



**LUCAS LORENZON RESENDE LIMA**

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE UM LATOSSOLO  
VERMELHO AMARELO TÍPICO DE CERRADO EM  
RESPOSTA A CALAGEM E ADUBAÇÃO MINERAL**

**LAVRAS-MG**

**2022**

**LUCAS LORENZON RESENDE LIMA**

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE UM LATOSSOLO VERMELHO AMARELO  
TÍPICO DE CERRADO EM RESPOSTA A CALAGEM E ADUBAÇÃO MINERAL**

Monografia apresentada a Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Curso de  
Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

Orientador

M.Sc. Mariana Rocha de Carvalho

Coorientadora

**LAVRAS-MG**

**2022**

**LUCAS LORENZON RESENDE LIMA**

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE UM LATOSSOLO VERMELHO AMARELO  
TÍPICO DE CERRADO EM RESPOSTA A CALAGEM E ADUBAÇÃO MINERAL  
ENZYMATIC ACTIVITY OF A TYPICAL CERRADO'S RED-YELLOW LATOSOL  
IN RESPONSE TO LIMING AND MINERAL FERTILIZATION**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em 13/12/2022

Prof. Luiz Roberto Guimarães Guilherme, Ph.D. UFLA

Dra. Aline Oliveira Silva UFLA

M.Sc. Maila Adriely Silva UFLA

Prof. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

Orientador

M.Sc. Mariana Rocha de Carvalho

Coorientadora

**LAVRAS-MG**

**2022**

## RESUMO

Os atributos microbiológicos são apontados como importantes indicadores da qualidade do solo, visto que respondem rapidamente às práticas de manejo e alterações no solo. O manejo nutricional através do emprego de fertilizantes afeta a atividade enzimática e, por conseguinte a fertilidade do solo, uma vez que as enzimas estão envolvidas na dinâmica dos nutrientes no solo. Neste sentido, buscou-se neste estudo investigar os efeitos da fertilização principalmente com nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), enxofre (S) e micronutrientes na atividade enzimática de um Latossolo Vermelho Amarelo típico da região do Cerrado no Brasil. A fim de apurar esse efeito, foi analisada a atividade das enzimas  $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ -G), fosfatase ácida (FAC) e alcalina (FAL) e arilsulfatase (AR) e da atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) sob os seguintes tratamentos: Controle (sem fertilização), NKS<sub>m</sub> (N, K, S e micronutrientes) e NPKS<sub>m</sub> (N, P, K, S e micronutrientes), em dois níveis de calagem (com e sem calagem). Os resultados indicaram que as enzimas mais afetadas pelos tratamentos de adubação foram a arilsulfatase, fosfatase ácida e alcalina. Porém observou-se que a mudança de pH (potencial hidrogeniônico) proporcionada pela calagem teve efeito preponderante no comportamento enzimático de todas as enzimas, que apresentaram respostas diferenciadas. A enzima arilsulfatase mostrou-se sensível a presença de S, e as fosfatases ácidas e alcalinas a presença de P, uma vez que são enzimas induzíveis e logo suas atividades são amplamente determinadas pela presença destes elementos. A enzima  $\beta$ -glicosidase não demonstrou mudança em sua atividade devido ao manejo de calagem, o que indica que esta pode ser uma ótima enzima no monitoramento da qualidade do solo, pois não é afetada por essa prática agrícola amplamente empregada e que poderia comumente alterar os resultados. Conclui-se através dos resultados que a atividade das enzimas estudadas podem ser indicadores úteis da dinâmica de fertilidade de solo, e que calagem e adubação afetam sua atividade regulando a transformação de nutrientes no solo. Assim depreende-se que o pH e disponibilidade de nutrientes são agentes determinantes para a atividade enzimática e microbiológica do solo. Com isso cuidados são oportunos no manejo destes fatores a fim de minimizar quaisquer impactos negativos na disponibilidade de nutrientes.

**Palavras-chave:** Calagem. Enzimas. Fertilizantes. Manejo nutricional. Microrganismos.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Dinâmica e interações das enzimas no solo. ....	15
Figura 2 - Ciclo simplificado do enxofre. ....	17
Figura 3 - Ação catalítica das enzimas celulasas. ....	20
Figura 4 - Hidrólise realizada pelas enzimas fosfatase ácida e alcalina. ....	23
Figura 5 - Reação da hidrólise de diacetato de fluoresceína com formação do composto colorido fluoresceína. ....	25
Figura 6 - Atividade enzimática de Arilsulfatase em função dos tratamentos aplicados no experimento de adubação (controle, NKSm e NPKSm) e calagem (com e sem calagem) sobre um Latossolo Vermelho Amarelo. ....	34
Figura 7 - Atividade enzimática de $\beta$ -glicosidase em função dos tratamentos aplicados no experimento de adubação (controle, NKSm e NPKSm) e calagem (com e sem calagem) sobre Latossolo Vermelho Amarelo. ....	37
Figura 8 - Atividade enzimática de fosfatase ácida e alcalina em função dos tratamentos aplicados no experimento de adubação (controle, NKSm e NPKSm) e calagem (com e sem calagem) sobre Latossolo Vermelho Amarelo. ....	41
Figura 9 - Atividade hidrolítica FDA em função dos tratamentos aplicados no experimento de adubação (controle, NKSm e NPKSm) e calagem (com e sem calagem) sobre Latossolo Vermelho Amarelo. ....	44
Tabela 1 - Análise do Latossolo Vermelho Amarelo na camada 0-20 cm. ....	28
Tabela 2 - Resultados da ANOVA para atividade enzimática de Arilsulfatase em resposta aos fatores calagem e adubação. ....	34
Tabela 3 - Resultados da ANOVA para atividade enzimática de $\beta$ -glicosidase em resposta aos fatores calagem e adubação. ....	37
Tabela 4 - Resultados da ANOVA para atividade enzimática de fosfatase ácida e alcalina em resposta aos fatores calagem e adubação. ....	40
Tabela 5 - Resultados da ANOVA para atividade hidrolítica de FDA em resposta aos fatores calagem e adubação. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

Al	Alumínio
AR	Arilsulfatase
B	Boro
C	Carbono
Ca	Cálcio
CTC	Capacidade de troca de cátions
Cu	Cobre
FAC	Fosfatase ácida
FAL	Fosfatase alcalina
FDA	Hidrólise de diacetato de fluoresceína
Fe	Ferro
K	Potássio
M.O	Matéria orgânica
MAP	Fosfato monoamônico
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
N	Nitrogênio
P	Fósforo
pH	Potencial hidrogeniônico
S	Enxofre
Zn	Zinco
$\beta$ -G	$\beta$ -glicosidase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Adubação e calagem e sua importância na agricultura</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2</b>	<b>Atividade enzimática no solo</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Arilsulfatase</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2.2</b>	<b><math>\beta</math> -glicosidase</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Fosfatase ácida e alcalina</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta de campo</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Análises químicas e físicas do solo</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3</b>	<b>Delineamento experimental</b> .....	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Correção do solo</b> .....	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>Condução dos experimentos</b> .....	<b>29</b>
<b>4.6</b>	<b>Determinação da atividade enzimática</b> .....	<b>30</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Estimativa da atividade da enzima Arilsulfatase (AR)</b> .....	<b>30</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Estimativa da atividade da enzima <math>\beta</math>-glicosidase (<math>\beta</math>-G)</b> .....	<b>31</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Estimativa da atividade das enzimas Fosfatase ácida (FAC) e alcalina (FAL)</b> ..	<b>32</b>
<b>4.6.4</b>	<b>Quantificação da atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)</b> ....	<b>32</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise de dados</b> .....	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Arilsulfatase</b> .....	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase</b> .....	<b>36</b>
<b>5.3</b>	<b>Fosfatase ácida e alcalina</b> .....	<b>40</b>
<b>5.4</b>	<b>Atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)</b> .....	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em 2050 a população mundial deverá ser cerca de 9,7 bilhões de pessoas segundo a Organização das Nações Unidas (ONU, 2022). Essa tendência deverá ser acompanhada pelo aumento da renda média e poder aquisitivo das populações de baixa e média renda, redução da pobreza, melhoria na distribuição de renda e mudança nos padrões de consumo, o que gerará grande impacto na demanda e consumo de alimentos (TORRES; CAMPOS, 2022).

Com base e em vista destas predições, percebe-se que invariavelmente a agricultura e um dos recursos mais valiosos, o solo, entram nessa equação, estando relacionados para a mitigação de problemas ligados a clima, fome e pobreza, meio ambiente, etc. A partir desse precedente, estabelece-se que o desafio de se produzir mais e com melhor qualidade, seguindo princípios sustentáveis e garantindo a segurança alimentar passa pelo manejo adequado do solo.

O solo constitui-se de um recurso natural não renovável, vivo e dinâmico que necessita de total cuidado e monitoramento com base em seus aspectos físicos, químicos e biológicos (ALEXANDRE, 2015; SILVA et al., 2021). Fundamentado no entendimento destes atributos pode-se entender a qualidade do solo e sua saúde, que é definida como “*A capacidade de um solo funcionar dentro dos limites do ecossistema para sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde de plantas e animais*” (DORAN; PARKIN, 1994, p. 7).

O solo abriga muitas formas de vida e é o meio por onde as plantas encontram os recursos para crescer. Entretanto sua funcionalidade vai muito além, relacionando-se com a produtividade das culturas e dos animais, com a qualidade ambiental e dos recursos naturais, além da saúde de plantas, animais e humanos (DORAN; ZEISS, 2000). Desta maneira é extremamente relevante que se faça o uso sustentável do solo e realize seu monitoramento, no que concerne à sua qualidade.

Assim faz-se necessário o acesso a qualidade do solo, por meio de parâmetros capazes de ilustrar as situações e modificações que ocorrem neste sistema, a fim de entender as práticas que possam ser positivas e negativas e com isso alterar ou manter o manejo. Indicadores físicos, químicos e biológicos podem ser usados. Estratégias que visem o uso de indicadores biológicos podem ser uma ferramenta adequada para avaliar a sustentabilidade do solo, como, por exemplo, a avaliação da atividade enzimática, que é uma indicadora para medir o estado do solo e de sua qualidade (GIANFREDA; RAO, 2014).

As enzimas participam da ciclagem de nutrientes no solo, o que pode favorecer plantas e microrganismos, e desempenham papel essencial em ciclos como do nitrogênio (N), carbono



(C), fósforo (P) e enxofre (S), por exemplo, com enzimas como urease no ciclo do N,  $\beta$ -glicosidase no de C, fosfatases no de P e arilsulfatases no de S (KARACA et al., 2010). A determinação das atividades destas enzimas é muito vantajosa por serem sensíveis as variações de manejo, de simples e fácil análise, são relacionadas à matéria orgânica do solo (M.O), e são capazes de indicar e descrever o estado de qualidade e de fertilidade do solo, e as alterações nele realizadas (BALOTA; CHAVES, 2010; GODLEWSKA, 2018). Elas podem indicar alterações relacionadas ao revolvimento do solo, cobertura do solo, diferentes tipos de manejo, efeitos de pesticidas e de fertilização orgânica e inorgânica, por exemplo (GIANFREDA et al., 2002; KRELING et al., 2022; MELO, 1988).

As fertilizações têm grande importância para a nutrição de plantas, e podem apresentar efeitos sobre os microrganismos e a atividade enzimática. Neste sentido, destaca-se as adubações nitrogenadas, fosfatadas, potássicas, de cálcio, magnésio, enxofre, além das adubações com vários micronutrientes que são amplamente empregados na agricultura. Estes elementos desempenham papéis primordiais em muitos processos fisiológicos podendo atuar na fotossíntese, respiração, na ativação enzimática, crescimento celular, composição de proteínas e enzimas, estrutura celular, entre outros. (MALAVOLTA, 2008; REETZ, 2017; VAN RAIJ, 2011).

Assim, é necessário entender quais os impactos que as adubações e nutrientes adicionados através dela, e também calagem, podem ter sobre a atividade enzimática, e consequentemente na dinâmica de outros nutrientes no solo. Logo o monitoramento das mudanças ocorridas na atividade enzimática induzidas pelas fertilizações e calagem, são cruciais a fim de entender e indicar os efeitos positivos e negativos dessas práticas agrícolas. Portanto indagou-se: qual a influência da adubação mineral e calagem sobre a atividade de diferentes enzimas de um Latossolo Vermelho Amarelo típico da região de Cerrado?

A partir desse pressuposto buscou-se neste trabalho entender a influência de calagem e adubação sobre as enzimas arilsulfatase,  $\beta$ -glicosidase, fosfatase ácida e alcalina e atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína. Partiu-se da hipótese que a adição de fertilizantes e calagem aumentam a atividade destas enzimas no solo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar e avaliar como os manejos de adubação e calagem, e conseqüentemente as mudanças provocadas por eles, afetariam a atividade enzimática e a ciclagem de nutrientes no solo, a fim de aperfeiçoar o manejo integrado de nutrientes.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase
- b) Avaliar atividade enzimática de arilsulfatase
- c) Avaliar atividade enzimática de fosfatase ácida e alcalina
- d) Avaliar a atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Adubação e calagem e sua importância na agricultura

Diante do atual cenário de crescimento populacional mundial para os próximos anos, é primordial que se busquem novas medidas para uma maior produção de alimentos (BOARETTO; JUNIOR; ABREU-JÚNIOR, 2014). Com isso novas tecnologias e ferramentas precisam ser bem utilizadas, aprimoradas e inovadas para que se garanta esse objetivo.

Uma das maneiras para chegar a esse objetivo é o uso de tecnologias e insumos chave como os fertilizantes e o correto manejo de adubação. Os fertilizantes são fundamentais pois através deles há efetividade na nutrição das plantas garantindo altas produtividades e assegurando o acesso a alimentos em quantidade e qualidade, o que contribui para a segurança alimentar da população mundial e proteção do meio ambiente (MACIEL; TUNES, 2021).

Com base nessa premissa, o uso de fertilizantes, emprego correto do manejo da adubação, além do entendimento correto sobre nutrição de plantas e fertilidade dos solos são importantes. A adubação compreende a prática de se adicionar ao solo materiais que tem o papel de disponibilizar para as plantas os nutrientes por elas requeridos, procurando atender sua demanda sem comprometer os recursos naturais (SANTOS; SILVA, 2010). A fertilização pode ser orgânica que são produtos ou subprodutos de origem animal, vegetal, urbana e resíduos de agroindústria; mineral com materiais resultantes de processos industriais; e organomineral que consiste na combinação entre os orgânicos e minerais (SALDANHA et al., 2016).

A prática da adubação dos solos é extremamente necessária dada as características apresentadas pelos solos do mundo que podem apresentar limitações, além do requerimento diferenciado de nutrientes por cada cultura. Alguns solos do Brasil, por exemplo, apresentam caráter ácido com pH baixo, pobreza em nutrientes como N, P, K, Ca, Mg, S, Zn e Cu, baixa capacidade de troca catiônica (CTC), alto poder de fixação de P e altos níveis de  $Al^{3+}$  (BERNARDI; MACHADO; SILVA, 2002). Essas características são ocasionadas principalmente pela localização geográfica, fatores e processos de formação dos solos, como a própria rocha que deu origem ao solo, que pode ser mais rica ou mais pobre em nutrientes e o intenso intemperismo que o solo sofreu (LOPES; GUILHERME, 2007).

Os nutrientes presentes no solo são divididos em macro e micronutrientes, no qual os macronutrientes são exigidos em maior quantidade e micronutrientes em menores quantidades, sendo, entretanto, todos igualmente importantes as plantas, de modo que a carência de qualquer um deles pode reduzir a produtividade (CRAVO; VELOSO, 2008). Os nutrientes não minerais C (carbono), H (hidrogênio), O (oxigênio) são obtidos do ar e da água pelas plantas, e os demais

são absorvidos na forma inorgânica da solução do solo pelas raízes (LOPES, 1998). Os macronutrientes minerais são N (nitrogênio), P (fósforo), K (potássio), Ca (cálcio), Mg (magnésio) e S (enxofre); e os micronutrientes são B (boro), Cu (cobre), Cl (cloro), Fe (ferro), Ni (níquel), Mn (manganês), Zn (zinco) e Mo (molibdênio) (PAULETTI, 2016).

Cada nutriente presente no solo é necessário para que as plantas e microrganismos possam crescer e desenvolver (RESENDE et al., 2016). A maioria dos nutrientes atuam em processos fisiológicos nas plantas como a fotossíntese, respiração, crescimento celular, além de exercerem funções estruturais, de constituição e ativação enzimática, etc. (SALDANHA et al., 2016).

Malavolta (2008) destaca as principais funções destes nutrientes. O C, H e O fazem parte da estrutura de compostos orgânicos; o N compõe ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, participa da fotossíntese; o P regula a atividade de enzimas, compõe ácidos nucleicos, é envolvido com a molécula de ATP; o K está envolvido na ativação de enzimas, abertura e fechamento de estômatos, fotossíntese; o Ca é um componente da parede celular, é ativador de enzimas; o Mg é um mineral constituinte da clorofila, relacionando-se com a fotossíntese; o S está presente em proteínas, enzimas e coenzimas. Estas são algumas das funções importantes de alguns nutrientes amplamente utilizados em maior quantidade. Há ainda também os micronutrientes que são requeridos em menores quantidades, mas que também cumprem funções imprescindíveis, principalmente como ativadores e cofatores enzimáticos.

Em condições tropicais, como a do Brasil, um problema pode ser focalizado para o P, que é a sua disponibilidade limitante. Destaca-se que o P apresenta uma dinâmica de movimento lenta por difusão no solo, e tem a tendência de interagir com os componentes do solo, podendo ser fixado por óxidos de Fe e Al, e argilas silicatadas do tipo 1:1 (BRADY; WEIL, 2013; YAMADA; STIPP; ABDALLA, 2004). Além disso, o P pode precipitar, o que ocorre com as reações do P com Fe e Al em solos ácidos formando compostos insolúveis de fosfato de Fe e Al, e reações do P com Ca em solos alcalinos formando fosfatos insolúveis de cálcio (GYANESHWAR et al., 2002). Assim tais processos indisponibilizam as formas de P no solo dificultando sua absorção pelas plantas, o que exige aplicações de altas doses de fertilizantes fosfatados (TURNER; RABOY, 2003).

No geral para o P, bem como para os outros elementos a adubação majoritariamente se destaca por ser empregada na forma mineral com a utilização de alguns fertilizantes. Os fertilizantes amplamente utilizados podem ser destacados como: fosfato monoamônico (MAP), fosfato diamônico, superfosfato triplo, sulfato de amônio, ureia, nitrato de amônio, cloreto de

potássio, sulfato de potássio, sulfato de cálcio, sulfato de manganês, sulfato de cobre, sulfato de zinco, carbonato de cálcio e magnésio, etc. (REETZ, 2017).

Contudo a eficiência da adubação em geral e a disponibilidade dos nutrientes no solo, dependerá de inúmeros fatores como quantidade e tipo de argila, fonte, modo e época de aplicação de fertilizantes, aeração, compactação, umidade, temperatura, disponibilidade de outros nutrientes, tipo de cultura, teor de M.O e pH (LOPES, 1998). Segundo o mesmo autor, práticas como a calagem em solos de pH ácidos podem ajudar ajustando o pH para a faixas de maior disponibilidade de nutrientes que em geral ficam em torno 6 a 6,5. Ainda, como explicado, com exceção dos elementos Fe, Cu, Mn e Zn, que apresentam diminuição de disponibilidade com o aumento do pH, os demais tem sua disponibilidade aumentada.

Além do efeito em aumentar o pH a prática da calagem também adiciona os nutrientes Ca e Mg no solo (BORGES; SILVA JUNIOR, 2010). A calagem corresponde a prática de adição de corretivos no solo, com a finalidade de neutralizar a acidez e elevar o pH do solo, o que favorece a atividade microbiana, disponibilidade de determinados nutrientes, eficiência de fertilizantes, aumento de CTC e redução da disponibilidade de elementos tóxicos às plantas (WIETHÖLTER, 2000).

Apesar da importância para a agricultura, ressalta-se que na atualidade a utilização de fertilizantes minerais é extremamente alta e é a mais empregada, mas como compõe um recurso que pode em algumas situações ser de baixa eficiência, caro e também finito devido à escassez de fontes de mineração que são presentes e concentradas nas mãos de poucos fornecedores de poucos países; se faz necessário explorar e utilizar mais os resíduos e compostos orgânicos na agricultura (BERNARDI; MACHADO; SILVA, 2002; CALIGARIS et al., 2022).

A M.O e adubação orgânica no contexto do solo são atributos extremamente essenciais e cruciais, por diversos motivos. Os efeitos positivos alcançados por meio do aumento da M.O nos solos são inúmeros como: 1. Estabiliza e agrega partículas de solo, reduzindo a erosão; 2. Melhora armazenamento e fluxo de água e ar no solo; 3. Provê nutrientes como N, P e S; 4. Mantém o solo menos compactado; 5. Aumenta CTC do solo, retendo mais nutrientes como Ca, Mg e K; 6. Provê fontes de C e energia para os microrganismos, entre outros (LOPES; GUILHERME, 2007).

De tal modo, o efeito da adubação orgânica propicia melhorias em propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, melhorando porosidade, retenção de umidade, condiciona menores temperaturas, aumenta fontes de nutrientes (BERNARDI; MACHADO; SILVA, 2002). Os nutrientes presentes na M.O tornam-se disponíveis no solo através da atuação de microrganismos que realizam o processo de mineralização (SALDANHA et al., 2016). Para a

efetuação deste processo, entram em cena os papéis das enzimas produzidas por esses microrganismos e outros organismos do solo.

### **3.2 Atividade enzimática no solo**

O solo é um ambiente complexo, heterogêneo e dinâmico, com características que propiciam vasta diversidade de organismos (MOREIRA, 2009). Neste ambiente estão inseridos diversos organismos que tem o solo como habitat, englobando seres eucariontes e procariontes pertencentes a flora e fauna (macro, meso e microfauna) de diversos tamanhos, como plantas, algas, minhocas, centopeias, insetos, colêmbolos, ácaros, nematoides, protozoários, fungos, bactérias, entre outros (BRADY; WEIL, 2013; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

No contexto dos organismos do solo, destacam-se os microrganismos, que são formados principalmente por bactérias, arqueobactérias, fungos, algas e protozoários, que atuam em processos chave para a manutenção da vida na terra (CERETTA; AITA, 2008). Estes são indispensáveis e desempenham múltiplos processos no ambiente como a decomposição de resíduos orgânicos animais e vegetais, que proporciona a ciclagem e disponibilidade de nutrientes no solo, por meio de sua participação nos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes (COUTINHO et al., 2003; PEDROSA et al., 2015).

Nos ciclos biogeoquímicos a atividade microbiana contribui ativamente e tem participações principalmente nos ciclos de C, N, S, P e Fe (NICOLAU, 2016). Essas transformações mediadas pelos microrganismos denotam elevada importância, visto que estes nutrientes são indispensáveis para o crescimento das plantas e estão em grande parte na forma orgânica precisando ser passados para a forma inorgânica para serem absorvidos pelas plantas (CERETTA; AITA, 2008).

A atuação dos microrganismos é devida em grande parte pela influência de enzimas produzidas por eles, que são responsáveis por mediar estes processos e transformações no solo. Essas enzimas são de natureza proteica e participam nos ciclos biogeoquímicos, sendo capazes de catalisar as reações químicas e desempenhar papéis primordiais na sustentabilidade dos ecossistemas (BALOTA et al., 2013). As enzimas apresentam a capacidade de acelerar as reações diminuindo a energia requerida para que determinada reação ocorra, através da formação de um complexo com substratos (DICK; BREAKWELL; TURCO, 1996). Por meio da formação deste complexo, as enzimas, como resultados do metabolismo microbiano, são capazes de atuar sobre reações de catabolismo com a quebra de compostos orgânicos complexos em compostos mais simples; e anabolismo com a formação de compostos mais complexos a partir de compostos simples (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Todas as reações bioquímicas

no solo são catalisadas por enzimas (TOTOLA; CHAER, 2002) e através de suas interações e funcionamentos no solo exercem funções importantes como funções catabólicas que contribuem para o ciclo de vida de microrganismos, levam a formação de M.O, decomposição de resíduos orgânicos e estruturação do solo (FRIGHETTO; VALARINI, 2000).

A produção de enzimas pode ser desempenhada especificamente por determinados organismos. A principal fonte de enzimas no solo provém da biomassa microbiana, porém podem também ser originados das plantas e resíduos animais (TABATABAI, 1994). Porém, os microrganismos são considerados os principais produtores dessas enzimas no solo (MELO, 1988), possuindo por isso maior relevância nessa atuação.

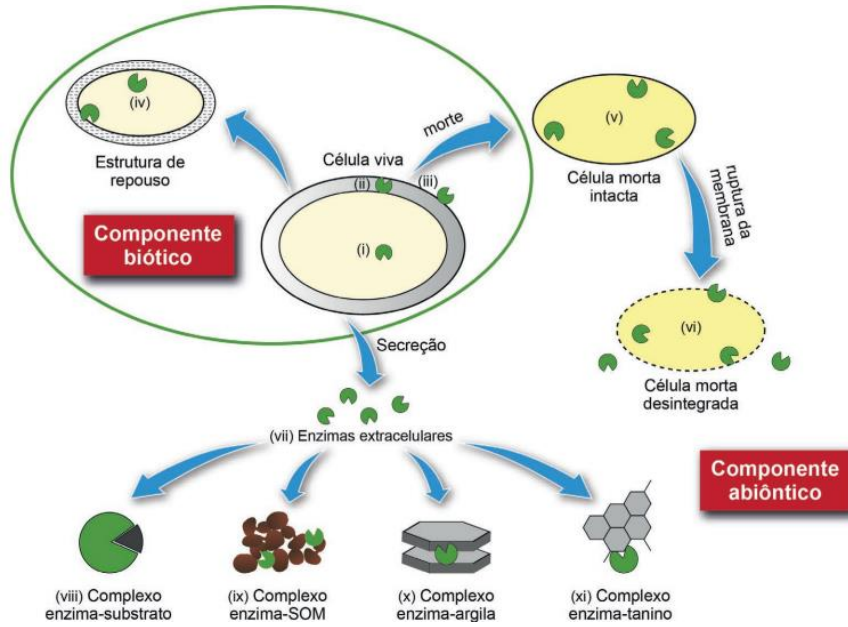
Usualmente as enzimas podem ser encontradas no solo em células microbianas, chamadas de enzimas intracelulares, e de forma não associadas a elas, chamadas de enzimas extracelulares (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007). As primeiras atuam em reações que se passam dentro das células, podendo, entretanto, serem liberadas após a lise celular, desempenhando atividades extracelulares; enquanto que as segundas são programadas para serem liberadas e exercerem sua atividade no exterior da célula, degradando substratos grandes para serem transportados para dentro da célula (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) .

As enzimas intracelulares podem catalisar reações fora e dentro da célula, e se tornam funcionais na mesma célula produtora enquanto as extracelulares se tornam funcionais apenas fora da célula produtora, executando suas funções longe da célula-mãe (KAUR; GOSAL; KHURANA, 2020). Além disso, denota-se que as enzimas intracelulares podem ser encontradas ligadas às paredes celulares de células vivas, no citoplasma da célula, e também em células mortas enquanto as extracelulares são liberadas no solo interagindo com seus componentes podendo ser imobilizadas em argila e coloides húmicos, por interações iônicas, ligações covalentes, ligações de hidrogênio, quelatação e outros (RAO et al., 2017).

No solo, uma série de fatores bióticos a abióticos podem regular a estabilidade, interação de enzimas e substratos, e a atividade enzimática, como a fauna do solo, matéria orgânica, temperatura, umidade, pH, tipo de solo, tipo de cultura e cobertura vegetal, fertilização, poluentes, mudanças climáticas, CO<sub>2</sub> e outros (NANNIPIERI et al., 2012; RAO et al., 2017). Dessa forma, a atividade enzimática total de um solo pode ser vista como produto da complexidade de seus fatores e interações. Neste sentido acentua-se primeiramente que as enzimas são afetadas por fatores químicos, físicos e biológicos do solo. Em segundo lugar a atividade enzimática total do solo pode ser entendida pela combinação destes fatores, juntamente com a atuação de organismos vivos (microrganismos, plantas e animais); e de enzimas abiônicas associadas a fração não viva, que se acumulam no solo, através da adsorção

a argila, M.O que as protegem da degradação por proteases (WALLENSTEIN; BURNS, 2011). Esses mecanismos e interações que regulam a ação das enzimas, podem ser verificados na Figura 1.

Figura 1 – Dinâmica e interações das enzimas no solo.



Legenda: (i) enzimas que atuam no citoplasma de células microbianas, animais e vegetais; (ii) enzimas restringidas ao espaço periplasmático; (iii) enzimas associadas a superfície externa das células viáveis que atuarão no ambiente do solo; (iv) enzimas em células não proliferativas como sementes de plantas, esporos de fungos, endósporos de bactérias; (v) enzimas no interior de células mortas; (vi) enzimas liberadas de células inteiras e células mortas desintegradas; (vii) enzimas extracelulares livres na solução do solo; (viii) enzimas formando o complexo enzima-substrato; (ix) enzimas complexadas a colóides húmicos; (x) enzimas formando o complexo enzima-argila dentro de redes de silicato 2:1; (xi) enzimas associadas a taninos de lixiviados de folhas ou raízes.

Fonte: (MENDES et al., 2020; WALLENSTEIN; BURNS, 2011).

Mediante a estas observações constata-se que quaisquer alterações feitas em atributos físicos, químicos e biológicos podem impactar na atividade enzimática. Tais alterações são provocadas pelas mais diversas práticas agrícolas, como mudanças no manejo do solo, cobertura vegetal, mudanças em condições ambientais, adição de fertilizantes, contaminantes e pesticidas (GIANFREDA; RAO, 2014). Dessa forma a atividade agrícola e poluidores ambientais, podem afetar a composição química e características estruturais do solo, que influenciarão na composição de espécies, abundância e atividade metabólica de microrganismos, refletindo no aumento ou supressão da produção de enzimas e sua atividade (SHERENE, 2017).



Entende-se em vista disso que intervenções de caráter humano e ambiental, podem afetar o comportamento das enzimas, sua produção e atividade; e através delas se pode saber e entender os reflexos das perturbações feitas no presente e no passado. Estas mudanças e perturbações ocorridas, analogamente deixam “impressões digitais no solo”, funcionando como assinaturas biológicas, visto que a atividade enzimática é a somatória da atividade de enzimas de organismos vivos e de enzimas ligadas a fração não viva, que acumulam no solo e que são reflexos diretos das gerações passadas de organismos que estiveram ali presentes (MENDES et al., 2020).

Além disso nota-se que as enzimas podem se configurar como importantes indicadores da qualidade do solo, uma vez que respondem rapidamente as mudanças em seu manejo, quando comparados com outras propriedades físico-químicas e biológicas (GIANFREDA; RAO, 2014). Também sua atividade está relacionada com outros atributos do solo, como M.O, propriedades físicas, atividade e biomassa microbiana (DICK, 1997 apud ARAÚJO; MONTEIRO, 2007), diversidade de organismos no solo (SILVA et al., 2021), comunidade microbiana, fornecendo avaliação integrada do estado biológico do solo (NOGUEIRA; HUNGRIA, 2013).

A escolha das enzimas a serem analisadas seguem os critérios de sensibilidade ao manejo do solo, importância na ciclagem de nutrientes, decomposição da M.O e simplicidade de análise (TOTOLA; CHAER, 2002). Sendo assim as enzimas mais analisadas são aquelas relacionadas aos ciclos da M.O e de macronutrientes C, N, S e P; como as  $\beta$ -glucosidases, arilsulfatase, fosfatases ácida e alcalina (TOTOLA; CHAER, 2002), por exemplo. Também se destaca a quantificação da atividade da hidrólise da fluoresceína (FDA), como medida da atividade microbiana total do solo, visto que esse substrato é hidrolisado por várias enzimas, como proteases, lipases e esterases (CHÁVEZ et al., 2011).

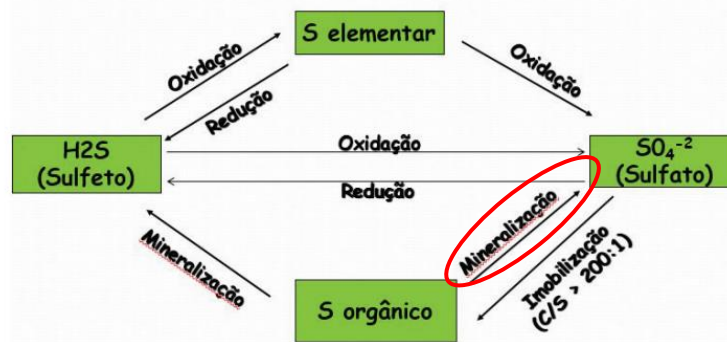
### **3.2.1 Arilsulfatase**

O S é considerado o quarto principal nutriente vegetal depois do N, P e K (ZHAO; TAUSZ; DE KOK, 2008). O S exerce funções primordiais no desenvolvimento e qualidade das plantas, participando na formação de aminoácidos e proteínas, na fotossíntese, controle hormonal e mecanismos de defesa de plantas contra patógenos (VITTI; OTTO; SAVIETO, 2015). O S é requerido para síntese de proteínas e enzimas, e é constituinte de aminoácidos como metionina e cisteína (KLOSE et al., 2011), para a síntese de vitaminas, coenzimas, óleos glicosídeos, ligações estruturais e na ativação de certas enzimas (COLEMAN, 1966). Por seu papel na estrutura e funcionamento das enzimas efetua papéis relevantes na defesa de plantas

contra estresses, pragas, metais-tóxicos, xenobióticos, estresses oxidativos, pragas e herbivoria, evidenciando seu papel decisivo no crescimento de plantas, resistência a estresses abióticos e bióticos, afetando a qualidade dos alimentos (ZHAO; TAUSZ; DE KOK, 2008).

Em solos, o S ocorre nas formas orgânicas e inorgânicas, sendo o S orgânico constituinte de mais de 95% do S total em solos de regiões temperadas, úmidas e semiúmidas; e a proporção dessas formas variam de acordo com tipo de solo e profundidade de amostragem (TABATABAI, 1984). Os compostos orgânicos com S estão indisponíveis para as plantas e precisam ser convertidos para a forma inorgânica ( $\text{SO}_4^{-2}$ ), através da mineralização bioquímica ou microbiana para serem absorvidos pelas plantas (CASTELLANO; DICK, 1991). A Figura 2 ilustra o ciclo simplificado do S no solo.

Figura 2 - Ciclo simplificado do enxofre.



Legenda: Processos de transformação do enxofre no solo. O S orgânico compreende uma fonte essencial de enxofre no solo e sua transformação em S inorgânico (Sulfato) através do processo mineralização, é altamente mediado pela ação das enzimas arilsulfatase.

Fonte: Vitti, Otto e Savieto (2015)

Muitas das transformações do S são catalisadas por enzimas liberadas no solo por microrganismos, raízes de plantas, fauna do solo (KLOSE et al., 2011). A mineralização em solos é principalmente biológica, e a quantidade total de S mineralizável, varia conforme suas propriedades físicas e químicas (PIRELA; TABATABAI, 1988). Neste contexto, insere-se a enzima arilsulfatase (AR), que participa de maneira importante nestas etapas. A AR é responsável pela ciclagem do S no solo, participando dos processos de mineralização do S orgânico, disponibilizando-o as plantas (KLOSE; MOORE; TABATABAI, 1999). Exerce papel essencial na hidrólise de éster de sulfato (GUNJAL et al., 2019), que representa uma importante fração do total de S orgânico e que é considerada a fração mais lábil de S orgânico no solo (ERIKSEN; MURPHY; SCHNUG, 1998).

A AR opera a hidrólise de sulfatos aromáticos ( $R-O-SO_3^-$ ), em fenóis ( $R-OH$ ) e sulfato ou sulfato de enxofre ( $SO_4^{2-}$  ou  $SO_4-S$ ) (VERMA et al., 2018). Esta enzima catalisa a hidrólise de S ligado a éster por meio da fissão da ligação O-S, na reação de água e arilsulfato (éster de sulfato) que resulta em fenol, íon hidrogênio e sulfato (KLOSE et al., 2011). O S inorgânico, sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), por sua vez se torna disponível para plantas e microrganismos. A reação da enzima ocorre da seguinte forma:



A AR é produzida por fungos, bactérias, animais e plantas, porém com maior predominância em microrganismos (GERMIDA; WAINWRIGHT; GUPTA, 1992). Conforme estas características apresentadas por essa enzima e pela dinâmica do elemento S no solo, constata-se que sua atividade pode ser impactada por numerosas causas ligadas aos componentes do solo, ambiente e outros, que medeiam a microbiota e a dinâmica deste elemento.

A atividade de AR é afetada pela concentração de S inorgânico no solo (DOTANIYA et al., 2019), havendo a indução de sua síntese e atividade em condições de baixa disponibilidade de S inorgânico (MCGILL; COLE, 1981). Em situações em que a demanda microbiana por sulfato inorgânico não pode ser encontrada no solo, a AR é usada para hidrolisar éster de sulfato a fim de obtê-lo; e ao contrário altos níveis de sulfato inibem a mineralização biológica (ERIKSEN; MURPHY; SCHNUG, 1998).

Visto que o “status” do elemento S no solo está diretamente ligado a microbiota presente, os aspectos que afetam esses processos, impactarão na dinâmica da enzima. Podem impactar deste modo fatores como a lixiviação, erosão, absorção pelas plantas, adição de fertilizantes, práticas de manejo, teor de M.O, condições físicas, químicas e biológicas do solo (ERIKSEN; MURPHY; SCHNUG, 1998).

A vista disso, inúmeras outras causas têm sido relatadas influenciando positivamente ou negativamente na atividade de AR em solos. Sua atividade é inibida e reprimida pela presença de fosfato e sulfato, já que o  $SO_4^{2-}$  é facilmente dessorvido dos coloides pelos fosfatos (SCHERER, 2001). Como o fosfato é adsorvido preferencialmente nos sítios dos coloides do solo, pode-se haver deficiência de S no solo estimulando a produção e atividade da AR (MENDES; REIS JUNIOR, 2004). Ademais o uso de fertilizantes minerais com N, P e K podem afetar sua atividade (HOLÍK et al., 2019).

O pH é um dos principais agentes controladores da atividade de AR e em situações de mais proximidade a neutralidade, em pH em torno de 6,2, tem ocorrido maior atividade, quando comparado a solos mais ácidos (CHEN et al., 2019; SHERENE, 2017). É também uma enzima sensível aos impactos adversos de metais tóxicos no solo, podendo ser usada como importante indicador para o estudo da toxicidade por metais tóxicos (XIAN; WANG; CHEN, 2015).

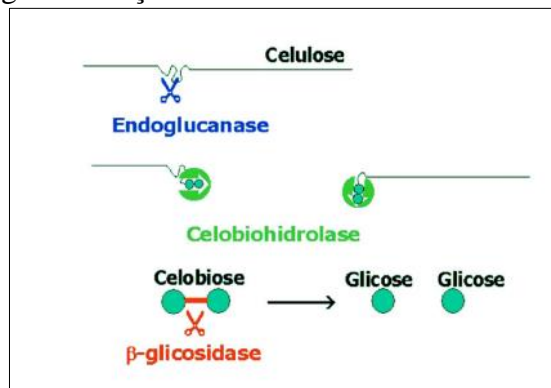
A atividade de AR é correlacionada com o conteúdo de M.O do solo, e diminui com o aumento de sua profundidade, reflexo dos menores teores de M.O. com o aumento da profundidade do perfil do solo (KNIGHTS et al., 2001; TABATABAI; BREMNER, 1970b). Ademais, o revolvimento e cobertura do solo tem evidenciado efeito na atividade da enzima; sendo constatado maior atividade em sistemas conservacionistas como florestas e plantio direto, do que em sistemas convencionais de cultivo (BALOTA et al., 2014; KAUR; GOSAL; KHURANA, 2020). Tal fato é comprovado em estudos em que a atividade de AR aumenta em virtude de maior cobertura e sem o preparo do solo (BALOTA et al., 2011).

### 3.2.2 $\beta$ -glicosidase

A enzima  $\beta$  -glicosidase ( $\beta$ -G) age no solo na etapa final de degradação da celulose, hidrolisando resíduos de celobiose e liberando glicose, que é uma fonte fundamental de energia para os microrganismos (MAKOI; NDAKIDEMI, 2008). É uma enzima importante pois reflete diretamente na habilidade do solo em quebrar a celulose (SARATHCHANDRA; PERROT, 1984).

A celulose, é o principal componente da parede celular (DAROIT, 2007) e corresponde a molécula orgânica mais abundante da natureza (TOTOLA; CHAER, 2002). Sua hidrólise e degradação no solo depende da atuação de enzimas pertencentes ao grupo das celulasas que envolvem três tipos de enzimas, sendo elas endoglucanases, exoglucanases e glicosidases. As endoglucanases (endo-1,4-glucanase), cortam a cadeia polissacarídica da celulose de maneira aleatória, gerando oligossacarídeos e novas extremidades de cadeia; as exoglucanases ou celobiohidrolases (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases) atuam nas extremidades redutoras e não redutoras das cadeias de polissacarídeos liberando glicose e celobiose (LYND et al., 2002). As glicosidases, entre elas a  $\beta$ -G, por fim atuam na hidrólise de celobiose e de cadeias curtas de oligossacarídeos liberando glicose (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002). Tais mecanismos podem ser notados na Figura 2.

Figura 3 - Ação catalítica das enzimas celulases.



Legenda: Processo de decomposição e catálise da celulose pelo complexo enzimático de celulases, na geração de glicose ao final das reações.

Fonte: Ogeda e Petri (2010)

Neste sentido a  $\beta$ -G tem participação crucial na ciclagem do C no solo, principalmente na decomposição de constituintes celulósicos de plantas (PAZUTTI; CHAER, 2012). Na natureza está amplamente distribuída e associada ao ciclo do C, cumprindo papel essencial na degradação de carboidratos no solo, e o produto de sua reação é considerado uma importante fonte energia para os microrganismos (EIVAZI; TABATABAI, 1988). São produzidas por bactérias, fungos, leveduras, plantas e animais (VEENA et al., 2011). Na medida em que são sintetizados por organismos do solo, condições físicas, químicas adequadas, além do aporte de M.O favorecem a sua atividade enzimática (PAZUTTI; CHAER, 2012). Desta forma vários fatores que ocorrem no solo podem afetar o funcionamento e atividade dessa enzima como os fatores químicos, físicos e biológicos.

Nessa perspectiva a atividade da enzima  $\beta$ -G, pode ser um bom indicativo das alterações ocorridas no solo e em sua qualidade. A atividade de  $\beta$ -G é uma boa indicadora de qualidade do solo, já que são sensíveis a influência de mudanças ocorridas e seu uso, demonstrando sensibilidade a uma variedade de manejos, a vários tipos de solo e texturas (ALMEIDA; NAVES; MOTA, 2015). Baseado nisso muitos fatores são reconhecidamente interferentes na atividade desta enzima. Em condições de baixa umidade no ambiente, alta salinidade e baixas temperaturas, sua atividade diminui, sendo que também a qualidade e quantidade de M.O, interferem nessa dinâmica (ALMEIDA; NAVES; MOTA, 2015). É sensível também às modificações no pH, tornando-se um bom indicador bioquímico (KAUR; GOSAL; KHURANA, 2020) de modo que o aumento no pH leva a um aumento em sua atividade (ACOSTA-MARTÍNEZ; TABATABAI, 2000; EKENLER; TABATABAI, 2003b).

Para mais, esta enzima apresenta também correlação com a profundidade e tipo de manejo do solo. Com o aumento da profundidade a atividade desta enzima tende a diminuir,

em razão do decréscimo de M.O (EIVAZI; TABATABAI, 1990; TAYLOR et al., 2002). Já em relação ao sistema de cultivo sua atividade tem se mostrado superior, em plantio direto e orgânico, em relação ao sistema convencional de cultivo (EVANGELISTA et al., 2012; LISBOA, 2009).

No Brasil, essa enzima juntamente com a enzima arilsulfatase, tem ganho grande destaque por suas características importantes na identificação de alterações no solo sejam positivas ou negativas (MENDES; SOUSA; REIS JUNIOR, 2015). Segundo Mendes et al. (2020), estas enzimas apresentam características vantajosas como coerência, precisão, sensibilidade, simples determinação analítica e reprodutibilidade. Ainda, segundo os mesmos autores estas enzimas estão correlacionadas a diversos atributos e enzimas do solo como carbono da biomassa microbiana, respiração basal, atividade da enzima fosfatase ácida, celulase, desidrogenase, podendo assim dar evidências do funcionamento da maquinaria biológica dos solos.

### **3.2.3 Fosfatase ácida e alcalina**

O P é um elemento importante para as plantas. Entra na composição de ácidos nucleicos de genes e cromossomos, coenzimas, fosfoproteínas, fosfolipídeos; e tem funções primordiais na respiração, fotossíntese e transferência de energia nas células (GRANT et al., 2001). É um nutriente de lenta difusão e apresenta-se dissolvido na solução do solo principalmente em forma de íons ortofosfato nas formas  $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (SOUSA et al., 2010).

Contudo o elemento P dispõe de diversos entraves que limitam a sua disponibilidade para as plantas e microrganismos, relacionados a seu ciclo e interações com o solo. Conforme as características do solo e do ambiente podem estar em formas disponíveis ou indisponíveis para sua assimilação. Neste sentido os maiores processos ocorridos envolvendo este elemento, englobam sua absorção pelas plantas, ciclagem de resíduos vegetais e animais, mineralização e imobilização por microrganismos, fixação nos argilominerais do tipo 1:1, principalmente a caulinita e superfície de óxidos, além da possibilidade de solubilização desse fosfato (STEVENSON; COLE, 1999)

No solo o P pode apresentar-se em formas orgânicas e inorgânicas, no qual esta última é a forma assimilada pelas plantas e microrganismos. A forma orgânica de P pode constituir de 5 % a 50 % do P total de um solo, e para ser assimilada pelas plantas e microrganismos é preciso a atuação de enzimas que possam mineralizar esse P orgânico (ŠARAPATKA, 2003). A forma orgânica de P não é diretamente disponível para os organismos não podendo ser absorvida pelas células; já que para a captação celular, o P, precisa ser liberado das moléculas orgânicas por

meio da mineralização, que é controlada por enzimas fosfatases (PAUL, 2007). As fosfatases são enzimas produzidas por raízes de plantas e microrganismos como fungos e bactérias que mineralizam o P orgânico, liberando íons ortofosfato no solo (SANTOS et al., 2015). Clivam grupos fosfatos de seus substratos e são produzidas como resultado da demanda de P por plantas e microrganismos, disponibilidade de substrato orgânico e limitação de P no solo (MARGALEF et al., 2017)

Fosfatase é uma designação genérica que descreve um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres e anidridos de ácido fosfórico (FRIGHETTO; VALARINI, 2000), e são categorizadas baseados no número de ligações hidrolisadas para liberação de ortofosfato e o pH ótimo para a sua atividade (DOTANIYA et al., 2019). São classificadas em alguns tipos segundo os compostos que hidrolisam como: fosfotriesterases, fosfodiesterases, metafosfatase, pirofosfatase e fosfomonoesterase (BALOTA et al., 2013).

As fosfomonoesterases são as mais estudadas entre as fosfatases, e englobam as fosfomonoesterases ácidas e alcalinas que hidrolisam ligações monoésteres, que incluem mononucleotídeos e fosfatos de açúcar (NANNIPIERI et al., 2011). São classificadas como ácidas e alcalinas por apresentarem ótima atividade sobre condições de acidez e alcalinidade no solo (DODOR; TABATABAI, 2003). A fosfatase ácida (FAC) é desse modo encontrada principalmente em solos ácidos com pH entre 4 – 6, enquanto a alcalina (FAL) em pH de 9 – 11 (ADETUNJI et al., 2017). Com o aumento do pH do solo, a atividade da FAL aumenta, enquanto a de FAC diminui (DICK; CHENG; WANG, 2000).

Estas FACs e FALs, ocorrem no solo como enzimas endocelulares ou em estado livre, podendo ser sorvidas a coloides orgânicos, silte e argila (BURNS, 1982; NANNIPIERI; CECCANTI; BIANCHI, 1988). As FALs são documentadas essencialmente sendo produzidas por microrganismos, principalmente por fungos e bactérias, e não são produzidas por plantas; enquanto a ácida é produzida por microrganismos e plantas (DOTANIYA et al., 2019; JUMA; TABATABAI, 1988a). Ambas as enzimas hidrolisam ligações monoéster para produzirem fosfato livre. A reação que envolve estas enzimas pode ser conferida conforme mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Hidrólise realizada pelas enzimas fosfatase ácida e alcalina.



Legenda: Transformação de fontes orgânicas de fósforo indisponível (fosfato monoéster) no solo, em formas inorgânicas de fósforo disponível, por meio das enzimas fosfomonoesterases.

Fonte: adaptado de Turner e Haygarth (2005)

Essas enzimas são consideradas induzíveis, ou seja, são sintetizadas em condições de baixa disponibilidade de P inorgânico no solo (SOUZA, 2004). Dado esse fato pode-se entender que os fatores bióticos e abióticos relacionados ao ciclo do P no solo, e as condições físicas, químicas e biológicas do solo, podem predispor e impactar de forma conjunta determinado comportamento dessas enzimas. Assim neste sistema vários fatores poderão influir sobre a produção e atividade de FACs e FALs.

Na literatura múltiplos autores apontam fatores que podem alterar a atividade destas enzimas de forma positiva ou negativa, mostrando que pode haver diferenças do impacto de cada um em relação a FAC e FAL, dado suas características específicas (FERNANDES et al., 1998; JANES-BASSETT et al., 2022; NANNIPIERI et al., 2011). Desta maneira vários fatores influenciam como fertilização e disponibilidade de nutrientes no solo, manejo e cobertura do solo, valor de pH, teor de M.O, presença de metais tóxicos, umidade, temperatura, etc.

Suas atividades estão ligadas diretamente aos teores de P inorgânico no solo, e a deficiência deste nutriente interfere no desempenho das enzimas (GOMIDE; SILVA; SOARES, 2011), havendo maior atividade em condições de baixa disponibilidade de P inorgânico (ŠARAPATKA, 2003). São produzidas quando o teor de P disponível cai para níveis críticos para o crescimento de plantas e microrganismos (BALOTA et al., 2014). Em vista disso a adubação fosfatada pode afetar a atividade destas fosfatases, aumentando sua atividade após a adição de pequenas doses de fertilizantes, mas decrescendo com doses mais elevadas (MELO, 1988).

Ainda é evidenciado que a adubação com N tem aumentado a atividade destas enzimas, visto que a disponibilidade de N é necessária para que os organismos invistam na produção de fosfatases e que o requerimento em P só se torna limitante ao crescimento, onde há disponibilidade de outros nutrientes como o N (MARGALEF et al., 2017).



Também podem ser enzimas indicadoras de contaminações no qual as atividades das enzimas FAL e FAC têm sido monitoradas para avaliar os efeitos de vários poluentes no solo (NANNIPIERI et al., 2011). Além disso pesticidas e metais tóxicos mostram diversos efeitos sobre estas enzimas, podendo levar a um aumento, diminuição ou neutralidade em suas atividades enzimáticas (ŠARAPATKA, 2003)

FALs e FACs mostram forte relação com a M.O do solo, e podem aumentar significativamente após a aplicação de compostos orgânicos (AON; COLANERI, 2001; FERNANDES et al., 1998). As enzimas diminuem sua atividade com a profundidade do solo em decorrência da diminuição dos teores de M.O (PANG; KOLENKO, 1986).

Sobre sistemas de plantio direto, com cobertura do solo e sem revolvimento sua atividade tem se mostrado maior em comparação com sistemas de manejo convencional com revolvimento, uma vez que promovem manutenção de M.O no sistema (DENG; TABATABAI, 1997; GREEN et al., 2007; PANDEY; AGRAWAL; BOHRA, 2014). Essas enzimas manifestam grande dependência de padrões climáticos, condições locais de disponibilidade de água e temperatura, aumentando sua atividade com altas temperaturas e precipitações (MARGALEF et al., 2017). Estes fatores promovem grande desenvolvimento de comunidades microbianas e raízes de plantas (ŠARAPATKA, 2003).

#### **3.2.4 Atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)**

Com o crescente interesse em estudos integrados no ecossistema do solo, se faz necessário dispor de um método capaz de medir o potencial geral da atividade microbiana do solo (GREEN; STOTT; DIACK, 2006). Geralmente mais de 90% do fluxo de energia no sistema solo passa através dos decompositores microbianos, e por isso, um indicador capaz de medir a atividade destes decompositores se faz necessária, fornecendo uma boa avaliação da atividade microbiana total do solo (PATLE; NAVNAGE; BARANGE, 2018).

De encontro com essa perspectiva e demanda dispõe-se do método da quantificação da atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), que é capaz de ilustrar bem o funcionamento da microbiota do solo. É um método que não mensura especificamente a atividade de uma enzima, mas sim de um grupo de enzimas como lipases, proteases e esterases (ROCHA, 2020).

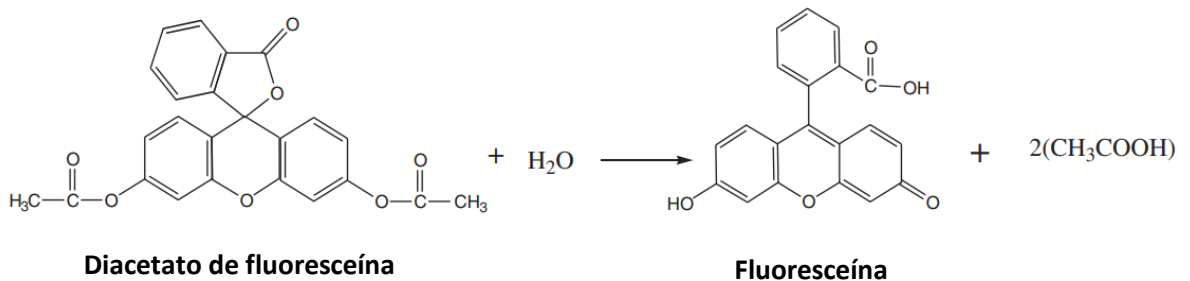
Essas enzimas são abundantes no solo, estão envolvidas na decomposição de vários compostos orgânicos (ADAM; DUNCAN, 2001) e expressam bem a atividade microbiológica total e qualidade do solo (LANNA, 2002). São capazes de hidrolisar compostos fluorogênicos e podem estar presentes como enzimas livres (exoenzimas) ou enzimas ligadas a membrana

celular (DOTANIYA et al., 2019). Esta habilidade hidrolítica está difundida principalmente entre os maiores decompositores do solo como bactérias e fungos (SCHNURER; ROSSWALL, 1982).

Deste modo a mensuração da atividade microbiológica total do solo pelo método FDA pode ser extremamente vantajosa. É um método enzimático que consegue mensurar em uma grande variedade de números de amostras, as atividades microbianas, sejam de populações cultiváveis ou não (RIBEIRO; ÖSTERREICHER-CUNHA; SILVA, 2015). Sendo assim, a mensuração por meio deste método, é muito importante, visto que dão indícios do potencial do solo em suportar processos bioquímicos que são cruciais para manter sua saúde e fertilidade (PATLE; NAVNAGE; BARANGE, 2018).

A determinação da hidrólise de FDA, possui grandes vantagens, mostrando-se como um método simples, rápido, sensível, preciso e útil para vários estudos (ADAM; DUNCAN, 2001; SCHNURER; ROSSWALL, 1982). O método FDA, fundamenta-se na formação de um produto final colorido, a fluoresceína, a partir da hidrólise do diacetato de fluoresceína que é um composto incolor (LANNA, 2002). A reação pode ser vista a seguir conforme Figura 5:

Figura 5 – Reação da hidrólise de diacetato de fluoresceína com formação do composto colorido fluoresceína.



Legenda: Processo de transformação do diacetato de fluoresceína em fluoresceína, realizado por várias enzimas existentes no solo como lipases proteases e esterases. A hidrólise de FDA é um método por este motivo capaz de representar a atividade microbiana em amostras de solo.

Fonte: Green, Stott e Diack (2006)

A fluoresceína, que é um composto colorido de coloração amarelo-esverdeado, permanece dentro da célula causando fluorescência, possibilitando a quantificação por fluorometria ou espectrofotometria a 490 nm (DICK; BREAKWELL; TURCO, 1996; KUMAR; CHAUDHURI; MAITI, 2011). De acordo com a quantidade de cor fluorescente formada, constata-se a atividade enzimática da comunidade microbiana na amostra, sendo que por espectrofotometria a intensidade de cor medida é comparada a uma curva padrão a fim de determinar a atividade microbiana relativa em uma amostra (PATLE; NAVNAGE; BARANGE, 2018).

Inúmeros estudos têm sido utilizados para a mensuração e determinação da FDA, que pode por sua vez apontar, destacar e revelar as práticas e condições que mais impactam no funcionamento destas enzimas. Com isso pode-se entender quais as práticas promovem o aumento e a diminuição da atividade das enzimas e, conseqüentemente, da microbiota do solo. Com isso, como apontados por diversos estudos, vários fatores e práticas aplicadas ao ecossistema solo, impactam no comportamento enzimático de maneira positiva ou negativa (GHINI; MENDES; BETTIOL, 1998; OLIVEIRA et al., 2004; SÁNCHEZ-MONEDERO et al., 2008).

Neste sentido o método FDA mostra-se eficiente como bioindicador da atividade microbiana, e pode ser empregado no intuito de determinar a sua qualidade e auxiliar em estudos de monitoramento de solos (OLIVEIRA et al., 2014). Tem sido apontado como um método relacionado a supressividade contra patógenos, avaliação da quantidade e qualidade da M.O e cobertura do solo, diferenciação de sistemas de manejos sustentáveis, etc. Desta forma pode indicar técnicas de manejo benéficas ao solo e apontar medidas para o reestabelecimento de sua saúde.

Alguns estudos encontraram alta correlação positiva entre a supressividade a patógenos, e a atividade microbiana total avaliada pela taxa de FDA (CHEN; HOITINK; MADDEN, 1988; GHINI; MENDES; BETTIOL, 1998; INBAR; BOEHM; HOITINK, 1991). Conclui-se nestes estudos que uma alta atividade de hidrólise FDA representa uma alta atividade microbiana no solo que por sua vez desempenham um papel essencial na supressão de doenças, reduzindo a incidência e aparecimento de patógenos. Comprova-se desse modo a importância da microbiota do solo no controle natural de patógenos.

A alta atividade microbiana associada a alta hidrólise de FDA, também se relaciona grandemente com os níveis de M.O no solo e profundidade. Têm forte relação a M.O, e aumentam fortemente a seu incremento no solo (GHINI; MENDES; BETTIOL, 1998; SÁNCHEZ-MONEDERO et al., 2008; TRANNIN; SIQUEIRA; MOREIRA, 2007). Conforme o aumento em profundidade sua atividade diminui em decorrência ao decréscimo nos níveis de M.O (FRIGHETTO; VALARINI, 2000; SCHNURER; ROSSWALL, 1982).

A atividade de FDA se perfaz como um método útil além do mais para a diferenciação de sistemas de manejo e sua sustentabilidade. Sua atividade demonstra-se maior em sistemas que promovem a maior cobertura do solo (KUMAWAT et al., 2017) e em sistemas de plantio direto sem revolvimento do solo e com rotação de cultura (BENINTENDE et al., 2008; VARGAS GIL et al., 2009). Além disso em sistemas de agricultura orgânica, plantio direto e

ecossistemas nativos se mostram maior em comparação a sistemas convencionais e que prezam pela monocultura e revolvimento do solo (KARACA et al., 2010; KREMER; LI, 2003).

O pH é um fator controlador da atividade de hidrólise de FDA, e o valor ideal varia entre 5 e 8,5, sendo mais relatado em condições ligeiramente alcalinas (KUMAR; CHAUDHURI; MAITI, 2011). Apresenta também relação com contaminantes, e tem sido avaliado como indicador da atividade microbiana em solos contaminados, podendo indicar a disponibilidade de metais tóxicos e o impacto destes sobre a microbiota do solo (BOUGHATTAS et al., 2019; RIBEIRO; ÖSTERREICHER-CUNHA; SILVA, 2015; YANG et al., 2014). Também variam conforme umidade e temperatura exibindo máxima atividade em 30°C e em estações de verão em comparação com primavera e inverno (KUMAR; CHAUDHURI; MAITI, 2011; XIA; WANDER, 2021).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Coleta de campo**

O solo utilizado no experimento foi coletado em uma área de mata nativa com vegetação típica de Cerrado em setembro de 2020, no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, e foi classificado como Latossolo Vermelho Amarelo (SANTOS et al., 2018), com teor de argila de 32 %. Foi coletada uma amostra composta de três subamostras de solo na profundidade de 0 – 20 cm, para a caracterização química e física do solo da área. As subamostras foram homogeneizadas e encaminhadas para serem analisadas pelo Laboratório de Análises de Solo do Departamento de Ciência do Solo da UFLA (DCS/UFLA). Em laboratório, a amostra foi destorroada e colocada para secagem em estufa a 40°C. Após seca, a amostra foi passada em malha de 2 mm e analisada química e fisicamente.

Para a condução do experimento foram coletadas quantidades de solos na camada de 0 – 20 cm. O solo foi encaminhado para o DCS/UFLA. Lá os solos foram espalhados em superfície plana para secagem ao ar, destorroados e peneirados em malha 2 mm. Em seguida foram homogeneizados e transferidos para sacos plásticos com capacidade de 12 L. Cada saco plástico recebeu 4 kg de solo seco, totalizando-se 24 sacos plásticos.

### **4.2 Análises químicas e físicas do solo**

As análises químicas e físicas seguiram os procedimentos de rotina do Laboratório de Análises de Solo/DCS UFLA, conforme manual da EMBRAPA (TEIXEIRA et al., 2017). Ca, Mg e Al trocáveis foram extraídos com KCl 1 mol L<sup>-1</sup>; P, K, Zn, Cu, Mn e Fe disponíveis

utilizou-se o extrator Mehlich-1; enquanto S foi extraído em fosfato monocálcio em ácido acético (FMCa-HAC); e B disponível em água quente. A extração da acidez potencial (H+Al) foi feita com o extrator SMP. A M.O no solo foi determinada por oxidação com  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  4 N +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 N. A capacidade de troca de cátions (CTC) foi calculada pela soma dos parâmetros de somas de bases ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ ) e acidez potencial (H+Al<sup>3+</sup>). O pH das amostras foi determinado em água e a leitura foi aferida em pHmetro (TABELA 1).

A análise de textura do solo foi realizada seguindo os procedimentos de rotina do Laboratório de Física do Solo/DCS UFLA. Empregou-se o método da pipeta para a determinação granulométrica, com determinação das frações areia, silte e argila, com separação das frações, secagem em estufa e pesagem. Os resultados das análises físicas e químicas do solo estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise do Latossolo Vermelho Amarelo na camada 0-20 cm.

	<b>pH</b>	<b>M.O</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Al</b>	<b>H+Al</b>	<b>SB</b>	<b>T</b>	<b>m</b>	<b>V</b>
Horizonte	H <sub>2</sub> O	dag kg <sup>-1</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----				-----		-----%-----		
0-20 cm	5,1	1,01	0	0,1	0,19	0,16	0	2,3	0,45	3,08	0	14,4

	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cu</b>	<b>B</b>	<b>S</b>	<b>Argila</b>	<b>Silte</b>	<b>Areia</b>
Horizonte	-----mg dm <sup>-3</sup> -----						----- dag kg <sup>-1</sup> -----		
0-20cm	1,03	73,83	8,83	1,57	0,28	4,07	32	6	62

Fonte: Do autor (2022).

### 4.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, os tratamentos foram: três tipos de manejo de adubação, sob dois níveis de correção de pH (com e sem calagem), com quatro repetições cada, totalizando 24 unidades experimentais. Os tipos de manejo de adubação foram: controle (sem fertilização), NKS<sub>m</sub> (N, K, S e micronutrientes) e NPKS<sub>m</sub> (N, P, K, S e micronutrientes). No tratamento NPKS<sub>m</sub> foi incrementado apenas o fertilizante MAP em relação ao tratamento NKS<sub>m</sub>.

### 4.4 Correção do solo

A calagem foi realizada nos tratamentos com calagem e a correção do pH tomou como base o método de saturação por bases para elevação da saturação a 80% segundo manual 5ª aproximação (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ V., 1999); enquanto a outra metade

permaneceu em seu valor de pH nativo (5,1). O pH dos tratamentos com calagem foi elevado até pH 6,3 em média, com a utilização de uma mistura de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio na proporção  $(\text{CaCO}_3)$   $(\text{MgCO}_3)$  (3:1), com valor neutralizante 105%, na dosagem 1 g para cada 1 kg de solo.

Para garantir a reação do calcário no solo, estes foram irrigados constantemente mantendo a umidade a 70% da capacidade de campo. Irrigou-se e acompanhou-se a evolução do pH por 60 dias, até cessar a variação. Para isso as amostras foram coletadas e secas em estufa a 105°C por 24 horas e posteriormente peneiradas em malha 2 mm para serem submetidas a análise.

O pH foi determinado adicionando 25 mL de água a 10 g de solo seco em erlenmeyer de 125 mL. Agitaram-se as amostras por 5 minutos em agitador horizontal e as deixaram em repouso por 30 minutos. Após este tempo, agitaram-se as amostras com o uso de um bastão de vidro e aferiram-se as leituras, mergulhando o eletrodo do pHmetro na parte sobrenadante da solução. Como referência se fez a leitura do padrão ESAL de pH conhecido.

Os solos contidos nos sacos plásticos submetidos a calagem e mantidos sobre 70% da capacidade de campo foram posteriormente secos ao ar, destorroados e passados novamente em peneira de 2 mm de malha.

#### **4.5 Condução dos experimentos**

Após a correção do pH, colocaram-se os sacos plásticos com os solos em seu interior em vasos de plástico com capacidade de 6 L. Após este processo realizou-se a adubação de plantio seguindo as recomendações para a cultura da alface tomando como base as necessidades da cultura e a interpretação da análise química do solo. O cultivo de alface foi realizado em uma segunda fase do experimento. As doses dos nutrientes foram aplicadas segundo Malavolta (1980), por meio de soluções aquosas. Seguiu-se a seguinte recomendação por quilo de solo: 200 mg kg<sup>-1</sup> N; 50 mg kg<sup>-1</sup> K; 200 mg kg<sup>-1</sup> Ca; 50 mg kg<sup>-1</sup> Mg; 50 mg kg<sup>-1</sup> S; 0.5 mg kg<sup>-1</sup> B; 1.5 mg kg<sup>-1</sup> Cu; 2 mg kg<sup>-1</sup> Mn; 5 mg kg<sup>-1</sup> Mo; 5 mg kg<sup>-1</sup> Zn; 5 mg kg<sup>-1</sup> Fe. As fontes utilizadas para isso foram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CH}_4\text{NO}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FeN}_2\text{O}_8$ .

Nesta etapa efetuaram-se também as adubações fosfatadas nos tratamentos do experimento utilizando o MAP como fonte. O fertilizante MAP foi aplicado na dosagem de 0,4 g de P por quilo de solo, misturando-o em toda a sua massa. Antes da aplicação a fim de obter partículas mais uniformes os fertilizantes foram macerados manualmente e peneirados em malha 1 mm, aproveitando apenas as porções passadas por ela. Após a aplicação dos

fertilizantes manteve-se os solos nos vasos em 70% de sua capacidade de campo por 4 meses até a coleta para análise enzimática.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciências do solo da Universidade Federal de Lavras, sob condições controladas de temperatura e umidade.

#### **4.6 Determinação da atividade enzimática**

As análises enzimáticas das enzimas  $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ -G), arilsulfatase (AR), fosfatase ácida (FAC) e alcalina (FAL) e da atividade da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) foram efetuadas no Laboratório de Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, situado no DCS/UFLA. Para a realização dessas análises, foram retirados de cada vaso com o auxílio de uma pá, amostras de 100 g de solo úmido, após o solo contido no interior destes vasos terem sido homogeneizados. Em seguida os solos foram passados em peneira de malha de 2 mm, colocados em sacos plásticos e levados para armazenamento em câmara fria, a temperatura de 4° C; para em seguida serem analisados.

A quantificação da atividade das enzimas foram realizadas seguindo as metodologias descritas por Eivazi e Tabatabai (1988) para  $\beta$ -G, Eivazi e Tabatabai (1977) para FAC e FAL, Tabatabai e Bremner (1970b) para AR e Dick (1994) para FDA. As metodologias destacadas têm por princípio a mensuração do produto da atividade enzimática sobre o substrato específico adicionado para cada enzima. Para  $\beta$ -G, FAC, FAL e AR foram determinados a concentração final de *p*-nitrofenol liberado como produto da reação enzimática, que é de cor amarela, podendo, desse modo sua concentração ser determinada colorimetricamente por Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do visível. Da mesma forma é mensurada a FDA, porém com a liberação de fluoresceína como produto da reação. Nas análises, foram feitas para cada amostra coletada 4 repetições analíticas, sendo um branco para cada repetição. Amostras em branco foram preparadas com a incubação de solo sem os respectivos substratos.

##### **4.6.1 Estimativa da atividade da enzima Arilsulfatase (AR)**

Os princípios para a AR são similares aos relatados para  $\beta$ -G, e seu método da mesma maneira é baseado na liberação de *p*-nitrofenol quando o solo é incubado com *p*-nitrofenil sulfato (PNS) e tolueno, em pH 5,8. Assim inicialmente em erlenmeyer de 50 mL colocou-se 1 g de solo seco fresco previamente pesados, 0,25 mL de tolueno, 4 mL de tampão acetato pH 5,8 (0,5 mol L<sup>-1</sup>) e 1 mL de solução PNS. Posteriormente, os erlenmeyer foram tampados, agitados manualmente e incubados a temperatura de 37° C por uma hora em banho maria.

Decorrido o tempo de incubação, adicionaram-se aos frascos 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 4 mL de solução  $\text{NaOH}$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), procedendo a agitação e filtragem em papel filtro Whatman nº 42 em seguida. No filtrado determinou-se colorimetricamente a quantidade de *p*-nitrofenol nas amostras em espectrofotômetro UV–VIS a 410 nm. A solução controle foi preparada igualmente excetuando-se a adição de substrato PNS.

Para estimar os resultados das concentrações das amostras, utilizou-se também a equação da curva padrão, feita a partir da leitura das absorbâncias dos pontos da curva conhecidos de 0, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g}$  de *p*-nitrofenol  $\text{mL}^{-1}$ . A partir da leitura da absorbância dos valores conhecidos obteve-se a equação da curva padrão que correlaciona a absorbância com as concentrações de *p*-nitrofenol contidas nas amostras. Ao realizar a leitura da absorbância das amostras inseriu-se os resultados na equação para obtenção da concentração das amostras. Por fim a atividade enzimática foi expressa em microgramas de *p*-nitrofenol liberado por hora por grama de solo seco ( $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ solo}$ ) e o resultado foi obtido pela média das quatro repetições subtraído o branco.

#### **4.6.2 Estimativa da atividade da enzima $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ -G)**

Em erlenmeyer de 50 mL colocou-se 1 g de solo seco fresco previamente pesado, 0,25 mL de tolueno, 4 mL de tampão universal MUB pH 6,0 e 1 mL de solução PNG (*p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo). Posteriormente, tamparam-se os erlenmeyer, os agitaram manualmente e então os incubaram a temperatura de  $37^\circ \text{C}$  por uma hora em banho maria.

Após o período de uma hora, adicionaram-se aos frascos 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 4 mL de solução  $\text{NaOH}$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) a fim de cessar a reação enzimática. Em seguida procedeu-se a agitação e filtragem em papel filtro Whatman nº 42. No filtrado por fim determinou-se colorimetricamente a quantidade de *p*-nitrofenol contido nas amostras por meio de espectrofotômetro UV–VIS a 410 nm. A solução controle foi preparada igualmente excetuando-se a adição de substrato PNG.

A fim de determinar os resultados da quantidade de *p*-nitrofenol liberada por cada amostra, foi preparada uma curva padrão com concentrações conhecidas com os pontos 0, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g}$  de *p*-nitrofenol  $\text{mL}^{-1}$ . No fim após a leitura das absorbâncias foi feita a média das 4 repetições de cada amostra retirada e subtraiu-se a absorbância da prova em branco, sendo o resultado expresso em  $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ solo}$ .



#### 4.6.3 Estimativa da atividade das enzimas Fosfatase ácida (FAC) e alcalina (FAL)

Na determinação de FAC e FAL assim como nos métodos anteriores, aferiu-se a concentração de *p*-nitrofenol liberado pela atividade das enzimas, a partir do substrato, solução tampão, e tolueno em faixas de pH específicas e adequadas para cada uma. A faixa de pH estipulada para FAC é de 6,5 e FAL de 11.

Inicialmente quantidades de 1 g de solo seco fresco foram inseridas em erlenmeyer de 50 mL, agregando concomitantemente 0,2 mL de tolueno, 4 mL de solução tampão MUB (pH 6,5 para FAC e pH 11 para FAL) e 1 mL de *p*-nitrofenil-fosfato. Posteriormente, os erlenmeyer foram tampados, agitados manualmente e incubados a temperatura de 37° C por uma hora em banho maria.

Após o tempo de uma hora agregou-se aos frascos 1 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,5 mol L<sup>-1</sup>) e 4 mL de solução NaOH (0,5 mol L<sup>-1</sup>), executando a seguir a agitação e filtragem em papel filtro Whatman nº 42. Por fim no filtrado procedeu-se a leitura da quantidade de *p*-nitrofenol, em espectrofotômetro UV-VIS a 410 nm. A solução controle foi preparada igualmente excetuando-se a adição de substrato *p*-nitrofenil-fosfato.

Para obter os resultados das concentrações das amostras, utilizou-se também da equação da curva padrão elaborada a partir dos pontos 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg de *p*-nitrofenol mL<sup>-1</sup>. Obteve-se por fim o resultado a partir da média das 4 repetições subtraído o branco e o resultado expresso em µg *p*-nitrofenol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> solo.

#### 4.6.4 Quantificação da atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)

Para estimativa da atividade microbiológica geral do solo, empregou-se a metodologia da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA), que tem como princípio a mensuração da quantidade de fluoresceína hidrolisada liberada a partir da incubação de diacetato de fluoresceína.

O procedimento consistiu inicialmente na pesagem de 2,5 g de solo seco em tubos de 50 mL, no qual foi adicionado 40 mL da solução tampão de fosfato de sódio (60 mmol L<sup>-1</sup>) a pH 7,0 com diacetato de fluoresceína (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>). Após a adição, tamparam-se os tubos e os submeteram a incubação com agitação a 50 rpm por 24 horas, em temperatura de 37°C.

Decorrido o tempo de incubação adicionaram-se 2 mL de acetona (50%) para interromper a reação, e em seguida procedeu-se a centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, filtrou-se a porção sobrenadante em papel filtro Whatman nº 42, para leitura

em espectrofotômetro a 490 nm. Para o preparo das repetições controle adotaram-se os mesmos procedimentos excetuando-se a adição do substrato FDA.

Para a estimativa da concentração de fluoresceína presente nas amostras, utilizou-se a equação da reta, gerada a partir da leitura da curva padrão com concentrações conhecidas de 0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg de fluoresceína. Efetuou-se as leituras e com os resultados se produziu o gráfico com a equação da reta. Por fim o resultado foi obtido a partir da média das 4 repetições subtraído o branco e o resultado expresso em mg fluoresceína  $\text{kg}^{-1}$  solo seco  $\text{h}^{-1}$ .

#### **4.7 Análise de dados**

Os efeitos das adubações, correções de solo e interações entre eles foram testados pela análise de variância (ANOVA), e ao ocorrerem diferenças significativas, aplicou-se o teste de Tukey a 5 % de significância para a comparação de médias. Ao serem constatadas diferenças significativas para as interações estas foram desdobradas adequadamente. Efetuou-se a análise de variância e teste de médias utilizando o programa estatístico SISVAR. Os resultados das análises foram expressos nas figuras que constam nos Resultados e Discussões.

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **5.1 Arilsulfatase**

O efeito dos tratamentos de adubação e calagem sobre a atividade da enzima arilsulfatase (AR) não foram isolados, apresentando interação entre os fatores ( $p = 0,0$ ) (FIGURA 6), o que indicou que essa atividade enzimática foi amplamente afetada pela calagem e a adubação. Estes comportamentos puderam ser averiguados conforme os resultados gerados pela análise de variância que estão representados na Tabela 2 abaixo.

Foram observadas diferenças significativas para o fator calagem nos tratamentos controle e NKS<sub>m</sub> (FIGURA 6), sendo que a calagem efetuada e o aumento de pH proporcionado por ela estimularam a atividade desta enzima. Ao comparar cada tratamento, é notório que a calagem promoveu as maiores atividades da AR (FIGURA 6).

Tabela 2 - Resultados da ANOVA para atividade enzimática de Arilsulfatase em resposta aos fatores calagem e adubação.

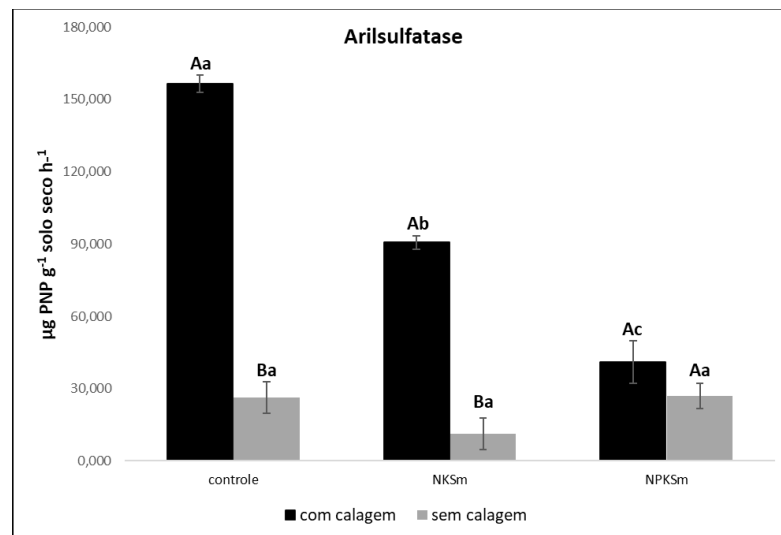
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
<b>Blocos</b>	3	417,5888	139,1962	0,699	0,5682
<b>Adubação</b>	2	13342,3102	6671,1551	33,490	0,0000
<b>Calagem</b>	1	31004,7095	31004,7095	155,647	0,0000
<b>Adubação*calagem</b>	2	14069,2759	7034,6379	35,315	0,0000
<b>Erro</b>	14	2788,7931	199,1995		
<b>Total corrigido</b>	22	61622,6778			
<b>C.V (%)</b>	23,20				
<b>Média Geral</b>	60,8301				

Número de observações: 23

Legenda: FV- Fonte de variação; GL- Graus de liberdade; SQ- Soma de quadrados; QM- Quadrado médio; C.V- Coeficiente de variação.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 6 - Atividade enzimática de Arilsulfatase em função dos tratamentos aplicados no experimento de adubação (controle, NKSm e NPKSm) e calagem (com e sem calagem) sobre um Latossolo Vermelho Amarelo.



Legenda: Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos com e sem calagem em  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey. Letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos de fertilização em  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2022).

O efeito da calagem na elevação da atividade da enzima AR era esperado, principalmente devido ao aumento do pH do solo proporcionado por esta prática. Como observado em estudos anteriores a faixa de pH ideal para esta enzima é compreendida entre 5,5 a 6,2 em intervalos de valores mais próximos a alcalinidade (GERMIDA; WAINWRIGHT; GUPTA, 1992).

Tais resultados positivos da calagem e do pH em relação a enzima AR, estão em concordância ao observado em estudos anteriores (ACOSTA-MARTÍNEZ; TABATABAI, 2000; CHEN et al., 2019; INAGAKI et al., 2016). Conforme mostrado nestes estudos, o

aumento do pH proporcionado pela aplicação da calagem pode estimular a diversidade e população microbiana, levando ao aumento da atividade enzimática do solo, perfazendo um dos principais fatores controladores de sua atividade. Desta forma constata-se que a calagem estimulou a atividade enzimática de AR, vindo de encontro a nossa hipótese.

Em relação aos tratamentos de adubação nos tratamentos com calagem, pode-se observar que aquele que permitiu maior atividade da AR foi o tratamento controle, seguido dos tratamentos NKSm e NPkSm, sendo este último o que teve o menor valor (FIGURA 6). Tais comportamentos eram esperados conforme as características da enzima, que tende a diminuir a sua atividade quando há muito enxofre prontamente disponível no solo, que foi o caso dos tratamentos NKSm e NPkSm. Essa resposta apresentada pela AR apoia a ideia de que esta é uma enzima induzível e que se expressa fortemente em condições de carência de S (HALLMANN; SUMPER, 1994). Logo baixos níveis de S presentes no solo tendem a estimular a atividade desta enzima, como pode ser observado no tratamento controle em relação aos demais.

Ao comparar o tratamento controle e NKSm infere-se o efeito do sulfato na redução da atividade da AR, visto que o sulfato adicionado promove sua redução. O fato de a disponibilidade de sulfato reduzir a atividade da AR foi amplamente relatada em outros estudos (FILIPEK-MAZUR; GORCZYCA; TABAKA, 2017; GUPTA; LAWRENCE; GERMIDA, 1988; PRIETZEL, 2001).

Contudo a AR pode ser alterada por muitos outros fatores e nutrientes no solo, como o fosfato e nitrogênio aplicado. Neste sentido, é válido ressaltar que a atividade desta enzima pode ter sido afetada grandemente por estes fatores. No tratamento NPkSm houve o incremento do elemento P por meio do fertilizante MAP. Com base nisso o fosfato adicionado ao solo, pode ter tido efeito sobre a AR. Houve diferenças significativas do tratamento NPkSm com calagem em relação aos demais tratamentos com calagem (FIGURA 6), pois este apresentou a menor atividade de AR, indicando que possa ter havido efeito adicional da deposição de P sobre estas enzimas.

Segundo Dogson, White e Fitzgerald (1982); Scherer (2001), o sulfato e ortofosfato podem inibir competitivamente e não-competitivamente a AR. Tais resultados estão em concordância com outros trabalhos como os que mostram justamente esse decaimento da atividade desta enzima ao ser aplicado fontes com P (CHEN et al., 2016; HAYNES; SWIFT, 1988; WHALEN; WARMAN, 1996). Entretanto, respostas diferentes têm sido apontadas para o efeito da fertilização fosfatada sobre a atividade de AR, sendo relatados efeitos positivos e negativos em relação a essa prática (WANG et al., 2019). Por último depreende-se que em

nosso experimento o comportamento enzimático de AR frente a adubação foge a hipótese inicial levantada, o que como visto, pôde ser explicado principalmente pelas características desta enzima frente a disponibilidade de S e P.

Por outro lado, as adubações nos tratamentos sem calagem, não apresentaram diferença estatística entre si. Observou-se ligeiro decréscimo do tratamento controle para NKSm e aumento em relação ao NPkSm. Este fato pode ser explicado pelo efeito mediador do pH do solo na disponibilidade de nutrientes, visto que em menores faixas de pH a disponibilidade de nutrientes pode ser mais baixa e influenciar menos a atividade enzimática. Esta dinâmica dos nutrientes conforme as faixas de pH podem explicar o comportamento dos tratamentos de adubação dentro do tratamento sem calagem.

Por fim salienta-se que a arilsulfatase foi sensível aos manejos de adubação e calagem efetuados neste trabalho, o que nos mostra que estes manejos podem alterar seu comportamento enzimático nos solos e no ambiente agrícola como um todo. Como ressaltado por Mendes et al. (2019) as características das enzimas de não possuem alterações em sua atividade frente a manejos de adubação e calagem são desejáveis. Contudo essa característica não pôde ser observada para arilsulfatase neste experimento, visto que foi uma enzima que teve grande interferência de adubações sulfatadas, fosfatadas e calagem.

## 5.2 $\beta$ -glicosidase

De acordo com os resultados da análise de variância (TABELA 3), nota-se que a atividade da  $\beta$ -G não apresentou interação entre os fatores calagem e adubação, sendo pouco afetada por eles (FIGURA 7). Percebe-se também que somente para fator adubação foi encontrada diferença estatística significativa ( $p=0,0046$ ), que pôde ser notada apenas no tratamento NPkSm com calagem que foi o único que se diferiu dos demais com a menor atividade enzimática. Esta falta de variações encontradas nos tratamentos, se dá em virtude principalmente da baixa disponibilidade de M.O e de fontes de C no solo, que são cruciais para uma maior expressão em sua atividade enzimática (SARATHCHANDRA; PERROT, 1984); e que, entretanto, não puderam ser acrescidas ao solo via manejos de adubação orgânica ou por deposição rizosférica por exemplo.

O fator calagem não apresentou efeito sobre a atividade de  $\beta$ -G significativo ( $p = 0,7666$ ) entre os tratamentos (FIGURA 7). Tal resultado contrasta com aqueles encontrados na literatura que indicam aumento de sua atividade em decorrência da calagem e aumento do pH (ACOSTA-MARTÍNEZ; TABATABAI, 2000; CHEN et al., 2021; INAGAKI et al., 2016). Segundo esses autores a aplicação de calcário pode aumentar a respiração, a biomassa e a

diversidade microbiana e diminuir o  $Al^{3+}$  trocável o que favorece a microbiota do solo e estimula maior atividade biológica e enzimática. Assim segundo Acosta-Martínez e Tabatabai (2000) a adição de calcário em geral, aumenta a atividade de  $\beta$ -glicosidase.

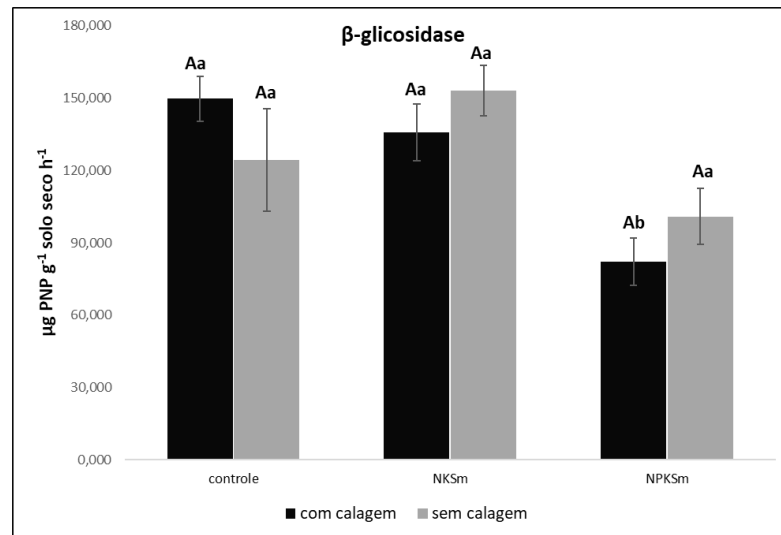
Tabela 3 - Resultados da ANOVA para atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase em resposta aos fatores calagem e adubação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
<b>Blocos</b>	3	3742,9721	1247,6573	1,498	0,2554
<b>Adubação</b>	2	13108,6082	6554,3041	7,872	0,0046
<b>Calagem</b>	1	76,0782	76,0782	0,091	0,7666
<b>Adubação*calagem</b>	2	2523,0720	1261,5360	1,515	0,2516
<b>Erro</b>	15	12489,121264	832,6080		
<b>Total corrigido</b>	23	31939,8519			
<b>C.V (%)</b>	23,21				
<b>Média Geral</b>	124,3096	Número de observações: 24			

Legenda: FV- Fonte de variação; GL- Graus de liberdade; SQ- Soma de quadrados; QM- Quadrado médio; C.V- Coeficiente de variação.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 7 - Atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase em função dos tratamentos aplicados no experimento de adubação (controle, NKS<sub>m</sub> e NPKS<sub>m</sub>) e calagem (com e sem calagem) sobre Latossolo Vermelho Amarelo.



Legenda: Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos com e sem calagem em  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos de fertilização em  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2022).

No entanto, neste estudo, as observações que apontam a ausência de efeito da calagem e aumento do pH sobre a atividade enzimáticas de  $\beta$ -G, foram inconsistentes com estudos anteriores. Ademais, na literatura muitos trabalhos apontam correlações negativas ou ausência de efeito sobre essa enzima, o que demonstra resultados controversos (CHA et al., 2021;

EIVAZI; TABATABAI, 1990; RUY, 2014). Entretanto uma explicação apontada para a ausência de efeito sobre a atividade de  $\beta$ -G pode ter sido devido a diminuição do potencial microbiano para a degradação de M.O que foi reduzido pela adição de calcário, pois o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no solo pode aumentar a estabilidade do substrato, criando pontes entre as partículas do solo e assim desacelerando as taxas de degradação (WHITTINGHILL; HOBBIE, 2012).

No entanto, neste estudo, constatou-se uma resposta controversa do efeito da calagem em relação a estudos anteriores, visto que apontou uma ausência de efeito da calagem e do aumento do pH sobre a atividade enzimática de  $\beta$ -G, o que contrariou a hipótese inicial levantada. Essa resposta segundo Mendes et al. (2019), é vantajosa, pois as características das enzimas de não serem afetadas por adubos e calcário são desejáveis a fim de representar outras alterações de manejo com maior precisão e menor interferência destes fatores do solo. Ademais, na literatura muitos trabalhos apontam correlações negativas ou ausência de efeito da calagem sobre essa enzima, o que demonstra resultados controversos (CHA et al., 2021; EIVAZI; TABATABAI, 1990; RUY, 2014). Nestes trabalhos além do efeito do pH, outros quesitos são levados em consideração e que demonstram grande relevância na atividade de  $\beta$ -G como M.O, elementos traços, salinidade, além da presença de plantas, que contribuem muito para as alterações na atividade desta enzima.

Segundo Sinsabaugh et al. (2008) o potencial enzimático para a hidrólise de componentes lábeis da M.O do solo está ligado a disponibilidade de substrato, pH do solo, e estequiometria da demanda de nutrientes microbianos. Com base nessa ideia é apontado que a responsividade da atividade de  $\beta$ -G é grande, principalmente, em função da disponibilidade de substrato, e sua atividade estritamente relacionada a quantidade de M.O e carbono orgânico (CHA et al., 2021; EIVAZI; TABATABAI, 1990). Segundo Mendes e Reis Junior (2004) as variações na atividade dessa enzima são largamente influenciadas pela quantidade e qualidade dos resíduos orgânicos que são retornados ao solo. Dessa forma maiores variações podem ser encontradas em função disso. No presente experimento o nível de M.O era baixo, não houve deposição de resíduos, nem tampouco a presença de plantas, o que pode explicar tal comportamento.

Além disso, faixas de pH mais ácidas em torno de 5,5 são apresentadas como aquelas mais propícias para a atividade de  $\beta$ -G, indicando maior desempenho sobre estas condições (DAROIT, 2007). Também como constatado por Eivazi e Tabatabai (1990), o aumento do pH do solo de 4,5 a 8,5 teve efeito negativo sobre a  $\beta$ -G reduzindo sua atividade.

Analisando o efeito dos tratamentos de adubações, verifica-se que estes não favoreceram a atividade da enzima em relação ao controle, como era esperado. Não houve diferenças significativas para as adubações nos tratamentos sem calagem (FIGURA 7). Já nos tratamentos com calagem observou-se que o tratamento NPKSm teve a menor atividade diferindo estatisticamente do tratamento controle e NKS<sub>m</sub>. O tratamento controle e NKS<sub>m</sub> não diferiram entre si estatisticamente.

A partir dessas observações verifica-se que as adubações não estimularam a atividade enzimática de  $\beta$ -G como era esperado, contrariando a hipótese levantada no estudo. Em metanálise realizada por Jian et al. (2016), conclui-se que a fertilização com N aumentou a atividade de  $\beta$ -G, apontando que o suprimento de N sustenta a microbiota do solo para produzir mais enzimas extracelulares associadas a aquisição de C. O P da mesma maneira expressa relação positiva com  $\beta$ -G, porém menos pronunciada apresentando pequenos ou as vezes nenhum incremento em atividade enzimática e em combinação com N pode ter comportamentos diversos sobre a atividade de  $\beta$ -G (DONG et al., 2015; WANG et al., 2022; XIAO et al., 2018). Assim como apontado, o efeito positivo das adubações sobre esta enzima deve-se grandemente ao efeito positivo de N e P sobre elas.

Porém percebeu-se em nosso estudo que no tratamento NKS<sub>m</sub> não houve incremento em atividade em relação ao controle, como era de se esperar devido a adição de N. Com isso pôde-se observar que o incremento de outros nutrientes e principalmente de N, não promoveu aumento em atividade de  $\beta$ -G.

Ao observar o tratamento NPKSm, com a adição de MAP como fonte de P e de N, percebe-se que este promoveu decréscimo na atividade de  $\beta$ -G em relação ao controle e NKS<sub>m</sub> nos tratamentos com calagem, com diferença estatística significativa. Como demonstrado por Allison e Vitousek (2005) em seu trabalho, a celulose e nutrição ocupam papéis essenciais para o funcionamento enzimático de  $\beta$ -G. Neste estudo o autor observou que a adição de fontes de N e P com ausência de adição de celulose não promoveram a maior atividade de  $\beta$ -G, ao contrário dos tratamentos que receberam fontes de N e P combinadas com celulose que mostraram a maior atividade. Assim a combinação destes dois fatores é primordial para o funcionamento enzimático. Deste modo os resultados levantados em nosso trabalho podem vir em razão destes fatores (disponibilidade de substrato e nutrição) sendo que a disponibilidade de substrato (celulose) em nosso experimento foi baixa, o que pode ter induzido a menores respostas da nutrição para a atividade de  $\beta$ -G.

Por último depreende-se que a resposta apresentada pela  $\beta$ -G aos manejos de calagem e adubação, a faz como uma importante enzima capaz de ilustrar a qualidade do solo, visto que



poderia ser utilizada para identificar alterações de manejo benéficas e malélicas sem grande influência de fatores como adubação e calagem. Deste modo a  $\beta$ -G se configura conforme apresentado como um ótimo indicador biológico de qualidade do solo, apropriada para determinar sua sustentabilidade, saúde e qualidade.

### 5.3 Fosfatase ácida e alcalina

A atividade enzimática da fosfatase ácida (FAC) e da fosfatase (FAL) apresentaram interação entre os fatores calagem e adubação ( $p = 0,0039$  e  $0,0034$ ), como mostrado pelos resultados apresentados pela análise de variância expressos na Tabela 4. A atividade de FAC e FAL apresentaram comportamentos similares tanto para calagem quanto para as adubações (FIGURA 8). É possível perceber que o fator calagem apresentou diferença estatística significativa apenas no tratamento com adubação NKS<sub>m</sub>. No tratamento controle observou-se ligeiro aumento também da atividade de FAC e FAL com a calagem, sem, no entanto, apresentar diferença estatística significativa. Já o tratamento NPKS<sub>m</sub> exibiu comportamento contrário com maior atividade no tratamento sem calagem, sem apresentar, entretanto, diferença estatística significativa.

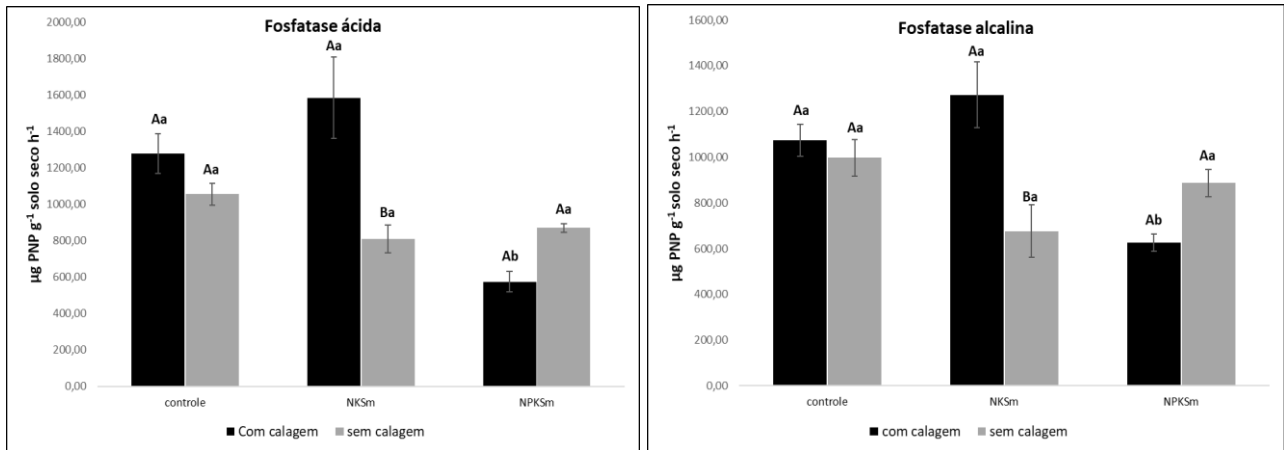
Tabela 4 - Resultados da ANOVA para atividade enzimática de fosfatase ácida e alcalina em resposta aos fatores calagem e adubação.

<b>Fosfatase ácida</b>					
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
<b>Blocos</b>	3	134883,1126	44961,0375	0,642	0,5997
<b>Adubação</b>	2	1129871,8358	564935,9179	8,069	0,0042
<b>Calagem</b>	1	328045,4852	328045,4852	4,686	0,0470
<b>Adubação*calagem</b>	2	1146349,7513	573174,8756	8,187	0,0039
<b>Erro</b>	15	1050176,7975	70011,7865		
<b>Total corrigido</b>	23	3789326,9826			
<b>C.V (%)</b>	25,73				
<b>Média Geral</b>	1028,3938				
Número de observações: 24					
<b>Fosfatase alcalina</b>					
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
<b>Blocos</b>	3	120876,7289	40292,2429	0,923	0,4538
<b>Adubação</b>	2	344533,4557	172266,7278	3,944	0,0420
<b>Calagem</b>	1	114401,1250	114301,1250	2,617	0,1265
<b>Adubação*calagem</b>	2	744586,0090	372293,0045	8,524	0,0034
<b>Erro</b>	15	1050176,7975	70011,7865		
<b>Total corrigido</b>	23	1979416,3571			
<b>C.V (%)</b>	22,65				
<b>Média Geral</b>	922,5228				
Número de observações: 24					

Legenda: FV- Fonte de variação; GL- Graus de liberdade; SQ- Soma de quadrados; QM- Quadrado médio; C.V- Coeficiente de variação.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 8 – Atividade enzimática de fosfatase ácida e alcalina em função dos tratamentos aplicados no experimento de adubação (controle, NKS<sub>m</sub> e NPKS<sub>m</sub>) e calagem (com e sem calagem) sobre Latossolo Vermelho Amarelo.



Legenda: Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos com e sem calagem em  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos de fertilização em  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2022).

Estes resultados observados podem apontar para algumas características apresentadas por estas enzimas. Dentre essas características estão a sua alta correlação com fatores como pH, disponibilidade de N, P e M.O, por exemplo.

Como assinalado por alguns estudos a resposta da atividade enzimática de ambas as enzimas em relação ao pH pode apresentar comportamentos diferentes. Contudo vários estudos apontam para respostas positivas da FAL com o aumento de pH e respostas negativas de FAC ao aumento de pH (ACOSTA-MARTÍNEZ; TABATABAI, 2000; EKENLER; TABATABAI, 2003a; FERNANDES, 1996; HAYNES; SWIFT, 1988; ŠARAPATKA; DUDOVÁ; KRŠKOVÁ, 2004). Em nosso trabalho os comportamentos destas enzimas não foram completamente consistentes com estes estudos. Verifica-se que no tratamento controle não houve diferença estatística significativa para o fator calagem para ambas as enzimas, mas que exibiram, no entanto, ligeiros aumentos em suas atividades com a calagem. Esta baixa resposta à calagem pode estar atrelada aos baixos níveis de M.O e de nutrientes disponíveis para a síntese e atividade enzimática destas enzimas que são altamente responsivas a N e C principalmente (MARGALEF et al., 2017).

Já no tratamento NKS<sub>m</sub> percebeu-se que houve diferença estatística entre os tratamentos que receberam calagem e os que não receberam. Esta resposta pode estar atrelada principalmente a influência positiva da adição de nutrientes ao solo que podem ser utilizados pelos microrganismos para crescimento e desenvolvimento. Segundo Margalef et al. (2017) em

meta-análise, o N estimula a atividade de fosfatases, sendo considerado o principal nutriente limitante do crescimento dos microrganismos; e é necessário para que estes consigam investir na produção de enzimas fosfatases que são ricas em N. Ressalta-se também que os microrganismos respondem a desequilíbrios elementares, produzindo enzimas direcionadas para o elemento em necessidade, sendo que o P pode se tornar mais limitante quando há a disponibilidade suficiente de outros recursos como o N.

Para mais, nutrientes como o K são importantes, influenciando positivamente estas enzimas, visto que regulam o pH citoplasmático e turgor da célula (BOOTH, 1985). Como a calagem e o aumento do pH proporcionado por ela aumentam a disponibilidade destes nutrientes pode ser que a grande diferença apresentada se deva em função da elevação e maior disponibilidade de nutrientes para serem usados pelos microrganismos.

O aumento da atividade de FAL com o aumento do pH pode demonstrar que a correção do solo pela prática da calagem, pode ter tido impacto positivo no tamanho das populações microbianas, já que esta enzima é produzida apenas por microrganismos (JUMA; TABATABAI, 1988b). Porém o aumento de pH proporcionado pela efetuação da calagem sobre a enzima FAC teve comportamento contrário ao esperado. Houve grande acréscimo de atividade para esta enzima no tratamento que foi feita calagem em relação ao que não foi, o que entra em contraste com resultados obtidos em trabalhos anteriores. Tal comportamento pode ser explicado como mostrado em trabalho de Margenot, Sommer e Parikh (2018) pela dose de calcário aplicado ao solo, que impacta de maneira diferente sobre esta enzima. Além do mais o incremento de Ca e Mg exibem efeito ativador sobre a atividade de FAC (ABD-ALLA, 1994), e por isso o aumento de saturação por bases do solo com a calagem e a disponibilidade de Ca e Mg a partir dela pode ter gerado esse efeito positivo em sua atividade.

Já no tratamento NPKSm observa-se um comportamento contrário ao obtido no tratamento NKSm, em que foi constatado ligeiro decréscimo da atividade de FAC e FAL com a presença da calagem, sem apresentar, todavia, diferença estatística significativa. Este comportamento pode ser explicado pelo efeito inibidor do P sobre a atividade destas enzimas, que compõe um dos principais fatores para essa diminuição. Como enfatizado por Allison et al. (2010), o requerimento nutricional dos microrganismos segue o “princípio econômico da evolução” e o investimento metabólico na produção de enzimas fosfatases será reduzida quando houver disponibilidade de P inorgânico suficiente. Logo a síntese e atividade destas fosfatases ocorre em resposta à deficiência de P, sendo reprimidas em condições de alto nível de P e estimuladas em condições limitantes deste nutriente (KUMAR; KUMAR; PATEL, 2018; YAMADA; STIPP; ABDALLA, 2004). Com base nisso muitos estudos salientam o efeito

inibidor que o fosfato tem em relação a atividade das enzimas FAC e FAL (FERNANDES et al., 1998; GATIBONI et al., 2008; PAREDES et al., 2011). Nossos resultados entram em concordâncias com tais estudos.

É sabido amplamente que o P em relação a variação de pH, se comporta de maneiras diferentes, com diminuição de sua disponibilidade em pH menores que acabam por propiciar o processo de fixação e precipitação com íons  $Fe^{3+}$  e  $Al^{3+}$  (BRADY; WEIL, 2013). Além disso nos coloides do solo, há a possibilidade de ocorrer o processo de hidroxilação de sua superfície, e nessa camada hidroxilada podem ser criadas cargas positivas por protonação do grupo hidroxila, o que pode favorecer a adsorção do fósforo em pH menores (FRANZEN, 2009). Assim o aumento de pH pode aumentar a disponibilidade de P (ROSA; CAPONI; JÚNIOR, 2016), o que pode deixá-lo disponível para a utilização pelos microrganismos.

Desta forma a menor atividade de ambas as enzimas no tratamento que recebeu a adubação NPkSm juntamente com correção de pH com calagem, pode ser explicada em razão disso. Como o pH aumentou, a disponibilidade de P inorgânico aumentou, o que acentuou os efeitos negativos do P sobre estas enzimas. Dessa maneira as respostas encontradas para as enzimas FAC e FAL apoiam descobertas anteriores que mostram que estas enzimas são induzíveis e que a intensidade de sua atividade e excreção são determinadas pelo requerimento em P inorgânico (PAREDES et al., 2011).

Por fim ressalta-se que as respostas encontradas para a atividade das enzimas FAC e FAL no geral, não apoiam a hipótese inicial de nosso trabalho em relação aos manejos de calagem e adubação. Essas respostas como visto entram em virtude de características próprias de cada uma destas enzimas em relação a disponibilidade de P e pH, bem como a disponibilidade de M.O. Com base nestas características observou-se, portanto, que estas enzimas foram sensíveis aos manejos efetuados de adubação e calagem, o que pode não ser interessante em algumas situações para a utilização como indicador de alteração de qualidade relacionada a outros tipos de manejo.

#### **5.4 Atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)**

Para a atividade de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), a calagem ( $p=0,6406$ ) e adubação ( $p=0,7560$ ) não apresentaram diferença estatística significativa, como pode ser averiguado na Tabela 5. Tal fato demonstra que estes fatores não tiveram efeito sobre a atividade enzimática de FDA, o que sugere que as práticas de calagem e adubação não levaram a um aumento ou diminuição na atividade microbiológica total do solo (FIGURA 9). Essa

constatação contrapõe a hipótese levantada para estes fatores, no qual esperavam-se incrementos em atividade.

Entretanto salienta-se que a variação dos resultados foi alta (CV=81,72%) para esse parâmetro, em razão da grande dispersão dos resultados das leituras em relação à média. Portanto novos testes poderiam ser feitos para uma melhor confiabilidade dos resultados. Entretanto o coeficiente de variação para propriedades biológicas é geralmente alto, quando comparados com outras propriedades do solo (PIOTROWSKA; DŁUGOSZ, 2012; PIOTROWSKA-DŁUGOSZ et al., 2017; YANAI et al., 2003).

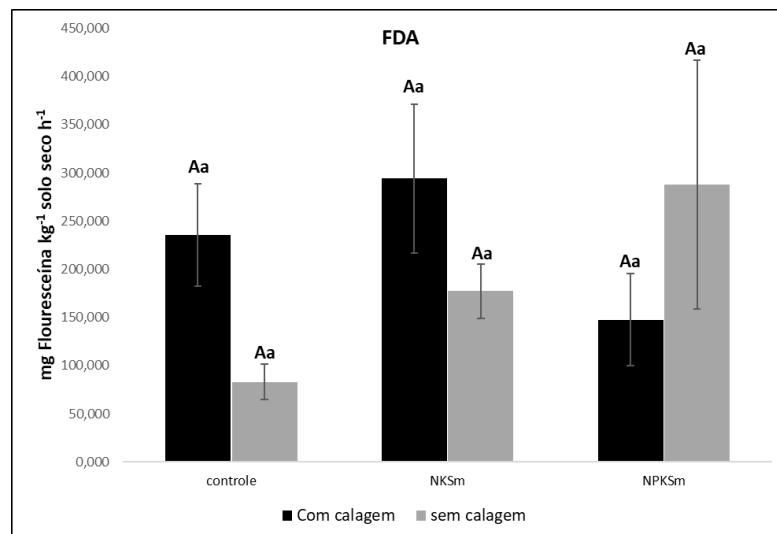
Tabela 5 - Resultados da ANOVA para atividade hidrolítica de FDA em resposta aos fatores calagem e adubação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
<b>Blocos</b>	3	49467,1053	16489,0351	0,563	0,6483
<b>Adubação</b>	2	16720,4167	8360,2083	0,285	0,7560
<b>Calagem</b>	1	6671,1958	6671,1958	0,228	0,6406
<b>Adubação*calagem</b>	2	99801,1247	49900,5623	1,703	0,2177
<b>Erro</b>	14	410130,7337	29295,0524		
<b>Total corrigido</b>	22	582790,5763			
<b>C.V (%)</b>	81,72				
<b>Média Geral</b>	209,4337				Número de observações: 23

Legenda: FV- Fonte de variação; GL- Graus de liberdade; SQ- Soma de quadrados; QM- Quadrado médio; C.V- Coeficiente de variação.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 9 - Atividade hidrolítica FDA em função dos tratamentos aplicados no experimento de adubação (controle, NKS<sub>m</sub> e NPKS<sub>m</sub>) e calagem (com e sem calagem) sobre Latossolo Vermelho Amarelo.



Legenda: Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos com e sem calagem em  $p < 0,05$ . Letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos de fertilização em  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2022).

Como apresentado por alguns autores a quantidade de fluoresceína hidrolisada, está associada com a maior quantidade de enzimas liberadas pelos microrganismos, o que está diretamente relacionado a quantidade de M.O no solo (OLIVEIRA et al., 2014). Em trabalho conduzido por Galindo, Strock e Pagliari (2022), é retratado que em tratamentos que receberam adubação NPK e retirada de resíduos de palhada do solo, tiveram menor atividade do que aqueles que tiveram adubação NPK e cobertura com palhada. Por conseguinte, a M.O e cobertura de solo desempenham papéis cruciais aumentando a estabilização de micro agregados, garantindo proteção de enzimas celulares, promovendo habitat para microrganismos e conseqüentemente aumentando a atividade enzimática de microrganismos do solo (GAJDA; PRZEWOCA; GAWRYJOEK, 2013). Ainda, a M.O e cobertura do solo são fonte de recursos para obtenção de energia pelos microrganismos do solo, sustentando sua multiplicação e crescimento. Assim constata-se que a disponibilidade de M.O no solo, é altamente benéfica aos microrganismos, apresentando correlação positiva com sua atividade enzimática geral (GHINI; MENDES; BETTIOL, 1998; NAYAK; BABU; ADHYA, 2007).

Em geral o aumento da atividade microbiológica total pode ser atribuído a M.O facilmente biodegradável que estimula o crescimento de microrganismos do solo (PERUCCI, 1992). Estudos observaram por exemplo que adições de compostos orgânicos, como lodo de esgoto e outros resíduos sólidos, podem promover o aumento de FDA em virtude da elevação de M.O e da adição de microrganismos ativos (PERUCCI, 1992; SÁNCHEZ-MONEDERO et al., 2008). Em vista disso, entende-se que a baixa disponibilidade de M.O, a perda de estrutura e falta de fontes simples para serem utilizadas pelos microrganismos podem ter impactado na atividade geral da enzima, constituindo-se de fatores interferentes para menor expressão em atividade de FDA.

Contudo como enfatizado, ligeiros aumentos na hidrólise FDA foram observados nos tratamentos controle e NKSm com a efetuação da calagem, mas sem apresentar diferença estatística. Em nosso estudo o pH com a efetuação da calagem foi de 5,1 a 6,3, e segundo Adam e Duncan (2001), faixas de pH maiores em valores mais alcalinos em torno de 7 a 8 são mais propícios para maior atividade de FDA. Com base nisso o menor acréscimo em atividade de FDA e falta de diferença estatística observada com a realização da calagem, pode ter sido devido a esse menor aumento do pH do solo, que não alcançou valores maiores e mais adequados para a atividade de FDA. Já no tratamento NPkSm houve ligeira diminuição de atividade com a calagem, mas sem diferença significativa.

No que concerne o efeito dos tratamentos de adubação sobre a FDA, pode-se dizer que variou pouco mas pode dar indícios da disponibilidade de elementos importantes para os microrganismos como o N, P e micronutrientes. Salienta-se que embora haja alguns relatos sobre essa temática, o efeito de nutrientes sobre a atividade microbiológica total do solo representada por FDA tem sido pouco abordado.

O N e P principalmente são mencionados em estudos apresentando correlações com FDA. No entanto, respostas diferentes são mostradas para esse comportamento enzimático, que exibem tanto resultados negativos, positivos e neutros em relação a esses elementos (KRACMAROVA et al., 2020; KUMAWAT et al., 2017; SARATHCHANDRA et al., 2001; VERDENELLI et al., 2018). Observações anteriores mostram por exemplo a alta correlação da atividade FDA com a presença de N disponível que é um nutriente limitante para a produção de enzimas (BRAGAZZA et al., 2012). Todavia em nossa presente pesquisa percebeu-se que ao comparar o tratamento controle e NKS<sub>m</sub> (FIGURA 9), houve pequenos incrementos em atividade devido a presença de N e de outros elementos nesse tratamento, sem entretanto apresentar diferença significativa. No entanto há de se salientar que as respostas encontradas, podem também demonstrar a baixa disponibilidade de M.O, que como destacado anteriormente são essências aos microrganismos.

No tratamento NPKS<sub>m</sub> em que foi agregado o fertilizante MAP que contém tanto fontes de N e P, houve pequeno decaimento em atividade em relação aos tratamentos controle e NKS<sub>m</sub> com calagem, sem, no entanto, apresentar diferença estatística significativa (FIGURA 9). Esta ausência de efeito e ligeira diminuição da atividade possivelmente foi devido a adição de fontes de P, que já foram relatadas anteriormente (RUY, 2014; VERDENELLI et al., 2013). De acordo com Li et al. (2020), a fertilização com P exprime menores efeitos na comunidade microbiana do solo, mostrando-se muitas vezes insensíveis no tamanho de grupos microbianos e com influência insignificante na estrutura geral das comunidades microbianas. Deste modo se houvesse estímulo no tamanho da comunidade microbiana, provavelmente maior investimento metabólico na produção de enzimas e maior atividade enzimática seria notada a fim de manter o sustento dessa comunidade maior; o que não ocorreu visto que o P não estimulou a comunidade microbiana.

Contudo respostas positivas têm sido encontradas na literatura ao adicionar fontes de N, P e micronutrientes (VERDENELLI et al., 2013, 2018), assim como realizado em nosso trabalho. Porém, ressalta-se que fatores como doses e equilíbrios nutricionais também são importantes, uma vez que a atividade de FDA e as populações microbianas são grandemente

comandadas por equilíbrios na relação entre nutrientes. Por exemplo equilíbrios na relação C e N nos solos com menores valores favorecem a atividade FDA (AON; COLANERI, 2001).

Entretanto em nosso estudo a disponibilidade de P não impactou na atividade de FDA, o que sugere que a comunidade microbiana nos solos pode ter permanecido semelhante as diferentes adubações, que foram por sua vez insuficientes para induzir alterações nessas comunidades. Contudo os mecanismos para essas repostas ainda não foram evidenciados.

Por fim enfatiza-se que as respostas da atividade hidrolítica de FDA nos tratamentos, indicam que esta não foi sensível aos manejos de adubação e calagem. Dessa forma, a análise de FDA pode ser, por conseguinte uma boa indicadora para alterações de outros tipos de manejo de solo, assinalando seu estado de qualidade e sustentabilidade.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Verificou-se no trabalho que as adubações e calagem provocaram diferentes respostas sobre a atividade destas enzimas, no qual estes fatores tiveram efeito para interação nas enzimas AR, FAC e FAL. Em FDA e  $\beta$ -G não se observou interação entre estes fatores. Além disso, notou-se a resposta de cada uma das enzimas conforme os manejos efetuados, no qual houve situações de falta de efeito, aumentos e diminuições na atividade enzimática a depender da enzima analisada.

Com base nisso averigua-se que objetivo geral foi atendido porque efetivamente o trabalho conseguiu demonstrar como a atividade das enzimas variaram em resposta ao manejo nutricional no solo. Com isso foi possível responder ao questionamento levantado anteriormente de como estas enzimas se comportariam frente a esses manejos.

Hipotetizou-se nesta pesquisa que a adição de fertilizantes e calagem aumentam a atividade das enzimas no solo. No trabalho descobriu-se que a calagem estimulou a AR, e a adubação com S e P impactou negativamente nos tratamentos NKSm e NPKSm com calagem. Na atividade de  $\beta$ -G, a calagem não teve efeito, e nas adubações só o tratamento NPKSm se diferiu dos demais, com a menor atividade. Já as enzimas FAC e FAL exibiram respostas similares para calagem e adubações. A fosfatase ácida teve resposta positiva a calagem, o que não foi esperado; e para adubação houve redução em atividade de FAC e FAL, no tratamento NPKSm. Para FDA houve ausência de efeito de calagem e adubação. Dentre estas enzimas, notou-se que a  $\beta$ -G teve um uma resposta muito interessante frente a adubação e calagem, visto que não teve sua atividade enzimática muito alterada em relação a esses manejos, o que a leva a poder ser usada como um indicador de qualidade vantajoso.



Notou-se ao final, que no geral as respostas apresentadas pelas enzimas, não foram consistentes com a hipótese levantada, visto que a adição de fertilizantes e calagem não promoveram incrementos significativos na atividade de enzimas no solo. Entretanto algumas respostas peculiares eram esperadas em relação a algumas enzimas que mostram características específicas quanto a disponibilidade de nutrientes, substrato e pH principalmente.

Conforme os resultados e dados obtidos neste trabalho pode-se entender que as enzimas são importantes indicadores biológicos da qualidade de solo e sua saúde, oferecendo um diagnóstico rápido de sua atual condição, além de interferências passadas ocorridas nesse ambiente. Com isso as enzimas estudadas mostram grande utilidade neste sentido, demonstrando como os tipos de manejo do solo podem influenciar em seu estado enzimático e biológico.

Por último espera-se que nossa pesquisa, possa ter contribuído no sentido de permitir maior entendimento a respeito da influência do manejo nutricional na agricultura sobre o comportamento enzimático do solo, com práticas como adubação e calagem. Entretanto, como visto no trabalho, inúmeros fatores podem interferir sobre a atividade das enzimas no solo como textura, condições climáticas, temperatura, umidade, disponibilidade de nutrientes, M.O, etc. Em vista disso percebeu-se que diante da metodologia proposta não se pôde abranger uma maior variedade destes fatores, já que nesse trabalho pela limitação de tempo, espaço e recursos não foram possíveis de serem feitos. Assim, estudos posteriores podem ser realizados de forma mais aplicada e aprofundada investigando uma maior variação destes fatores e de manejos agrícolas.

## REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M. H. Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae. **Letters in applied microbiology**, v. 18, n. 5, p. 294–296, maio 1994.
- ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; TABATABAI, M. A. Enzyme activities in a limed agricultural soil. **Biology and fertility of soils**, v. 31, n. 1, p. 85–91, 4 abr. 2000.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil biology and biochemistry**, v. 33, n. 7–8, p. 943–951, jun. 2001.
- ADETUNJI, A. T. et al. The biological activities of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 17, n. 3, p. 794–807, set. 2017.
- ALEXANDRE, C. Funções, usos e degradação do solo. 2015.

- ALLISON, S. D. Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: Implications for ecosystem processes. **Biogeochemistry**, v. 81, n. 3, p. 361–373, dez. 2006.
- ALLISON, S. D. et al. Evolutionary-economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. Em: **Soil enzymology**. [s.l.] Springer, 2010. p. 229–243.
- ALLISON, S. D.; VITOUSEK, P. M. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. **Soil biology and biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 937–944, maio 2005.
- ALMEIDA, R. F. DE; NAVES, E. R.; MOTA, R. P. DA. Soil quality: Enzymatic activity of soil  $\beta$ -glucosidase. v. 3, n. 2, p. 146–150, 2015.
- AON, M. A.; COLANERI, A. C. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. **Applied soil ecology**, v. 18, n. 3, p. 255–270, 2001.
- ARAÚJO, A. S. F. DE; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience journal**, v. 23, n. 3, 2007.
- BALOTA, E. L. et al. Effect of tillage systems and permanent groundcover intercropped with orange trees on soil enzyme activities. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 54, n. 2, p. 221–228, abr. 2011.
- BALOTA, E. L. et al. Enzimas e seu papel na qualidade do solo. **Tópicos em ciência do solo**, v. 8, n. 1, p. 221–278, 2013.
- BALOTA, E. L. et al. Long-term land use influences soil microbial biomass P and S, Phosphatase and Arylsulfatase activities and S mineralization in a Brazilian Oxisol. **Land degradation & development**, v. 25, n. 4, p. 397–406, jul. 2014.
- BALOTA, E. L.; CHAVES, J. C. D. Enzymatic activity and mineralization of carbon and nitrogen in soil cultivated with coffee and green manures. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 34, n. 5, p. 1573–1583, out. 2010.
- BENINTENDE, S. M. et al. Soil microbiological indicators of soil quality in four rice rotations systems. **Ecological indicators**, v. 8, n. 5, p. 704–708, set. 2008.
- BERNARDI, A. C. DE C.; MACHADO, P. L. O. DE A.; SILVA, C. A. Fertilidade do solo e demanda por nutrientes no Brasil. **Embrapa solos-capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)**, 2002.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial  $\beta$ -glucosidases: Cloning, properties, and applications. **Critical reviews in biotechnology**, 2002.
- BOARETTO, A. E.; JUNIOR, J. L.; ABREU-JÚNIOR, C. H. Os desafios da nutrição mineral de plantas. **PRADO, RM; WADT, PGS Nutrição e adubação de espécies florestais e palmeiras. Jaboticabal: FCAV/CAPES**, p. 27–53, 2014.
- BOOTH, I. R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 49, n. 4, p. 359–378, dez. 1985.
- BORGES, A. L.; SILVA JUNIOR, J. F. DA. Nutrição, calagem e adubação. Em: [s.l.] In: SILVA JUNIOR, JF da; LOPES, GMB; FERRAZ, LGB (Ed.). Sistema de produção ..., 2010.

- BOUGHATTAS, I. et al. Use of earthworms *Eisenia andrei* on the bioremediation of contaminated area in north of Tunisia and microbial soil enzymes as bioindicator of change on heavy metals speciation. **Journal of soils and sediments**, v. 19, n. 1, p. 296–309, 29 jan. 2019.
- BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. [s.l.] Bookman Editora, 2009.
- BRAGAZZA, L. et al. High nitrogen deposition alters the decomposition of bog plant litter and reduces carbon accumulation. **Global change biology**, v. 18, n. 3, p. 1163–1172, mar. 2012.
- BURNS, R. G. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. **Soil biology and biochemistry**, v. 14, n. 5, p. 423–427, jan. 1982.
- CALIGARIS, B. S. A. et al. A importância do Plano Nacional de Fertilizantes para o futuro do agronegócio e do Brasil. 2022.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. [s.l.] Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2016.
- CASTELLANO, S. D.; DICK, R. P. Cropping and Sulfur Fertilization Influence on Sulfur Transformations in Soil. **Soil science society of america journal**, v. 55, n. 1, p. 114–121, jan. 1991.
- CERETTA, C. A.; AITA, C. *Biologia do solo*. 2008.
- CHA, S. et al. Liming alters the soil microbial community and extracellular enzymatic activities in temperate coniferous forests. **Forests**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 1 fev. 2021.
- CHÁVEZ, L. F. et al. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura-pecuária sob intensidades de pastejo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 46, p. 1254–1261, 2011.
- CHEN, H. et al. Effects of nitrogen deposition on soil sulfur cycling. **Global biogeochemical cycles**, v. 30, n. 11, p. 1568–1577, 1 nov. 2016.
- CHEN, H. et al. Controls on soil arylsulfatase activity at a regional scale. **European journal of soil biology**, v. 90, p. 9–14, 1 jan. 2019.
- CHEN, W.; HOITINK, H. A. J.; MADDEN, L. V. Microbial Activity and Biomass in Container Media for Predicting Suppressiveness to Damping-Off Caused by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v. 78, n. 11, p. 1447, 1988.
- CHEN, Y. P. et al. Agricultural management and cultivation period alter soil enzymatic activity and bacterial diversity in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) orchards. **Botanical studies**, v. 62, n. 1, 1 dez. 2021.
- COLEMAN, R. The importance of sulfur as a plant nutrient in world crop production. 1966.
- COUTINHO, H. L. DA C. et al. *Ecologia e biodiversidade do solo no contexto da agroecologia*. 2003.

CRAVO, M. DA S.; VELOSO, C. A. C. Aspectos da adubação e nutrição mineral do arroz. 2008.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma beta-glicosidase de *Monascus purpureus***. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. **Biology and fertility of soils**, v. 24, n. 2, p. 141–146, 17 fev. 1997.

DICK, R. P. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. **Defining soil quality for a sustainable environment**, v. 35, p. 107–124, 1994.

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

DICK, R. P.; BREAKWELL, D. P.; TURCO, R. F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. **Methods for assessing soil quality**, v. 49, p. 247–271, 1997.

DICK, W. A.; CHENG, L.; WANG, P. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. **Soil biology and biochemistry**, v. 32, n. 13, p. 1915–1919, nov. 2000.

DODOR, D. E.; TABATABAI, M. A. Effect of cropping systems on phosphatases in soils. **Journal of plant nutrition and soil science**, v. 166, n. 1, p. 7–13, 5 fev. 2003.

DODOR, D. E.; TABATABAI, M. A. Glycosidases in soils as affected by cropping systems. **Journal of plant nutrition and soil science**, v. 168, n. 6, p. 749–758, dez. 2005.

DOGSON, K. S.; WHITE, G. F.; FITZGERALD, J. W. **Sulfatases of microbial origin**. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, , 1982.

DONG, W. Y. et al. Responses of soil microbial communities and enzyme activities to nitrogen and phosphorus additions in Chinese fir plantations of subtropical China. **Biogeosciences**, v. 12, n. 18, p. 5537–5546, 29 set. 2015.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. **Defining soil quality for a sustainable environment**, v. 35, p. 1–21, 1994.

DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied soil ecology**, v. 15, n. 1, p. 3–11, ago. 2000.

DOTANIYA, M. L. et al. Role of Soil Enzymes in Sustainable Crop Production. Em: **Enzymes in food biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 569–589.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Phosphatases in soils. **Soil biology and biochemistry**, v. 9, n. 3, p. 167–172, jan. 1977.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil biology and biochemistry**, v. 20, n. 5, p. 601–606, jan. 1988.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. **Soil biology and biochemistry**, v. 22, n. 7, p. 891–897, 1990.

- EKENLER, M.; TABATABAI, M. A. Responses of phosphatases and arylsulfatase in soils to liming and tillage systems. **Journal of plant nutrition and soil science**, v. 166, n. 3, p. 281–290, 10 jun. 2003a.
- EKENLER, M.; TABATABAI, M. A. Effects of liming and tillage systems on microbial biomass and glycosidases in soils. **Biology and fertility of soils**, v. 39, n. 1, p. 51–61, 1 nov. 2003b.
- ERIKSEN, J.; MURPHY, M. D.; SCHNUG, E. The soil sulphur cycle. Em: **Sulphur in agroecosystems**. [s.l.] Springer, 1998. p. 39–73.
- EVANGELISTA, C. R. et al. Atividade enzimática do solo sob sistema de produção orgânica e convencional na cultura da cana-de-açúcar em Goiás. **Semina: Ciências agrárias**, v. 33, n. 4, p. 1251–1261, jul. 2012.
- FERNANDES, L. A.. **Fósforo e atividade de fosfatases em dois solos sob diferentes condições de uso e cultivados com plantas de feijoeiro**. 1996. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- FERNANDES, M. F. et al. Efeito da saturação por bases sobre a atividade de fosfatases em um solo de tabuleiro costeiro cultivado com citros. I. Correlações entre a atividade enzimática e as diferentes características do solo alteradas pela calagem. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 22, n. 3, p. 395–401, set. 1998.
- FILIPEK-MAZUR, B.; GORCZYCA, O.; TABAKA, M. The effect of sulphur-containing fertilizers on soil biological properties. **Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie**, v. 17, 2017.
- FRANZEN, M. Dinâmica do fósforo na interface água-sedimento em reservatórios. 2009.
- FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo: manual técnico. 2000.
- GAJDA, A. M.; PRZEWOCA, B.; GAWRYJOEK, K. Changes in soil quality associated with tillage system applied. **International agrophysics**, v. 27, n. 2, p. 133–141, mar. 2013.
- GALINDO, F. S.; STROCK, J. S.; PAGLIARI, P. H. Impacts of corn stover management and fertilizer application on soil nutrient availability and enzymatic activity. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.
- GATIBONI, L. C. et al. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatases ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1085–1091, ago. 2008.
- GERMIDA, J. J.; WAINWRIGHT, Milton; GUPTA, Vandakattu VSR. Biochemistry of sulfur cycling in soil. In: **Soil biochemistry**. CRC Press, 2021. p. 1-53.
- GHINI, R.; MENDES, M. D. L.; BETTIOL, W. Metodo de hidrolise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Embrapa meio ambiente-artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1998.
- GIANFREDA, L. et al. Enzymes in soil: properties, behavior and potential applications. Em: **Developments in soil science**. [s.l.] Elsevier, 2002. v. 28p. 301–327.

- GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Enzymes in Agricultural Science. 2014.
- GODLEWSKA, A. Assesment of the effect of NPK fertilisation and elemental sulphur on soil enzyme activity. 2018.
- GOMIDE, P. H. O.; SILVA, M. L. N.; SOARES, C. R. F. S. Atributos físicos, químicos e biológicos do solo em ambientes de voçorocas no município de Lavras - MG. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 35, n. 2, p. 567–577, abr. 2011.
- GRANT, C. A. et al. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações agronômicas**, v. 95, n. 1, 2001.
- GREEN, V. et al. Tillage impacts on soil biological activity and aggregation in a Brazilian Cerrado Oxisol. **Soil and tillage research**, v. 92, n. 1–2, p. 114–121, jan. 2007.
- GREEN, V. S.; STOTT, D. E.; DIACK, M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. **Soil biology and biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 693–701, abr. 2006.
- GUNJAL, A. B. et al. Significance of soil enzymes in agriculture. Em: **Smart bioremediation technologies**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 159–168.
- GUPTA, V. V. S. R.; LAWRENCE, J. R.; GERMIDA, J. J. Impact of elemental sulfur fertilization on agricultural soils. I Effects on microbial biomass and enzyme activities. **Canadian journal of soil science**, v. 68, n. 3, p. 463–473, 1 ago. 1988.
- GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and soil**, v. 245, p. 83–93, 2002.
- HALLMANN, A.; SUMPER, M. An inducible arylsulfatase of *Volvox carteri* with properties suitable for a reporter-gene system. Purification, characterization and molecular cloning. **European journal of biochemistry**, v. 221, n. 1, p. 143–150, abr. 1994.
- HAYNES, R. J.; SWIFT, R. S. Effects of lime and phosphate additions on changes in enzyme activities, microbial biomass and levels of extractable nitrogen, sulphur and phosphorus in an acid soil. **Biology and fertility of soils**, v. 6, n. 2, p. 153–158, abr. 1988.
- HOLÍK, L. et al. Soil Microbial Communities and Enzyme Activities after Long-Term Application of Inorganic and Organic Fertilizers at Different Depths of the Soil Profile. **Sustainability**, v. 11, n. 12, p. 3251, 12 jun. 2019.
- INAGAKI, T. M. et al. Lime and gypsum application increases biological activity, carbon pools, and agronomic productivity in highly weathered soil. **Agriculture, ecosystems and environment**, v. 231, p. 156–165, 1 set. 2016.
- INBAR, Y.; BOEHM, M. J.; HOITINK, H. A. J. Hydrolysis of fluorescein diacetate in sphagnum peat container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. **Soil biology and biochemistry**, v. 23, n. 5, p. 479–483, jan. 1991.
- JANES-BASSETT, V. et al. A meta-analysis of phosphatase activity in agricultural settings in response to phosphorus deficiency. **Soil biology and biochemistry**, v. 165, 1 fev. 2022.

- JIAN, S. et al. Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis. **Soil biology and biochemistry**, v. 101, p. 32–43, out. 2016.
- JUMA, N. G.; TABATABAI, M. A. Phosphatase activity in corn and soybean roots: Conditions for assay and effects of metals. **Plant and soil**, v. 107, n. 1, p. 39–47, mar. 1988a.
- JUMA, N.; TABATABAI, M. Comparison of kinetic and thermodynamic parameters of phosphomonoesterases of soils and of corn and soybean roots. **Soil biology and biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 533–539, 1988b.
- KARACA, A. et al. Soil enzymes as indication of soil quality. Em: **Soil enzymology**. [s.l.] Springer, 2010. p. 119–148.
- KAUR, J.; GOSAL, S. K.; KHURANA, S. Soil enzymes: an agricultural perspective. **New perspectives in agricultural sciences**. Lambert academic publishing, Moldova, p. 59–82, 2020.
- KLOSE, S. et al. Sulfur cycle enzymes. Em: **Methods of soil enzymology**. [s.l.] wiley, 2011. p. 125–159.
- KLOSE, S.; MOORE, J. M.; TABATABAI, M. A. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. **Biology and fertility of soils**, v. 29, n. 1, p. 46–54, 7 abr. 1999.
- KNIGHTS, J. S. et al. Long-term effects of land use and fertiliser treatments on sulphur transformations in soils from the Broadbalk experiment. **Soil biology and biochemistry**, v. 33, n. 12–13, p. 1797–1804, out. 2001.
- KRACMAROVA, M. et al. Response of soil microbes and soil enzymatic activity to 20 years of fertilization. **Agronomy**, v. 10, n. 10, 10 out. 2020.
- KRELING, B. E. et al. Avaliação da atividade enzimática como uma promissora ferramenta indicadora da qualidade do solo. Em: **Open science research**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2022. p. 525–540.
- KREMER, R. J.; LI, J. Developing weed-suppressive soils through improved soil quality management. **Soil and tillage research**, v. 72, n. 2, p. 193–202, 2003.
- KUMAR, A.; KUMAR, A.; PATEL, H. Role of Microbes in Phosphorus Availability and Acquisition by Plants. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 7, n. 05, p. 1344–1347, 20 maio 2018.
- KUMAR, S.; CHAUDHURI, S.; MAITI, S. K. Soil Fluorescein Diacetate Hydrolase Activity in Natural and Degraded Soil-A Review. **Environment and ecology**, v. 29, n. 4, p. 1699–1705, 2011.
- KUMAWAT, C. et al. Fluorescein Diacetate Activity as Affected by Residue Retention and P Fertilization in Maize under Maize-Wheat Cropping System. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 6, n. 5, p. 2571–2577, 20 maio 2017.
- LANNA, A. C. Impacto ambiental de tecnologias, indicadores de sustentabilidade e metodologias de aferição: uma revisão. 2002.

- LI, Y. et al. Long-term effects of nitrogen and phosphorus fertilization on soil microbial community structure and function under continuous wheat production. **Environmental microbiology**, v. 22, n. 3, p. 1066–1088, 1 mar. 2020.
- LOPES, A. S. Manual internacional de fertilidade do solo. **Piracicaba: Potafos**, p. 79–85, 1998.
- LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. Fertilidade do solo e produtividade agrícola. **Fertilidade do solo**, p. 2–64, 2007.
- LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, set. 2002.
- MACIEL, L. M.; TUNES, L. V. M. DE. A importância dos fertilizantes para a agricultura/ The importance of fertilizers for agriculture. **Brazilian journal of development**, v. 7, n. 6, p. 58647–58658, 15 jun. 2021.
- MAKOI, J. H. J. R.; NDAKIDEMI, P. A. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. **African journal of biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 181–191, 2008.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. [s.l.] Agronômica Ceres São Paulo, 1980. v. 1
- MALAVOLTA, E. **O futuro da nutrição de plantas tendo em vista aspectos agrônômicos, econômicos e ambientais**. [s.l.] Ipni SP, 2008.
- MARGALEF, O. et al. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- MARGENOT, A. J.; SOMMER, R.; PARIKH, S. J. Soil Phosphatase Activities across a Liming Gradient under Long-Term Managements in Kenya. **Soil science society of america journal**, v. 82, n. 4, p. 850–861, jul. 2018.
- MATTOS, M. L. T. **Microbiologia do solo**. Embrapa Clima Temperado-Capítulo em livro científico (ALICE), 2015.
- MCGILL, W. B.; COLE, C. V. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. **Geoderma**, v. 26, n. 4, p. 267–286, nov. 1981.
- MELO, W. DE. Enzimas no solo. [s.l: s.n.], 1998.
- MENDES, I. DE C. et al. Bioanálise de solo: a mais nova aliada para a sustentabilidade agrícola. 2020.
- MENDES, I. DE C.; SOUSA, D. M. G. DE; REIS JUNIOR, F. B. DOS. Bioindicadores de qualidade de solo: dos laboratórios de pesquisa para o campo. **Cadernos de ciência & tecnologia**, v. 32, n. 1/2, p. 191–209, 2015.
- MENDES, I. DE C. et al. Critical limits for microbial indicators in tropical Oxisols at post-harvest: The FERTBIO soil sample concept. **Applied soil ecology**, v. 139, p. 85–93, jul. 2019.
- MENDES, I. DE C.; REIS JUNIOR, F. B. DOS. Uso de parâmetros microbiológicos como indicadores para avaliar a qualidade do solo e sustentabilidade dos agroecossistemas. 2004.



- MOREIRA, F. M. D. S. Diversidade de microrganismos são fundamentais ao agroecossistema. [s.l: s.n.], 2019.
- MOREIRA, F. M. D. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. **UFLA, Lavras**, 2006.
- NANMPIERI, P.; CECCANTI, B.; BIANCHI, D. Characterization of humus-phosphatase complexes extracted from soil. **Soil biology and biochemistry**, v. 20, n. 5, p. 683–691, jan. 1988.
- NANNIPIERI, P. et al. Role of phosphatase enzymes in soil. Em: **Phosphorus in action**. [s.l.] Springer, 2011. p. 215–243.
- NANNIPIERI, P. et al. Soil enzymology: classical and molecular approaches. **Biology and fertility of Soils**, v. 48, n. 7, p. 743–762, 15 out. 2012.
- NAYAK, D. R.; BABU, Y. J.; ADHYA, T. K. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aeris Endoaquept planted to rice under flooded condition. **Soil biology and biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1897–1906, ago. 2007.
- NICOLAU, P. B. **Microrganismo e ambiente: ar e água, solo e extremos**. [s.l: s.n.], 2016
- NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Indicadores microbiológicos da qualidade do solo. 2013.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.
- OLIVEIRA, K. B. et al. Análise de atividade microbiana do solo em diferentes sistemas de manejo e profundidades pelo método de hidrólise de diacetato de fluoresceína. 2014.
- OLIVEIRA, V. C. et al. Atividade microbiana enzimática (FDA) como bioindicadora da qualidade de solos para o monitoramento ambiental em agroecossistemas do semi-árido. Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE). **Anais...In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 2.; SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE ...**, 2004.
- ONU. Population. Disponível em: < <https://www.un.org/en/global-issues/population>>. Acesso em: 19 de agosto de 2022.
- PANDEY, D.; AGRAWAL, M.; BOHRA, J. S. Effects of conventional tillage and no tillage permutations on extracellular soil enzyme activities and microbial biomass under rice cultivation. **Soil and tillage research**, v. 136, p. 51–60, mar. 2014.
- PANG, P. C. K.; KOLENKO, H. Phosphomonoesterase activity in forest soils. **Soil biology and biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 35–39, jan. 1986.
- PAREDES, C. et al. Phosphorus and nitrogen fertilization effect on phosphorus uptake and phosphatase activity in ryegrass and tall fescue grown in a Chilean Andisol. **Soil science**, v. 176, n. 5, p. 245–251, maio 2011.
- PATLE, P. N.; NAVNAGE, N. P.; BARANGE, P. K. Fluorescein Diacetate (FDA): Measure of Total Microbial Activity and as Indicator of Soil Quality. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 7, n. 06, p. 2103–2107, 20 jun. 2018.

- PAUL, E. A. Soil microbiology, ecology, and biochemistry in perspective. Em: **Soil microbiology, ecology and biochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 3–24.
- PAULETTI, V. Nutrição Mineral de Plantas. **Revista plantio direto-Setembro/Outubro de**, v. 2010, p. 15, 2016.
- PAZUTTI, L. V. B.; CHAER, G. M. Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para análise de  $\beta$ -glicosidase em solos. 2012.
- PEDROSA, M. V. et al. Importância ecológica dos microrganismos do solo. **Enciclopédia biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.
- PERUCCI, P. Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. **Biology and fertility of soils**, v. 14, n. 1, p. 54–60, set. 1992.
- PIOTROWSKA, A.; DŁUGOSZ, J. Spatio-temporal variability of microbial biomass content and activities related to some physicochemical properties of Luvisols. **Geoderma**, v. 173–174, p. 199–208, mar. 2012.
- PIOTROWSKA-DŁUGOSZ, A. et al. Spatio-temporal variability of soil sulfur content and arylsulfatase activity at a conventionally managed arable field. **Geoderma**, v. 295, p. 107–118, 1 jun. 2017.
- PIRELA, H. J.; TABATABAI, M. A. Sulfur mineralization rates and potentials of soils. **Biology and fertility of soils**, v. 6, n. 1, p. 26–32, 1988.
- PRIETZEL, J. Arylsulfatase activities in soils of the Black Forest/Germany—seasonal variation and effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fertilization. **Soil biology and biochemistry**, v. 33, n. 10, p. 1317–1328, ago. 2001.
- RAO, C. S. et al. Soil Enzymes. Em: **Encyclopedia of soil science, third edition**. [s.l.] CRC Press, 2017. p. 2100–2107.
- REETZ, H. F. **Fertilizantes e o seu uso eficiente**. São Paulo: ANDA, p. 178, 2017.
- RESENDE, Á. V. DE et al. Solos de fertilidade construída: características, funcionamento e manejo. 2016.
- RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em minas gerais: 5ª aproximação**, 1999.
- RIBEIRO, T. S.; ÖSTERREICHER-CUNHA, P.; SILVA, L. A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos contaminados: método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana. **Revista Aquila**, v. 13, p. 105–120, 2015.
- ROCHA, C. H. Atividade microbiana do solo e produtividade do algodoeiro em resposta às plantas de cobertura e adubação potássica e nitrogenada. 2020.
- ROSA, A.; CAPONI, L. H.; JÚNIOR, L. A. Z. Disponibilidade de fósforo em um Latossolo Vermelho em função do pH do solo. **Acta Iguazu**, v. 5, n. 5, p. 108–115, 2016.
- RUY, RAFAELA. Indicadores microbiológicos e bioquímicos de qualidade em solo de baixa fertilidade natural que recebeu calagem e adubação fosfatada. **Embrapa soja-tese/dissertação (Alice)**, 2014.

SALDANHA, C. B. et al. **Ciência do Solo: Fertilidade do Solo e Nutrição Mineral de Plantas**. [s.l: s.n.], 2016.

SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A. et al. Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. **Biology and fertility of soils**, v. 44, n. 6, p. 885–890, jul. 2008.

SANTOS, D. R. DOS; SILVA, L. S. DA. **Fertilidade do solo e nutrição de plantas**. [s.l.] Brasil, 2010.

SANTOS, H. G. [et al.]. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed., rev. e ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2018. E-book: il. color. 590 p. <https://www.embrapa.br/solos/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094003/sistema-brasileiro-de-classificacao-de-solos>

SANTOS, U. J. DOS et al. Efeitos da Adubação Fosfatada e Resíduos Orgânicos na Atividade das Fosfatases em Neossolo Regolítico Cultivado com Milho. [s.l: s.n.], 2015.

ŠARAPATKA, B. **Phosphatase activities (ACP, ALP) in agroecosystem soils**. [s.l.] Swedish University of Agricultural Sciences, 2003.

ŠARAPATKA, B.; DUDOVÁ, L.; KRŠKOVÁ, M. Effect of pH and phosphate supply on acid phosphatase activity in cereal roots. **Biol. bratislava**, v. 59, p. 127–131, 2004.

SARATHCHANDRA, S. U. et al. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils. **Soil biology and biochemistry**, v. 33, n. 7–8, p. 953–964, jun. 2001.

SARATHCHANDRA, S. U.; PERROT, K. W. Assay of  $\beta$ -Glucosidase activity in soils. p. 15–19, 1984.

SCHERER, H. W. Sulphur in crop production — invited paper. **European journal of agronomy**, v. 14, n. 2, p. 81–111, mar. 2001.

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

SHERENE, T. Role of soil enzymes in nutrient transformation: A review. **Bio bull**, v. 3, n. 1, p. 109–131, 2017.

SILVA, M. DE O. et al. Qualidade do solo: Indicadores biológicos para um manejo sustentável. **Brazilian journal of development**, v. 7, n. 1, p. 6853–6875, 2021.

SINSABAUGH, R. L. et al. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. **Ecology letters**, v. 11, n. 11, p. 1252–1264, nov. 2008.

SOUSA, S. M. DE et al. Importância da morfologia radicular na eficiência da aquisição de fósforo. 2010.

SOUZA, P. M. DE. **Caracterização bioquímica, fisiológica e ultraestrutural do processo de biossorção do cobre por *Cunninghamella elegans* - UCP 542**. [s.l: s.n.]. Disponível em: [www.pdfactory.com](http://www.pdfactory.com), 2004.

- STEVENSON, F. J.; COLE, M. A. **Cycles of soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients**. [s.l.] John Wiley & Sons, 1999.
- TABATABAI, M. A. Importance of sulphur in crop production. **Biogeochemistry**, v. 1, n. 1, p. 45–62, 1984.
- TABATABAI, M. A. Soil enzymes. **Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties**, v. 5, p. 775–833, 1994.
- TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Arylsulfatase activity of soils. **Soil science society of america journal**, v. 34, n. 2, p. 225–229, 1970a.
- TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Arylsulfatase Activity of Soils. **Soil Science Society of america journal**, v. 34, n. 2, p. 225–229, mar. 1970b.
- TAYLOR, J. P. et al. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. **Soil biology and biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 387–401, mar. 2002.
- TEIXEIRA, P. C. et al. **Manual de métodos de análise de solo**. [s.l.] Embrapa Brasília, DF, 2017.
- TORRES, L. A.; CAMPOS, S. K. **Megatendências da Ciência do Solo 2030**. [s.l.] EMBRAPA, 2022.
- TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. **Tópicos em ciência do solo**, v. 2, n. 3, p. 195–276, 2002.
- TRANNIN, I. C. DE B.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. DE S. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de biossólido industrial e cultivo de milho. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 31, n. 5, p. 1173–1184, out. 2007.
- TURNER, B. L.; HAYGARTH, P. M. Phosphatase activity in temperate pasture soils: Potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. **Science of the total environment**, v. 344, n. 1–3, p. 27–36, maio 2005.
- TURNER, B. L.; RABOY, V. Phosphorus cycle. 2003.
- VAN RAIJ, B. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. [s.l.] International Plant Nutrition Institute, 2011.
- VARGAS GIL, S. et al. Field assessment of soil biological and chemical quality in response to crop management practices. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 439–448, mar. 2009.
- VEENA, V. et al. Isolation and characterization of  $\beta$ -glucosidase producing bacteria from different sources. **African journal of biotechnology**, v. 10, n. 66, p. 14907–14912, 2011.
- VERDENELLI, R. A. et al. Integrated multivariate analysis of selected soil microbial properties and their relationships with mineral fertilization management in a conservation agriculture system. **Acta agriculturae Scandinavica section B: soil and plant science**, v. 63, n. 7, p. 623–632, 2013.

- VERDENELLI, R. A. et al. Influence of 12-years of nps fertilization on soil quality, microbial community profile and activity under conservation agricultural management. Argentina), v. 36, n. 1, p. 99–109, 2018.
- VERMA, S. S. et al. Conservation Agriculture and Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. Em: **Research trends in agriculture sciences**. [s.l.] AkiNik Publications, 2018. p. 01–35.
- VITTI, G. C.; OTTO, R.; SAVIETO, J. Manejo do enxofre na agricultura. **Informações agrônômicas-internacional plant nutrition institute**, v. 52, p. 1–14, 2015.
- WALLENSTEIN, M. D.; BURNS, R. G. Ecology of extracellular enzyme activities and organic matter degradation in soil: A complex community-driven process. Em: **Methods of soil enzymology**. [s.l.] wiley, 2011. p. 35–55.
- WANG, S. et al. Effects of phosphorus and nitrogen fertilization on soil arylsulfatase activity and sulfur availability of two tropical plantations in southern China. **Forest ecology and management**, v. 453, 1 dez. 2019.
- WANG, X. et al. Ecoenzymatic stoichiometry reveals phosphorus addition alleviates microbial nutrient limitation and promotes soil carbon sequestration in agricultural ecosystems. **Journal of soils and sediments**, v. 22, n. 2, p. 536–546, 5 fev. 2022.
- WHALEN, J. K.; WARMAN, P. R. Arylsulfatase activity in soil and soil extracts using natural and artificial substrates. **Biology and fertility of soils**, v. 22, n. 4, p. 373–378, 1996.
- WHITTINGHILL, K. A.; HOBBIE, S. E. Effects of pH and calcium on soil organic matter dynamics in Alaskan tundra. **Biogeochemistry**, v. 111, n. 1–3, p. 569–581, 1 nov. 2012.
- WIETHÖLTER, S. Calagem no Brasil. [s.l.] Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000., 2000.
- XIA, Y.; WANDER, M. Responses of  $\beta$ -glucosidase, permanganate oxidizable carbon, and fluorescein diacetate hydrolysis to conservation practices. **Soil science society of America journal**, v. 85, n. 5, p. 1649–1662, 1 set. 2021.
- XIAN, Y.; WANG, M.; CHEN, W. Quantitative assessment on soil enzyme activities of heavy metal contaminated soils with various soil properties. **Chemosphere**, v. 139, p. 604–608, 1 nov. 2015.
- XIAO, W. et al. A meta-analysis of soil extracellular enzyme activities in response to global change. **Soil biology and biochemistry**, v. 123, p. 21–32, ago. 2018.
- YAMADA, T.; STIPP, S. R.; ABDALLA. **Fósforo na agricultura brasileira**. [s.l.] Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato Piracicaba, 2004.
- YANAI, J. et al. Spatial Variability of Nitrous Oxide Emissions and Their Soil-Related Determining Factors in an Agricultural Field. **Journal of environmental quality**, v. 32, n. 6, p. 1965–1977, nov. 2003.
- YANG, J.-Y. et al. Effect of Lead on Soil Enzyme Activities in Two Red Soils. **Pedosphere**, v. 24, n. 6, p. 817–826, dez. 2014.
- YUAN, Z. et al. Monitoring Soil Microbial Activities in Different Cropping Systems Using Combined Methods. **Pedosphere**, v. 27, n. 1, p. 138–146, 1 fev. 2017.

ZHAO, F.-J.; TAUSZ, M.; DE KOK, L. J. Role of sulfur for plant production in agricultural and natural ecosystems. Em: **Sulfur metabolism in phototrophic organisms**. [s.l.] Springer, 2008. p. 417–435.