has been attributed to microbial nitrogen immobilization. The present research aimed to evaluate the amount of nitrogen immobilized, its remineralization and changes in microbial community induced by nitrogen fertilization and soil management practices. A soil that was used for oats crop was seeded with corn and subjected to under conventional and no-till systems. Samples were collected from the top (0-5cm) soil layer on the day of the corn seeding and after 46, 62, 88 and 112 days. At the same time, the aerial parts of corn plants were collected and dry matter, nitrogen concentration and nitrogen accumulation were evaluated. Soil samples were assayed for mineral N, immobilized N, potentially mineralizable N and C, urease activity and the composition of the microbial community. The latter was estimated by microbial biomass C:N, C:N-Nin and C:CHO ratios and by PCR, using specific primers to bacterium and fungi.

Microbial nitrogen immobilization was higher in no-till, reducing soil mineral nitrogen concentration and resulting in a lower amount of nitrogen in the aerial parts of corn plants at the end of the growth cycle. Nitrogen remineralization was not observed, indicating that the microbial biomass acted more as an agent of organic N mineralization than as a source of potentially mineralizable N.

The composition of the microbial community changed with time due to oats residues availability and nitrogen fertilization. The availability of oats residues benefited fungal population, while the application of N fertilizer resulted in an increase in the bacterial population, which responded more rapidly to N fertilizer addition in no-till system. Microbial biomass C:CHO ratio was shown to be a less suitable indicator than C:N and C:N-Nin ratios for monitoring alterations in the microbial community.

^{1/} Doctoral Thesis in Soil Science - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (103 p.) - January, 2002.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Disponibilidade de nitrogênio em sistemas de manejo de solo	3
2.2. A comunidade microbiana nos sistemas plantio direto e convencional	11
2.3. Composição da comunidade microbiana e a imobilização de nitrogênio	15
2.3.1. Métodos para avaliar a composição da comunidade microbiana em sistemas de manejo de solo	20
2.4. Remineralização do nitrogênio	24
3. HIPÓTESES	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Localização e caracterização da área experimental	29
4.2. Tratamentos e amostragem	30
4.3. Avaliações	31
4.3.1. Avaliação do carbono da biomassa microbiana	31
4.3.2. Procedimento de fumigação - extração para avaliação de componentes da biomassa microbiana	33
4.3.2.1. Avaliação de nitrogênio da biomassa microbiana	33
4.3.2.2. Avaliação de nitrogênio reativo com ninhidrina da biomassa microbiana	34
4.3.2.3. Avaliação de carboidratos da biomassa microbiana ..	35
4.3.3. Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)	35
4.3.3.1. Extração direta e purificação de DNA do solo	35
4.3.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de seqüências de DNA bacteriano	37
4.3.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de seqüências de DNA fúngico	38
4.3.3.3. Quantificação do DNA	39
4.3.4. Avaliação do nitrogênio mineral do solo	39
4.3.5. Avaliação do nitrogênio acumulado pela parte aérea da cultura do milho	40
4.3.6. Avaliação do carbono e do nitrogênio do solo potencialmente mineralizáveis ao longo da cultura do milho	40
4.3.7. Avaliação de atividade potencial de urease	40

	Página
4.4. Análises estatísticas	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Quantidade de nitrogênio mineral no solo	42
5.2. Nitrogênio absorvido pela cultura do milho	46
5.3. Nitrogênio e carbono potencialmente mineralizáveis	50
5.4. Atividade potencial de urease	53
5.5. Nitrogênio imobilizado pela biomassa microbiana	56
5.6. Composição da comunidade microbiana	61
5.6.1. Relações entre constituintes da biomassa microbiana	61
5.6.2. Composição da comunidade microbiana avaliada por meio da análise do rDNA de fungos e de bactérias	69
6. CONCLUSÕES	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8. APÊNDICES	91

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

01. Carbono da biomassa microbiana e relações entre carbono e nitrogênio reativo com ninhidrina (C:N-Nin), carbono e nitrogênio (C:N) e carbono e carboidratos (C:CHO) da biomassa microbiana do solo nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC)..... 62

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
01. Nitrogênio mineral total do solo ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC).....	43
02. Teor de nitrogênio total na parte aérea de plantas de milho nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC)	46
03. Quantidade de nitrogênio total acumulado na parte aérea de plantas de milho nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC)	48
04. Nitrogênio potencialmente mineralizável do solo nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC)	51
05. Carbono potencialmente mineralizável do solo nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC)	52
06. Atividade potencial de urease nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC)	54
07. Nitrogênio da biomassa microbiana do solo nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC)	57
08. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de rDNA de bactérias (linhas 2 a 8) e fungos (linhas 10 a 16) em amostras de solo sob sistema convencional (linhas 3, 4, 5, 11,12 e 13) e plantio direto (linhas 6, 7, 8, 14, 15 e 16) no dia da semeadura do milho (A) e 46 (B), 62 (C), 88 (D) e 112 dias após (E). Linhas 1, 9 e 17: marcador de pares de bases (100 pb); linha 2: <i>E. coli</i> ; linha 10: <i>Penicillium</i>	70
09. Quantidade de DNA nos produtos de PCR de 16S rDNA bacteriano nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC)	72
10. Quantidade de DNA nos produtos de PCR de 18S rDNA fúngico nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC)	73

1. INTRODUÇÃO

As práticas convencionais de preparo de solo, caracterizadas pela mobilização intensa, levaram a uma degradação acelerada dos solos agrícolas na região sul do Brasil. Com o objetivo de reverter este quadro, nos últimos anos tem havido uma mudança no sistema de produção de grãos com a adoção crescente do sistema plantio direto. Este sistema é caracterizado pelo revolvimento do solo apenas na linha de semeadura e pela manutenção da cobertura do solo ao longo de todo o ano, seja por culturas estabelecidas ou pelos resíduos da cultura anterior.

A necessidade de manter o solo coberto fez com que a utilização de plantas de cobertura durante o período de outono/inverno passasse a ser priorizada. Dentre as várias espécies, a aveia preta tornou-se a mais utilizada como planta de cobertura na região sul, em função da produção elevada de fitomassa, do custo, da facilidade de obtenção de sementes e da rusticidade.

Embora eficiente como cobertura, controlando a erosão e adicionando carbono orgânico ao solo, a aveia preta produz resíduos com relação C:N elevada, resultando em imobilização de nitrogênio por parte da microbiota durante a sua decomposição. Assim, há uma diminuição na disponibilidade de nitrogênio para a cultura seguinte, exigindo cuidados no manejo da adubação nitrogenada para culturas como o milho. A recomendação

da adubação nitrogenada, no entanto, é tradicionalmente feita a partir de critérios validados experimentalmente para o sistema convencional. Por outro lado, surgem propostas alternativas, como a antecipação da adubação nitrogenada no sistema plantio direto, a qual leva em conta a ocorrência da imobilização microbiana. Porém, a comunidade microbiana, agente deste processo, não está devidamente estudada. Não se conhecem a magnitude e a dinâmica da imobilização microbiana de nitrogênio nos sistemas convencional e plantio direto nem o comportamento da microbiota durante este processo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar, de forma comparativa, a imobilização microbiana de nitrogênio em solo manejado nos sistemas plantio direto e convencional ao longo do ciclo do milho. Pretendeu ainda avaliar a composição das comunidades microbianas nos sistemas plantio direto e convencional, de modo a entender as diferenças no potencial de imobilização microbiana nestes sistemas de manejo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Disponibilidade de nitrogênio em sistemas de manejo de solo

O nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas. No entanto, ele é suprido, freqüentemente, em quantidades insatisfatórias, limitando o rendimento das culturas (Amado et al., 2000; Malhi et al., 2001). O suprimento inadequado de nitrogênio tem sido apontado como uma das causas que mais contribui para baixas produtividades na cultura do milho (Bortolini et al., 2000).

Embora abundante, o nitrogênio atmosférico é utilizado por plantas não leguminosas em quantidades variáveis e geralmente insuficientes, de modo que o restante de suas necessidades deve ser suprido na forma mineral. No solo, porém, ele se encontra predominantemente sob a forma orgânica, na qual não é absorvido ou o é em quantidades muito pequenas (Korsaeth et al., 2001). Assim, para que esteja disponível para as plantas, é preciso que o nitrogênio orgânico seja mineralizado ou que haja o aporte externo, via fertilizante mineral. E tanto o processo de mineralização do nitrogênio orgânico quanto o aporte de um fertilizante mineral nitrogenado são fortemente influenciados pelos sistemas de manejo do solo.

A influência do manejo do solo sobre a disponibilidade de nitrogênio é evidente no que diz respeito ao uso de um fertilizante nitrogenado mineral, a começar pela escolha do fertilizante. As formas de fertilizante nitrogenado podem diferir quanto à sua eficiência de uso pelas culturas. Em solos da região amazônica cultivados com azevém, mais de 60% do N aplicado como uréia foi absorvido pelas plantas, enquanto que, para o sulfato de amônio, a absorção foi de no máximo 49% (Alfaia, 1997). Em função de seu preço, a uréia é o fertilizante nitrogenado mais comumente utilizado, embora possa ter sua eficiência comprometida por perdas por volatilização (Lara Cabezas et al., 1997a). A volatilização de amônia proveniente da uréia pode ser afetada pelo modo de aplicação. A aplicação da uréia em superfície favorece a perda por volatilização, a qual pode ser minimizada por meio da incorporação do fertilizante ao solo (Lara Cabezas et al., 2000). Outras fontes de nitrogênio, como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NO_3NH_4 , não têm sua eficiência afetada pelo método de aplicação do fertilizante (Diekow, 2000).

Além da volatilização, a eficiência de fertilizantes nitrogenados pode ser diminuída por desnitrificação, escoamento superficial, lixiviação e imobilização microbiana (Lara Cabezas et al., 2000). Estes processos também podem ser afetados por práticas de manejo do solo. Além disso, parte do nitrogênio aplicado como fertilizante é rapidamente incorporado à matéria orgânica do solo, tanto a compostos lábeis quanto a compostos mais recalcitrantes, como os ácidos húmicos (Ceretta, 1997).

A matéria orgânica é a principal reserva de nitrogênio no solo. Aproximadamente 95% do N no solo encontram-se em formas orgânicas, sendo cerca de 35% N-aminoácidos, 20% N-amônio, 5% N-hexosaminas, 11%

N-hidrolisado não identificado e 29% N-não hidrolisado (Ceretta, 1997). Como o nitrogênio total está associado à matéria orgânica, práticas de manejo que alterem o conteúdo de matéria orgânica do solo, inevitavelmente alterarão o teor de nitrogênio total do solo. O plantio direto promove o aumento de carbono e de nitrogênio orgânicos no solo (Bayer, 1996; Bayer & Mielniczuk, 1997). O aumento do teor de nitrogênio orgânico no sistema plantio direto, em comparação com o sistema convencional, deve-se ao controle da erosão, o que reduz as perdas de matéria orgânica por escorrimento superficial (Bayer & Bertol, 1999) e, principalmente, pela proteção física da matéria orgânica. A ausência de revolvimento do solo no plantio direto promove a agregação do solo, permitindo que a matéria orgânica fique protegida no interior dos agregados e formando interações com os minerais do solo, tornando esta matéria orgânica menos acessível ao ataque microbiano (Kristensen et al., 2000). Assim, havendo um aumento no teor de nitrogênio orgânico, aumenta também o potencial de suprimento de N para as culturas (Gonçalves et al., 2000). No entanto, a proteção à matéria orgânica no sistema plantio direto, ao mesmo tempo em que permite o acúmulo do N no solo e aumenta o potencial de suprimento, dificulta a mineralização e a disponibilização do N para as culturas.

A mineralização do N consiste na desaminação de compostos orgânicos promovida pela microbiota, liberando NH_4^+ para a solução do solo ao final da reação (Diekow, 2000; Mengel, 1996). A mineralização, tanto da matéria orgânica do solo quanto de resíduos orgânicos, depende da ação dos microrganismos sobre estes materiais. Em sistemas com menor revolvimento do solo, o acesso dos microrganismos aos substratos orgânicos é dificultado,

resultando em taxas de mineralização de N menores (Bayer, 1996; Diekow, 2000). Além da proteção da matéria orgânica humificada, discutida anteriormente, os resíduos das culturas são mantidos na superfície do solo. A manutenção dos resíduos na superfície do solo, em comparação com a sua incorporação, resulta em uma decomposição mais lenta deste resíduo. Isto tem sido atribuído ao menor contato do resíduo com o solo, ao menor grau de fragmentação do resíduo e às variações de umidade no resíduo, que não ocorreriam quando da sua incorporação ao solo (Parker, 1962; Schomberg et al., 1994). Se, por um lado, a taxa de mineralização é menor no sistema plantio direto, por outro, a quantidade de nitrogênio mineralizada pode ser maior. O acúmulo crescente de nitrogênio orgânico no solo (Bayer, 1996) e o aumento da biomassa e da atividade microbiana (Vargas & Scholles, 2000) fariam com que a quantidade de nitrogênio mineralizada fosse semelhante ou mesmo maior do que a de um solo sob sistema convencional.

As taxas de decomposição e a dinâmica de mineralização do N também são determinadas pela qualidade dos resíduos (Broder & Wagner, 1988; Mary et al., 1996). Qualitativamente, os resíduos com maior relação C:N, como palhas de cereais, são decompostos mais lentamente do que resíduos de leguminosas, com maior concentração de nitrogênio (Amado et al., 2000). A relação C:N é freqüentemente considerada o fator determinante tanto da taxa de decomposição do resíduo quanto da dinâmica de mineralização. No entanto, a cinética de decomposição de um resíduo é muitas vezes independente da relação C:N do material, sendo muito mais relacionada à composição bioquímica do resíduo (Mary et al., 1996). As características químicas do resíduo vegetal que determinam a velocidade de decomposição

agui

de um resíduo são: a própria relação C:N e os teores de C solúvel, de proteínas, de celulose, de lignina e de polifenóis do resíduo (Aita et al., 2001; Amado et al., 2000; Mary et al., 1996; Robinson et al., 1994; Schomberg et al., 1994). A fração do resíduo representada por açúcares, proteínas e amidos é decomposta em menos de um ano. Outras frações mais resistentes, incluindo celulose, gorduras, ceras, tanino e, principalmente, lignina, podem levar mais de dez anos para serem decompostas (Amado et al., 2000; Jenkinson & Rayner, 1977). Broder & Wagner (1988) verificaram uma taxa de decomposição alta para um resíduo de soja, com perda de 68% de sua massa após 32 dias. No mesmo período, resíduos de milho e de trigo perderam 42 e 47% de sua massa, respectivamente. Além de uma menor relação C:N, a degradação mais rápida do resíduo de soja esteve associada a uma maior concentração de carboidratos solúveis em água. A composição dos resíduos de trigo e de milho, mais ricos em lignina, resultou em uma decomposição mais lenta.

A presença de resíduos com maior relação C:N também pode resultar em imobilização líquida de nitrogênio no solo. A imobilização ocorre simultaneamente com a mineralização e consiste na assimilação de nitrogênio pela microbiota. Normalmente é referida como sendo exclusivamente a assimilação de nitrogênio na forma mineral, caso em que é o processo inverso à mineralização (Norton, 2000). No entanto, existe a evidência de que os microrganismos são capazes de assimilar diretamente formas orgânicas nitrogenadas, tais como aminoácidos, sem que estas sejam previamente mineralizadas pela ação de enzimas extracelulares (Barak et al., 1990; Mary et al., 1996). A imobilização microbiana está ligada diretamente ao metabolismo

1.000 kg de resíduos

do carbono, uma vez que a energia e os precursores celulares provenientes do composto carbonado resultam em crescimento celular, em aumento da biomassa microbiana e, por conseqüência, em aumento da demanda de nitrogênio para a formação das células microbianas (Aita, 1997). Quando da degradação de um substrato orgânico, a microbiota assimila o C e o N do composto para a formação de suas células. Se o composto for pobre em N, com uma relação C:N elevada, assim como uma palha de cereal, a microbiota irá utilizar também o nitrogênio mineral presente na solução do solo (Janssen, 1996). Neste caso, a quantidade de nitrogênio imobilizado é maior do que a de mineralizado, ocorrendo imobilização líquida. A relação C:N do resíduo a partir da qual a imobilização será maior do que a mineralização depende da relação C:N dos microrganismos decompositores e de sua eficiência de assimilação de carbono (White et al., 1988).

Por induzir à imobilização de N, a presença de resíduos culturais com relação C:N elevada constitui-se em um problema quando a cultura seguinte não for uma leguminosa. O cultivo de gramíneas em sucessão, apesar de não ser o mais adequado, é bastante comum. A aveia preta é a planta de cobertura mais usada no sul do Brasil, em função de uma produção de fitomassa elevada, de sua rusticidade, da facilidade para obtenção de sementes, de sua decomposição mais lenta e de seu crescimento inicial rápido (Aita, 1997; Bortolini et al., 2000; Heinrichs et al., 2001). Esta é freqüentemente sucedida pela cultura do milho, estabelecendo uma sucessão de gramíneas. Nesta situação, o rendimento de grãos da cultura do milho pode ser afetado quando esta é cultivada em níveis baixos de adubação nitrogenada (Heinrichs et al., 2001).

O problema da baixa disponibilidade de nitrogênio em sucessões de gramíneas parece ser agravado no sistema plantio direto. Embora o sistema plantio direto promova um aumento nos teores de nitrogênio total do solo, diversos autores têm observado uma menor absorção de nitrogênio por cereais neste sistema, em comparação com o sistema convencional (Amado et al., 1998; Amado et al., 2000; Bandel et al., 1975; Carefoot et al., 1990; Kitur et al., 1984, Meisinger et al., 1985). Diversas causas têm sido apontadas para explicar a menor disponibilidade de nitrogênio no sistema plantio direto. As perdas por lixiviação seriam maiores neste sistema em função do incremento da porosidade (Meisinger et al., 1985). As perdas por desnitrificação também seriam favorecidas pelo aumento da população de microrganismos desnitrificadores (Doran, 1980), pela abundância de carbono e por condições de anaerobiose no sistema plantio direto (Carefoot & Janzen, 1997; Whalley et al., 1995). Uma menor mineralização dos resíduos da cultura anterior e do N orgânico do solo também poderia ser a causa da menor disponibilidade de N do sistema plantio direto (Freitas et al., 1996; Amado et al., 1999). A outra causa provável seria a maior imobilização microbiana do fertilizante nitrogenado aplicado em cobertura (Kitur et al., 1984). Outra possibilidade seria uma interação entre estes fatores (Amado, 1997). Alguns destes fatores, no entanto, dificilmente poderiam coexistir. A menor mineralização e a maior imobilização reduziriam os teores de N na solução do solo, reduzindo as perdas por lixiviação, por exemplo (Diekow, 2000).

Dentre as causas prováveis para a menor disponibilidade de nitrogênio no sistema plantio direto, a imobilização microbiana do nitrogênio tem sido considerada a mais importante (Carefoot et al., 1990; Carter &

Rennie, 1984; Kitur et al., 1984). Autores como Kitur et al. (1984) e Salet (1994), embora não tenham medido diretamente a imobilização microbiana, montaram experimentos que permitiram descartar as demais hipóteses, restando a imobilização microbiana como a única explicação possível. Os primeiros autores constataram que as perdas de N por lixiviação e desnitrificação foram de apenas 10 kg ha⁻¹ em um período de três anos, quantidade esta insuficiente para afetar a absorção de nitrogênio pela cultura de milho. Por sua vez, Salet (1994) montou dois estudos que permitiram descartar as hipóteses de que a mineralização seria menor no sistema plantio direto, de que o N permanecesse retido nas superfícies de troca como NH₄⁺ e de que as perdas por volatilização, lixiviação e desnitrificação seriam maiores. Assim, restaria a imobilização microbiana como única hipótese aceitável para justificar a menor disponibilidade de N no sistema plantio direto verificada pelo autor. A hipótese, posteriormente, foi comprovada quando Salet et al. (1997) constataram valores até sete vezes maiores de N na biomassa microbiana no sistema plantio direto, após a aplicação de nitrogênio mineral, em comparação com o sistema convencional. Estes resultados são confirmados por autores como Carter & Rennie (1984) e Follett & Schimel (1989), que verificaram uma maior imobilização do fertilizante nitrogenado pela microbiota em solo sob plantio direto em comparação com o solo sob preparo convencional. A imobilização microbiana pode ser suficientemente elevada para, isoladamente, afetar a absorção de nitrogênio (Carefoot et al., 1990).

A imobilização microbiana pode ser maior no sistema plantio direto simplesmente por haver mais microrganismos neste sistema, por diferenças na

composição da comunidade microbiana em relação ao sistema convencional ou por uma associação dos dois fatores.

2.2. A comunidade microbiana nos sistemas plantio direto e convencional

A comunidade microbiana do solo, responsável pela imobilização de nitrogênio, é influenciada por fatores abióticos tais como a temperatura, a umidade, a aeração do solo e a disponibilidade de nutrientes e de substratos orgânicos. Estes fatores, por sua vez, podem ser modificados pelo manejo do solo, resultando em diferenças quantitativas e em alterações na estrutura das comunidades microbianas.

Os métodos de preparo de solo provocam diferentes modificações nos fatores ambientais em função da forma como os resíduos das culturas anteriores são depositados e do grau de revolvimento do solo (Vargas & Scholles, 2000). Com o preparo convencional, o solo é revolvido intensamente e os resíduos vegetais são incorporados, enquanto que, com o plantio direto, os resíduos são mantidos na superfície e o revolvimento limita-se à linha de semeadura (Dick, 1984; Diekow, 2000). A manutenção dos resíduos culturais na superfície atua no regime térmico do solo e diminui as taxas de evaporação, conservando a umidade do solo (Bragagnolo & Mielniczuk, 1990). Com isso, o sistema plantio direto apresenta menor temperatura, menor amplitude térmica e maior umidade (Salton & Mielniczuk, 1995). Estas características são benéficas para a comunidade microbiana como um todo. Por outro lado, a maior umidade do solo, associada ao aumento da densidade decorrente da ausência de revolvimento do solo, resultam em menor aeração no sistema

Paulo Sérgio

plantio direto (Calderón et al., 2001; Whalley et al., 1995). Entre outras conseqüências, a menor aeração do solo pode limitar a atividade microbiana, diminuindo a oxidação de compostos orgânicos (Doran, 1980). Este é um dos fatores pelos quais pode ocorrer um aumento nos teores de matéria orgânica no solo sob sistema plantio direto. Os outros fatores seriam as menores perdas de solo por erosão e a proteção física da matéria orgânica no interior dos agregados. No sistema plantio direto, também se verifica um aumento nos teores de nutrientes, especialmente de N (Dick, 1984). O aumento nos teores de matéria orgânica e de nutrientes, no entanto, é restrito às camadas superficiais do solo. Abaixo de 7,5 cm, aproximadamente, estes teores passam a ser iguais ou menores do que os do sistema convencional (Doran, 1980). Há, portanto, uma distribuição diferenciada da matéria orgânica e dos nutrientes ao longo do perfil do solo no sistema plantio direto. Já o sistema convencional caracteriza-se por uma distribuição mais uniforme da matéria orgânica e dos nutrientes no perfil, devida à inversão da camada superficial e à incorporação dos resíduos durante a aração (Alvarez et al., 1995).

Estas diferenças ambientais entre os dois sistemas fazem do sistema plantio direto um meio mais favorável para a comunidade microbiana. As condições de temperatura e de umidade do solo no plantio direto estimulam a microbiota, aumentando a biomassa e a atividade microbiana. Salinas-Garcia et al. (1997) verificaram que os valores de carbono na biomassa microbiana foram maiores no sistema plantio direto ao longo de todo o ciclo do milho. Verificaram ainda que as maiores diferenças na biomassa microbiana entre os sistemas plantio direto e convencional coincidiram com períodos de seca, o que pode ser atribuído à conservação mais eficiente de água no sistema

plantio direto. Vargas & Scholles (2000), por sua vez, constataram que os valores de carbono microbiano foram afetados pelos preparos de solo durante o verão. O C da biomassa foi menor na camada superficial do sistema convencional, coincidindo com os valores mais baixos de umidade do solo. Além da umidade do solo, também a ocorrência de temperaturas elevadas no solo sob sistema convencional, em contraste com temperaturas mais amenas no plantio direto, pode explicar as diferenças na biomassa e atividade microbiana. Temperaturas elevadas no solo frequentemente reduzem a biomassa e a atividade microbiana (Cattelan & Vidor, 1990; Garcia & Rice, 1994). Porém, Balota et al. (1998) observaram os maiores valores de respiração basal e de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana no sistema plantio direto durante o verão.

Dentre todos os fatores ambientais mencionados anteriormente, a disponibilidade de carbono tem sido considerada o fator mais limitante para o crescimento e a atividade microbiana no solo (Wheatley et al., 1990). As fontes de C orgânico em sistemas agrícolas são a matéria orgânica do solo, os resíduos adicionados ao solo e os exsudatos radiculares. Além da distribuição da M.O. e dos resíduos ao longo do perfil, os métodos de preparo de solo diferem quanto à possibilidade de acesso a estes substratos pela microbiota e, por consequência, influenciam a sua taxa de mineralização. O revolvimento do solo promove a ruptura de agregados, expondo substratos orgânicos que de outra forma não estariam disponíveis para a microbiota (Kristensen et al., 2000; Salinas-Garcia et al., 1997). Isto pode resultar em um estímulo temporário à microbiota, que aumentaria a sua atividade respiratória (Silva Filho & Vidor, 1984). Quando do preparo do solo, tem sido observado um

2/10/2010 para o trabalho de Mestrado em Agronomia

aumento da liberação de CO₂ do solo, o qual é atribuído à degradação da matéria orgânica do solo, mais do que à degradação de resíduos vegetais (Reicosky et al., 1995). No entanto, o revolvimento do solo pode causar a morte de microrganismos, reduzir as populações microbianas e conseqüentemente a atividade respiratória (Calderón et al., 2001; Kristensen et al., 2000). O CO₂ pode ser, na verdade, liberado fisicamente dos poros e da solução do solo (Reicosky et al., 1997). Após o preparo do solo, a respiração microbiana pode até mesmo ser reduzida, sugerindo uma baixa quantidade de carbono de rápida metabolização liberada pelo rompimento dos agregados (Calderón et al., 2001).

Também a qualidade da matéria orgânica pode ser afetada pelo preparo do solo. A matéria orgânica em solo sob sistema convencional pode apresentar uma relação C:N menor do que a do sistema plantio direto, resultado da maior presença de material orgânico não-humificado neste último sistema (Kristensen et al., 2000). A matéria orgânica que está presente em menor quantidade no sistema convencional encontrar-se-ia também em formas mais recalcitrantes (Mengel, 1996). Deste modo, há uma menor disponibilidade de carbono para a microbiota, fato este que foi constatado por Follett & Schimel (1989). Estes autores encontraram menos carbono respirado por unidade de nitrogênio mineralizado, indicando uma limitação de carbono disponível.

Por outro lado, a decomposição mais lenta dos resíduos no sistema plantio direto leva a um acúmulo de matéria orgânica biodegradável, sobretudo carboidratos, peptídeos, açúcares aminados, resíduos vegetais parcialmente degradados e a própria biomassa microbiana (Angers et al., 1993; Carter &

Rennie, 1982). Essa disponibilidade de substratos possibilita o sustento prolongado de uma biomassa microbiana maior (Salinas-Garcia et al., 1997).

Deve-se salientar que as diferenças entre os dois sistemas são também restritas à camada superficial do solo. A biomassa e a atividade microbiana seguem o mesmo padrão de distribuição dos resíduos e da matéria orgânica ao longo do perfil do solo (Alvarez et al., 1995). O acúmulo de matéria orgânica e de nutrientes favorece o crescimento e a atividade microbiana na camada superficial do solo sob sistema plantio direto (Dick, 1984). Vargas & Scholles (2000), estudando solo sob sistema convencional, reduzido e plantio direto, encontraram as diferenças mais pronunciadas de biomassa e atividade microbiana na camada de solo de 0-5 cm. Na camada de 5-15 cm, a biomassa microbiana e a atividade respiratória não diferiram entre os sistemas. Resultados semelhantes foram reportados por Alvarez et al. (1995), Angers et al. (1993), Carter & Rennie (1982) e McCarty et al. (1998).

Na medida em que a biomassa microbiana é maior, também o é a imobilização total de nitrogênio. Assim, a imobilização é maior no sistema plantio direto junto à superfície. Vargas & Scholles (1998), comparando solos sob diferentes sistemas de manejo, verificaram os maiores valores de nitrogênio na biomassa microbiana na camada de 0-5 cm do solo sob sistema plantio direto, em comparação com sistema convencional e preparo reduzido.

2.3. Composição da comunidade microbiana e a imobilização de nitrogênio

O efeito dos sistemas de manejo sobre a microbiota não se restringe a aspectos quantitativos, como as alterações na biomassa e na atividade.

Também a estrutura da comunidade microbiana pode ser alterada pelo manejo do solo. Os grupos microbianos podem ser afetados diferentemente pelas práticas de manejo. O preparo freqüente do solo, por exemplo, pode selecionar populações que suportem o rompimento físico (Calderón et al., 2001). A população fúngica poderia ser a mais prejudicada nesta situação, pois o revolvimento do solo causaria o rompimento de hifas, as quais seriam degradadas pelo restante da microbiota (Kristensen et al., 2000). A manutenção de resíduos sobre a superfície do solo também parece exercer uma ação benéfica sobre a população fúngica.

Estes fatores suportam a idéia de que a população fúngica seria favorecida no sistema plantio direto, podendo mesmo ser predominante (Kristensen et al., 2000). No entanto, Allison & Killham (1988) constataram um aumento da população fúngica, sobretudo da população de fungos celulolíticos, após a incorporação de palha de cevada. Os fungos são os principais responsáveis pela degradação de lignina e celulose (Mary et al., 1996), compostos abundantes em palhas de cereais. O estímulo à população fúngica parece, portanto, mais associado à qualidade do resíduo do que à sua forma de disposição no solo. A população fúngica pode, realmente, ser maior no sistema plantio direto em comparação com o sistema convencional. Porém, a população bacteriana também segue esta tendência. Linn e Doran (1984) observaram um aumento de 35% na população fúngica no sistema plantio direto em comparação com o convencional. Para a população bacteriana, o aumento foi de 41%.

Assim como a população fúngica é a principal responsável pela degradação de lignina e celulose, a população bacteriana é a principal

responsável pela degradação de carbono solúvel (Mary et al., 1996). A maior disponibilidade de carbono de rápida metabolização no plantio direto pode estimular mais intensamente a população bacteriana do que a fúngica. Gunapala & Scow (1997), comparando solos sob sistema convencional e sob sistema orgânico, notaram uma queda na relação C:N da biomassa microbiana no sistema orgânico. A relação C:N mais baixa deveu-se à maior proporção de bactérias, atribuída à qualidade dos resíduos adicionados ao solo no sistema orgânico.

As raízes de plantas em desenvolvimento também podem estimular diferentemente as populações microbianas nos sistemas de manejo. Além do aumento da matéria orgânica do solo e de sua qualidade, a manutenção dos resíduos vegetais pode levar a uma maior concentração de raízes na camada superficial do solo (Lynch & Panting, 1980). Esta concentração de raízes pode resultar em maior efeito rizosférico na camada superficial do solo sob sistema plantio direto, possibilitando o desenvolvimento de uma população microbiana heterotrófica maior nesta camada. A população fúngica normalmente não é beneficiada, pois o efeito rizosférico é seletivo. Os exsudatos radiculares promovem um aumento na concentração de carboidratos solúveis próximo às raízes (Cheng et al., 1996). Como a população bacteriana é a principal responsável pela degradação destes substratos, esta é grandemente beneficiada pelo efeito rizosférico (Christensen et al., 1995).

A conservação de umidade no solo também pode ser responsável por diferenças na estrutura das comunidades microbianas nos dois sistemas de manejo. A população bacteriana é a mais afetada por baixos níveis de umidade no solo. A atividade bacteriana declina rapidamente na medida em

que o potencial de água cai, sendo insignificante a -15 MPa. A extensão de hifas prossegue em potenciais de água mais baixos, permitindo aos fungos manterem sua atividade (Orchard & Cook, 1983). Em situações de déficit hídrico, a população fúngica é favorecida em relação à bacteriana. Assim, a menor umidade do solo no sistema convencional pode selecionar comunidades microbianas predominantemente fúngicas (Gunapala & Scow, 1997).

A estrutura da comunidade microbiana tem reflexos diretos no potencial de imobilização de nitrogênio. A imobilização depende da relação C:N dos microrganismos, a qual varia entre espécies e grupos microbianos. Uma menor relação C:N da biomassa microbiana indica que, para uma mesma quantidade de carbono, uma quantidade maior de nitrogênio é assimilada. Alguns microrganismos, especialmente fungos, podem alterar a sua relação C:N em resposta à disponibilidade de nitrogênio e carbono (Mary et al. 1996; Wheatley et al., 1990). É pouco provável, no entanto, que toda a biomassa microbiana altere a sua relação C:N simultaneamente (Wheatley et al., 1990). Portanto, as diferenças na relação C:N da biomassa microbiana indicam diferenças na sua composição, refletindo a predominância de grupos com maior ou menor relação C:N. A população bacteriana apresenta uma relação C:N mais baixa do que a população fúngica (Campbell et al., 1991; Mary et al., 1996). Logo, práticas que favoreçam a população bacteriana reduzirão a relação C:N da biomassa microbiana, enquanto que práticas que beneficiem a população fúngica produzirão efeito contrário.

A população bacteriana pode ser estimulada pelo aumento da disponibilidade de N. Garcia & Rice (1994) reportaram o aumento do nitrogênio da biomassa microbiana após a aplicação de fertilizante nitrogenado. O

carbono da biomassa, ao contrário, foi reduzido. A diminuição da relação C:N da biomassa microbiana refletiu a proporção de fungos e de bactérias, sendo estas últimas predominantes no solo após a fertilização nitrogenada.

A maior quantidade de nitrogênio potencialmente mineralizável verificado no sistema plantio direto (Bandel et al., 1975; Doran, 1980; Salinas-Garcia et al., 1997) também pode levar a uma mudança na composição da comunidade microbiana. Salinas-Garcia et al. (1997) afirmam que a biomassa microbiana apresenta uma maior relação C:N em resposta a condições de baixa disponibilidade de N, tal como ocorre no sistema convencional. Nesta situação, a comunidade microbiana poderia ser predominantemente fúngica. A situação inversa ocorre no sistema plantio direto. Há uma maior disponibilidade de compostos nitrogenados na camada superficial do solo, o que estimularia a população bacteriana, levando a uma biomassa microbiana com menor relação C:N e maior capacidade de imobilização de nitrogênio. Vargas (1997), ao avaliar um solo sob diferentes sistemas de manejo em quatro épocas durante um ano, observou relações C:N da biomassa microbiana mais baixas no sistema plantio direto em três épocas, em comparação com os preparos reduzido e convencional, independentemente do sistema de culturas. De modo semelhante, Aslam et al. (1999) encontraram relações C:N menores na biomassa microbiana em solo sob plantio direto em duas das três avaliações realizadas pelos autores. Estes resultados indicam que, ao menos em determinados períodos, a biomassa microbiana no sistema plantio direto pode apresentar relação C:N menor do que no sistema convencional, o que resultaria em um maior potencial para imobilização de nitrogênio.

2.3.1. Métodos para avaliar a composição da comunidade microbiana em sistemas de manejo de solo

Modificações na estrutura da comunidade microbiana, especialmente na proporção de fungos e bactérias, podem influenciar a dinâmica e a disponibilidade de nutrientes no solo (Frey et al., 1999). Tais alterações podem ser avaliadas por diversos métodos, baseados em diferentes princípios, tais como os métodos fisiológicos, os métodos culturais, os métodos baseados em contagem direta, os que estimam constituintes da biomassa, ou por meio de técnicas moleculares.

Os métodos fisiológicos baseiam-se na atividade metabólica da microbiota ao utilizar determinado substrato, geralmente carboidratos. O método fisiológico mais utilizado para estimar a proporção de fungos e de bactérias baseia-se na estimulação da microbiota com glicose e a inibição seletiva dos grupos por antibióticos. O método foi proposto inicialmente por Anderson & Domsch (1973) e vem sendo usado em diferentes situações por autores como Harrison & Betts (1996), Johnson et al. (1996), Selbach (1998) e Wardle & Parkinson (1990). As limitações do método residem no fato de que nem toda a microbiota responde igualmente ao estímulo com glicose nem à inibição pelos antibióticos (Wardle & Parkinson, 1990).

Os métodos culturais consistem em diluições das amostras de solo e cultivo em placas de Petri com meio seletivo. São os mais utilizados para o isolamento de microrganismos do solo e para a determinação de células viáveis. Estes métodos vêm sendo utilizados para estimar a abundância de fungos, bactérias (Doran, 1980), actinomicetos, solubilizadores de fosfato (Silva Filho & Vidor, 1984) e celulolíticos (Cattelan & Vidor, 1990). Entretanto,

as contagens de unidades formadoras de colônias, com o objetivo de avaliar a biomassa, produzem resultados subestimados. Algumas células podem permanecer aderidas às partículas de solo, outras podem morrer durante as diluições, podem ficar aderidas às paredes das vidrarias ou podem simplesmente não se desenvolver no meio de cultura (Parkinson et al., 1971). Esta última parece ser a maior limitação dos métodos culturais. Estima-se que, no máximo, 1% dos organismos presentes no solo é cultivável (Torsvik et al., 1996). A maioria da comunidade microbiana, portanto, não é mensurada por métodos culturais. A medida da proporção de fungos e de bactérias presentes no solo por tais métodos somente seria válida se esta fosse a mesma entre os organismos cultiváveis e os não-cultiváveis, o que seria pouco provável.

Outra forma de se avaliar a composição da biomassa microbiana consiste na contagem direta de hifas fúngicas e de células bacterianas e a posterior conversão das contagens para biovolume ou biomassa. Técnicas utilizando diferentes corantes e microscópios vêm sendo usadas há muitos anos (Anderson & Domsch, 1978). Em trabalhos mais recentes, é comum a utilização de corantes como o diacetato de fluoresceína, que permitem a contagem de células metabolicamente ativas por meio de microscopia de epifluorescência (Beare et al., 1997; Frey et al., 1999; Lundquist et al., 1999; Tate et al., 1991). Embora possam ser mais precisas do que os métodos culturais, as contagens diretas também podem subestimar as populações microbianas. As razões para contagens subestimadas seriam o confundimento dos microrganismos com as partículas do solo, deficiências na coloração de algumas células, problemas na liberação dos microrganismos das superfícies em que se encontram aderidos, imprecisões na mensuração dos biovolumes e

a discordância entre os muitos fatores de conversão de biovolume para biomassa (Frey et al., 1999).

A composição da comunidade microbiana também pode ser estimada por meio da quantificação de compostos constituintes das células microbianas. Alguns constituintes estão presentes apenas em grupos restritos da microbiota, como o ácido murâmico (Parkinson et al., 1971), presente em procariotos, ou a quitina e o ergosterol (Stahl & Parkin, 1996), presentes nas células fúngicas. A avaliação destes constituintes poderia estimar a biomassa de bactérias e de fungos, respectivamente. Porém, os valores obtidos para a biomassa de cada um dos grupos microbianos frequentemente são maiores do que a biomassa total estimada por outros métodos, sugerindo que a maior parte destes compostos é extraída de frações não vivas do solo (Jenkinson & Ladd, 1981). Outra alternativa é a utilização de métodos baseados na fumigação com clorofórmio e na extração de compostos solúveis, os quais permitem avaliar as relações entre carbono, nitrogênio, carboidratos (CHO) e N reativo com ninhidrina (N-Nin) presentes na biomassa microbiana. Estas relações permitem uma estimativa da composição da comunidade microbiana, de seu estado fisiológico e de sua capacidade de imobilizar N. A relação C:N tem sido usada como um indicativo da predominância de fungos ou de bactérias no solo em um dado momento, embora não avaliem diretamente os grupos microbianos (Campbell et al., 1991; Garcia & Rice, 1994; Gunapala & Scow, 1998; Wheatley et al., 1990). De modo semelhante, as relações CHO:C e C:N-Nin podem ser usadas no monitoramento de modificações na composição da biomassa microbiana, podendo ser medidas mais sensíveis do que a relação C:N (Joergensen et al., 1996). Além de permitirem uma

estimativa da composição da microbiota, estes métodos permitem estabelecer relações entre a dinâmica da comunidade microbiana e a disponibilidade de nutrientes, sobretudo de nitrogênio (Gunapala & Scow, 1998).

Os métodos moleculares, por sua vez, parecem ser a alternativa mais promissora aos métodos culturais. Eles permitem a identificação e a classificação até mesmo de organismos não-culturáveis, possibilitam análises da estrutura e da diversidade da comunidade microbiana e geram comparações quantitativas mais precisas do que os métodos culturais (Borneman et al., 1996, Fouly et al., 1996; Martin-Laurent et al., 2001; Nüsslein & Tiedje, 1999). A aplicação de técnicas moleculares envolve inicialmente a liberação de ácido nucléico das células microbianas, mais freqüentemente o DNA, a sua extração e purificação e, posteriormente, a sua análise por meio de procedimentos de hibridização e/ou reação em cadeia da polimerase (PCR) (Selbach, 1998). Ambos os procedimentos e as suas diversas variações permitem quantificar e identificar grupos microbianos a partir de seqüências-alvo de DNA. As seqüências mais usadas em estudos de diversidade microbiana são aquelas dos genes que codificam o RNA da subunidade menor do ribossomo (Borneman et al., 1996). Seqüências do 16S rDNA e do 18S rDNA estão presentes em todas as bactérias e em todos os fungos, respectivamente. Estes genes possuem regiões altamente conservadas, que permitem a identificação de organismos do mesmo grupo e, ao mesmo tempo, seqüências variáveis, que permitem distinguir organismos dentro daquele grupo (Smit et al., 1997).

2.4. Remineralização do nitrogênio

No sistema plantio direto, o aumento da biomassa microbiana resulta em maior imobilização de nitrogênio, diminuindo a sua disponibilidade para as culturas. Por outro lado, a maior imobilização implica menor concentração de nitratos na solução do solo. Com isto, há menor possibilidade de perdas de nitrogênio por lixiviação, aumentando a capacidade de conservação de nitrogênio no sistema solo (Follett & Schimel, 1989; House et al., 1984). Além disto, o nitrogênio é imobilizado apenas temporariamente e em uma forma ativa, pois os microrganismos, responsáveis pela imobilização, são também os agentes do processo de mineralização. Uma maior biomassa microbiana também pode significar maior atividade microbiana e, conseqüentemente, maior mineralização de nitrogênio, o que compensaria, ao menos em parte, a imobilização (Vargas & Scholles, 2000).

Além disso, a biomassa microbiana pode constituir-se em uma fonte de nitrogênio potencialmente mineralizável. Os nutrientes imobilizados pela comunidade microbiana podem atingir valores elevados, porém a sua reciclagem e liberação são mais rápidas do que as de outras frações da matéria orgânica do solo (Garcia & Moron, 1992). Em solos agrícolas, os valores de nitrogênio imobilizado nas células microbianas podem ser superiores a 100 kg ha^{-1} (Anderson & Domsch, 1980). Na medida em que ocorre a morte dos microrganismos, estes são rapidamente mineralizados pelos microrganismos restantes, liberando os nutrientes imobilizados no processo conhecido como remineralização (Marumoto et al., 1982; Mary et al., 1996). A remineralização ocorre após uma fase de decomposição ativa, na qual há um crescimento das populações microbianas. Com a morte dos

microrganismos e a diminuição das populações microbianas, inicia-se a remineralização. A cinética da remineralização parece ter duas fases distintas, sendo uma fase inicial rápida, seguida por uma fase mais lenta (Aita, 1997). Estas fases poderiam estar associadas à composição da microbiota. Os microrganismos que respondem a um determinado estímulo, como a aplicação de um fertilizante, seriam degradados mais rapidamente, enquanto os microrganismos autóctones seriam degradados mais lentamente (Carter & Rennie, 1984).

Acredita-se que a quantidade de nitrogênio remineralizado em curto prazo seja muito pequena (Aita, 1997). Porém, alguns trabalhos indicam que o processo de remineralização pode suprir uma quantidade significativa de nitrogênio para as plantas. Bonde et al. (1988) observaram que de 55 a 89% do N mineralizado durante 40 semanas de incubação eram derivados da biomassa microbiana. Resultados semelhantes foram obtidos por Carter & Rennie (1984) e Marumoto (1984). Os primeiros autores verificaram que entre 20 e 40% do nitrogênio imobilizado foram liberados em um período de 100 dias. Marumoto (1984), por sua vez, trabalhou com solo submetido a ciclos de secamento e umedecimento e constatou que 66% do nitrogênio mineralizado em um período de 28 dias eram provenientes de remineralização. Estes resultados reforçam a idéia de que a biomassa microbiana, além de ser responsável pela ciclagem de nutrientes, pode ser uma fonte importante de N potencialmente mineralizável (Goyal et al., 1992; Bonde et al., 1988).

Os fatores ambientais que controlam a proliferação e a morte de microrganismos irão determinar a taxa de liberação dos nutrientes para a solução do solo (Garcia & Moron, 1992; Mengel, 1996). A disponibilidade de

nutrientes, a capacidade do solo em prover proteção para a microbiota por meio de sua estrutura, a temperatura e a umidade do solo são fatores que contribuem para a manutenção de uma biomassa microbiana maior ou menor (Bonde et al., 1988). Marumoto (1984) afirma que a mortalidade dos microrganismos é maior quando o solo é submetido a estresses ambientais, como secamento, ou alguma perturbação mecânica. Este tipo de situação é mais comum no preparo convencional. Por isto, a ciclagem do N imobilizado pode ser mais lenta no plantio direto em condições de campo. Embora mais lenta, a ciclagem do nitrogênio no sistema plantio direto seria, no entanto, mais eficiente, uma vez que as perdas seriam menores (House et al., 1984).

A proporção de fungos e bactérias na biomassa microbiana também pode influenciar a taxa de remineralização. As bactérias, que crescem rapidamente em determinadas situações, como durante a decomposição de exsudatos radiculares, também são decompostas rapidamente (Mary et al., 1996). Os fungos, ao contrário, apresentam uma remineralização mais lenta (Kristensen et al., 2000). A remineralização mais lenta dos fungos possivelmente se deva à composição de suas células, ricas em compostos de difícil degradação, como quitina e celulose (Atlas, 1988; Jenkinson & Ladd, 1981; Stahl & Parkin, 1996).

A cinética da remineralização tem sido descrita por modelos exponenciais de primeira ordem, de segunda ordem ou mistos (Bonde et al., 1988; Whitmore, 1996). A maioria dos modelos segue uma cinética de primeira ordem, na qual a quantidade de nitrogênio remineralizado é proporcional à quantidade inicial imobilizada. Cinéticas de segunda ordem, no entanto, podem descrever o processo mais apropriadamente. Whitmore (1996),

comparando três modelos, considerou o modelo de segunda ordem o mais apropriado. De acordo com o modelo, a remineralização é regulada em parte pelas interações entre os microrganismos, as quais aumentam na medida em que a biomassa microbiana aumenta. No sistema plantio direto, uma maior quantidade de nitrogênio imobilizado e, possivelmente, a maior ocorrência de interações entre os microrganismos resultariam em maior quantidade de nitrogênio remineralizado. Assim, embora as taxas constantes de decaimento exponencial possam ser menores no sistema plantio direto, quanto maior for o conteúdo de nitrogênio na biomassa microbiana, mais rápida será a sua ciclagem.

3. HIPÓTESES

A partir da fundamentação teórica até aqui descrita, foram formuladas as seguintes hipóteses:

1. A composição das comunidades microbianas do solo é diferente nos sistemas plantio direto e convencional. No sistema plantio direto, há maior disponibilidade de matéria orgânica biodegradável e de nitrogênio, favorecendo em maior intensidade a população bacteriana. Assim, há o desenvolvimento de uma biomassa microbiana com menor relação C:N e, conseqüentemente, maior potencial de imobilização de nitrogênio, sobretudo após a aplicação do fertilizante nitrogenado.

2. O nitrogênio imobilizado na biomassa microbiana do solo constitui-se uma fração importante do nitrogênio potencialmente mineralizável e apresenta uma ciclagem rápida. No sistema plantio direto, há mais microrganismos, com maior interação entre eles, e maior atividade microbiana, resultando em maior remineralização. Com isso, há um retorno maior de nitrogênio imobilizado, compensando, em parte, a maior imobilização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização e caracterização da área experimental

As amostras de solo e de tecido vegetal, analisadas no presente trabalho, foram coletadas em um experimento localizado em área pertencente à Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS), no município de Eldorado do Sul (RS), região fisiográfica da Depressão Central.

O clima é subtropical de verão úmido quente do tipo fundamental Cfa, conforme a classificação de Koeppen. O solo é classificado como Argissolo Vermelho distrófico, textura franco-argilosa (Paleudult). O relevo da região é ondulado a suave ondulado, apresentando uma declividade média local de 5%.

O experimento vem sendo conduzido desde 1985 com tratamentos de preparos de solo e de sistemas de culturas. O experimento possui três repetições, em um delineamento experimental em blocos casualizados, com parcelas subdivididas. Os métodos de preparo de solo – convencional, reduzido e plantio direto - ocupam as parcelas principais, com 300 m² (15x20m). As operações de preparo de solo têm sido efetuadas apenas antes da semeadura das culturas de verão. No sistema convencional, o solo vem sendo preparado com uma aração e duas gradagens, havendo a incorporação

dos resíduos culturais ao solo. No preparo reduzido, com uma escarificação seguida por uma gradagem leve, enquanto que no plantio direto, a semeadura vem sendo realizada sobre os resíduos das culturas anteriores, sem o preparo do solo. As culturas de inverno têm sido semeadas diretamente sobre os resíduos das culturas de verão, sem preparo de solo.

As subparcelas, de 100 m² (5x20m), vêm sendo conduzidas com três sistemas de sucessões de culturas: aveia preta (*Avena strigosa*) + vica (*Vicia sativa*) / milho (*Zea mays*) + caupi (*Vigna sinensis*); aveia preta / milho e vica / milho.

As características do solo e o histórico do experimento encontram-se descritas em Bayer & Mielniczuk (1997).

4.2. Tratamentos e amostragem

Dois sistemas de manejo de solo foram avaliados: o sistema plantio direto e o sistema convencional. O solo foi cultivado, nos dois sistemas, com a sucessão de gramíneas aveia preta / milho.

Previamente à cultura do milho, a aveia preta foi rolada com o uso de um rolo-faca. Esta operação foi efetuada em 31/08/1999. No momento da rolagem, a palha da aveia preta apresentava uma relação C:N média igual a 59. O preparo convencional do solo foi realizado em 13/09/1999 e a semeadura da cultura do milho, em 23/09/1999, em ambos os sistemas. A população foi de 69.000 plantas por hectare. Como fertilizante nitrogenado, aplicado em cobertura, utilizou-se uréia, em uma dose total equivalente a 180 kg N ha⁻¹. O fertilizante foi aplicado a lanço, de modo fracionado, em duas doses, sendo aplicados 60 kg N ha⁻¹ aos 25 dias e 120 kg N ha⁻¹ aos 49 dias

após a semeadura da cultura do milho. Imediatamente após cada aplicação do fertilizante nitrogenado, procedeu-se uma irrigação equivalente a 20 mm.

Cada tratamento avaliado foi conduzido em três repetições, em blocos casualizados. As amostras de solo foram coletadas na camada de 0-5 cm, com o uso de uma espátula. Foram coletadas amostras compostas de cinco subamostras por parcela, as quais foram mantidas intactas, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas até o laboratório em caixas de isopor com gelo. No laboratório, foram homogeneizadas com o uso de peneira com malha de 4 mm. Após, parte das amostras foi pesada para as avaliações de biomassa microbiana pelo procedimento de fumigação-extração e análise de nitrogênio mineral, enquanto outra parte foi pré-incubada por 2 semanas para a análise de carbono da biomassa por fumigação-incubação. O restante das amostras foi armazenado em congelador a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento em que foram efetuadas as demais análises. As amostras de solo foram coletadas no dia da semeadura do milho e 46, 62, 88 e 112 dias após a semeadura. Nos mesmos dias, com exceção da primeira coleta, foram coletadas as partes aéreas de quatro plantas de milho de cada parcela para as análises de N no tecido vegetal.

4.3. Avaliações

4.3.1. Avaliação do carbono da biomassa microbiana

Para a avaliação de C da biomassa microbiana, foi utilizado o procedimento de fumigação-incubação descrito por Jenkinson & Powlson (1976). As amostras de solo de cada tratamento foram pré-incubadas por duas semanas em frascos cobertos com filme de PVC a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$. De cada amostra,

retiraram-se duas subamostras, sendo uma de 50 g e outra de 49 g de solo (base úmida). As subamostras de 49 g foram colocadas em um dessecador de 30 mm com as paredes forradas com papel úmido, contendo um becker com 15 mL de clorofórmio (CHCl_3) e esferas de vidro. Com o auxílio de uma bomba de sucção, produziu-se vácuo no interior dos dessecadores até que o clorofórmio borbulhasse. As demais subamostras foram submetidas ao mesmo tratamento, porém sem a presença do clorofórmio. As subamostras foram mantidas nos dessecadores por 24 horas. Ao final deste período, retirou-se o clorofórmio e o papel úmido de dentro do dessecador. Após, realizaram-se seis evacuações sucessivas de três minutos com a bomba de vácuo, de modo a eliminar o vapor do fumigante. As subamostras fumigadas foram então reinoculadas com 1,0 g da amostra original de solo e incubadas em frascos de vidro com volume de 1,5 L, com vedação hermética. No interior de cada frasco, foi colocado um copo plástico contendo 2 mL de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Com as subamostras de solo não-fumigadas, realizou-se o mesmo procedimento. Todas as subamostras, além de uma prova em branco sem solo, foram incubadas em estufa com temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, com a umidade do solo ajustada para $\pm 70\%$ da sua capacidade de campo. Após 10 dias de incubação, mediu-se a produção de C-CO_2 de cada subamostra por titulação com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O carbono da biomassa microbiana foi calculado pela equação $C_B = (1,73 C_F) - (0,56 C_{NF})$, proposta por Horwath et al. (1996), onde:

- C_B representa o carbono da biomassa microbiana, expresso em mg kg^{-1} de solo seco;
- C_F e C_{NF} representam o carbono liberado na forma de CO_2 nas subamostras fumigada e não-fumigada, respectivamente;

- Os parâmetros 1,73 e 0,56 estimam a proporção de carbono microbiano mineralizado durante o período de incubação.

Os valores expressos em mg kg^{-1} foram convertidos para kg ha^{-1} , considerando-se, para tal, a densidade aparente do solo de $1,49 \text{ g cm}^{-3}$ no sistema convencional e $1,59 \text{ g cm}^{-3}$ no sistema plantio direto determinada por Salton & Mielniczuk (1995).

4.3.2. Procedimento de fumigação - extração para avaliação de componentes da biomassa microbiana

O nitrogênio total, o nitrogênio reativo com ninhidrina e os carboidratos da biomassa microbiana foram analisados em extratos de solo, obtidos de acordo com o procedimento de fumigação-extração descrito por Brookes et al. (1985).

Foram pesados 20 g de solo (base úmida), os quais foram extraídos com 80 mL de K_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e agitados por 30 minutos. Simultaneamente, outra amostra, de massa igual, foi fumigada com clorofórmio por 24 horas, conforme descrito no item 4.3.1. O clorofórmio foi removido mantendo-se os frascos abertos por 6 a 8 horas, sendo então feita a extração do modo descrito anteriormente. Após a agitação, os extratos foram filtrados em papel filtro e mantidos em geladeira até o momento das análises.

4.3.2.1. Avaliação de nitrogênio da biomassa microbiana

Para a avaliação do nitrogênio da biomassa microbiana foi utilizado o método proposto por Brookes et al. (1985). Os extratos foram avaliados para N total como descrito por Tedesco et al. (1995). A quantidade de N liberado

pelo CHCl_3 após 24 horas de fumigação foi calculada subtraindo-se o N total no extrato de solo não-fumigado do valor encontrado para o extrato de solo fumigado. O N da biomassa foi calculado dividindo-se o valor obtido anteriormente pelo fator 0,54. Este fator representa a fração de nitrogênio da biomassa microbiana extraído após a fumigação com clorofórmio.

4.3.2.2. Avaliação de nitrogênio da biomassa microbiana reativo com ninhidrina

O nitrogênio da biomassa microbiana reativo com ninhidrina foi avaliado colorimetricamente pelo método descrito por Badalucco et al. (1992). O reagente de ninhidrina foi preparado com a mistura de 100 mL de tampão de citrato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, com pH 5,5, contendo 160 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 100 mL de uma solução 4% de ninhidrina (Nuclear) dissolvida em metoxietanol e água na proporção 1:1 (50 mL de água e 50 mL de metoxietanol). O tampão de citrato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ é preparado com 5,88 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 4,2 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em água destilada para o volume final de 100 mL.

Alíquotas de 1,0 mL do extrato de K_2SO_4 reagiram com 5,0 mL do reagente de ninhidrina em tubos de ensaio. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos. Após o resfriamento dos tubos, as amostras foram lidas em 570 nm em um fotolorímetro Varian 634. A quantidade de nitrogênio reativo com ninhidrina ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_2$) na biomassa microbiana foi obtida pela diferença entre os extratos do solo fumigado e do não-fumigado. Uma curva-padrão, composta por oito pontos (1,68 até 16,8 mg N L^{-1}), foi preparada a partir de uma solução de tirosina equivalente a 33,6 mg N L^{-1} de nitrogênio.

4.3.2.3. Avaliação de carboidratos da biomassa microbiana

Os extratos dos solos fumigados e não-fumigados foram analisados quanto ao seu teor de carboidratos pelo método descrito por Badalucco et al. (1990). O reagente de antrona foi preparado dissolvendo-se 1,0 g de antrona (Vetec) em 204 mL de H₂SO₄, 25 mL de etanol e água destilada para um volume final de 500 mL. Para a análise dos carboidratos extraíveis de cada amostra, foram misturados, em um tubo de ensaio, 5,0 mL do reagente de antrona com 1,0 mL de extrato. Tanto o reagente de antrona como os extratos foram mantidos sob refrigeração a 4 °C até o momento da sua mistura. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100 °C por 10 minutos. Após o resfriamento dos tubos, foi efetuada a leitura em colorímetro (Varian 634) em 625 nm. Foi preparada uma curva-padrão com cinco concentrações de glicose (entre 5 e 40 mg C L⁻¹) a partir de uma solução 200 mg C L⁻¹. Esta solução concentrada foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de glicose anidra em água destilada para o volume de 1,0 L. A quantidade de carboidratos retidos na biomassa microbiana foi estimada pela diferença entre os extratos do solo fumigado e do não-fumigado.

4.3.3. Avaliação da estrutura da comunidade microbiana por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.3.3.1. Extração direta e purificação de DNA do solo

O DNA das células microbianas foi extraído e purificado conforme descrito por Selbach (1998). De cada amostra de solo, pesou-se 1,0 g de solo, o qual foi colocado em um tubo de centrifuga de polipropileno (Nalgene) com capacidade para 50 mL. O solo foi lavado com 2,0 mL de tampão de fosfato de

sódio $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) para a eliminação de ácidos nucléicos livres. As amostras foram agitadas a 200 rpm por 10 minutos em um agitador horizontal e a seguir centrifugadas a 6.000 rpm por mais 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 2,0 mL de uma solução de CaCl_2 $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ e Tris-HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) contendo 10 mg mL^{-1} de lisozima. As amostras foram incubadas por 1 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação manual a cada 15 min. Após, foram adicionados $50 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução 20 mg mL^{-1} de proteinase K, procedendo-se nova incubação sob as mesmas condições. A seguir foram adicionados 2,0 mL de uma solução contendo NaCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, Tris-HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) e sódio dodecil sulfato (SDS) 10 %. A mistura foi homogeneizada brevemente em *vortex* e submetida a três ciclos sucessivos de congelamento em etanol com gelo seco ($-70 \text{ }^\circ\text{C}$) e aquecimento em banho-maria ($65 \text{ }^\circ\text{C}$). Após, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min, transferindo-se, posteriormente, o sobrenadante para outro tubo de centrifuga com capacidade para 50 mL. Ao sobrenadante adicionaram-se $160 \text{ }\mu\text{L}$ de Na-EDTA $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 8 mL de etanol e 1,2 mL de acetato de sódio 3 mol L^{-1} (pH 5,3). A seguir, as amostras foram incubadas a $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ por ao menos 1 h. Após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet*, o qual foi suspenso novamente em $500 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão TE (1,0 mL de Tris-HCl $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 8,0; $200 \text{ }\mu\text{L}$ de EDTA $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e 98,8 mL de água Mili-Q).

A purificação do DNA foi feita utilizando-se o conjunto de purificação *Wizard Plus* (Promega). Para cada amostra, utilizou-se uma coluna de purificação. Cada coluna foi atarraxada à extremidade de uma seringa de 3,0 mL, na qual foram misturados $200 \text{ }\mu\text{L}$ do DNA suspenso em TE e 1,0 mL de

resina. O êmbolo foi colocado na seringa e pressionado lentamente, permitindo a queda de uma gota a cada segundo. A coluna foi desatarraxada, o êmbolo removido e a coluna recolocada na extremidade da seringa. Foram pipetados para o interior da seringa 2,0 mL de solução de lavagem. O êmbolo foi recolocado e pressionado do modo mencionado anteriormente. A coluna foi removida e transferida para um tubo de microcentrífuga com capacidade para 1,5 mL. Procedeu-se a uma centrifugação a 14.000 rpm por 2 min para retirar o excesso de solução de lavagem. A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 50 μ L de tampão TE aquecido a 80 °C à coluna, a qual foi centrifugada a 14.000 rpm por 20 s. Este último procedimento foi repetido uma segunda vez.

Além das amostras de solo, foi extraído ainda o DNA de culturas puras de *Escherichia coli* e de *Penicillium* pelo mesmo procedimento. O DNA das culturas de *E. coli* e de *Penicillium* foram utilizados como padrões para bactérias e para fungos, respectivamente, nas reações de PCR.

4.3.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de seqüências de DNA bacteriano

Inicialmente, as preparações de DNA, tanto das amostras de solo quanto das culturas puras, foram diluídas em água Mili-Q na proporção de 1:10, a fim de eliminar inibidores da reação de PCR.

A mistura de PCR utilizada consistiu de 2 μ L de DNA molde (pipetados a partir das preparações diluídas), 5 μ L de tampão de PCR 10x, 0,2 mmol L⁻¹ de cada DNTP (Gibco), MgCl₂ 2,5 mmol L⁻¹, 25 picomoles de cada *primer* (Bio-Synthesis), 1,25 unidades de polimerase (Gibco) e água Mili-Q

estéril para o volume final de 50 μ L. A mistura foi feita em tubos de 500 μ L e coberta com 35 μ L de óleo mineral (Sigma). As amostras de DNA de *E. Coli* e de *Penicillium* atuaram como controle positivo e negativo, respectivamente, da reação de PCR.

Nesta reação, foram utilizados os *primers* U968, cuja seqüência é 5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3', e L1401, de seqüência 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3' (Felske et al. 1997). Estes *primers* amplificam uma seqüência-alvo de 433 pb do 16S rDNA.

A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos. Após, seguiram-se 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por 3 fases com duração de 1 minuto: 94 °C, 56 °C e 72 °C. Para a extensão final de produtos incompletos, procedeu-se a um ciclo extra a 72 °C por 5 minutos.

4.3.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de seqüências de DNA fúngico

A mistura de PCR utilizada foi idêntica, em termos de concentrações de reagentes, à descrita anteriormente para a amplificação de DNA bacteriano. No entanto, foi utilizado um novo conjunto de *primers*, os quais têm como seqüência-alvo um fragmento de 550 pb do 18S rDNA de fungos. Os *primers* EF4 e fung5 (Smit et al., 1999) possuem as seqüências de bases 5'-GGA AGG GGT GTA TTT ATT AG-3', e 5'-GTA AAA GTC CTG GTT CCC C-3', respectivamente.

Para a amplificação da seqüência-alvo, o termociclador foi programado da seguinte maneira: 1 ciclo a 94 °C por 3 min; 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 48 °C por 1 min e 72 °C por 3 min; 1 ciclo a 72 °C por 10 minutos.

4.3.3.4. Quantificação do DNA

Os produtos de PCR foram carregados em gel de agarose 1,5% contendo 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de brometo de etídeo. Para as amostras de solo, foram carregados 12 μL de produto de PCR misturados com 4 μL de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol em água). O gel encontrava-se imerso em tampão TBE 1x (Tris base 89 mmol L^{-1} ; ácido bórico 89 mmol L^{-1} ; EDTA 2 mmol L^{-1} ; pH 8,0), o qual também foi usado na preparação do gel. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese a 80 v por 75 min.

O gel foi fotografado por meio do sistema *Kodak Digital Science EDAS*. As imagens foram então analisadas no aplicativo *Gel-Pro Analyzer 3.1*, o qual mede a intensidade das bandas e estima, deste modo, a concentração de DNA.

4.3.4. Avaliação do nitrogênio mineral do solo

O N mineral do solo ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) foi analisado nos extratos das amostras de solo não-fumigadas, por meio do procedimento descrito por Tedesco et al. (1995).

4.3.5. Avaliação do nitrogênio acumulado pela parte aérea da cultura do milho

Foram realizadas avaliações do teor de nitrogênio no tecido vegetal da parte aérea de plantas de milho coletadas 46, 62, 88 e 112 dias após a semeadura da cultura. Aos 120 dias, o N dos grãos foi analisado separadamente do restante da parte aérea do milho. A avaliação do N total no tecido vegetal foi realizada por meio do procedimento descrito por Tedesco et al. (1995).

4.3.6. Avaliação do carbono e do nitrogênio do solo potencialmente mineralizáveis ao longo da cultura do milho

Foram realizadas avaliações do C-CO₂ liberado e do nitrogênio mineralizado ao final de 112 dias de incubação das amostras de solo. A incubação foi feita em estufa, a 26 ± 2 °C, com a umidade do solo ajustada para 70 % da sua capacidade de retenção.

4.3.7. Avaliação da atividade potencial de urease

A atividade potencial de urease foi estimada de acordo com Dick et al. (1996).

Foram colocados 5,0 g de cada amostra de solo em tubos volumétricos com capacidade para 50 mL. Em seguida, adicionaram-se 0,2 mL de tolueno e 9 mL de tampão THAM (Tris(hidroximetil)aminometano 0,05 mol L⁻¹; pH 9,0) e agitaram-se brevemente os tubos para misturar os componentes. Adicionaram-se 1,0 mL de uréia 0,2 mol L⁻¹ a cada tubo, os quais foram incubados a 37 °C por 2 horas. Após este período, foram colocados e

misturados cerca de 35 mL de KCl-Ag₂SO₄ (188 g KCl; 100 mg Ag₂SO₄; água destilada para 1 L). Os tubos foram então deixados em repouso até que atingissem a temperatura ambiente. Após, o volume foi completado para 50 mL com KCl-Ag₂SO₄ e os frascos foram invertidos diversas vezes para misturar os conteúdos. O NH₄⁺ foi determinado na suspensão do solo por destilação com MgO, tal como descrito em Tedesco et al. (1995).

4.4. Análises estatísticas

Os dados das variáveis estudadas foram analisados segundo um delineamento experimental em blocos completos casualizados com três repetições e um delineamento de tratamentos fatorial. O experimento fatorial apresentava dois fatores: sistemas de manejo de solo, com dois níveis e épocas de avaliação, com cinco níveis.

As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantidade de nitrogênio mineral no solo

Os sistemas de manejo influenciaram a disponibilidade de nitrogênio para a cultura do milho, estimada por meio da quantidade de nitrogênio mineral presente no solo (Figura 1). Apenas na primeira avaliação não houve diferença significativa entre os dois sistemas com relação à quantidade de nitrogênio mineral. Nas demais avaliações, a quantidade de nitrogênio mineral foi significativamente maior no sistema convencional.

Na primeira avaliação, foram observados os menores valores de nitrogênio mineral nos dois sistemas de manejo. Esta avaliação foi realizada no dia da semeadura do milho, 23 dias após a rolagem da aveia preta e 10 dias após o preparo convencional do solo. Antes, portanto, da primeira dose de adubação nitrogenada ter sido aplicada ao solo. O nitrogênio presente no solo seria originado da mineralização tanto da matéria orgânica como de resíduos adicionados recentemente (Matus & Rodríguez, 1994). A mineralização deveria estar sendo favorecida, sobretudo no sistema convencional após o preparo do solo (Doran, 1980), de modo que a quantidade de nitrogênio mineral verificada dificilmente estaria associada a taxas de mineralização reduzidas. Naquele momento, também não existiam ainda plantas de milho, as quais poderiam absorver o nitrogênio da solução do

*Dr. Mikael
junho 2010*

solo, reduzindo acentuadamente a quantidade de nitrogênio mineral (Malhi et al., 2001). Assim, embora possam ter ocorrido perdas de nitratos por lixiviação, a baixa quantidade de nitrogênio mineral estaria, aparentemente, associada à presença, em grande quantidade, dos resíduos da cultura anterior. Os resíduos de cereais, como a aveia preta, possuem uma relação C:N elevada e o seu aporte ao solo resulta em imobilização de nitrogênio (Aoyama & Nozawa, 1993; Somani, 1988), o que poderia explicar a baixa disponibilidade de nitrogênio mineral no dia da semeadura do milho em ambos os sistemas de manejo.

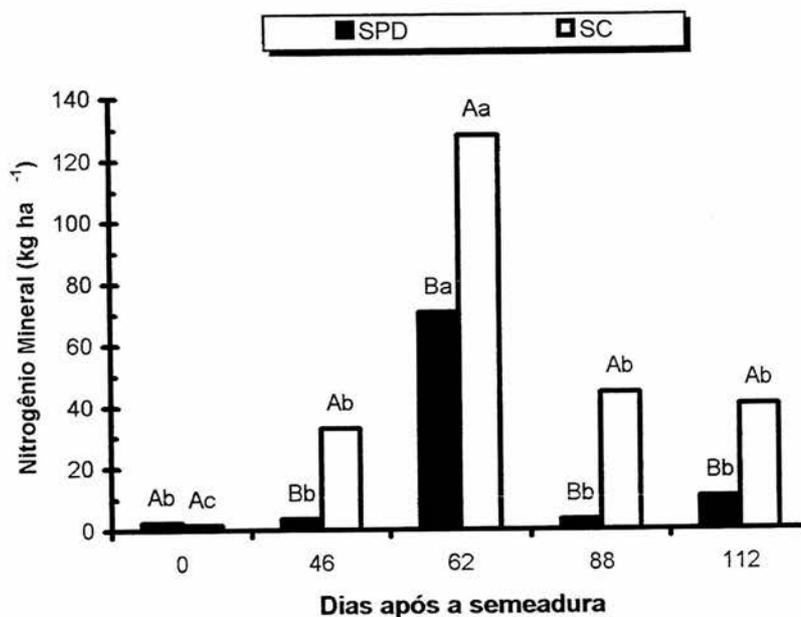


Figura 1. Nitrogênio mineral total do solo ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5%. Letras maiúsculas comparam sistemas de manejo dentro de cada época, e letras minúsculas comparam épocas dentro de cada sistema de manejo.

Na segunda avaliação, 46 dias após a semeadura e 21 dias após a aplicação da primeira dose de nitrogênio, observou-se um aumento do nitrogênio mineral no sistema convencional em relação à primeira avaliação. No sistema plantio direto, o nitrogênio mineral permaneceu estável, tendo sido significativamente mais baixo do que no sistema convencional. Baixos teores de nitrogênio mineral têm sido relatados em solos sob plantio direto e atribuídos a fatores como a volatilização de N-uréia (Lara Cabezas et al., 1997b), a maior lixiviação de nitratos (Meisinger et al., 1985) ou a maior imobilização microbiana (Carefoot et al., 1990; Carter & Rennie, 1984; Kitur et al., 1984, Salet, 1994).

A volatilização de N-uréia possivelmente tenha sido semelhante, na medida em que esta foi aplicada do mesmo modo - a lanço, sem incorporação do fertilizante e com irrigação imediatamente após - nos dois sistemas. No entanto, a ocorrência de uma maior atividade de urease no sistema plantio direto pode resultar em uma volatilização mais intensa de N-uréia (Malhi et al., 2001). A lixiviação também poderia ter ocorrido em função de chuvas intensas ocorridas alguns dias antes da coleta do solo (Apêndice 25) e poderia ter sido maior no sistema plantio direto em função de características de porosidade do solo (Meisinger et al., 1985). A imobilização microbiana de nitrogênio também poderia ter sido maior no sistema plantio direto, possivelmente devido à maior quantidade de substratos orgânicos nesse sistema (Doran et al., 1998). No sistema plantio direto, os resíduos vegetais permanecem na superfície do solo, enquanto que, no sistema convencional, estes são incorporados uniformemente ao longo da camada arável. Assim, há naturalmente menos resíduos na superfície do solo no sistema convencional. Além disso, a

incorporação do resíduo acelera a sua degradação (Douglas Jr. et al., 1980; Parker, 1962). Na segunda avaliação, 56 dias após a incorporação dos resíduos, grande parte deles já teria sido degradada no sistema convencional, resultando em menor biomassa microbiana e menor imobilização de N.

Na terceira avaliação, 62 dias após a semeadura do milho e 13 dias após a aplicação da segunda dose de nitrogênio, verificou-se um aumento no nitrogênio mineral nos dois sistemas, em relação à avaliação anterior. Este foi o único período de avaliação em que a quantidade de nitrogênio foi significativamente maior no sistema plantio direto em comparação com as avaliações anteriores. No entanto, a quantidade foi novamente menor do que a verificada no sistema convencional. As quantidades elevadas de nitrogênio mineral deveram-se à aplicação de 120 kg N ha^{-1} . Nesta avaliação, não teria havido imobilização ou perda do nitrogênio aplicado, ou estas teriam sido menos intensas em relação às avaliações anteriores, mesmo no sistema plantio direto, devido à dose maior do fertilizante. Porém, no sistema plantio direto, aparentemente, ainda não teria havido a liberação do nitrogênio imobilizado anteriormente, uma vez que a quantidade de nitrogênio mineral foi menor neste sistema.

Aos 88 e aos 112 dias, houve uma diminuição no nitrogênio mineral do solo, em comparação com o verificado aos 62 dias. As quantidades de nitrogênio mineral voltaram para níveis semelhantes aos verificados aos 46 dias, indicando que o fertilizante aplicado já havia sido utilizado pela cultura do milho ou havia sido perdido. A redução na quantidade de nitrogênio mineral foi mais acentuada no sistema plantio direto, o que poderia indicar maiores

perdas do nutriente, maior absorção pela cultura do milho ou uma maior imobilização microbiana mesmo no final do ciclo do milho.

5.2. Nitrogênio absorvido pela cultura do milho

O teor de nitrogênio total na parte aérea das plantas de milho foi influenciado pelos sistemas de manejo apenas na primeira avaliação desta variável, realizada aos 46 dias após a semeadura (Figura 2). Nesta avaliação, o teor de nitrogênio no tecido vegetal foi menor no sistema plantio direto. O menor teor de nitrogênio na parte aérea parece estar associado à baixa disponibilidade de nitrogênio mineral verificada no sistema plantio direto nesta ocasião, tal como discutido anteriormente.

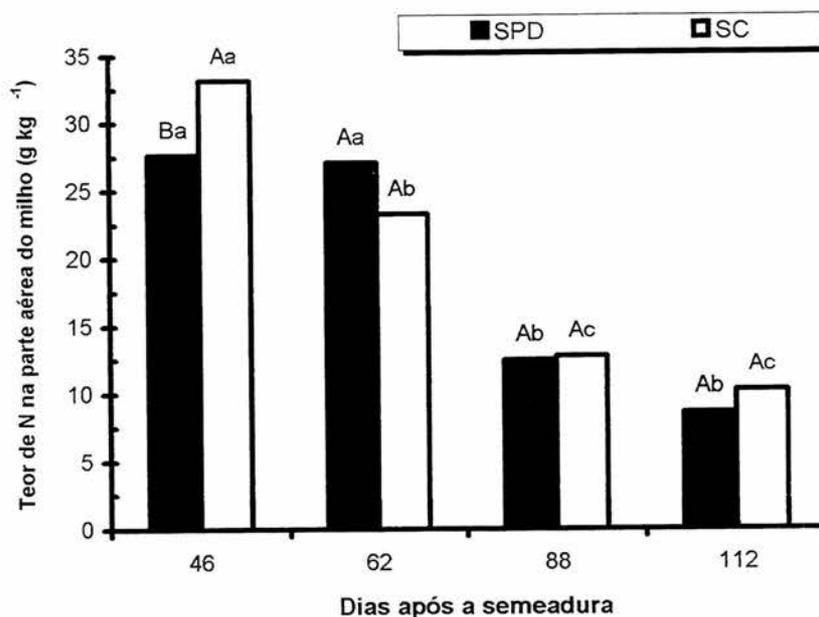


Figura 2. Teor de nitrogênio total na parte aérea de plantas de milho nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5%. Letras maiúsculas comparam sistemas de manejo dentro de cada época, e letras minúsculas comparam épocas dentro de cada sistema de manejo.

O teor de nitrogênio total na parte aérea de plantas de milho decresceu ao longo do tempo nos dois sistemas, embora tenha sido mais estável no plantio direto. Resultados semelhantes foram obtidos por Diekow (2000). A queda na concentração de nitrogênio no tecido vegetal na medida em que a planta se desenvolve é atribuída à diminuição da velocidade de absorção do nutriente com o envelhecimento da planta (Schenk, 1996). Esta pode ser devida à menor capacidade de absorção de raízes velhas ou, mais provavelmente, à demanda crescente de nitrogênio que deve ser suprida por unidade de raiz. Com isto, a taxa de acúmulo de carboidratos é maior do que a taxa de acúmulo de nitrogênio, diluindo este nutriente no tecido vegetal (Olson & Kurtz, 1982).

Com relação à produção de massa seca da parte aérea das plantas de milho, não houve interação significativa entre as épocas de amostragem e os sistemas de manejo (Apêndices 5, 6 e 7). Constatou-se apenas um aumento no acúmulo de massa seca ao longo do ciclo do milho. O acúmulo de massa seca foi, na média das quatro avaliações, maior no sistema plantio direto. No entanto, dentro de cada época, não houve diferença entre os dois sistemas de manejo.

Quando os resultados foram convertidos para kg N ha^{-1} , verificou-se que as quantidades de nitrogênio total na parte aérea das plantas de milho, ao longo do período de avaliação, diferiram significativamente entre os sistemas de manejo aos 62 e aos 112 dias após a semeadura do milho (Figura 3). Tal como constatado em relação à massa seca, a quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas aumentou significativamente ao longo do ciclo do milho.

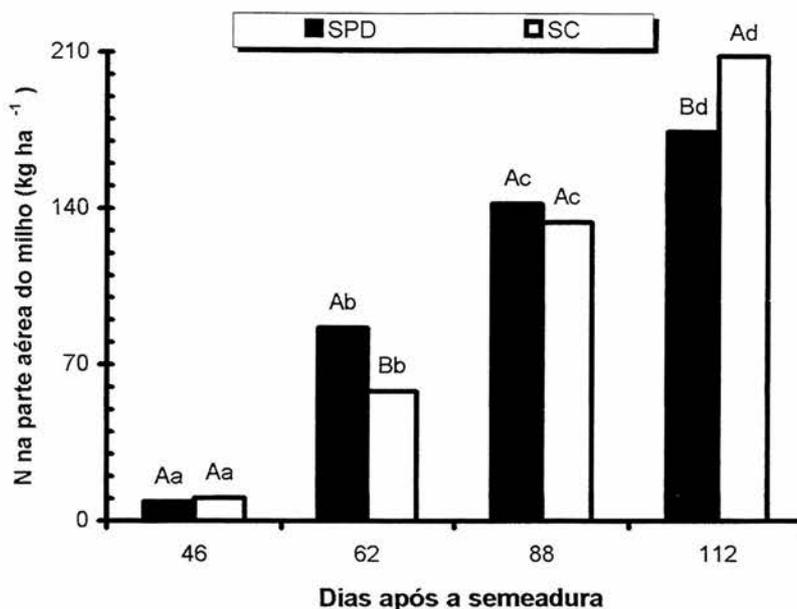


Figura 3. Quantidade de nitrogênio total acumulado na parte aérea de plantas de milho nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5%. Letras maiúsculas comparam sistemas de manejo dentro de cada época, e letras minúsculas comparam épocas dentro de cada sistema de manejo.

Aos 62 dias após a semeadura, o nitrogênio acumulado na parte aérea do milho foi significativamente maior no sistema plantio direto. A massa seca acumulada, embora não tenha diferido estatisticamente, foi maior naquele sistema. A concentração de N no tecido vegetal também não diferiu estatisticamente entre os dois sistemas, mas também foi, em média, maior no sistema plantio direto. A combinação destas duas variáveis resultou em maior acúmulo de nitrogênio no tecido vegetal no sistema plantio direto. Este maior acúmulo de nitrogênio nas plantas de milho, nesta avaliação, coincidiu com os maiores teores de nitrogênio mineral no solo sob plantio direto, em comparação com as demais avaliações. De acordo com Schenk (1996), a absorção de nitrogênio é dependente da concentração do nutriente junto à

superfície da raiz, de modo que o teor elevado de nitrogênio no solo, após a aplicação da segunda dose de nitrogênio, favoreceu a absorção de nitrogênio pela cultura do milho. No entanto, outros fatores devem ter contribuído para o maior acúmulo de nitrogênio pelas plantas no sistema plantio direto, pois os teores de nitrogênio mineral foram ainda mais elevados no sistema convencional. Fatores tais como a melhoria de condições físicas e químicas do solo podem resultar em maior produtividade e maior absorção de N pelo milho no sistema plantio direto (Fernandes et al., 1999). Neste sentido, destaca-se a maior conservação de água neste sistema, a qual possibilita uma maior taxa de transpiração, determinando um maior fluxo de nitratos em direção à superfície das raízes (Salet, 1994).

Aos 88 dias após a semeadura, as quantidades de nitrogênio na parte aérea do milho não diferiram estatisticamente. Já aos 112 dias, o sistema convencional apresentou uma quantidade significativamente maior de nitrogênio acumulado no tecido vegetal. Nestas duas últimas avaliações as quantidades de nitrogênio mineral foram menores no solo sob sistema plantio direto em comparação com o sistema convencional e em comparação com a quantidade observada aos 62 dias no próprio sistema plantio direto, o que justifica a diminuição na absorção de nitrogênio nesse sistema. A menor absorção de nitrogênio em plantio direto tem sido observada por autores como Amado et al. (2000) e Kitur et al. (1984). Os primeiros autores verificaram uma menor absorção de nitrogênio por plantas de milho no sistema plantio direto, em comparação com o convencional, independentemente da dose de nitrogênio aplicada. Por outro lado, Kitur et al. (1984) verificaram menor absorção no sistema plantio direto apenas com as doses mais baixas de

adubação nitrogenada. Com uma dose de 168 kg N ha^{-1} , não houve diferença entre os dois sistemas. Já Freitas et al. (1996), trabalhando com doses de nitrogênio entre 0 e 120 kg ha^{-1} , verificaram uma tendência de menor absorção do nutriente pelas plantas de milho no sistema plantio direto, porém os valores não diferiram significativamente, a exemplo do verificado no presente experimento aos 46 e 88 dias. A menor quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas descarta a possibilidade de que uma maior absorção de nitrogênio pela cultura do milho tenha levado à diminuição dos teores de nitrogênio mineral no sistema plantio direto aos 88 e 112 dias.

5.3. Nitrogênio e carbono potencialmente mineralizáveis

Os sistemas de manejo modificaram significativamente as quantidades de nitrogênio potencialmente mineralizável na camada de 0-5 cm de solo. No sistema plantio direto, a quantidade de nitrogênio mineralizada ao longo de 112 dias de incubação foi mais do que o dobro da quantidade mineralizada no sistema convencional (Figura 4). O aumento do nitrogênio orgânico total e do nitrogênio potencialmente mineralizável em solo sob plantio direto tem sido reportado por autores como Carter & Rennie (1982), Doran et al. (1998) e Follett & Schimel (1989). Fatores tais como o acúmulo de resíduos vegetais junto à superfície do solo (Hu et al., 1995), o controle da erosão (Bayer & Bertol, 1999) e a proteção física da matéria orgânica em complexos organominerais (Kristensen et al., 2000) possibilitam este aumento.

A matéria orgânica do solo constitui-se na maior reserva de nitrogênio orgânico no solo, e a sua mineralização supre quantidades substanciais deste nutriente durante o ciclo das culturas (Mengel, 1996).

Grande parte deste nitrogênio encontra-se em formas recalcitrantes, associadas aos ácidos húmicos e fúlvicos, apresentando taxas reduzidas de mineralização, enquanto as frações mais lábeis, representadas principalmente por compostos aminados, são mineralizadas mais rapidamente, constituindo-se no nitrogênio potencialmente mineralizável (Camargo et al., 1997; Mengel, 1996). O aumento da quantidade de nitrogênio potencialmente mineralizável significa uma maior capacidade do solo em suprir este nutriente (Drinkwater et al., 1996). E significa também uma maior conservação do nitrogênio no sistema solo (House et al., 1984). A sua manutenção em formas orgânicas impede, ou ao menos minimiza, a ocorrência de perdas de nitrogênio por lixiviação ou desnitrificação.

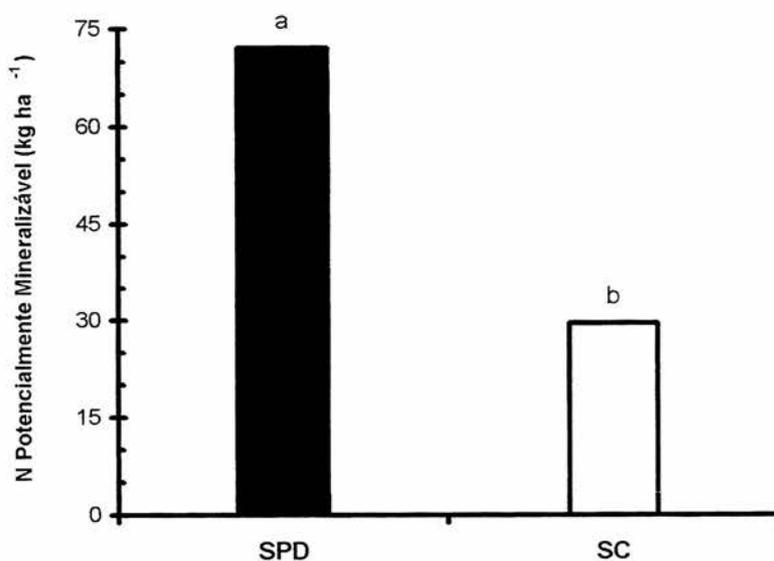


Figura 4. Nitrogênio potencialmente mineralizável do solo nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC). Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste F, ao nível de 5%.

A maior quantidade de carbono potencialmente mineralizável verificada no sistema plantio direto (Figura 5) dá suporte a essa idéia. De

acordo com Follett & Schimel (1989), o sistema convencional apresenta uma menor capacidade de imobilização e conservação de nitrogênio no sistema solo em função de uma quantidade mais limitada de carbono disponível para a microbiota. O nível mais elevado de carbono disponível para microbiota no sistema plantio direto possibilitaria uma maior imobilização do nitrogênio, bem como o seu acúmulo gradual em formas orgânicas, aumentando a capacidade de suprimento deste nutriente ao longo do tempo.

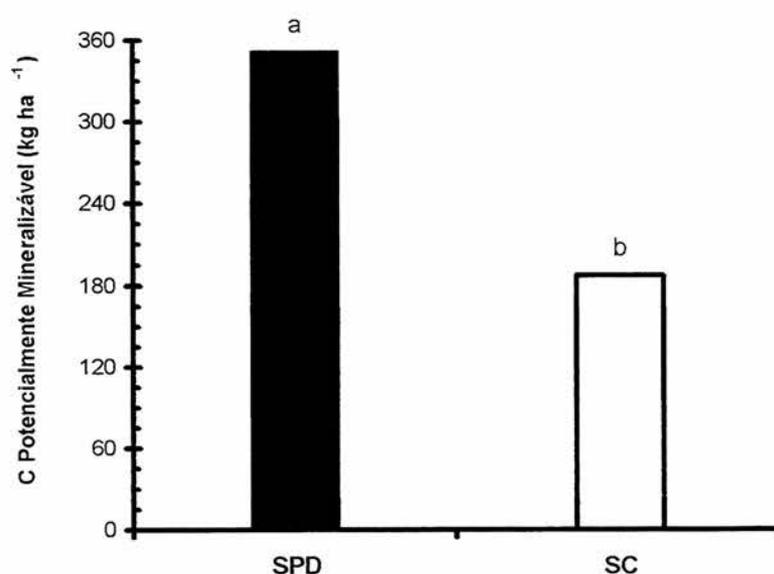


Figura 5. Carbono potencialmente mineralizável do solo nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC). Valores seguidos por letras distintas diferem entre si, pelo teste F, ao nível de 5%.

Foi verificada ainda uma menor relação entre C e N potencialmente mineralizáveis no sistema plantio direto. Esta relação foi de 4,87 no sistema plantio direto, contra 6,33 no sistema convencional. Estes resultados poderiam indicar a presença de compostos mais humificados ou o enriquecimento em

nitrogênio da matéria orgânica lábil no solo sob plantio direto. A relação C:N mais baixa de um composto orgânico pode ser devida ao estado de humificação mais avançado ou à sua composição originalmente mais rica em N. Kristensen et al. (2000) encontraram uma relação C:N mais elevada na matéria orgânica total do solo sob plantio direto, atribuindo o fato à presença de compostos em estado menos avançado de humificação. Por outro lado, Calderón et al. (2001) afirmam que compostos com baixa relação C:N podem estar protegidos em agregados no sistema plantio direto, sendo, eventualmente mineralizados. Por sua vez, Kanchikerimath & Singh (2001) relacionaram a diminuição da relação C:N da fração lábil da matéria orgânica ao aumento da fertilidade do solo. No presente trabalho, as melhorias nas condições químicas do solo sob plantio direto, verificadas neste experimento (Bayer, 1996), podem ter levado ao enriquecimento em nitrogênio na matéria orgânica potencialmente mineralizável.

5.4. Atividade potencial de urease

Foi verificado um efeito dos sistemas de manejo sobre a atividade potencial de urease, o qual foi dependente da época de avaliação (Figura 6). O sistema plantio direto apresentou uma atividade de urease superior ao convencional no dia da semeadura do milho e 112 dias após. Aos 62 dias após a semeadura, ocorreu o inverso: a atividade foi superior no sistema convencional. Nas demais avaliações, não houve diferença significativa entre os dois sistemas em relação à atividade potencial de urease.

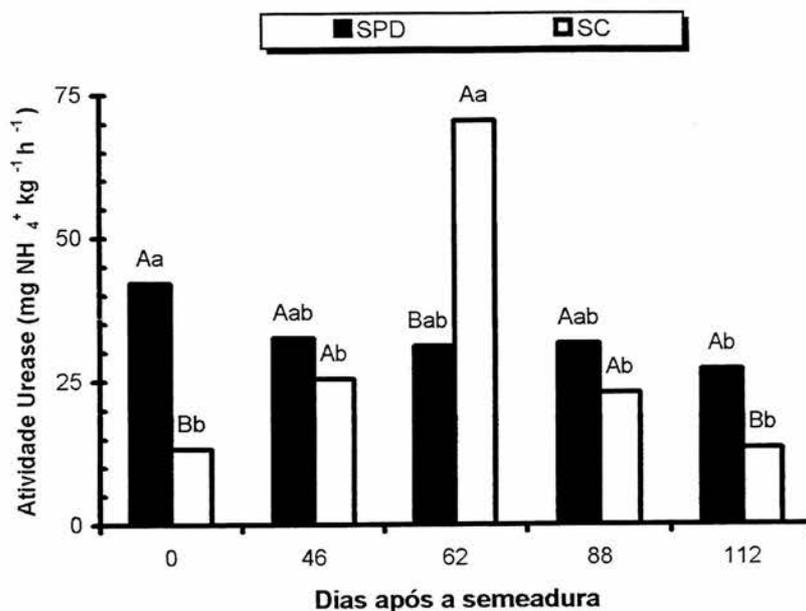


Figura 6. Atividade potencial de urease nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5%. Letras maiúsculas comparam sistemas de manejo dentro de cada época, e letras minúsculas comparam épocas dentro de cada sistema de manejo.

A atividade de urease apresentou uma menor oscilação no sistema plantio direto, tendo sido $33 \text{ mg NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na média das cinco avaliações. A média do sistema convencional não diferiu significativamente deste valor. No entanto, a atividade potencial de urease apresentou uma oscilação muito maior neste sistema, variando de 13 a $70 \text{ mg NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

A maior atividade de urease constatada no sistema plantio direto antes da aplicação da primeira dose de uréia poderia ter resultado em maiores perdas de nitrogênio por volatilização quando da aplicação do fertilizante (Barreto & Westerman, 1989; Malhi et al., 2001). Porém, após a aplicação da primeira dose de uréia, a atividade de urease não diferiu estatisticamente entre os dois sistemas e foi maior no sistema convencional após a aplicação da segunda dose. Em todas estas ocasiões, à exceção do dia da semeadura do

milho, a quantidade de nitrogênio mineral no solo foi significativamente menor no sistema plantio direto, independentemente da atividade de urease. Assim, as perdas de uréia por volatilização não devem ter diferido nos dois sistemas. Lara Cabezas et al. (1997b) não observaram diferenças entre os sistemas plantio direto e convencional quanto à volatilização de N-NH_3 proveniente da aplicação de uréia. A volatilização foi influenciada apenas pelo modo de aplicação, tendo sido maior quando da aplicação a lanço em comparação com a incorporação da uréia. No presente trabalho, a uréia foi aplicada a lanço com uma irrigação subsequente, nos dois sistemas, possivelmente apresentando perdas por volatilização elevadas, mas semelhantes. A atividade de urease pode ter contribuído mais para a mineralização de compostos nitrogenados heterocíclicos (Monreal et al., 1998) do que para a volatilização de N-NH_3 .

Aos 62 dias após a semeadura do milho, foi verificada no sistema convencional a maior atividade potencial de urease. O aumento na concentração do substrato deve ter estimulado a atividade enzimática mais intensamente no sistema convencional, possivelmente em decorrência de mudanças na composição da comunidade microbiana. Nas demais avaliações, a maior quantidade de nitrogênio mineral, sobretudo NH_4^+ , que é o produto final da reação da urease, pode ter inibido a atividade da enzima no sistema convencional (Bandick & Dick, 1999), uma vez que a atividade foi inferior ou no máximo equivalente à verificada no sistema plantio direto.

A atividade potencial de urease foi maior no sistema plantio direto em duas avaliações. No sistema plantio direto, o aumento da atividade enzimática de um modo geral, e da atividade de urease em particular, tem sido atribuído ao aumento da matéria orgânica do solo (Dick, 1984; Doran, 1980;

Klose & Tabatabai, 1999). A matéria orgânica influencia a atividade enzimática na medida em que favorece a atividade microbiana (Alvarez et al., 1995; Vargas & Scholles, 2000) e em que estabiliza algumas enzimas como a urease em complexos com argilominerais do solo (Klose & Tabatabai, 1999). A atividade potencial de urease e o nitrogênio potencialmente mineralizável verificados no sistema plantio direto sugerem que a quantidade de nitrogênio mineralizada ao longo do ciclo do milho pode não ter sido inferior neste sistema em comparação com o convencional. Neste caso, a menor absorção de nitrogênio pela cultura do milho ao final do seu ciclo e a menor quantidade de nitrogênio mineral no solo não seriam devidas a uma menor atividade microbiana e a uma conseqüente menor quantidade de nitrogênio mineralizada.

5.5. Nitrogênio imobilizado pela biomassa microbiana

A quantidade de nitrogênio imobilizado na biomassa microbiana foi afetada significativamente pelos sistemas de manejo (Figura 7). O nitrogênio microbiano foi maior no sistema plantio direto em todas as avaliações, com exceção da última, realizada 112 dias após a semeadura da cultura do milho. Nesta última avaliação, embora a quantidade de nitrogênio imobilizado tenha sido maior no sistema plantio direto, esta não diferiu significativamente da quantidade observada no sistema convencional.

Na primeira avaliação o nitrogênio da biomassa microbiana foi maior no sistema plantio direto, coincidindo com a baixa quantidade de nitrogênio mineral no solo. No entanto, a quantidade de nitrogênio mineral foi igualmente baixa no sistema convencional, embora a quantidade de nitrogênio imobilizado

na biomassa microbiana tenha sido menor neste sistema. Este resultado sugere que a quantidade de nitrogênio disponível foi limitante para a comunidade microbiana no sistema convencional.

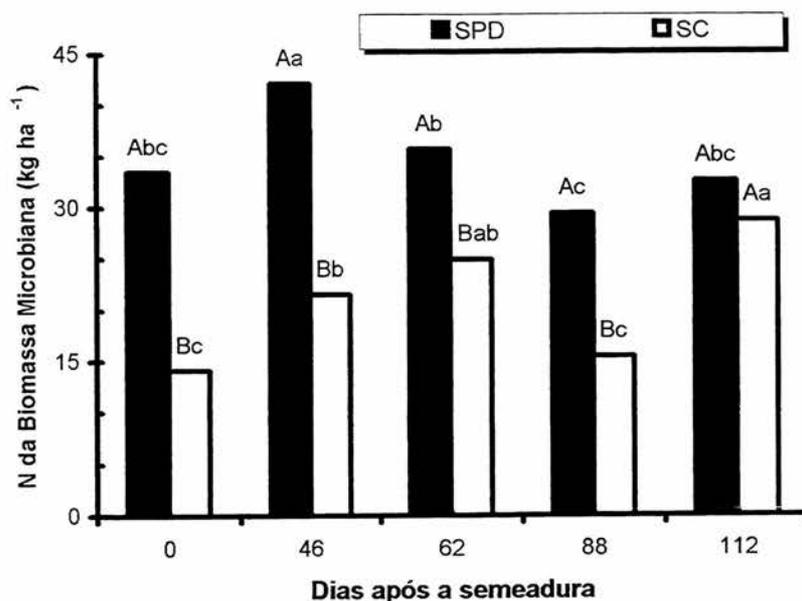


Figura 7. Nitrogênio da biomassa microbiana do solo nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5%. Letras maiúsculas comparam sistemas de manejo dentro de cada época, e letras minúsculas comparam épocas dentro de cada sistema de manejo.

Na segunda avaliação, houve uma relação inversa entre as quantidades de nitrogênio da biomassa microbiana e as de nitrogênio mineral no solo. No sistema plantio direto, foram verificadas uma maior quantidade de nitrogênio na biomassa microbiana e uma menor quantidade de nitrogênio mineral no solo, ocorrendo o contrário no sistema convencional. Ainda nesta avaliação, observou-se um aumento de nitrogênio na biomassa microbiana, tanto no sistema plantio direto como no sistema convencional, em relação à primeira avaliação, o que explicaria a baixa disponibilidade de nitrogênio mineral após a aplicação da primeira dose de fertilizante nitrogenado,

especialmente no sistema plantio direto. Estes resultados indicam que os baixos teores de nitrogênio mineral estão associados com a imobilização microbiana, decorrente da disponibilidade de resíduos de aveia preta, como sugerido anteriormente.

De acordo com White et al. (1988), o processo de imobilização predomina sobre o de mineralização durante a decomposição de resíduos deficientes em nitrogênio, ou seja, aqueles resíduos com a relação C:N maior do que a relação C:N crítica. Tal relação crítica é definida como a relação C:N da biomassa microbiana dividida por sua eficiência de assimilação e, normalmente, situa-se entre 20 e 30 (Douglas Jr. et al., 1980).

Os resíduos de aveia preta possuíam uma relação C:N inicial elevada, em torno de 60. Assim, ao utilizar este resíduo como fonte de carbono e de energia, a biomassa microbiana usaria tanto o nitrogênio orgânico presente no resíduo como o nitrogênio mineral presente no solo (Aoyama & Nozawa, 1993). A imobilização microbiana do fertilizante ocorreu nos dois sistemas de manejo, na medida em que a quantidade de nitrogênio microbiano foi maior aos 46 dias após a semeadura do milho, em comparação com a primeira avaliação. Porém, no sistema convencional a imobilização foi menor, refletindo-se na maior quantidade de nitrogênio mineral no solo. Pode-se inferir, portanto, que antes da aplicação da primeira dose de uréia, a decomposição dos resíduos estava sendo limitada pela disponibilidade de nitrogênio. Pode-se inferir ainda que, após a aplicação da uréia, esta limitação persistiu no sistema plantio direto e que, no sistema convencional, ao contrário, a imobilização microbiana estaria sendo limitada pela disponibilidade de carbono. Mary et al. (1996) afirmam que a disponibilidade de nitrogênio

pode limitar a degradação de resíduos pela microbiota. De acordo com os autores, em níveis baixos de nitrogênio mineral, a taxa de mineralização de carbono é reduzida, aumentando em níveis não limitantes. Já no sistema convencional, há uma menor disponibilidade de resíduos vegetais e de matéria orgânica na camada superficial do solo. A aplicação do nitrogênio tornaria este um sistema deficiente em carbono, com nitrogênio em excesso para a microbiota e no qual predominaria o processo de mineralização (White et al., 1988), ao contrário do verificado no sistema plantio direto.

A aplicação da segunda dose de fertilizante nitrogenado não levou a um aumento de imobilização no sistema plantio direto, como na segunda avaliação. Ao contrário, houve uma redução na imobilização, que se refletiu no aumento de nitrogênio mineral no solo. Pode-se afirmar que a disponibilidade de nitrogênio mineral não foi limitante para a microbiota nesta avaliação. A mineralização de carbono e a imobilização de nitrogênio aumentam com a adição de fertilizante nitrogenado apenas até atingir uma taxa máxima (Mary et al., 1996). Quando a quantidade de nitrogênio não limita a degradação do resíduo, a imobilização permanece constante, não havendo um consumo excessivo do nutriente na medida em que aumenta a sua disponibilidade. Na terceira avaliação, observou-se ainda um aumento na imobilização no sistema convencional, o qual poderia estar associado ao crescimento das populações já existentes ou a uma mudança na estrutura da comunidade microbiana em função da adubação nitrogenada. Ainda assim, porém, o nitrogênio na biomassa microbiana no sistema convencional foi menor do que no sistema plantio direto. Este fato, associado à maior quantidade de nitrogênio mineral e à menor absorção do nutriente no sistema convencional aos 62 dias após a

semeadura do milho, indicam que o nitrogênio mineral esteve mais sujeito a perdas neste sistema, sobretudo por lixiviação. No sistema plantio direto, ao contrário, o nitrogênio permanece em formas orgânicas (Doran et al., 1998), levando a uma conservação mais eficiente do nutriente no sistema solo (Fernandes et al., 1999; Follett & Schimel, 1989).

Aos 88 dias após a semeadura do milho, houve uma diminuição no nitrogênio da biomassa microbiana, a qual foi mais acentuada no sistema convencional. O decréscimo na quantidade de nitrogênio imobilizado pode estar associado a fatores ambientais, sobretudo variações de temperatura e umidade, comuns no sistema convencional (Salton & Mielniczuk, 1985). Esta idéia é reforçada pelo fato de terem sido verificados os menores valores de umidade gravimétrica no solo, nesta avaliação, em ambos os sistemas (Apêndice 24). A umidade gravimétrica foi especialmente baixa no sistema convencional, justificando a queda acentuada de nitrogênio da biomassa microbiana neste sistema.

A diminuição do nitrogênio na biomassa microbiana aos 88 dias após a semeadura do milho poderia representar a liberação do nitrogênio anteriormente imobilizado, no processo conhecido como remineralização, resultante do esgotamento de fontes de carbono e da morte de parte dos microrganismos, até mesmo pelo ressecamento do solo, como discutido anteriormente. No entanto, aos 112 dias, a quantidade de nitrogênio imobilizado tornou a aumentar. Até os 112 dias após a semeadura do milho, uma grande quantidade de nitrogênio permaneceu imobilizada no sistema plantio direto, acompanhada de uma baixa disponibilidade de nitrogênio mineral. Não houve, portanto, uma remineralização considerável, como

indicavam os resultados obtidos por Bonde et al. (1988) e Marumoto (1984). A não ocorrência de remineralização contraria a segunda hipótese do presente trabalho e inviabiliza a aplicação do nitrogênio em pré-semeadura como alternativa de manejo, prática sugerida por Diekow (2000).

No sistema convencional o aumento do nitrogênio na biomassa microbiana não foi acompanhado do decréscimo de nitrogênio mineral. De acordo com Appel (1998), a remineralização não é o processo predominante após um ciclo de secamento/umedecimento do solo. Segundo este autor, as flutuações na quantidade de nitrogênio imobilizado na biomassa microbiana não são suficientes para explicar a mineralização ao longo do ciclo de uma cultura apenas por meio do decréscimo da quantidade de nitrogênio imobilizado. Assim, a principal fonte de nitrogênio potencialmente mineralizável seria o nitrogênio lábil, excluindo-se a biomassa microbiana. Esta matéria orgânica lábil seria mais suscetível ao ataque microbiano após o ciclo de secamento/umedecimento do solo, o que poderia explicar o aumento simultâneo do nitrogênio na biomassa microbiana e do nitrogênio mineral verificado no solo sob sistema convencional. Mais do que fonte de nitrogênio potencialmente mineralizável, a biomassa microbiana pode ter contribuído para a cultura do milho por meio da mineralização de nitrogênio orgânico do solo, tanto no sistema convencional como no plantio direto.

5.6. Composição da comunidade microbiana

5.6.1. Relações entre constituintes da biomassa microbiana

As alterações na comunidade microbiana ao longo do ciclo do milho foram estimadas por meio de relações entre os constituintes da biomassa

microbiana (Tabela 1). As relações entre carbono e nitrogênio (C:N) e, principalmente, entre carbono e carboidratos (C:CHO) da biomassa microbiana mostraram-se sensíveis aos sistemas de manejo. Já a relação entre carbono e nitrogênio reativo com ninhidrina (C:N-Nin) apresentou um coeficiente de variação mais elevado (Apêndice 16) e não foi afetada pelos sistemas de manejo, tendo apresentado diferenças significativas apenas entre as médias das épocas de avaliação.

Tabela 1. Carbono da biomassa microbiana e relações entre carbono e nitrogênio reativo com ninhidrina (C:N-Nin), carbono e nitrogênio (C:N) e carbono e carboidratos (C:CHO) da biomassa microbiana do solo nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC).

Dias após Semeadura	C		C:N-Nin ¹	C:N		C:CHO	
	SPD	SC		SPD	SC	SPD	SC
	-----kg ha ⁻¹ -----						
0	324 Aa	154 Ba	53,5 a	9,7 Aa	10,9 Aa	21,1 Aa	11,9 Bb
46	308 Aa	166 Ba	22,4 c	7,3 Ab	7,8 Ab	9,4 Ac	6,6 Ac
62	257 Ab	194 Ba	25,6 bc	7,2 Ab	7,8 Ab	14,4 Bb	20,3 Aa
88	192 Ac	96 Bb	37,9 b	6,5 Ab	6,8 Ab	8,8 Ac	4,1 Bc
112	250 Ab	104 Bb	39,4 b	7,7 Aab	3,6 Bc	12,1 Abc	7,0 Bc

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5%. Letras maiúsculas comparam sistemas de manejo dentro de cada época, e letras minúsculas comparam épocas dentro de cada sistema de manejo.

¹Média dos dois sistemas de manejo.

A relação C:N-Nin apresentou flutuações ao longo do ciclo do milho, as quais foram independentes dos sistemas de manejo. A relação C:N-Nin foi mais elevada no dia da semeadura do milho, decrescendo após a aplicação do fertilizante nitrogenado. Ao final do ciclo do milho, a relação C:N-Nin tornou a aumentar, mas foi inferior à inicial. Segundo Joergensen (1996), a relação C:N-Nin é afetada pela quantidade de NH₄⁺ extraível na biomassa microbiana, mais do que pelo uso do solo. O autor encontrou uma variação muito grande da proporção de NH₄⁺ na biomassa microbiana, entre 0,1 e 79,6 %, com uma

média de 24,1 % do nitrogênio reativo com ninhidrina. Camargo et al. (1999), por outro lado, verificaram uma proporção praticamente uniforme. Porém, a média de 67 % obtida por estes autores é muito superior àquela obtida por Joergensen (1996). As causas da grande variabilidade na proporção de NH_4^+ no nitrogênio reativo com ninhidrina e da relação C:N-Nin podem ser devidas a diferenças na composição da comunidade microbiana (Joergensen 1996; Ocio & Brookes, 1990). Assim, o decréscimo na relação C:N-Nin, ocorrido aos 46 e aos 88 dias após a semeadura do milho, seria decorrente de alterações na estrutura da comunidade microbiana induzidas pela adubação nitrogenada. A partir deste decréscimo na relação C:N-Nin da biomassa microbiana, podemos inferir que a adubação nitrogenada estimulou a população bacteriana, aumentando a sua proporção em comparação com a população fúngica, independentemente do sistema de manejo. Por sua vez, as relações C:N-Nin mais elevadas, ocorridas no dia da semeadura do milho e 88 e 112 dias após, devem estar relacionadas com a menor disponibilidade de nitrogênio para a comunidade microbiana e com o aumento da proporção de fungos na biomassa microbiana (Joergensen et al., 1995).

O carbono da biomassa microbiana apresentou um comportamento distinto daquele verificado para o nitrogênio. Ao contrário do nitrogênio, o carbono da biomassa microbiana não foi afetado pela adubação nitrogenada. Este resultado está de acordo com Salinas-Garcia et al. (1997), que afirmam que a adubação nitrogenada tem pouca influência sobre o carbono da biomassa microbiana, o qual é usualmente limitado pela disponibilidade de carbono orgânico no solo. As maiores quantidades de carbono microbiano foram verificadas no sistema plantio direto, o qual superou o sistema

convencional em todas as cinco avaliações e, no início do ciclo do milho, em ambos sistemas. O carbono da biomassa microbiana decresceu 62 dias após a semeadura do milho, no sistema plantio direto, e 88 dias, no sistema convencional. A exemplo do verificado em relação ao nitrogênio da biomassa microbiana, o carbono decresceu acentuadamente na quarta avaliação, confirmando o efeito negativo da baixa umidade do solo sobre a biomassa microbiana, conforme discutido anteriormente. Porém, na quinta avaliação, o carbono da biomassa microbiana aumentou apenas no sistema plantio direto, permanecendo inalterado no sistema convencional. Ao contrário, portanto, do ocorrido com o nitrogênio da biomassa microbiana, o qual havia aumentado de modo semelhante em ambos sistemas.

As diferenças no comportamento do carbono e do nitrogênio resultaram em alterações na relação C:N da biomassa microbiana ao longo do ciclo do milho. A relação C:N da biomassa microbiana parece ter sido pouco influenciada pelo manejo do solo, uma vez que apenas aos 112 dias após a semeadura do milho houve uma diferença significativa entre os sistemas plantio direto e convencional. No dia da semeadura do milho, foram observados os maiores valores para a relação C:N da biomassa microbiana em ambos sistemas. Naquele momento, a relação C:N elevada coincidiu com a presença de uma grande quantidade de resíduos de aveia preta no solo. A relação C:N da biomassa microbiana, geralmente, apresenta uma correspondência com a relação C:N dos resíduos orgânicos adicionados ao solo (Gunapala & Scow, 1998). A presença de resíduos de aveia preta, com relação C:N elevada, antes do aporte da adubação nitrogenada, resultou em um sistema rico em carbono e deficiente em nitrogênio. O aumento da relação

C:N da biomassa microbiana é uma resposta da comunidade microbiana à baixa disponibilidade de nitrogênio (Ocio & Brookes, 1990; Salinas-Garcia et al., 1997) e à qualidade do resíduo presente no solo. Palhas de cereais são decompostas principalmente por fungos (Broder & Wagner, 1988; Mary et al., 1996), os quais apresentam uma relação C:N mais elevada do que bactérias e actinomicetos (Campbell et al., 1991; Garcia & Rice, 1994; Wheatley et al., 1990). Allison & Killham (1988) verificaram um aumento da relação C:N da biomassa microbiana após a incorporação de palha de cevada, acompanhado do aumento da taxa de respiração da população fúngica e do aumento da biomassa fúngica, creditado em grande parte à proliferação dos fungos celulolíticos. Assim, a relação C:N da biomassa microbiana verificada no dia da semeadura do milho resultaria da predominância da população fúngica naquele momento.

Após a aplicação da primeira dose do fertilizante nitrogenado ocorreu um decréscimo significativo na relação C:N da biomassa microbiana nos dois sistemas, permanecendo inalterada até os 88 dias após a semeadura do milho. A mudança na relação C:N da biomassa microbiana pode ser o resultado de modificações na sucessão microbiana ou de adaptações no conteúdo interno de fungos (Mary et al., 1996). Tal mudança é freqüentemente associada com a disponibilidade de nitrogênio. Normalmente são encontradas relações C:N baixas em solos com alta disponibilidade de nitrogênio (Mary et al., 1996; Salinas-Garcia et al., 1997). Embora alguns indivíduos ou populações possam ajustar a sua relação C:N à relação C:N do substrato, é pouco provável que toda a comunidade microbiana apresente este comportamento (Wheatley et al., 1990). O mais provável é que a diminuição da

relação C:N tenha ocorrido em função do aumento da população bacteriana em resposta ao aumento da disponibilidade de nitrogênio após as aplicações de uréia (Garcia & Rice, 1994). Esta diminuição da relação C:N da biomassa microbiana coincide com a diminuição da sua relação C:N-Nin aos 46 e aos 62 dias após a semeadura do milho, reforçando a idéia do aumento da população bacteriana.

A ocorrência de uma relação C:N menor significa um potencial de imobilização de nitrogênio maior, na medida em que a microbiota está assimilando mais nitrogênio por unidade de carbono decomposto. A adubação nitrogenada resultou em decréscimo na relação C:N da biomassa microbiana e, conseqüentemente, em maior capacidade de imobilização de nitrogênio, a qual parece estar associada ao predomínio da população bacteriana. Porém, não foram verificadas diferenças significativas entre os sistemas de manejo, confirmando apenas em parte a primeira hipótese deste trabalho. Apenas na quinta avaliação, a relação C:N da biomassa microbiana foi significativamente menor no sistema convencional. Nesta avaliação, houve um aumento do nitrogênio na biomassa microbiana devido, possivelmente, à disponibilização de nitrogênio orgânico lábil após um ciclo de secamento/umedecimento do solo, como discutido anteriormente. Este aumento de nitrogênio microbiano não foi acompanhado de um aumento no carbono, sugerindo diferenças entre a biomassa microbiana existente durante o período em que o solo encontrou-se ressecado, aos 88 dias, e a biomassa microbiana formada após o reumedecimento do solo, aos 112 dias após a semeadura do milho. Uma maior disponibilidade de nitrogênio orgânico lábil poderia ter favorecido a população

bacteriana após o reumedecimento do solo, baixando a relação C:N da biomassa microbiana.

Já a relação C:CHO da biomassa microbiana mostrou-se um parâmetro sensível aos manejos, apresentando diferenças significativas entre os tratamentos em todas as avaliações, com exceção da segunda. A quantidade de carboidratos variou entre 4,7 e 24,4 % do carbono total da biomassa microbiana. Badalucco et al. (1990) observaram valores abaixo de 10 %, considerado o valor médio para culturas microbianas em condições estáveis de crescimento. No entanto, este valor pode variar grandemente, dependendo das condições nutricionais e das espécies microbianas, podendo chegar até cerca de 65 % (Chapman & Gray, 1981).

No dia da semeadura do milho, a relação C:CHO da biomassa microbiana foi significativamente mais elevada no sistema plantio direto em comparação ao sistema convencional. Nesta ocasião, a relação C:CHO do sistema plantio direto foi a maior observada durante o período de avaliações. A relação C:CHO do sistema convencional, embora menor, também foi elevada. Nos dois sistemas de manejo, a proporção de carboidratos foi baixa. Na situação em que os sistemas se encontravam, com a disponibilidade de carbono alta e a de nitrogênio baixa, e em que as relações C:N e C:N-Nin eram elevadas, seria de se esperar uma maior proporção de carboidratos na biomassa microbiana. Relações C:CHO elevadas estão relacionadas com disponibilidades limitadas de carbono, de nitrogênio e com uma menor presença de fungos (Joergensen et al., 1996).

Na segunda avaliação, a relação C:CHO da biomassa microbiana diminuiu significativamente em ambos sistemas. Este resultado contraria a

idéia de que a aplicação da primeira dose de uréia induziu o aumento da proporção de bactérias na biomassa microbiana, levando à diminuição das relações C:N-Nin e C:N.

Ao contrário das avaliações anteriores, na terceira avaliação, a relação C:CHO não foi conflitante com as relações C:N-Nin e C:N. A relação C:CHO foi menor no sistema plantio direto, o que indicaria uma biomassa mais fúngica do que no sistema convencional. Porém, a relação C:CHO aumentou nos dois sistemas em comparação com a observada aos 46 dias após a semeadura do milho. Isto indicaria um aumento na população bacteriana após a aplicação da segunda dose de nitrogênio, o que é reforçado pelas baixas relações C:N-Nin e C:N ocorridas nesta avaliação. Este aumento da população bacteriana teria acontecido nos dois sistemas, mas teria sido mais acentuado no sistema convencional. As relações C:N-Nin e C:N poderiam não ter sido suficientemente sensíveis para detectar esta diferença entre os dois sistemas.

Aos 88 dias após a semeadura do milho, a relação C:CHO tornou a diminuir nos dois sistemas. Porém, no sistema plantio direto, a relação foi significativamente maior do que no sistema convencional. A relação C:CHO menor indica que houve um aumento da população fúngica nesta ocasião, sobretudo no sistema convencional, possivelmente em resposta às condições de umidade do solo. Com a diminuição da umidade do solo, a população fúngica é favorecida em relação à bacteriana (Gunapala & Scow, 1997; Orchard & Cook, 1983). A menor umidade do solo, na quarta avaliação, pode ter selecionado comunidades microbianas predominantemente fúngicas com menor relação C:CHO, efeito este que foi mais acentuado no sistema convencional. Na avaliação seguinte, a relação C:CHO da biomassa

microbiana seguiu a mesma tendência notada aos 88 dias após a semeadura do milho. Embora os valores tenham sido maiores do que na avaliação anterior, estes não diferiram estatisticamente.

Aparentemente as diferenças observadas entre as relações C:N-Nin, C:N e C:CHO da biomassa microbiana sugerem que esta última é a mais sensível a mudanças na estrutura das comunidades microbianas, o que está de acordo com os resultados obtidos por Joergensen et al. (1996). Os autores também observaram variações na relação C:CHO que excediam as das relações C:N-Nin e C:N. No entanto, a relação C:CHO da biomassa microbiana pode não ser o indicador mais adequado para monitorar alterações na estrutura da comunidade microbiana, pois não depende apenas da predominância de um ou outro grupo microbiano, mas também do metabolismo, do estado de nutrição e da fase de crescimento das células microbianas (Badalucco et al., 1990; Chapman & Gray, 1981), o que explicaria alguns resultados inesperados.

5.6.2. Composição da comunidade microbiana avaliada por meio da análise do rDNA de fungos e de bactérias

Na Figura 8, encontram-se os fragmentos de 433 pb do 16S rDNA bacteriano e de 550 pb do 18S rDNA fúngico, amplificados por meio de PCR, nas cinco avaliações realizadas ao longo do ciclo do milho. A visualização dos produtos de PCR separados em gel de agarose permite constatar a especificidade das reações. É possível constatar ainda a existência de flutuações nas populações bacterianas e fúngicas, indicadas pelas variações nas intensidades das bandas.

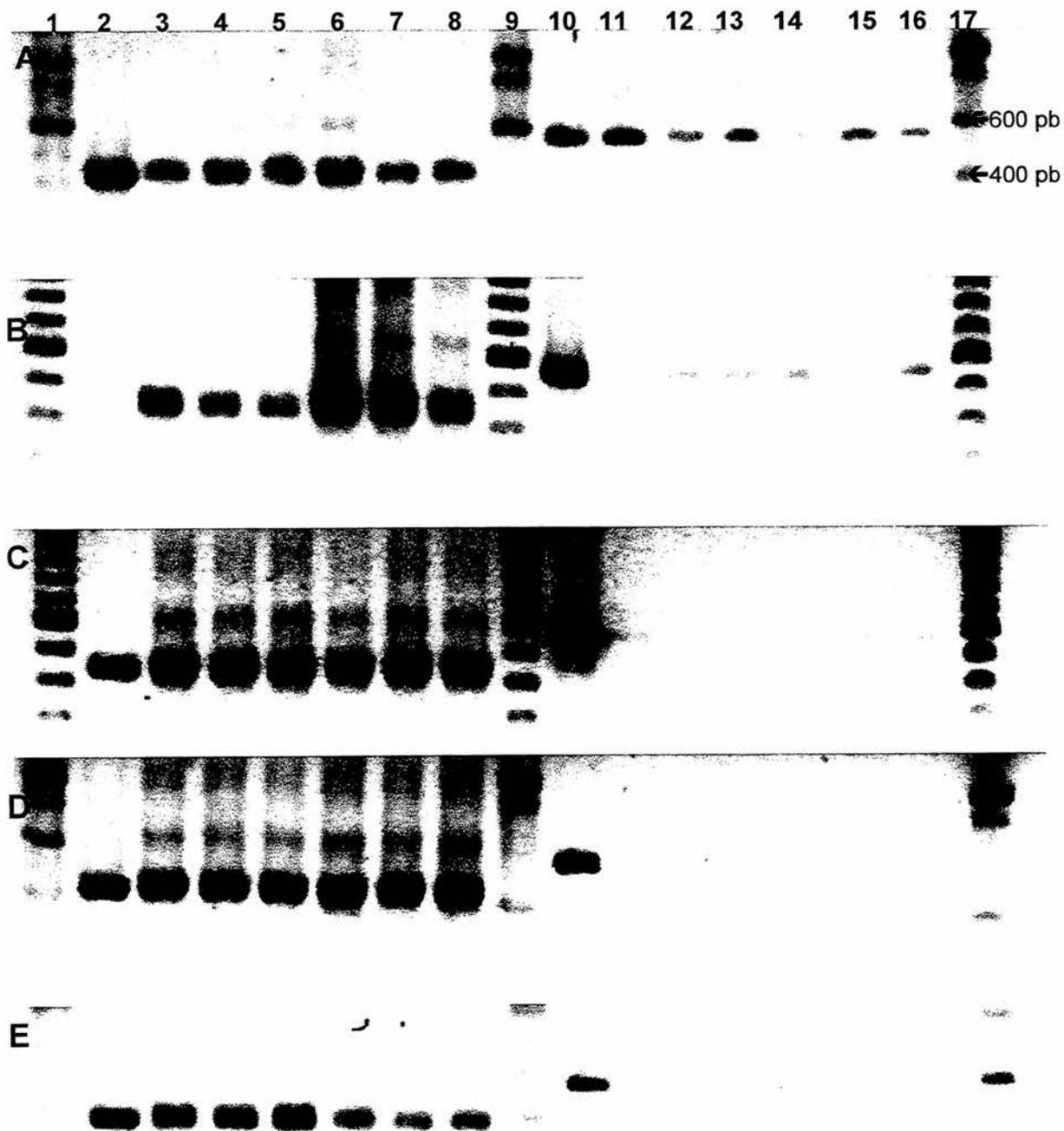


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de rDNA de bactérias (linhas 2 a 8) e fungos (linhas 10 a 16) em amostras de solo sob sistema convencional (linhas 3, 4, 5, 11, 12 e 13) e plantio direto (linhas 6, 7, 8, 14, 15 e 16) no dia da semeadura do milho (A) e 46 (B), 62 (C), 88 (D) e 112 dias após (E). Linhas 1, 9 e 17: marcador de pares de bases (100 pb); linha 2: *E. coli*; linha 10: *Penicillium*.

A quantificação dos produtos de PCR pode ser feita a partir da eletroforese em gel de agarose, uma vez que a intensidade da banda é proporcional à quantidade de DNA da amostra (Udeh et al., 2000). A quantidade de DNA no produto de PCR, por sua vez, depende do número de seqüências-alvo de DNA, o qual é proporcional ao número de células dos microrganismos que as possuem (Picard et al., 1992). Portanto, variações na quantidade de DNA nas reações de PCR refletem variações nas populações microbianas.

A partir da quantificação do DNA presente nos produtos de PCR, foi possível verificar que a população bacteriana foi mais baixa nos dois sistemas no dia da semeadura do milho (Figura 9). A população fúngica, ao contrário, foi elevada naquela avaliação, tendo sido significativamente maior no sistema convencional (Figura 10). A quantificação dos produtos de PCR confirma o indicado pelas relações C:N e C:N-Nin no dia da semeadura do milho. A presença abundante de resíduos de aveia preta, ricos em lignina e com relação C:N alta, favoreceram a população fúngica em detrimento da população bacteriana, resultando em uma biomassa microbiana com relações C:N e C:N-Nin elevadas. A decomposição de palhas de cereais é feita, geralmente, por um consórcio de microrganismos que se alternam durante o processo. Em uma primeira etapa, que dura cerca de sete dias, predominam bactérias que utilizam substratos solúveis em água (Hu & van Bruggen, 1997). Após predominam fungos que utilizam os polímeros do tecido vegetal a partir da sua capacidade de sintetizar enzimas hidrolíticas (Jensen & Nibroe, 1999). Nesta segunda etapa, na qual os sistemas se encontravam no dia da semeadura do milho, há uma limitação na disponibilidade de nitrogênio,

sobretudo para as bactérias, a partir da disponibilização de carbono dada pela atividade fúngica (Jensen & Nibroe, 1999). Já a relação C:CHO, embora não indicasse um predomínio de fungos naquele momento, foi suficientemente sensível para detectar uma maior população fúngica no sistema convencional em comparação com o sistema plantio direto.

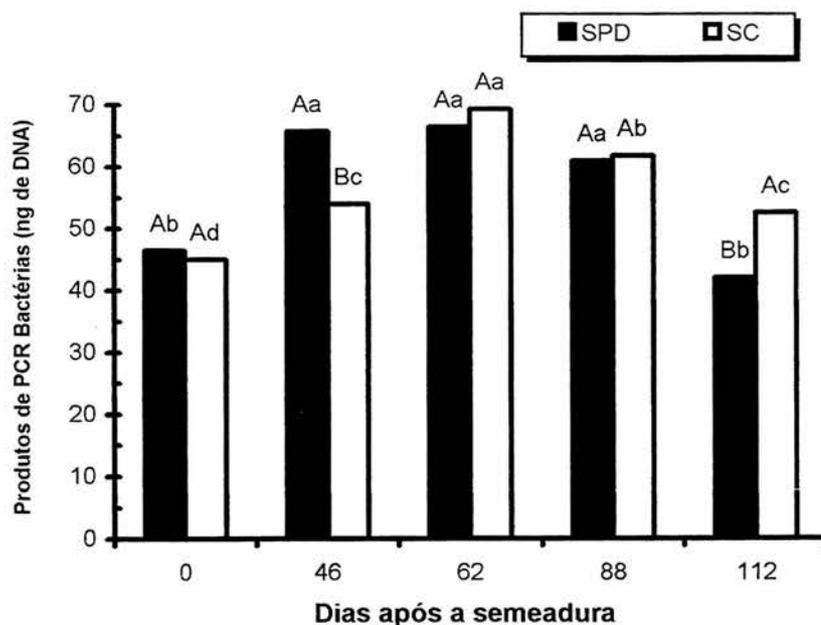


Figura 9. Quantidade de DNA nos produtos de PCR de 16S rDNA bacteriano nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5%. Letras maiúsculas comparam sistemas de manejo dentro de cada época, e letras minúsculas comparam épocas dentro de cada sistema de manejo.

Após a aplicação da primeira dose de nitrogênio, houve um crescimento da população bacteriana em relação à avaliação anterior. Este crescimento foi mais acentuado no sistema plantio direto. A população fúngica, por sua vez, manteve-se inalterada no sistema plantio direto e decresceu no sistema convencional, não diferindo da encontrada naquele sistema. Estes

resultados confirmam que a diminuição das relações C:N e C:N-Nin deveu-se ao aumento da população bacteriana e não a adaptações no metabolismo de fungos em resposta ao aumento da disponibilidade de nitrogênio. A relação C:CHO, ao contrário, não indicou um aumento da população bacteriana nos sistemas de manejo.

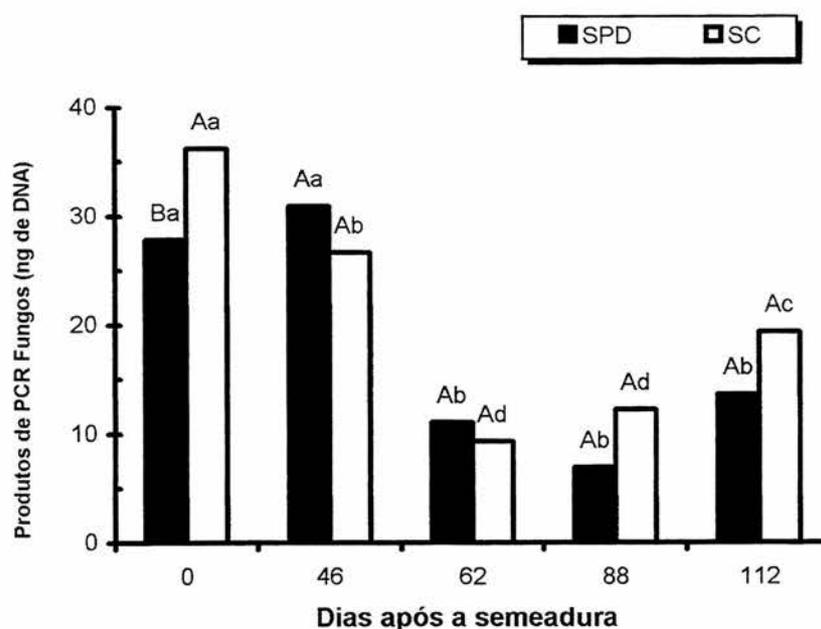


Figura 10. Quantidade de DNA nos produtos de PCR de 18S rDNA fúngico nos sistemas plantio direto (SPD) e convencional (SC). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5%. Letras maiúsculas comparam sistemas de manejo dentro de cada época, e letras minúsculas comparam épocas dentro de cada sistema de manejo.

Como discutido anteriormente, nesta segunda avaliação foi verificado ainda um aumento na imobilização microbiana de nitrogênio em ambos sistemas, imobilização esta que foi maior no sistema plantio direto. Estes resultados confirmam a primeira hipótese deste trabalho, na medida em que a aplicação da dose inicial de nitrogênio levou a um aumento da

imobilização de nitrogênio, associada ao aumento da população bacteriana e à diminuição da relação C:N da biomassa microbiana. A imobilização microbiana de nitrogênio e o crescimento da população bacteriana foram mais acentuados no sistema plantio direto, embora a relação C:N da biomassa microbiana não tenha diferido entre os dois sistemas.

Aos 62 dias após a semeadura do milho, a população bacteriana cresceu no sistema convencional, igualando-se à do sistema plantio direto. Esta, por sua vez, não diferiu estatisticamente da observada na avaliação anterior. Enquanto a população bacteriana atingiu os valores mais elevados, a população fúngica decresceu acentuadamente. A aplicação da segunda dose do fertilizante nitrogenado favoreceu a população bacteriana em detrimento da população fúngica, mantendo as relações C:N e C:N-Nin baixas. A relação C:CHO também refletiu o aumento da população bacteriana, sobretudo no sistema convencional. A imobilização microbiana de nitrogênio aumentou no sistema convencional, acompanhando o crescimento da população bacteriana. Estes resultados reforçam a idéia de que a adubação nitrogenada resulta na mudança da estrutura da comunidade microbiana, aumentando a proporção de bactérias, diminuindo a relação C:N e aumentando o potencial de imobilização da biomassa microbiana. Porém, o crescimento da população bacteriana após a aplicação do fertilizante nitrogenado, por si só, não determina a quantidade de nitrogênio imobilizado. Mesmo com o aumento significativo da população bacteriana no sistema convencional, a imobilização de nitrogênio foi menor neste sistema. Além da composição da biomassa microbiana, também um aspecto quantitativo determina a imobilização. O sistema plantio direto constitui-se em um ambiente mais favorável para a microbiota, sustentando

uma biomassa microbiana maior que imobiliza mais nitrogênio (Salinas-Garcia et al. 1997; Vargas & Scholles, 2000).

Na quarta avaliação, a estrutura da comunidade microbiana permaneceu praticamente inalterada. Houve um decréscimo da população bacteriana no sistema convencional em comparação com a avaliação anterior, mas esta não diferiu da população observada no sistema plantio direto. A população fúngica não se alterou. A proporção de fungos e bactérias na biomassa microbiana parece ter sido semelhante à encontrada aos 62 dias após a semeadura do milho, confirmando o indicado pelas relações C:N e C:N-Nin. Ao contrário do sugerido pela relação C:CHO, não houve um aumento da população fúngica, embora o decréscimo da população bacteriana, no sistema convencional, possa estar ligado à baixa umidade do solo, como discutido anteriormente.

Na última avaliação, a população bacteriana decresceu em relação à avaliação anterior nos dois sistemas. O decréscimo da população bacteriana foi mais acentuado no sistema plantio direto, no qual a população bacteriana foi significativamente inferior à do sistema convencional. A população fúngica aumentou no sistema convencional em relação à avaliação anterior, mas não diferiu da ocorrida no sistema plantio direto. O decréscimo da população bacteriana, no sistema plantio direto, parece ter levado ao aumento da relação C:N neste sistema. Já a relação C:N mais baixa verificada no sistema convencional parece não ser explicada apenas pelas diferenças nas populações bacterianas dos dois sistemas. Embora a população bacteriana tenha sido superior no sistema convencional em comparação com o plantio direto, na verdade esta decresceu em relação à observada aos 88 dias após a

semeadura do milho, enquanto a população fúngica aumentou. Em comparação com o sistema plantio direto, seria de se esperar uma relação C:N menor no sistema convencional, porém maior do que aquela verificada aos 88 dias após a semeadura do milho neste sistema. A relação C:CHO também não é esclarecedora, na medida em que aponta um crescimento da população fúngica no sistema convencional. Os resultados obtidos não permitem concluir a este respeito, mas é possível que, após o reumedecimento do solo, novas espécies tenham se estabelecido no solo sob sistema convencional, havendo mais do que uma simples alteração nas proporções de fungos e bactérias.

As diferenças na composição da comunidade microbiana estiveram mais relacionadas com alterações nas relações C:N e C:N-Nin do que com alterações na relação C:CHO. Isto confirma que a relação C:CHO da biomassa microbiana não é o indicador mais adequado para monitorar alterações na estrutura da comunidade microbiana, pois, conforme apresentado anteriormente, é afetado por outros fatores que não apenas a predominância de um ou outro grupo microbiano.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e considerando as condições em que o experimento foi conduzido, pode-se concluir que:

1. A imobilização microbiana do nitrogênio foi maior no sistema plantio direto, levando a uma menor quantidade de nitrogênio mineral no solo. Isto resultou em menor acúmulo de nitrogênio na parte aérea do milho ao final do seu ciclo neste sistema em comparação com o sistema convencional;

2. A quantidade de nitrogênio imobilizado na biomassa microbiana permaneceu elevada até o final da cultura do milho, indicando que a remineralização contribuiu pouco para a disponibilidade de nitrogênio no solo. A biomassa microbiana atuou mais como agente da mineralização de nitrogênio orgânico do que como fonte de nitrogênio potencialmente mineralizável;

3. A composição da comunidade modificou-se ao longo do período de avaliações em função da presença de resíduos vegetais de aveia preta e da adubação nitrogenada. A presença de resíduos de aveia preta favoreceu a população fúngica. A aplicação do fertilizante nitrogenado favoreceu a população bacteriana, resultando em diminuição das relações C:N e C:N-Nin da biomassa microbiana e em aumento da imobilização microbiana. A população bacteriana respondeu mais rapidamente à aplicação do fertilizante

nitrogenado no sistema plantio direto, tendo sido significativamente maior neste sistema aos 46 dias após a semeadura do milho, do que no sistema convencional.

4. A relação C:CHO mostrou-se um indicador menos adequado do que as relações C:N e C:N-Nin para monitorar alterações na composição da comunidade microbiana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITA, C. Dinâmica do nitrogênio no solo durante a decomposição de plantas de cobertura: efeito sobre a disponibilidade de nitrogênio para a cultura em sucessão. In: FRIES, M. R.; DALMOLIN, R. S. D. **Atualização em recomendação de adubação e calagem**. Santa Maria: Palloti, 1997. p. 76-111.
- AITA, C, BASSO, C. J.; CERETTA, C. A. et al. Plantas de cobertura de solo como fonte de nitrogênio ao milho. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 157-165, 2001.
- ALFAIA, S. S. Destino de adubos nitrogenados marcados com ^{15}N em amostras de dois solos da Amazônia Central. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 21, n. 3, p. 379-385, 1997.
- ALLISON, M. F.; KILLHAM, K. Response of soil microbial biomass to straw incorporation. **J. Soil Sci.**, London, v. 39, n. 2, p. 237-242, 1988.
- ALVAREZ, R.; DÍAZ, R. A.; BARBERO, N. et al. Soil organic carbon, microbial biomass and $\text{CO}_2\text{-C}$ production from three tillage systems. **Soil Tillage Res.**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 17-28, 1995.
- AMADO, T. J. **Disponibilidade de nitrogênio para o milho em sistemas de cultura e preparo do solo**. 1997. 201 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
- AMADO, T. J. C.; FERNANDES, S. B. V.; MIELNICZUCK, J. Nitrogen availability as affected by ten years of cover crop and tillage systems in southern Brazil. **J. Soil and Water Cons.**, Ankeny, v. 53, n. 3, p. 268-271, 1998.
- AMADO, T. J. C.; MIELNICZUCK, J.; FERNANDES, S. B. V. et al. Culturas de cobertura, acúmulo de nitrogênio total no solo e produtividade de milho. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 23, n. 3, p. 679-686, 1999.

- AMADO, T. J. C.; MIELNICZUCK, J.; FERNANDES, S. B. V. Leguminosas e adubação mineral como fontes de nitrogênio para o milho em sistemas de preparo de solo. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 179-189, 2000.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 10, n. 3, p.215-221, 1978.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Quantification of bacterial and fungal contributions to soil respiration. **Arch. Mikrobiol.**, Berlin, v. 93, n. 1, p. 113-127, 1973.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. **Soil Sci.**, Baltimore, v. 130, n. 4, p. 211-216, 1980.
- ANGERS, D. A.; BISSONNETTE, N.; LÉGÈRE, A. et al. Microbial and biochemical changes induced by rotation and tillage in a soil under barley production. **Can. J. Soil Sci.**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 39-50, 1993.
- AOYAMA, M.; NOZAWA, T. Microbial biomass nitrogen and mineralization-immobilization processes of nitrogen in soils incubated with various organic materials. **Soil Sci. Plant Nutr.**, Tokyo, v. 39, n. 1, p. 23-32, 1993.
- APPEL, T. Non-biomass soil organic N – the substrate for N mineralization flushes following soil drying-rewetting and for organic N rendered CaCl₂-extractable upon soil drying. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 30, n. 10-11, p. 1445-1456, 1998.
- ASLAM T., CHOUDHARY M. A.; SAGGAR S. Tillage impacts on soil microbial biomass C, N and P, earthworms and agronomy after two years of cropping following permanent pasture in New Zealand. **Soil Tillage Res.**, Amsterdam, v. 51, n. 1-2, p. 103-111, 1999.
- ATLAS, R. M. **Microbiology: Fundamentals and Applications**. New York: MacMillan, 1988. 807 p.
- BADALUCCO, L.; GELSOMING, A.; DELL'ORCO, S. et al. Biochemical characterization of soil organic compounds extracted by 0,5 M K₂SO₄ before and after chloroform fumigation. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 569-578, 1992.
- BADALUCCO, L.; NANNIPIERI, P.; GREGO, S. Microbial biomass and anthrone-reactive carbon in soils with different organic matter contents. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 899-904, 1990.
- BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S. et al. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e

- sucessão de culturas. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 641-649, 1998.
- BANDEL, V. A.; DZIENIA, S.; STANFORD, G. et al. N behavior under no-till vs. conventional corn culture. I. First year results using unlabeled N fertilizer. **Agron. J.**, Madison v.67, n. 6, p. 782-786, 1975.
- BANDICK, A. K.; DICK, R. P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 31, n. 11, p. 1471-1479, 1999
- BARAK, P.; MOLINA, J. A. E.; HADAS, A. et al. Mineralization of amino acids and evidence of direct assimilation of organic nitrogen. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 54, n. 2, p. 769-774, 1990.
- BARRETO, H. J.; WESTERMAN, R. L. Soil urease activity in winter wheat residue management systems. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 53, n. 5, p. 1455-1458, 1989.
- BAYER, C. **Dinâmica da matéria orgânica em sistemas de manejo de solos**. 1996. 240 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.
- BAYER, C; BERTOL, I. Características químicas de um Cambissolo Húmico afetadas por sistema de preparo, com ênfase à matéria orgânica. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 23, n. 3, p. 687-694, 1999.
- BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de cultura. **R. Bras. Ci. Solo**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 105-112, 1997.
- BEARE, M. H.; HU, S.; COLEMAN, D. C. et al. Influences of mycelial fungi on soil aggregation and organic matter storage in conventional and no-tillage soils. **Appl. Soil Ecol.**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 211-219, 1997.
- BONDE, T. A.; SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Microbial biomass as a fraction of potentially mineralizable nitrogen in soils from long-term field experiments. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 447-452, 1988.
- BORNEMAN, J.; SKROCH, P. W.; O'SULLIVAN, K. M. et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 62, n. 2, p. 1935-1943, 1996.
- BORTOLINI, C. G.; SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G. Sistemas consorciados de aveia preta e ervilhaca comum como cobertura de solo e seus efeitos na cultura do milho em sucessão. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 897-903, 2000.

- BRAGAGNOLO, N.; MIELNICZUK, J. Cobertura do solo por palha de trigo e seu relacionamento com a temperatura e umidade do solo. **R. bras. Ci. Solo**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 369-374, 1990.
- BRODER, M. W.; WAGNER, G. H. Microbial colonization and decomposition of corn, wheat, and soybean residue. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 52, n. 1, p. 112-117, 1988.
- BROOKES, P. C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G. et al. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure soil microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 837-842, 1985.
- CALDERÓN, F. J.; JACKSON, L. E.; SCOW, K. M. et al. Short-term dynamics of nitrogen, microbial activity, and phospholipid fatty acids after tillage. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 65, n. 1, p. 118-126, 2001.
- CAMARGO, F. A. O.; GIANELO, C.; VIDOR, C. Potencial de mineralização do nitrogênio em solos do Rio Grande do Sul. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 21, n. 4, p. 575-579, 1997.
- CAMPBELL, C. A.; BIEDERBECK, V. O.; ZENTNER, R. P. et al. Effect of crop rotations and cultural practices on soil organic matter, microbial biomass and respiration in a thin Black Chernozem. **Can. J. Soil Sci.**, Ottawa, v. 71, n. 4, p. 363-376, 1991.
- CAREFOOT J. M.; JANZEN, H. H. Effect of straw management, tillage timing and timing of fertilizer nitrogen application on the crop utilization of fertilizer and soil nitrogen in an irrigated cereal rotation. **Soil Tillage Res.**, Amsterdam, v. 44, n. 3-4, p. 195-210, 1997.
- CAREFOOT, J. M.; NYBORG, M.; LINDWALL, C. W. Differential fertilizer N immobilization in two tillage systems influences grain N concentration. **Can. J. Soil Sci.**, Ottawa, v. 70, n. 2, p. 215-225, 1990.
- CARTER, M. R.; RENNIE, D. A. Dynamics of soil microbial biomass N under zero and shallow tillage for spring wheat, using ¹⁵N urea. **Plant and Soil**, The Hague, v. 76, n. 1, p.157-164, 1984.
- CARTER, M. R.; RENNIE, D. A. Changes in soil quality under zero tillage farming systems: distribution of microbial biomass and mineralizable C and N potentials. **Can. J. Soil Sci.**, Ottawa v. 62, n. 4, p. 587-597, 1982.
- CATTELAN, A. J.; VIDOR, C., Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. **R. bras. Ci. Solo**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 133-142, 1990.
- CERETA, C. A. Manejo da adubação nitrogenada na sucessão aveia/milho, no sistema plantio direto. In: FRIES, M. R.; DALMOLIN, R. S. D. **Atualização**

- em recomendação de adubação e calagem.** Santa Maria: Palloti, 1997. p. 112-124.
- CHAPMAN, S. J.; GRAY, T. R. G. Endogenous metabolism and macromolecular composition of *Arthrobacter globiformis*. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 11-18, 1981.
- CHENG, W.; ZANGH, Q.; COLEMAN, D. C. et al. Is available carbon limiting microbial respiration in rhizosphere? **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 28, n. 10/11, p. 1283-1288, 1996.
- CHRISTENSEN, H.; RØNN, R.; EKELUND, F. et al. Bacterial production determined by [³H]Thymidine incorporation in field rhizosphere as evaluated by comparison to rhizodeposition. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 93-99, 1995.
- DICK, W. A. Influence of long-term tillage and crop rotation combinations on soil enzyme activities. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 48, n. 2, p. 569-574, 1984.
- DICK, P. R.; BREAKWELL, D. P.; TURCO, R. F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J. W.; JONES, A. J. **Methods for Assessing Soil Quality**. Wisconsin: SSSA, 1996. p. 247-271.
- DIEKOW, J. **Antecipação da adubação nitrogenada em milho cultivado no sistema plantio direto, em sucessão à aveia preta.** 2000. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- DORAN, J. W. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 44, n. 3, 765-771, 1980.
- DORAN, J. W.; ELLIOTT, E. T.; PAUSTIAN, K. Soil microbial activity nitrogen cycling, and long-term changes in organic carbon pools as related to fallow tillage management. **Soil Tillage Res.**, Amsterdam, v. 49, n. 1-2, p. 3-18, 1998.
- DOUGLAS JR., C. L.; ALLMARAS, R. R.; RASMUSSEN, P. E. et al. Wheat straw composition and placement effects on decomposition in dryland agriculture of the Pacific Northwest. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 44, n. 3, p. 833-837, 1980.
- DRINKWATER, L. E.; CAMBARDELLA, C. A.; REEDER, J. D. et al. Potentially mineralizable nitrogen as an indicator of biologically active soil nitrogen. In: DORAN, J. W.; JONES, A. J. **Methods for Assessing Soil Quality**. Wisconsin: SSSA, 1996. p. 217-229.

- FELSKE, A.; RHEIMS, H.; WOLTERINK, A. et al. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grasslands soils. **Microbiology**, Berks, v. 143, n. 9, p. 2983-2989, 1997.
- FOLLETT, R. F.; SCHIMEL, D. S. Effect of tillage practices on microbial biomass dynamics. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 53, n. 4, p. 1091-1096, 1989.
- FOULY, H. M.; WILKINSON, H. T.; DOMIER, L. L. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of *Gaeumannomyces* species. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 703-710, 1996.
- FERNANDES, L. A.; VASCONCELOS, C. A.; FURTINI NETO, A. E. et al. Preparo do solo e adubação nitrogenada na produção de grãos e matéria seca e acúmulo de nutrientes pelo milho. **Pesq. Agrop. Bras.**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1691-1698, 1999.
- FREITAS, H. F.; ROSSO, A.; BAYER, C. et al. Efeito de métodos de preparo do solo e sistemas de cultura na absorção de nitrogênio e rendimento de milho. **Pesq. Agrop. Gaúcha**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 69-77, 1996.
- FREY, D.; ELLIOTT, E. T.; PAUSTIAN, K. Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 573-585, 1999.
- GARCIA, A.; MORON, A. Estudios de C, N y P en la biomassa microbiana del suelo en tres sistemas de rotación agrícola. **Rev. INIA Inv. Agr.**, Montevideo, v. 1, n. 1, p. 111-126, 1992.
- GARCIA, F. O.; RICE, C. W. Microbial biomass dynamics in tallgrass prairie. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 58, n. 3, p. 816-823, 1994.
- GONÇALVES, C. N.; CERETTA, C. A.; BASSO, C. J. Sucessões de culturas com plantas de cobertura e milho em plantio direto e sua influência sobre o nitrogênio do solo. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 153-159, 2000.
- GOYAL, S.; MISHIRA, M. M.; HOODA, I. S. et al. Organic matter-microbial biomass relationships in field experiments under tropical conditions: effects of inorganic fertilization and organic amendments. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 24, n.11, p. 1081-1084, 1992.
- GUNAPALA, N.; SCOW, K. M. Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 805-816, 1998.
- HARRISON, A. B.; BETTS, W. B. Assay of bacterial and fungal activity in diesel contaminated soil using a ¹⁴C-glucose utilization method. **Letters Appl. Microbiol.**, London, v. 23, n. 1, p. 43-46, 1996.

- HEINRICHS, R.; AITA, C.; AMADO, T. J. C. Cultivo consorciado de aveia e ervilhaca: relação C:N da fitomassa e produtividade do milho em sucessão. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 331-340, 2001.
- HOUSE, G. J.; STINNER, B. R.; CROSSLEY, JR. Nitrogen cycling in conventional and no-tillage agroecosystems in the Southern Piedmont. **J. Soil and Water Cons.**, Ankeny, v. 39, n. 3, p. 194-200, 1984.
- HORWATH, R. W.; PAUL, E. A.; HARRIS, D. et al. Defining a realistic control for the chloroform fumigation-incubation method using microscopic counting and ¹⁴C-substrates. **Can. J. Soil Sci.**, Ottawa, v. 76, n. 4, p. 459-467, 1996.
- HU, S.; COLEMAN, D. C.; BEARE, M. H. et al. Soil carbohydrates in aggrading and degrading agroecosystems: influences of fungi and aggregates. **Agric. Ecosyst. Environ.**, Amsterdam, v. 54, n. 1-2, p. 77-88, 1995.
- HU, S.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Microbial dynamics associated with multiphasic decomposition of ¹⁴C-labeled cellulose in soil. **Microb. Ecol.**, New York, v. 33, n. 2, p. 134-143, 1997.
- JANSSEN, B. H. Nitrogen mineralization in relation to C:N ratio and decomposability of organic materials. **Plant Soil**, The Hague, v. 181, n. 1, p. 39-45, 1996.
- JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. **Soil Biochemistry**. New York: M. Dekker, 1981. v.5, p.415-471.
- JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 209-213, 1976.
- JENKINSON, D. S.; RAYNER, J. H. The Turnover of soil organic matter in some of the Rothamsted classical experiment. **Soil Sci.**, Baltimore, v. 123, n. 5, p. 298-305, 1977.
- JENSEN, E. L.; NIBROE, O. Nitrogen availability to *Pseudomonas fluorescens* DF57 is limited during decomposition of barley straw in bulk soil and in the barley rhizosphere. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4320-4328, 1999.
- JOERGENSEN, R. G. Quantification of the microbial biomass determining ninhydrin-reactive N. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 301-306, 1996.
- JOERGENSEN, R. G.; MUELLER, T.; WOLTERS, V. Carbohydrates of the soil microbial biomass in 0,5 M K₂SO₄ soil extracts. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 1147-1153, 1996.

- JOERGENSEN, R. G.; SCHMAEDEKE, F.; WINDHORST, K. et al. Biomass and activity of microorganisms in a fuel oil contaminated soil. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 1137-1143, 1995.
- JOHNSON, C. K.; VIGIL, M. F.; DOXTADER, K. G. et al. Measuring bacterial and fungal substrate-induced respiration in dry soils. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 28, n. 4-5, p. 427-432, 1996.
- KANCHIKERIMATH, M.; SINGH, D. Soil organic matter and biological properties after 26 years of maize-wheat-cowpea cropping as affected by manure and fertilization in a Cambisol in semiarid region of India. **Agric. Ecosyst. Environ.**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 155-162, 2001.
- KITUR, B. K.; SMITH, M. S.; BLEVINS, R. L. et al. Fate of ¹⁵N-depleted ammonium nitrate applied to no-tillage corn. **Agron. J.**, Madison v. 76, n. 2, p. 240-242, 1984.
- KLOSE, S.; TABATABAI, M. A. Urease activity of microbial biomass in soils. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 205-211, 1999.
- KORSAETH, A.; MOLSTAD, L.; BAKKEN, L. R. Modeling the competition for nitrogen between plants and microflora as a function of soil heterogeneity. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 215-226, 2001.
- KRISTENSEN, H. L.; McCARTY, G. W.; MEISINGER, J. J. Effects of soil disturbance on mineralization of organic soil nitrogen. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 64, n. 1, p. 371-378, 2000.
- LARA CABEZAS, W. A. R.; KORNDÖRFER, G. H.; MOTTA, S. A. Volatilização de N-NH₃ na cultura de milho: I. Efeito da irrigação e substituição parcial da uréia por sulfato de amônio. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 21, n. 3, p. 481-487, 1997a.
- LARA CABEZAS, W. A. R.; KORNDÖRFER, G. H.; MOTTA, S. A. Volatilização de N-NH₃ na cultura de milho: II. Avaliação de fontes sólidas e fluidas em sistema de plantio direto e convencional. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 21, n. 3, p. 489-496, 1997b.
- LARA CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O.; KORNDÖRFER, G. H. et al. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura de milho, em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro (MG). **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 363-376, 2000.
- LINN, D. M.; DORAN, J. W. Aerobic and anaerobic microbial populations in no-till and plowed soils. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 48, n. 2, p. 794-799, 1984.
- LUNDQUIST, E.; JACKSON, L. E.; SCOW, K. M. et al. Changes in microbial biomass and community composition, and soil carbon and nitrogen pools

after incorporation of rye into three California agricultural soils. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 221-236, 1999.

LYNCH, J. M.; PANTING, L. M. Cultivation and the soil biomass. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 29-33, 1980.

MALHI, S. S.; GRANT, C. A.; JOHNSTON, A. M. et al. Nitrogen fertilization management for no-till cereal production in the Canadian Great Plains: a review. **Soil Tillage Res.**, Amsterdam, v. 60, n. 3-4, p. 101-122, 2001.

MARUMOTO, T.; ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K. H. Decomposition of ^{14}C - and ^{15}N -labelled microbial cells in soil. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v.14, n. 5, p. 461-467, 1982.

MARUMOTO, T. Mineralization of C and N from microbial biomass in paddy soil. **Plant Soil**, The Hague, v. 76, n. 1, p.165-173, 1984.

MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; CHAUSSOD, R. et al. DNA extraction from soil: old bias for new microbial diversity analysis methods. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2354-2359, 2001.

MARY, B.; RECOUS, S.; DARWIS, D. et al. Interactions between decomposition of plant residues and nitrogen cycling in soil. **Plant Soil**, The Hague, v. 181, n. 1, p. 71-82, 1996.

MATUS, F. J.; RODRÍGUEZ, J. A simple model for estimating the contribution of nitrogen mineralization to the nitrogen supply of crops from a stabilized pool of soil organic matter and recent organic input. **Plant Soil**, The Hague, v. 181, n. 1, p. 71-82, 1994.

McCARTY, G. W.; LYSSENKO, N. N.; STARR, J. L. Short-term changes in soil carbon and nitrogen pools during tillage management transition. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 62, n. 6, p. 1564-1571, 1998.

MEISINGER, J. J.; BANDEL, V. A.; STANFORD, G. et al. Nitrogen utilization of corn under minimal tillage and moldboard plow tillage. I. Four-year results using labeled N fertilizer on an Atlantic Coastal Plain soil. **Agron. J.**, Madison v.77, n. 4, p. 602-611, 1985.

MENGEL, K. Turnover of nitrogen in soil and its availability to crops. **Plant Soil**, The Hague, v. 181, n. 1, p. 83-93, 1996.

MONREAL, C. M.; DINEL, H.; SCHNITZER, M. et al. Impact of carbon sequestration on functional indicators of soil quality as influenced by management in sustainable agriculture. In: LAL, R.; KIMBLE, J. M.; FOLLETT, R. et al. **Soil processes and the carbon cycle**. Boca Raton: CRC, 1998. p. 435-457.

- NORTON, J. M. Nitrogen mineralization immobilization turnover. In: SUMNER, M. E. **Handbook of soil science**. Boca Raton: CRC, 2000. p. C148-C160.
- NÜSSLEIN, K.; TIEDJE, J. M. Soil microbial community shift with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3622-3626, 1999.
- OCIO, J. A.; BROOKES, P. C. An evaluation of methods for measuring biomass in soils following recent additions of wheat straw and the characterization of the biomass that develops. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 685-694, 1990.
- OLSON, R. A.; KURTZ, L. T. Crop nitrogen requirements, utilization and fertilization. In: STEVENSON, F. J. **Nitrogen in agricultural soils**. Madisom: ASA/SSSA, 1982. p. 567-604.
- ORCHARD, V. A.; COOK, F. J. Relationship between soil respiration and soil moisture. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 447-453, 1983.
- PARKER, D. T. Decomposition in the field of buried and surface-applied cornstalk residue. **Soil Sci. Soc. Proc.**, Madison, v. 26, n. 6, p. 559-562, 1962.
- PARKINSON, D.; GRAY, T. R. G.; WILLIAMS, S. T. **Methods for studying the ecology of soil microorganisms**. Oxford: Blackwell, 1971. 116p.
- PICARD, C.; PONSONNET, C.; PAGET, E. et al. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 58, n. 9, p. 2717-2722, 1992
- REICOSKY, D. C.; DUGAS, W. A.; TORBET, H. A. Tillage-induced soil carbon dioxide loss from different cropping systems. **Soil Tillage Res.**, Amsterdam, v. 41, n. 1-2, p. 105-118, 1997.
- REICOSKY, D. C.; KEMPER, W. D.; LANGDALE, G. W. et al. Soil organic matter resulting from tillage and biomass production. **J. Soil and Water Cons.**, Ankeny, v. 50, n. 3, p. 253-261, 1995.
- ROBINSON, C. H.; DIGHTON, J.; FRANKLAND, J. C. et al. Fungal communities on decaying wheat straw of different resource qualities. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 1053-1058, 1994.
- SALET, R. L. **Dinâmica de íons na solução de um solo submetido ao sistema plantio direto**. 1994. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.
- SALET, L. R.; VARGAS, L. K.; ANGHINONI, I. et al. Por Que a Disponibilidade de Nitrogênio é Menor no Sistema Plantio Direto? In: SEMINÁRIO

- INTERNACIONAL DO SISTEMA PLANTIO DIRETO, 2., 1997, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA/CNPT, 1997. p. 217-219.
- SALINAS-GARCIA, J. R.; HONS; F. M.; MATOCHA, J. E. Long-term effects of tillage and fertilization on soil organic matter dynamics. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 61, n. 1, p. 152-159, 1997.
- SALTON, J. C.; MIELNICZUK, J. Relações entre sistemas de preparo, temperatura e umidade de um podzólico vermelho-escuro de Eldorado do Sul (RS). **R. bras. Ci. Solo**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 313-319, 1995.
- SCHENK, M. K. Regulation of nitrogen uptake on the whole plant level. **Plant Soil**, The Hague, v. 181, n. 1, p. 131-137, 1996.
- SCHOMBERG, H. H.; STEINER, J. L.; UNGER, P. W. Decomposition and Nitrogen Dynamics of Crop Residues: Residue Quality and Water Effects. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v. 58, n. 2, p. 372-381, 1994.
- SELBACH, P. A. **Optimization of a DNA extraction procedure for phylogenetic probe analysis of soil microbial communities**. Madison, 1998. 127 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). University of Wisconsin, Madison, 1998.
- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. As práticas de manejo de solo na população microbiana. **R. bras. Ci. Solo**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 291-296, 1984.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B. et al. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2614-2621, 1999.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; WERNARS, K. Detection of community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 249-261, 1997.
- SOMANI, L. L. Nitrogen mineralization under the influence of decomposing organic materials in some soils of Rajasthan. **Agronomia Lusitana**, Oeiras, v. 43, n. 1-4, p. 39-48, 1988.
- STAHL, P. D.; PARKIN, T. B. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 847-855, 1996.
- TATE, K. R.; ROSS; D. J.; RAMSAY, A. J. et al. Microbial biomass and bacteria in two soils: An assessment of measurement procedures, temporal variations, and the influence of P fertility status. **Plant Soil**, The Hague, v. 132, n. 2, p.233-241, 1991.

- TEDESCO, J. M.; GIANELO, C.; BISSANI, C. A. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 1995. 174 p. (Boletim técnico, 5).
- TORSVIK, V.; SØRHEIN, R.; GOKSØYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. **J. Industrial Microbiol.**, New York, v. 17, n. 1, p. 170-178, 1996.
- UDEH, P.; VEENSTRA, J.; ABRAHAM, A. J. et al. Quantitative polymerase chain (QPCR) reaction using the MIMIC approach to estimate *Cryptosporidium parvum* oocysts, an intestinal pathogen, in municipal water treatment sludge samples. **Mol. Cell. Probes**, San Diego, v. 14, n. 2, p. 121-126, 2000.
- VARGAS, L. K. **Biomassa e atividade microbiana em sistemas de manejo do solo**. 1997. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
- VARGAS, L. K.; SCHOLLES, D. Nitrogênio da biomassa microbiana, em sistemas de manejo do solo, estimado por métodos de fumigação. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 411-417, 1998.
- VARGAS, L. K.; SCHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N mineral de um solo Podzólico vermelho-escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **R. bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2000.
- WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Response of the soil microbial biomass to glucose, and selective inhibitors, across a soil moisture gradient. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 825-834, 1990.
- WHALLEY, W. R.; DUMITRU, E.; DEXTER, A. R. Biological effects of soil compaction. **Soil Tillage Res.**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 53-68, 1995.
- WHEATLEY, R.; RITZ, K.; GRIFFITHS, B. Microbial biomass and mineral N transformations in soil planted with barley, ryegrass, pea or turnip. **Plant Soil**, The Hague, v. 127, n.1, p.157-167, 1990.
- WHITE, C. S.; MOORE, D. I.; HORNER, J. D. et al. Nitrogen mineralization-immobilization response to field N or C perturbations: an evaluation of a theoretical model. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 101-105, 1988.
- WHITMORE, A. P. Alternative kinetic laws to describe the turnover of the microbial biomass. **Plant Soil**, The Hague, v.181, n. 1, p. 169-173, 1996.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 01. Quadro de análise da variância da variável nitrogênio da biomassa microbiana.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	44,8890798			
Épocas	4	452,6765557	113,1691389	14,0123	0,00008
Manejo	1	1408,2229744	1408,2229744	174,3622	0,00001
Épocas x Manejo	4	278,6589505	69,6647376	8,6257	0,00067
Resíduo	18	145,3756177	8,0764232		
Total	29	2329,8231782			

Média geral = 27,835333

Coefficiente de variação = 10,210 %

APÊNDICE 02. Quadro de análise da variância da variável nitrogênio mineral do solo.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	1,0702864			
Épocas	4	34174,0551097	8543,5137774	84,9268	0,00001
Manejo	1	7371,1688509	7371,1688509	73,2731	0,00001
Épocas x Manejo	4	2726,2100391	681,5525098	6,7750	0,00195
Resíduo	18	1810,7743964	100,5985776		
Total	29	46083,2786826			

Média geral = 33,698334

Coefficiente de variação = 29,764 %

APÊNDICE 03. Quadro de análise da variância da variável nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de milho.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	768,4655786			
Épocas	3	112462,7722640	37487,5907547	349,8264	0,00001
Manejo	1	0,4844999	0,4844999	0,0045	0,94585
Épocas x Manejo	3	3073,9781566	1024,6593855	9,5619	0,00138
Resíduo	14	1500,2479398	107,1605671		
Total	23	117805,9484389			

Média geral = 102,881248

Coeficiente de variação = 10.062 %

APÊNDICE 04. Quadro de análise da variância da variável teor de nitrogênio na parte aérea de plantas de milho.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	4,1280089			
Épocas	4	1799,0829806	599,6943269	111,6345	0,00001
Manejo	1	5,0050676	5,0050676	0,9317	0,64711
Épocas x Manejo	4	66,7639377	22,2546459	4,1428	0,02657
Resíduo	18	75,2072044	5,3719432		
Total	29	1950,1871992			

Média geral = 19,389166

Coeficiente de variação = 11,954 %

APÊNDICE 05. Quadro de análise da variância da variável massa seca da parte aérea de plantas de milho.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	0,0326083			
Épocas	4	795,0373822	598,3457941	3428,3692	0,00001
Manejo	1	2,8635042	2,8635042	16,4072	0,00148
Épocas x Manejo	4	1,0860126	0,3620042	2,0742	0,14907
Resíduo	18	2,4433895	0,1745278		
Total	29	1801,4628967			

Média geral = 9,162916

Coefficiente de variação = 4,559 %

APÊNDICE 06. Teste de Duncan para média de épocas da variável massa seca da parte aérea de plantas de milho.

Épocas	Médias	5%	1%
	-----Mg ha ⁻¹ -----		
46	0,305000	d	D
62	2,878333	c	C
88	10,965000	b	B
112	22,503333	a	A

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

APÊNDICE 07. Teste de Duncan para média de sistemas de manejo da variável massa seca da parte aérea de plantas de milho.

Sistema de manejo	Médias	5%	1%
	-----Mg ha ⁻¹ -----		
Plantio direto	9,508333	a	A
Convencional	8,817500	b	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

APÊNDICE 08. Quadro de análise da variância da variável nitrogênio potencialmente mineralizável.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	377,9526876			
Manejo	1	2710,2252483	2710,2252483	21,9740	0,03946
Resíduo	2	246,6761078	123,3380539		
Total	5	3334,8540437			

Média geral = 50,826668

Coefficiente de variação = 21,850 %

APÊNDICE 09. Quadro de análise da variância da variável carbono potencialmente mineralizável.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	846,8400576			
Manejo	1	40419,4763688	40419,4763688	64,4189	0,01190
Resíduo	2	1254,8951256	627,4475628		
Total	5	42521,2115520			

Média geral = 269,40668

Coefficiente de variação = 9,298 %

APÊNDICE 10. Quadro de análise da variância da variável relação C:N potencialmente mineralizáveis.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	0,3985333			
Manejo	1	5,5104167	5,5104167	24,8590	0,03459
Resíduo	2	0,4433332	0,2216666		
Total	5	6,3522832			

Média geral = 5,408333

Coeficiente de variação = 8,705 %

APÊNDICE 11. Quadro de análise da variância da variável atividade de urease.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	33,6331594			
Épocas	4	3220,2915881	805,0728970	13,6002	0,00009
Manejo	1	106,5967220	106,5967220	1,8008	0,19386
Épocas x Manejo	4	3936,2190875	984,0547719	16,6238	0,00004
Resíduo	18	1065,5223455	59,1956859		
Total	29	8362,2629024			

Média geral = 31.001667

Coeficiente de variação = 24,818 %

APÊNDICE 12. Quadro de análise da variância da variável carbono da biomassa microbiana.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	2392,9091146			
Épocas	4	43075,9952691	10768,9988173	13,9538	0,00008
Manejo	1	114077,1691964	114077,1691964	147,8142	0,00001
Épocas x Manejo	4	11390,3860858	2847,5965215	3,6897	0,02284
Resíduo	18	13891,6921347	771,7606741		
Total	29	184828,1518006			

Média geral = 204,575668

Coefficiente de variação = 13,580 %

APÊNDICE 13. Quadro de análise da variância da variável relação C:N da biomassa microbiana.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	6,4201390			
Épocas	4	71,8655161	17,9663790	11,4579	0,00019
Manejo	1	0,5713201	0,5713201	0,3644	0,55996
Épocas x Manejo	4	27,4510804	6,8627701	4,3767	0,01205
Resíduo	18	28,2246584	1,5680366		
Total	29	134,5327140			

Média geral = 7,536

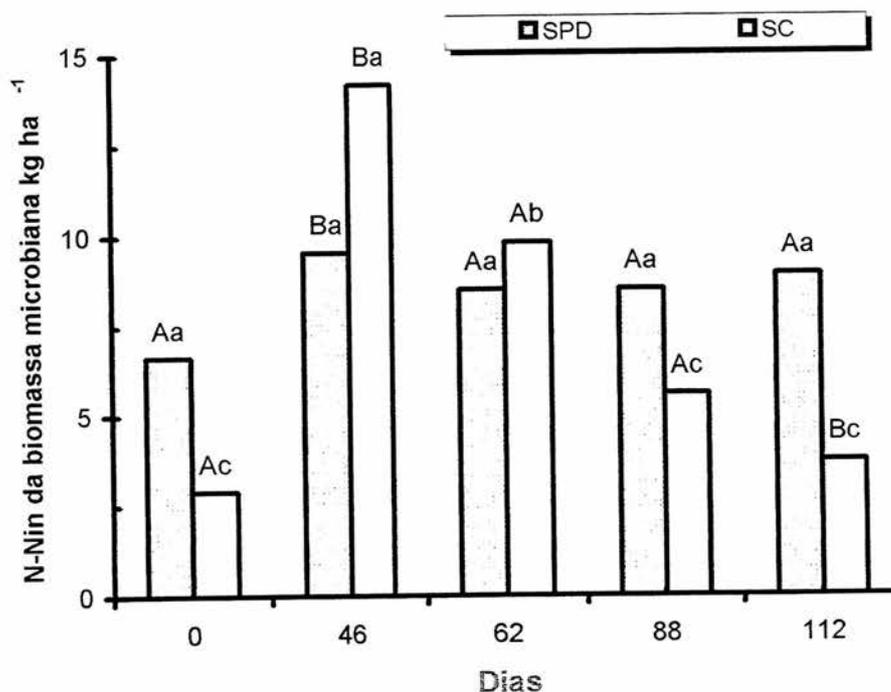
Coefficiente de variação = 16,616 %

APÊNDICE 14. Quadro de análise da variância da variável nitrogênio reativo com ninhidrina da biomassa microbiana.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	3,5092466			
Épocas	4	181,5946121	45,3986530	8,2671	0,00081
Manejo	1	10,5376158	10,5376158	1,9189	0,18022
Épocas x Manejo	4	98,7674795	24,6918699	4,4964	0,01084
Resíduo	18	98,8462110	5,4914562		
Total	29	393,2551650			

Média geral = 7,829333

Coefficiente de variação = 29,931 %



APÊNDICE 15. Nitrogênio reativo com ninhidrina da biomassa microbiana nos sistemas plantio direto e convencional em 5 épocas ao longo do ciclo do milho. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5%. Letras maiúsculas comparam sistemas de manejo dentro de cada época e letras minúsculas comparam épocas dentro de cada sistema de manejo.

APÊNDICE 16. Quadro de análise da variância da variável relação C:N-Nin da biomassa microbiana.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	472,9568623			
Épocas	4	3697,6533183	924,4133296	6,8067	0,00191
Manejo	1	214,8078624	214,8078624	1,5817	0,22276
Épocas x Manejo	4	1023,1033951	255,7758488	1,8833	0,15666
Resíduo	18	2444,5690277	135,8093904		
Total	29	7853,0904658			

Média geral = 35,81

Coefficiente de variação = 32,543 %

APÊNDICE 17. Quadro de análise da variância da variável carboidratos da biomassa microbiana.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	23,4172429			
Épocas	4	2515,5201172	628,8800293	19,2200	0,00002
Manejo	1	355,8340746	355,8340746	10,8751	0,00419
Épocas x Manejo	4	153,8662766	38,4665691	1,1756	0,35477
Resíduo	18	588,9610109	32,7200562		
Total	29	3637,5987222			

Média geral = 24,432667

Coefficiente de variação = 23,412 %

APÊNDICE 18. Teste de Duncan para média de épocas da variável carboidratos da biomassa microbiana.

Dias após semeadura	Médias	5%	1%
	-----kg ha ⁻¹ -----		
0	14,195000	c	D
46	29,436666	b	AB
62	15,220000	c	CD
88	38,733334	a	A
112	24,578334	b	BC

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

APÊNDICE 19. Teste de Duncan para média de sistemas de manejo da variável carboidratos da biomassa microbiana.

Sistema de manejo	Médias	5%	1%
	-----kg ha ⁻¹ -----		
Plantio direto	27,876667	a	A
Convenciona	20,988667	b	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

APÊNDICE 20. Quadro de análise da variância da variável relação C:CHO da biomassa microbiana.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	19,8504592			
Épocas	4	605,6216304	151,4054076	39,5578	0,00001
Manejo	1	75,8112088	75,8112088	19,8072	0,00052
Épocas x Manejo	4	188,5398585	47,1349646	12,3150	0,00014
Resíduo	18	68,8941258	3,8274514		
Total	29	958,7172828			

Média geral = 11,581

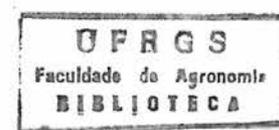
Coefficiente de variação = 16,893 %

APÊNDICE 21. Quadro de análise da variância da variável produtos de PCR de bactérias.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	33,0607926			
Épocas	4	2183,7086579	545,9271645	33,1713	0,00001
Manejo	1	0,3197144	0,3197144	0,0194	0,88563
Épocas x Manejo	4	387,2267244	96,8066811	5,8821	0,00358
Resíduo	18	296,2409715	16,4578318		
Total	29	2900,5568608			

Média geral = 56,394768

Coefficiente de variação = 7,194 %



APÊNDICE 22. Quadro de análise da variância da variável produtos de PCR de fungos.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	13,6240780			
Épocas	4	2626,0338736	656,5084684	45,4129	0,00001
Manejo	1	53,8948124	53,8948124	3,7281	0,06652
Épocas x Manejo	4	173,9663169	43,4915792	3,0085	0,04547
Resíduo	18	260,2160335	14,4564463		
Total	29	3127,7351143			

Média geral = 19,393

Coefficiente de variação = 19,606 %

APÊNDICE 23. Quadro de análise da variância da variável razão dos produtos de PCR de bactérias e de fungos.

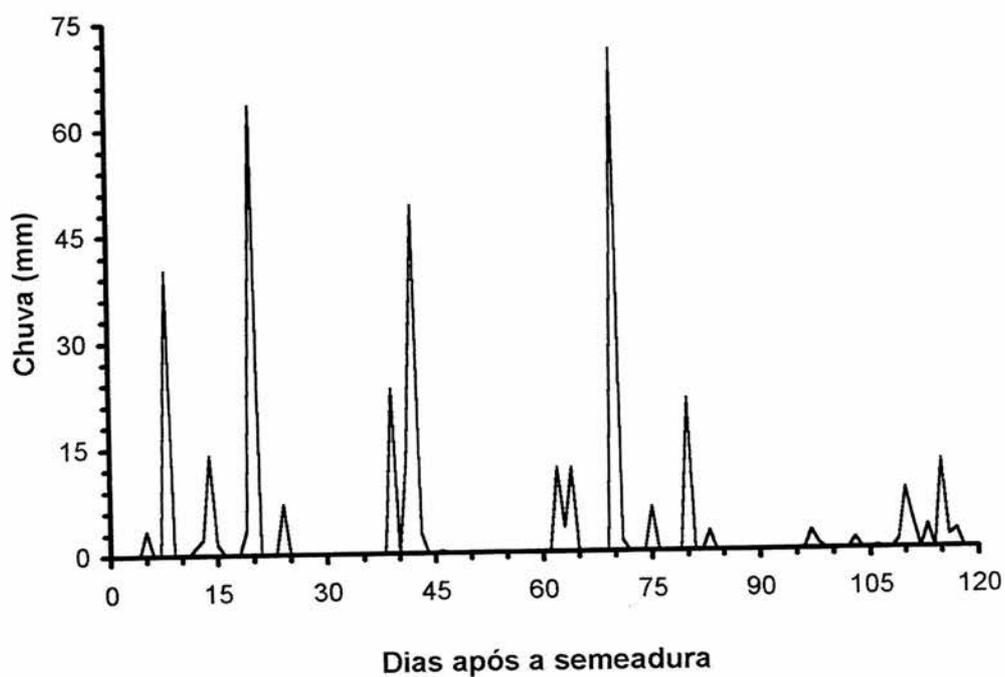
Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Blocos	2	0,2746668			
Épocas	4	168,3038671	42,0759668	74,8253	0,00001
Manejo	1	3,2472298	3,2472298	5,7747	0,02583
Épocas x Manejo	4	23,0362532	5,7590633	10,2416	0,00032
Resíduo	18	10,1218024	0,5623224		
Total	29	204,9838194			

Média geral = 4,091667

Coefficiente de variação = 18,327 %

APÊNDICE 24. Umidade gravimétrica média (%) das amostras de solo nas cinco avaliações.

Dias após semeadura do milho	Sistema de Manejo	
	Plantio direto	Convencional
0	13,08	12,37
46	12,82	8,75
62	11,82	8,82
88	8,73	5,55
112	10,81	8,14



APÊNDICE 25. Precipitação pluviométrica ao longo do ciclo do milho (23/09/1999 a 14/01/2000).