

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO FRACIONAMENTO DA
MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO ATRAVÉS DE HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA**

NATACHE GONÇALVES DE MOURA FERRÃO

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes

Co-orientador: Dr. Flávio Adriano Marques

Recife, PE

Fevereiro, 2016

NATACHE GONÇALVES DE MOURA FERRÃO

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO FRACIONAMENTO DA
MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO ATRAVÉS DE HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Energia da Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes

Co-orientador: Dr. Flávio Adriano Marques

Recife, PE

Fevereiro, 2016

Catálogo na fonte
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

- F373e Ferrão, Natache Gonçalves de Moura.
Avaliação da viabilidade do fracionamento da matéria orgânica do solo através de hidrólise enzimática. / Natache Gonçalves de Moura Ferrão. - Recife: O Autor, 2016.
59 f. : il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes.
Coorientador: Dr. Flávio Adriano Marques.

Dissertação (mestrado) ó Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2016.
Inclui referências bibliográficas.

1. Dinâmica do carbono. 2. Técnicas de quantificação. 3. Mudança no uso da terra. I. Menezes, Rômulo Simões Cezar, orientador. II. Marques, Flávio Adriano, coorientador. III. Título.

CDD 631.4 (21. ed.)

UFPE
BDEN/2016-15

*Avaliação da Viabilidade do Fracionamento da Matéria Orgânica
do Solo Através de Hidrólise Enzimática*

Natache Gonçalves de Moura Ferrão

APROVADA EM: 24.02.2016

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Flávio Adriano Marques

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Everardo Valadares de Sá Barreto Sampaio (UFPE/DEN)

Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva (UFPE/DEPA)

Dr. Emmanuel Damilano Dutra (UERGS-RS)

Visto e permitida a impressão

Coordenador(a) do PROTEN/DEN/UFPE

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, oportunidades e força para vencer os obstáculos e superar os desafios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energética e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, pela estrutura que possibilitou o desenvolvimento do trabalho.

Aos responsáveis pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco do município de Itambé, por nos dispor as áreas para as coletas e atenção em nos atender.

À equipe do laboratório de Energia da Biomassa (DEN/ UFPE), pelo auxílio nas análises, grande amizade em todas as horas.

Ao meu orientador, Rômulo Simões Cezar Menezes e ao meu co-orientador, Flávio Adriano Marques pela orientação nos trabalhos realizados, compreensão, paciência e dedicação.

À minha mãe e avós, pela paciência, apoio, amor e tolerância em todas às horas.

Aos meus filhos amados, pelo amor incondicional em grandes momentos da minha vida.

Ao meu irmão Emmanuel Ferrão, pelo companheirismo, paciência e grande amizade.

Aos amigos, pela troca de conhecimentos, apoio e inúmeras horas de companheirismo que sem dúvida tornaram a caminhada mais agradável.

Aos membros da banca, pelas sugestões e participação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentuais dos componentes vegetais encontrados no solo	16
Tabela 2 ó Exemplos de atividades enzimáticas doo solo relacionadas a ciclagem de carbono	21
Tabela 3 - Atributos químicos em um Argissolo sob dois diferentes sistemas de uso da terra (mata nativa e cana-de-açúcar) na Zona da Mata do estado de Pernambuco	35
Tabela 4 - Atributos físicos em um Argissolo sob dois diferentes sistemas de uso da terra (mata nativa e cana-de-açúcar) na Zona da Mata do estado de Pernambuco	35
Tabela 5 ó Quantificação do carbono orgânico total (COT) e do carbono solúvel em água quente (CSAQ) do solo antes do tratamento de hidrólise enzimática em um Argissolo sob dois diferentes sistemas de uso da terra (mata nativa e cana-de-açúcar) na Zona da Mata do estado de Pernambuco	42
Tabela 6 ó Valores de carbono orgânico nos hidrolisados (sobrenadante) de solo obtidos com a utilização de enzimas em diferentes tratamentos e tempos reacionais.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação das enzimas do complexo celulolítico	23
Figura 2 - Fluxograma da metodologia analítica sequencial de hidrólise enzimática do carbono orgânico do solo em Argissolo sob dois diferentes sistemas de uso da terra: mata nativa e cana-de-açúcar, na Zona da Mata do estado de Pernambuco	40
Figura 3 - Variação da matéria orgânica presente no sobrenadante de solo hidrolisado com diferentes cargas de enzima e tempos de reação	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Matéria orgânica do solo	14
2.2 Dinâmica e estabilidade da matéria orgânica do solo	15
2.2.1 Origem e natureza da matéria orgânica	16
2.2.2 Textura do solo	17
2.2.3 Clima	17
2.2.4 Manejo do solo	17
2.2.5 Mecanismos de estabilização da MOS	18
2.2.5.1 Recalcitrância química	18
2.2.5.2 Estabilização química	18
2.2.5.3 Inacessibilidade (proteção física)	19
2.3 Atividade biológica do solo	20
2.3.1 Atividade enzimática do solo	20
<i>Fatores inibitórios da atividade enzimática do solo</i>	<i>21</i>
<i>Atividade catalítica das enzimas</i>	<i>22</i>
<i>Celulases</i>	<i>22</i>
<i>Xilanases</i>	<i>24</i>
2.4 Métodos de quantificação da atividade enzimática	24
2.4.1 Quantificação da atividade enzimática no solo	24
2.4.2 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulóticos	25
2.5 Métodos de mensuração e fracionamento do carbono orgânico da MOS	26
2.5.1 Oxidação da matéria orgânica do solo	26
2.5.2 Respiração basal	27
2.5.3 Carbono da biomassa microbiana	28
2.5.5 Fracionamento físico da MOS	29
<i>Método densimétrico</i>	<i>29</i>
<i>Método granulométrico</i>	<i>30</i>
<i>Ultrassonificação do solo</i>	<i>31</i>
2.5.6 Fracionamento químico da MOS	32
<i>Substâncias Húmicas (SHs)</i>	<i>32</i>

<i>Hidrólise ácida</i>	32
<i>Carbono solúvel em água</i>	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Área de estudo	34
3.2 Amostragem do solo	34
3.3 Metodologias de quantificação do carbono orgânico	35
3.3.1 Carbono orgânico total (COT)	35
3.3.2 Carbono solúvel em água quente (CSAQ)	36
3.4 Quantificação do carbono orgânico do solo por hidrólise enzimática	36
3.4.1 Determinação da atividade das enzimas	36
3.4.3 Determinação da atividade da Carboximetilcelulase (CMCase)	37
3.4.4 Determinação da atividade da α -glucosidase	37
3.4.5 Determinação da atividade xilanolítica	38
3.4.6 Hidrólise enzimática do solo	38
3.5 Extração sequencial do carbono orgânico por hidrólise enzimática	39
3.6 Análise estatística	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Carbono orgânico total (COT)	41
4.2 Quantificação do CO no processo de hidrólise enzimática	41
<i>Quantificação do carbono solúvel em água quente</i>	41
<i>Quantificação do CO nos hidrolisados utilizando acetato de sódio (50 mM, pH 5)</i> <i>como tampão</i>	42
<i>Avaliação do pH dos hidrolisados utilizando água deionizada</i>	43
<i>Quantificação da matéria orgânica nos hidrolisados utilizando água deionizada</i> ...	44
5 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

RESUMO

A matéria orgânica do solo (MOS) compõe um compartimento dinâmico, composto por uma mistura complexa de resíduos vegetais e animais em diversos estádios de decomposição. De forma didática, o carbono (C) presente na MOS pode ser dividido em compartimentos, diferenciados por similaridades estruturais, estabilidade e dinâmica. Neste trabalho utilizamos as definições dos compartimentos da MO: Compartimento ativo ou lábil: constituído por componentes facilmente oxidáveis, estando fortemente sujeito a alterações resultantes do manejo do solo; Compartimento lento: ligado a formação de micro e macroagregados do solo (o manejo influencia diretamente na ocorrência dos macroagregados, mas muito pouco a ocorrência de microagregados); Compartimento passivo: substâncias húmicas estáveis supostamente não afetadas pelas técnicas de manejo. Na literatura, ainda há muitas lacunas e controvérsias sobre as metodologias para quantificação do C nessas frações em diferentes tipos de solos. Parte dessa dificuldade pode ser função das variações das classes de solo, do clima e manejo a que esses solos estão submetidos. Sendo assim, constata-se que esse é um tema de alta relevância, pois, as metodologias de avaliação do C influenciam a geração de dados e as estimativas da dinâmica do C no solo e seu tempo de permanência. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a viabilidade do fracionamento do carbono da matéria orgânica do solo utilizando o método de hidrólise enzimática, como método alternativo aos métodos tradicionais de fracionamento. Foi utilizado um Argissolo de região de clima tropical úmido sob dois manejos: mata nativa preservada e plantio de cana-de-açúcar. O sítio experimental escolhido para a coleta das amostras de solo foi a estação experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), no município de Itambé, PE, localizada na Zona da Mata Norte de Pernambuco. As amostras foram coletadas nas camadas de 0-20 cm. Para liberação e quantificação dos compostos de carbono das frações da MOS através da hidrólise enzimática, foi realizada uma sequência analítica constituída por duas etapas: (i) Extração do carbono solúvel em água quente (ii) Hidrólise enzimática. No solo sob cultivo com cana-de-açúcar a proporção da fração mais lábil de carbono, extraída com água quente, foi maior que no solo sob mata. Houve uma maior proporção na quantificação da matéria orgânica em solo sob mata atlântica para o método de demanda química de oxigênio (DQO). O método de DQO mostrou-se eficaz como método auxiliar ao analisador TOC na quantificação da matéria orgânica para o método de extração por água quente. O acetato de sódio utilizado como tampão orgânico causou interferência na leitura do CO dos hidrolisados pelo analisador TOC. A utilização de água deionizada no lugar do tampão orgânico demonstrou ser uma alternativa para substituir o acetato, pois não foram observadas diferenças significativas de pH ao longo do tempo reacional. Nos testes utilizando água deionizada, foi observado decréscimo dos teores da MO em relação ao tempo, podendo estar relacionado à interferência de elementos presentes no solo, à falta de precisão do método analítico empregado, à perda de MO durante o processo reacional e/ou à incorporação da MO ao substrato (solo). Os teores de CO nos hidrolisados obtidos pelo método de hidrólise enzimática mostraram correlação positiva com a adição de enzimas, entretanto, a adição de enzimas introduz quantidades significativas de C ao meio reacional, o que indica que serão necessárias mudanças no método analítico.

Palavras-chave: dinâmica do carbono; técnicas de quantificação; mudança no uso da terra.

ABSTRACT

The soil organic matter (SOM) comprises a dynamic compartment consists of a complex mixture of plant and animal residues in various stages of decomposition. Didactically, carbon (C) present in the SOM can be divided into compartments, differentiated by structural similarities, stability and dynamics. In this work we use the definitions of the storage MO: active or labile compartment: consisting of easily oxidized components, being strongly subject to change resulting from soil management; slow compartment: on the formation of micro- and macroaggregates soil (management directly influences the occurrence of macroaggregates, but very little the occurrence of micro-aggregates); Passive Housing: stable humic substances supposedly not affected by management techniques. In the literature, there are still many gaps and controversies about the methodologies for quantification of these fractions carbon in different types of soils. Part of this difficulty may be a function of variations in soil types, climate and management that these soils are submitted. Thus, it appears that this is a highly important issue because the evaluation methodologies of C influence the generation of data and the carbon dynamics of the estimates in the soil and your length of stay. Therefore, this study aims to evaluate the viability of the soil organic matter carbon fractionation using the enzymatic hydrolysis method as an alternative method to traditional methods of fractionation. Ultisol of humid tropical climate region was used in two managements: preserved native forest and planting sugarcane. The experimental site chosen for the collection of soil samples was the experimental station of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), in the city of Itambé, PE, located in the North Forest Zone of Pernambuco. The samples were collected at 0-20 cm. To quantify the release and carbon compounds of SOM fractions by enzymatic hydrolysis, an analytical sequence consists of two steps it taken: (i) Carbon Extraction hot water soluble (ii) Enzymatic hydrolysis. The soil under cultivation of sugarcane the proportion of the more labile fraction of carbon, extracted with hot water, was higher than in the soil under forest. There was a higher proportion in the quantification of organic matter in soil under rainforest for chemical demand method of oxygen (COD). The COD method was effective as an auxiliary method to the TOC analyzer quantification of organic matter to the extraction method by hot water. The sodium acetate buffer used as organic interference caused CO hydrolyzed by reading the TOC analyzer. The use of deionized water in place of the organic buffer to be an alternative to replace the acetate, as significant differences in pH during the reaction time were not observed. In tests using deionized water, was observed decrease of OM content in relation to time, may be related to the interference of elements present in the soil, lack of precision of the analytical method employed, the loss OM during the reaction process and / or OM incorporation of the substrate (soil). CO contents in the hydrolysates obtained by enzymatic hydrolysis method showed a positive correlation with addition of enzymes, however, the addition of enzymes introduces significant amounts of carbon to the reaction medium, which indicates that changes will be needed in the analytical method.

Keywords: carbon dynamics; quantification techniques; change in land use

1 INTRODUÇÃO

O solo constitui um grande reservatório de carbono (C), contendo aproximadamente 2.500 Pg de C, divididos em 1.550 Pg na forma de C orgânico e 950 Pg de C inorgânico (LAL, 2004). O C orgânico estocado em regiões de clima tropical representa cerca de 32 % do total de C orgânico contido nos solos do planeta (CARVALHO et al., 2010) e compõe uma parte considerável da matéria orgânica (MO), que é um compartimento dinâmico, composto por uma mistura complexa de resíduos vegetais e animais em diversos estádios de decomposição (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A MO participa diretamente da dinâmica do C no solo, interagindo com fatores químicos, físicos e biológicos. Do ponto de vista químico, a MO está ligada a capacidade de troca catiônica, contribuindo para o aumento da disponibilidade de nutrientes às plantas, como também afeta o pH, influenciando o poder tampão do solo. A interação física da MO com o solo se dá através da formação dos agregados. Quanto à interação biológica, a MO está diretamente ligada à atividade microbiana, que é responsável pela ciclagem de nutrientes.

O aumento do estoque da matéria orgânica do solo (MOS) é um processo lento e necessita de um manejo adequado, principalmente em regiões de clima tropical úmido, onde a taxa de decomposição é alta devido às altas temperaturas e umidade do solo (CARVALHO et al., 2010). O acúmulo de C no solo se dá pelo seu potencial de armazenamento, que depende dos reservatórios ativo/lábil (que possuem tempo de permanência curto, semanas a meses) vs. os reservatórios recalcitrante/passivo (que possuem tempo de permanência longo, anos a décadas). A quantidade de MO presente no solo é regulada pela taxa de produção primária do material orgânico, pela distribuição dos fotoassimilados entre parte aérea e raízes e pela velocidade de decomposição dos compostos orgânicos (BATJES, 1996; CANELLAS et al., 2000).

Muitos modelos matemáticos de dinâmica da MOS são utilizados como ferramenta para relacionar a MOS a níveis de fertilidade e ao manejo atual e futuro, em solos de diversos agroecossistemas. Estes modelos têm como objetivo compreender a dinâmica e os mecanismos que estabilizam a MOS, na tentativa de desenvolver práticas de gestão que preservem a qualidade do solo e maximizem o sequestro de carbono (LEITE & MENDONÇA, 2003; LUTZOW et al., 2007; BRUUN et al., 2010; STROSSER, 2010). Os modelos dividem a MOS em três compartimentos distintos de acordo com a taxa de decomposição, variando de meses a milhares de anos (PARTON et al., 1987). No caso do

modelo Century, o primeiro compartimento que representa a fração de C mais lábil, é chamado de ôativoö; o segundo compartimento de labilidade intermediária é chamado de ôlentoö; e o terceiro compartimento onde o C está intrinsicamente ligado a fração mineral do solo é chamado de ôpassivoö. No entanto, estes compartimentos não estão relacionados com entidades mensuráveis, significando que os fluxos entre eles são em grande parte construídos teoricamente, introduzidos para imitar a heterogeneidade da MOS e não são inferidos a partir de evidências diretas de sua existência (LEITE et al., 2004).

Embora sejam utilizados diversos métodos analíticos para avaliar alterações no conteúdo de carbono orgânico do solo relacionado ao manejo do solo, a questão prática quanto à quantidade e qualidade da MOS não pode ser respondida completamente. Portanto, estudos sobre a dinâmica da MOS têm impacto fundamental no entendimento do funcionamento dos ecossistemas terrestres, principalmente a fatores que afetam a qualidade e fertilidade do solo.

A maioria dos métodos propostos para o fracionamento da MOS é baseada em processos químicos (uso de ácidos ou bases fortes), físicos (separação por densidade, tamanho de partículas, associação com partículas minerais do solo) ou uma combinação desses processos. As transformações dos compostos orgânicos que compõem a MOS são, entretanto, mediados principalmente por reações bioquímicas decorrentes da atividade dos microrganismos presentes no solo. Sendo assim, uma hipótese a ser testada é de que o fracionamento do carbono orgânico do solo será melhor representado através de processos de hidrólise enzimática por serem análogos aos processos realizados pela microbiota do solo.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a viabilidade do fracionamento do carbono orgânico da matéria orgânica do solo utilizando o método de hidrólise enzimática, como método alternativo aos métodos tradicionais de fracionamento da MOS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Matéria orgânica do solo

A matéria orgânica do solo (MOS) controla as propriedades chave do solo, como a capacidade de troca catiônica, a disponibilidade de nutrientes, a retenção hídrica, a fertilidade, a agregação e fluxo de gases que intensificam o efeito estufa, como, CO₂ (dióxido de carbono), CH₄ (metano) (LEITE & MENDONÇA, 2003; TRUMBORE & CAMARGO, 2009). Ao mesmo tempo, a MOS representa o principal compartimento de C na biosfera, estimado em 1550 Pg (FOLLETT, 2001) e atua como fonte e dreno de C e nutrientes (LEITE & MENDONÇA, 2003).

Em média, os trópicos são 15 °C mais quentes que as regiões temperadas, além de não possuírem invernos rigorosos com temperaturas muito baixas. As temperaturas mais elevadas resultam num aumento das taxas dos processos bioquímicos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Desta forma, nos trópicos úmidos, as temperaturas elevadas e as precipitações de aproximadamente 300 a 800 mm ano⁻¹ resultam em taxas de decomposição mais altas que em regiões temperadas.

As elevadas taxas de decomposição em regiões tropicais são contrabalanceadas por maiores taxas de produção dos resíduos vegetais que retornam ao solo. Em condições naturais, os estoques de MO dos solos tropicais e subtropicais não diferem dos verificados em solos de regiões temperadas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; BAYER & MIELNICZUK, 2008).

Quando os solos são submetidos ao uso agrícola apresentam maior declínio no estoque de MO em regiões tropicais e subtropicais maior que em regiões temperadas (BAYER & MIELNICZUK, 2008). A diminuição na quantidade de MO depositada sobre o solo devido ao manejo inadequado contribui com a emissão de aproximadamente 78 Pg de C para a atmosfera na forma de CO₂ (CARVALHO et al., 2010). Dixon et al (1994), estimaram em média, 787 Pg de C estocados no solo sob florestas no mundo, enquanto áreas de pastagem contêm, em média, 500 Pg de C (CARVALHO et al., 2010), e sob cultivo agrícola aproximadamente 170 Pg de C (PAUSTIAN et al., 2000), refletindo a diminuição da capacidade de estocagem de C no solo.

A perda da cobertura florestal impacta negativamente em importantes ciclos biogeoquímicos, como o de C, no qual a MOS possui contribuição bastante complexa (LIMA

et al., 2008). Na maior parte dos solos, as formas mais recalcitrantes da MO são dominantes em termos quantitativos, portanto constituem um compartimento que desempenha papel crucial no armazenamento do C, com prolongado tempo de residência (TRUMBORE, 2000).

A MOS pode ser dividida em dois grupos fundamentais: o primeiro constituído por produtos da decomposição dos resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano, como proteínas, aminoácidos, carboidratos. Esta fração constitui cerca de 10 ó 15% do carbono orgânico total (COT) do solo e o segundo representado pelas substâncias húmicas, constituindo cerca de 85 ó 90% do COT (TRUMBORE, 2000; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; GUERRA et al., 2008; STROSSER, 2010). As substâncias húmicas são consideradas o estágio final da evolução dos compostos de C no solo e representam cerca de 30 a 85% do húmus (CANELLAS et al., 2000).

Leite & Mendonça (2003), em estudo sobre modelos matemáticos, utilizados como ferramenta para relacionar MO a níveis de fertilidade e ao manejo atual e futuro, em solos de diversos agroecossistemas, relataram que a MOS pode ser dividida em três compartimentos. O primeiro compartimento é chamado de ãativoö; o segundo compartimento é chamado de ãlentoö; e o terceiro compartimento é chamado de ãpassivoö.

Diversos trabalhos (ROVIRA & VALLEJO, 2002; CHENG et al., 2007; ROVIRA & VALLEJO, 2007; SILVEIRA et al., 2008; PLANTE et al., 2011; GREENFIELD et al., 2013) tem-se concentrado na qualificação e quantificação da fração ativa da MOS, levando em consideração que é um compartimento indicador de rápidas modificações ao manejo. Embora sejam utilizados diversos métodos analíticos para avaliar alterações no conteúdo de carbono orgânico do solo relacionado ao manejo, a questão prática quanto a quantidade e qualidade da MOS não pode ser respondida completamente. Desta forma, sugere-se a investigação sobre as interações entre as frações da MOS e sua melhor caracterização funcional (STROSSER, 2010).

2.2 Dinâmica e estabilidade da matéria orgânica do solo

As transformações que o C passa no solo compreendem-se pela velocidade de decomposição da MOS. Independente da forma em que se encontra a MO no solo, esta é condicionada à inúmeros fatores, dentre eles: origem e natureza da MO, umidade, temperatura, textura do solo, clima, relevo e manejo do solo (PILLON et al., 2011). A capacidade em proteger e estabilizar o C depende das características intrínsecas do solo, como

o decréscimo do potencial de perda da MO pelo crescimento microbiano, erosão ou lixiviação (PILLON et al., 2002; BAYER et al., 2011). Os três principais mecanismos de proteção do C no solo são: recalcitrância química, estabilização química e inacessibilidade (proteção física).

2.2.1 Origem e natureza da matéria orgânica

A adição de MO no solo provem, em quase sua totalidade de resíduos vegetais cuja composição média varia entre as diferentes espécies vegetais e, dentro da mesma espécie, devido à idade e nutrição da planta (MELO & ALLEONI, 2009; PILLON et al., 2011). Waksman (1952) relatou que apesar de haver diferenças, em relação a composição química, entre as espécies vegetais, ocorre certa constância entre os componentes básicos do vegetal variando apenas o percentual dos componentes estruturais. Em termos percentuais de massa seca do material vegetal, os componentes são divididos em seis grupos: celulose, hemicelulose, lignina, fração solúvel em água, fração solúvel em éter ou álcool e proteínas. (WAKSMAN, 1952; PILLON et al., 2002) (Tabela 1.).

Tabela 1. Percentuais dos componentes vegetais encontrados no solo.

Componente vegetal*	(%)
Celulose	10 ó 60
Hemicelulose	10 ó 30
Lignina	5 ó 30
Fração solúvel em água (açúcares, aminoácidos, ácidos alifáticos)	5 ó 30
Fração solúvel em éter ou álcool (gorduras, óleos, ceras, resinas)	1 ó 15
Proteínas	1 ó 10

Fonte: Waksman, 1952 *Termos percentuais obtidos a partir do peso seco do material vegetal.

2.2.2 Textura do solo

A textura do solo desempenha um papel importante nos processos físicos (formação de macro e microagregados), químicos (capacidade de troca catiônica) e biológicos (taxas de decomposição microbiana), inferindo no funcionamento dos ecossistemas. A proporção relativa de areia, silte e argila define a classe textural do solo e modifica o potencial de estoque de nutrientes, carbono e capacidade de retenção de água nos solos (SIX et al., 2002a; BITTAR et al., 2013).

A textura, por estar relacionada à porosidade e aeração do solo, afeta também a dinâmica de ar neste meio, alterando a atividade microbiana e enzimática, com implicações sobre a decomposição da MO (SIX et al., 2002b; PILLON et al., 2002; BAYER et al., 2011; BITTAR et al., 2013).

2.2.3 Clima

Bronick & Lal (2005), relataram que o clima, por meio da temperatura e da precipitação, influenciam no estoque e na taxa de mineralização da MO e na adição da fitomassa no solo. Alterações da temperatura e umidade afetam a atividade microbiana, que alteram as taxas de decomposição. Temperaturas mais altas resultam em maior respiração e atividade biológica no solo, enquanto que temperaturas mais baixas resultam em maior estoque de C (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; COSTA et al. 2008;).

2.2.4 Manejo do solo

Os solos agrícolas podem atuar como dreno ou fonte de gases de efeito estufa (GEE), dependendo do sistema de manejo ao qual foram submetidos (IPCC, 2001). Costa et al. (2008), em estudo sobre estoque de CO no solo, relataram que o preparo do solo e o manejo de culturas afetam as taxas metabólicas dos microrganismos nos processos de decomposição dos resíduos vegetais e da MOS. Galvão et al. (2005) descreveram que a conversão de ecossistemas naturais em sistemas agrícolas ou pecuários resultam em declínio da MO, que é acompanhado pela mineralização de nutrientes orgânicos.

2.2.5 Mecanismos de estabilização da MOS

2.2.5.1 Recalcitrância química

A natureza bioquímica dos compostos orgânicos, como composição elementar, estrutura molecular e grupos funcionais, atua como mecanismo de estabilização da MOS (SIX et al., 2002a). A recalcitrância química se dá pela complexa composição química dos compostos orgânicos (alto teor de compostos fenólicos, lignina) ou pelos processos de condensação e polimerização que ocorrem durante a decomposição dos resíduos vegetais (humificação), tornando-os mais resistentes à decomposição (SIX et al., 2002a; PILLON et al., 2002).

Gleixner et al. (2001) relataram que carboidratos, lipídios e proteínas são degradados rapidamente, através da conversão microbiana (fungos, bactérias), por um conjunto complexo de enzimas, tendo como resíduo final açúcares, ácidos graxos menores e aminoácidos. Silva & Mendonça (2007) relataram que a lignina é o segundo constituinte mais abundante na maior parte dos resíduos vegetais, e por sua complexidade química é degradada parcialmente, contribuindo para o acúmulo de C no solo.

Six et al. (2002) e Bayer et al. (2011) descreveram que, embora os compostos fenólicos (lignina) pareçam ter papel importante na formação da MOS, pouco se sabe em que magnitude eles contribuem no processo de humificação, pois estudos recentes mostram que estes compostos não são seletivamente preservados (THEVENOT et al., 2010).

2.2.5.2 Estabilização química

A matriz mineral do solo exerce importante influência sobre a quantidade e a qualidade da MOS (PILLON et al., 2002). A associação de moléculas orgânicas aos minerais pode ocorrer via troca de cátions por compostos orgânicos carregados positivamente, por ligação hidrofóbica com moléculas orgânicas já existentes sobre a superfície mineral e por pontes de cátions polivalentes, ligando às superfícies minerais de carga negativa aos ânions orgânicos (BAYER et al., 2011).

Six et al. (2002) relataram que a adsorção da MO às superfícies minerais protege a MO da decomposição microbiana, pela formação de microagregados que a protegem em poros inacessíveis aos microrganismos. A contínua deposição de resíduos vegetais estimula a

formação de microagregados ($< 250 \mu\text{m}$) que se unem para formar estruturas menos estáveis denominadas macroagregados, com incremento no teor de C.

Sollins et al. (1996), em trabalho sobre mecanismos e controles da estabilização e desestabilização da MOS, descreveram que os argilominerais e os óxidos são os principais minerais responsáveis pela interação com a MOS. Pillon et al. (2002), em revisão sobre a dinâmica da MO no ambiente, relataram que o efeito de proteção à MO pela interação com a fração mineral, principalmente nos solos oxícos (grande parte dos solos tropicais) pode estar relacionada a três fatores:

- (i) Formação de complexos organo-minerais insolúveis entre a MO e os óxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al), tornando difícil o acesso da microbiota do solo;
- (ii) As superfícies minerais (argila, silte), altamente reativas, adsorvem as exoenzimas responsáveis pela clivagem das estruturas orgânicas;
- (iii) A forte associação entre os oxihidróxidos e argilominerais com as frações orgânicas constitui o principal mecanismo de formação e estabilização de microagregados no solo.

2.2.5.3 Inacessibilidade (proteção física)

A proteção física ocorre por efeito da agregação da fração mineral do solo, partículas de silte, areia e argila, promovendo uma barreira à degradação da MOS, limitando o acesso dos microrganismos e de suas enzimas (SIX et al., 2002a; SIX et al., 2002b). Bayer & Mielniczuk (2008) relataram que a formação dos agregados ocorre concomitante e não seletivamente, onde as moléculas orgânicas interagindo com a superfície mineral.

Leite et al. (2003), em estudo sobre os estoques de COT e seus compartimentos em Argissolo sob agricultura e mata Atlântica, relataram que os estoques de COT diminuíram após a mudança de áreas de florestas para agricultura. Os solos de floresta apresentaram uma relação da quantificação (C_{mic}/COT) média de $2,47 \text{ kg ha}^{-1}$ em relação a $1,56 \text{ kg ha}^{-1}$ do solo agricultável. Essa diferença está relacionada à rápida mineralização do CO em solo sob agricultura, tendo como um dos fatores, a diminuição do aporte relacionado à falta de proteção física por meio dos agregados.

Six et al. (2002b), em trabalho de revisão sobre mecanismos de estabilização da MOS, descreveram que em solos agricultáveis sem manejo adequado há uma maior liberação de C, provocado, pela quebra das estruturas agregadas, aumentando assim a disponibilidade de C

mineralizável. Lehmann et al (2007), em trabalho sobre estabilização da MOS em microagregados, relataram que os agregados do solo são considerados o repositório mais estável de C, mesmo sendo um padrão aleatório de captura do C, ou seja, o C intragregado não necessariamente é uma estrutura recalcitrante, podendo conter frações lábeis como, açúcares, carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas.

2.3 Atividade biológica do solo

2.3.1 Atividade enzimática no solo

As enzimas são essenciais a todas as formas de vida, tendo sua síntese e atividade bastante regulada. Podem atuar dentro ou fora da célula, permanecendo ativas mesmo sem o crescimento microbiano. Apresentam alta especificidade de reação, elevada eficiência catalítica, não são consumidas na reação e estão sujeitas a processos de indução, ativação, inibição e desnaturação química ou biodegradação no ambiente (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As enzimas estão diretamente relacionadas à decomposição dos resíduos orgânicos (TRANNIN et al., 2007; CENCIANI et al., 2008; MARDOMINGO et al., 2013), mineralização e transformação da MOS, influenciando na ciclagem do C, nitrogênio (N), fósforo (P), enxofre (S) (BANDICK & DICK, 1999; CUI & HOLDEN, 2015), fertilidade do solo (GREGGIO & NAHAS, 2007; CENCIANI et al., 2008; EVANGELISTA et al., 2012), eficiência do uso de fertilizantes (FREITAS et al., 2010; GARCIA et al., 2010), interação entre plantas e estado de oxidação do solo (LONGO et al., 2011), além de servir como indicador de presença de poluentes (CARNEIRO et al., 2008).

Araújo & Monteiro (2007) em revisão sobre indicadores biológicos de qualidade do solo, relataram que as enzimas estão presentes no solo tanto associadas às células microbianas (enzimas intracelulares), como não associadas (enzimas extracelulares). As enzimas intracelulares catalisam reações que ocorrem dentro das células, podendo ser liberadas pela lise celular e exercer atividades extracelulares, enquanto que as extracelulares são programadas para serem liberadas e atuar no exterior da célula, degradando substratos estruturalmente grandes para serem transportados para dentro da membrana celular e metabolizados (GIANFREDA & RAO, 2004; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Quanto à atuação enzimática no substrato, as enzimas são classificadas em exoenzimas e endoenzimas. As exoenzimas são em grande maioria enzimas extracelulares que catalisam a remoção terminal de um polímero. As endoenzimas também são em maioria enzimas extracelulares, que degradam polímeros através de ligações internas e produzindo oligômeros que serão atacados por exoenzimas (GIANFREDA & RAO, 2004).

Caldewell (2005), em trabalho de revisão sobre atividade enzimática como componente da biodiversidade do solo, explicou que existem correlações entre a atividade enzimática e o substrato, havendo uma especificidade enzima/substrato. Dentro de cada tipo de nutriente, existem formas químicas específicas baseadas em estrutura ou de ligação. As principais formas de carbono encontrados no solo são polissacarídeos, aromáticos (lignina), alifáticos e para cada um desses compostos há enzimas específicas e ativas, algumas dessas enzimas estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2. Exemplos de atividades enzimáticas do solo relacionadas a ciclagem de carbono.

Forma	Composto	Enzima
Polissacarídeo	Celulose	Endo/ Exo-celulase
	(1,3)-glucan	(1,3)-glucanase
	Hemicelulose	Xilanase
	Quitina	Endo-quitinase
	Amido	Amilase
Aromático	Lignina	Fenoloxidase
		Peroxidase
		Mn-peroxidase
Alifático	Ésteres de ácido graxo	Lipases

Fonte: Caldewell (2005); Araújo et al. (2007)

Fatores inibitórios da atividade enzimática do solo

O carbono orgânico, além de ser aproveitado como fonte de energia pelos microrganismos, protege as enzimas do ataque de enzimas proteolíticas, que permanecem de forma constante no solo. Essa proteção se dá pela formação de complexos enzimas-compostos

húmicos, impossibilitando o acesso das enzimas proteolíticas (GIANFREDA & RAO, 2004; CALDEWELL, 2005).

Pillon et al (2002), em texto sobre a dinâmica da MOS, relataram que a interação organo-mineral resulta em alterações conformacionais na MO, a qual é protegida do ataque microbiano. As enzimas extracelulares também podem ser adsorvidas pelos minerais, inibindo sua ação (SIX et al., 2002ab; CALDEWELL, 2005). Burns et al. (2013) relataram que muitas enzimas extracelulares do solo tornam-se estabilizadas por meio da associação com argila e ácidos húmicos, causando uma diminuição da atividade enzimática em comparação aos seus homólogos livres por períodos prolongados.

A diminuição da atividade enzimática ocorre pela complexação da enzima, restringindo à acessibilidade ao substrato, oclusão de sítios ativos, como também pode causar mudanças da conformação da enzima. Entretanto, enzimas imobilizadas representam um importante reservatório de atividade microbiana, podendo funcionar como resposta catalítica a mudanças na disponibilidade de substrato nos solos, servindo como o gerador de sinalização para a comunidade microbiana e como fonte de substrato durante os períodos em que a biomassa microbiana possui baixa atividade, seja por condições naturais ou por estresse (BURNS, 1982; BANDICK & DICK, 1999; FERNANDES et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008; BURNS, 2013).

A influência do pH na catálise enzimática está correlacionada com o estado de ionização dos resíduos. A concentração de íons de hidrogênio no sistema reacional pode afetar os grupos de ionização da enzima ou influenciar o estado de ionização do substrato. Assim a constante de afinidade enzima-substrato torna-se afetada. Moléculas de enzimas possuem um número específico de grupos ionizáveis em sua distribuição total, assim como seu papel na degradação dos nutrientes são influenciados diretamente pela variação do pH no solo. Desta forma, cada enzima tem um pH ótimo de atuação, no qual a sua atividade é máxima (FRANKENBERGER & JOHANSON, 1982; WANG, 1990).

Atividade catalítica das enzimas

Celulases

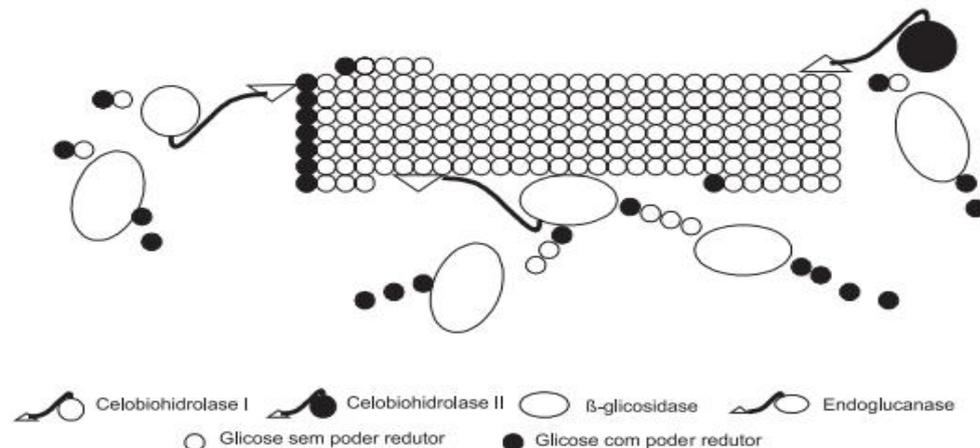
As celulases podem ser classificadas de acordo com a região de ação no substrato celulósico em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), exoglucanases (ExG) e - glucosidases (BG) (DENG & TABATABAI, 1994; DENG & TABATABAI, 1995; ZHANG

et al. 2006). A Figura 1 ilustra a ação sinérgica e dinâmica entre exoglucanases, endoglucanase e β -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica. As EnG são as enzimas do complexo celulolítico responsáveis por hidrolisar aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP). As EnG são as enzimas responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do GP), devido a sua rápida fragmentação em oligossacarídeos.

As ExG são constituídas por celobio-hidrolases (CBH) e glucano-hidrolase (GH). A GH tem como principal característica a liberação de glicose diretamente do polímero. As CBHs participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, onde há uma ruptura física do substrato, ocasionando a desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. As CBHs podem ser divididas em dois grupos: as enzimas do tipo I (CBH I), que hidrolisam terminais redutores e as enzimas do tipo II (CBH II) que hidrolisam terminais não redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pela celobiose (CASTRO & PEREIRA, 2010).

As BG atuam na etapa final da decomposição da celulose e têm como propriedade a redução da celobiose em oligossacarídeos solúveis (glicose). Assim como as CBH, as BG também podem sofrer inibição pelo seu produto de hidrólise (CASTRO & PEREIRA, 2010; EVANGELISTA et al. 2012).

Figura 1. Mecanismo de ação das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: Castro & Pereira (2010)

Xilanases

As xilanases são caracterizadas por serem enzimas extracelulares que hidrolisam substratos de xilana (SANTOS & ISHII, 2011). Gonçalves et al. (2015), em trabalho sobre os efeitos e a aplicação da xilanase na hidrólise de biomassa lignocelulósica, relataram que as xilanases têm sido tradicionalmente utilizadas em diversos processos industriais, especialmente em gêneros alimentícios, detergentes e em segmentos de papel e celulose. No entanto, são cada vez mais utilizadas para o processo de sacarificação de biomassa lignocelulósica, uma vez que possuem atividade auxiliar a hidrólise de celulose e hemicelulose, na obtenção de açúcares fermentáveis com potencial de utilização na produção de compostos bioquímicos e biocombustíveis.

2.4 Métodos de quantificação da atividade enzimática

2.4.1 Quantificação da atividade enzimática no solo

A atividade enzimática total do solo é determinada pelo método de diacetato de floresceína proposto por Ghini, Mendes e Bettiol (1998) e a atividade da enzima é estimada de acordo com o método proposto por Tabatabai (1994), utilizando a determinação colorimétrica do *p*-nitrofenol após incubação do solo com substrato específico de cada enzima, sendo *p*-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo para a β -glucosidase, carboximetilcelulose para a celulase e xilano de Birchwood para xilanase.

Bandick & Dick (1999), em estudo sobre os efeitos da atividade enzimática em diferentes usos da terra, relataram que as enzimas que catalisam reações bioquímicas são parte integrante do ciclo de nutrientes no solo, são principalmente de origem microbiana, mas também podem originar-se a partir de plantas e animais. Os autores avaliaram a atividade de onze diferentes tipos de enzimas do solo em relação ao manejo e qualidade do solo. Dentre as enzimas estudadas estão a alfa (α) e β -glucosidase, celulase, uréase, e β -galactosidase. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade da celulase, α -glucosidase e β -galactosidase em sistemas cultivados onde havia deposição de material orgânico, indicando a significância destas enzimas na ciclagem de nutrientes devido ao seu papel no ciclo do carbono.

Evangelista et al. (2012), em trabalho sobre atividade enzimática do solo sob sistema de produção orgânica e convencional, tiveram como objetivo avaliar a atividade das enzimas

ligadas ao ciclo do carbono (α -glucosidase), à mineralização do fósforo (fosfatase ácida) e atividade enzimática total do solo sob sistemas de produção orgânica e convencional. Observaram maiores níveis da atividade enzimática da α -glucosidase, em média 76 e 60 %, em solos sob cerrado nativo e sistema de produção orgânica, respectivamente. Estes resultados foram significativos quanto a relação da α -glucosidase na ciclagem do material orgânico provido das adubações orgânicas, bem como da deposição lenta do material vegetal sobre o solo na área nativa.

2.4.2 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulóticos

Atualmente, uma das aplicações em desenvolvimento das enzimas do complexo celulolítico é a hidrólise de biomassas, como por exemplo, a utilização do bagaço de cana-de-açúcar para produção de álcool. As matérias-primas de origem lignocelulósica, com constituição média de 20 a 60% de celulose, podem ser convertidas em glicose, por ação enzimática, tendo como produto final uma gama de subprodutos, como por exemplo, etanol (CASTRO & JR, 2010).

No processo de hidrólise enzimática, geralmente a biomassa passa por um pré-tratamento, objetivando o aumento da acessibilidade da biomassa ao ataque enzimático. A hidrólise é realizada com o uso de um complexo enzimático altamente especificado em relação ao substrato, o que leva a uma diminuição dos custos na separação dos produtos. Em via de regra, no processo de hidrólise enzimática as condições de temperatura (45 ó 50 °C) e pH (4,8 ó 5,0) são mantidas constantes, com o intuito de aumentar o rendimento. O rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores, como o tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e taxa de agitação (SUN & CHENG, 2002; CASTRO & JR, 2010; DYK & PLETSCHE, 2012; WANDERLEY et al., 2013; YANG & FANG, 2014;).

2.5 Métodos de mensuração e fracionamento do carbono orgânico da MOS

2.5.1 Oxidação da matéria orgânica do solo

O estoque de C no solo compreende desde frações intimamente associadas aos minerais até frações mais lábeis (ativas), pouco ou não associadas à fração mineral, como os resíduos vegetais existentes entre e dentro de agregados no solo. O carbono orgânico (CO) pode ser indicador de alterações da qualidade do solo, uma vez que está associado às funções ecológicas do ambiente, sendo capaz de refletir as mudanças do uso da terra (SIMÕES et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Rheinheimer et al. (2008), em trabalho sobre a comparação de métodos de determinação do COT no solo, relataram que a MOS contém em média 50 % de C, em relação à massa total. Portanto, a determinação do COT tem sido utilizada para estimar quantitativamente a fração orgânica do solo (BUSO & KLIEMANN, 2003; BEZERRA et al., 2013; MACHADO et al., 2014).

Os teores de COT podem ser determinados por métodos que se baseiam nos princípios de combustão a seco e combustão úmida. O método de combustão a seco é considerado padrão, devido a sua alta precisão e exatidão nos resultados. Neste método, a amostra é oxidada em forno, à temperatura de 1.020 ó 1.500 °C, alimentado com oxigênio (O₂) sob pressão de 30 kPa. As moléculas orgânicas são oxidadas na forma de N_xO_y e CO₂. H₂O + O₂, que são carregadas nas formas de gás, para um forno de redução, sob fluxo de hélio. O forno de redução contém íons Cu (cobre), à temperatura de 750 °C, onde o N (nitrogênio) sai na forma de N₂ (gás nitrogênio). Posteriormente, o N₂ e o CO₂ são separados em uma coluna cromatográfica e determinados em detector apropriado (RHEINHEIMER et al., 2008).

Entre os métodos de combustão úmida destacam-se os propostos por Walkley & Black (1934) e por Yeomans & Bremner (1988). Ambos baseiam-se na oxidação da MOS com uma mistura de K₂Cr₂O₇ (dicromato de potássio) a 0,167 mol L⁻¹ e H₂SO₄ (ácido sulfúrico) concentrado, sendo o excesso de dicromato titulado com sulfato ferroso amoniacal, assumindo que o dicromato reduzido durante a reação com o solo equivale ao CO na amostra. Porém, no método proposto por Walkley & Black, faz-se necessária a aplicação de um fator de correção, uma vez que não ocorre completa oxidação do CO da amostra. A principal diferença entre os métodos de combustão úmida é a fonte externa de aquecimento. Na proposta por Yeomans & Bremner, o aquecimento da mistura a 170 °C, por 30 min, seria

suficiente para a completa oxidação do CO, sendo desnecessário empregar um fator de correção (RHEINHEIMER et al., 2008; SANTOS et al., 2008; GATTO et al., 2009).

Atualmente, o método de Walkley-Black ainda é o mais empregado em laboratórios de solos devido à simplicidade e ao baixo custo das análises, mesmo apresentando problemas analíticos, devido à não uniformidade nos métodos utilizados, e ambientais, devido ao uso do cromo (SANTOS et al., 2008; RHEINHEIMER et al., 2008). O método do Analisador Elementar, considerado como padrão mundial de determinação da MOS, possui vantagens quanto à ausência da utilização de qualquer tipo de extrator, o que elimina possíveis influências destas substâncias na quantificação do CO, permitindo análises rápidas e confiáveis, mas, também possui problemas quanto a custos de cada análise e a manutenção dos equipamentos, que são elevados (RHEINHEIMER et al., 2008; SANTOS et al., 2008; GATTO et al., 2009).

2.5.2 Respiração basal

A taxa de respiração basal do solo consiste na medida da produção de CO₂ resultante da atividade metabólica no solo de microrganismos, raízes vivas e macrorganismos (TÓTOLA & CHAER, 2002). Sua medição pode ser considerada uma estimativa indireta da velocidade de decomposição da MOS (KUMMER et al., 2008). A respiração do solo é um dos componentes mais importantes do ciclo de C em ecossistemas (ADACHI et al., 2006).

Adachi et al (2006), em trabalho sobre diferentes taxas de respiração do solo em distintos ecossistemas tropicais, estimaram que a produção primária líquida anual de regiões tropicais é aproximadamente 32% da fotossíntese terrestre global. Malh & Grace (2000), em estudo sobre florestas tropicais e CO₂ atmosférico, calcularam que as florestas tropicais são estimadas em dreno de C de aproximadamente 1 a 3 Pg C ano⁻¹.

Uma alta taxa de respiração é indicativo de alta atividade biológica e pode ser uma característica desejável se considerado que é um sinal de rápida decomposição de resíduos orgânicos em nutrientes disponíveis para as plantas (TÓTOLA & CHAER, 2002; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Islam & Weil (2000) relataram que taxas elevadas de respiração podem indicar tanto distúrbio ecológico, como a incorporação de resíduos, como um alto nível de produtividade do ecossistema.

As taxas da respiração basal do solo estão relacionadas à umidade, conteúdo de C e temperatura (ADACHI et al., 2006; YI et al., 2007), e presença de cobertura vegetal. Raízes

mais abundantes também influenciam as taxas respiratórias do solo, pois o sistema radicular libera grande quantidade de exsudados, que estimulam a atividade microbiana (KUMMER et al., 2008).

Diversos trabalhos (ISLAM & WEIL, 2000; DILLY, 2006; ARAÚJO et al., 2008; MATIAS et al., 2009; ALVES et al., 2011; JHA & MOHAPATRA, 2011) utilizaram a respiração basal como parâmetro na quantificação das atividades biológicas dos solos, pois tal método consiste em uma das formas mais diretas de quantificar a MO lábil do solo.

2.5.3 Carbono da biomassa microbiana

A biomassa microbiana é considerada a parte viva e mais ativa da MOS, constituída por fungos, bactérias, protozoários e algas. A biomassa microbiana representa aproximadamente 2 a 5 % do C orgânico e 1 a 5 % do N total do solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; ROSCOE et al., 2006), e atua diretamente no balanço de nutrientes (ARAÚJO & MELO, 2010), em processos de formação do solo (intemperização de rochas) (ZAIA et al., 2008), decomposição de resíduos orgânicos disponibilizando-os as plantas (BUSO & KLIEMANN, 2003; ALVES et al., 2011), biorremediação de poluentes e metais pesados (LONGO et al., 2011; BOECHAT et al., 2012).

Para avaliar a interferência da atividade microbiana na dinâmica da MOS, diversos métodos são utilizados na quantificação do C microbiano do solo. Dentre os métodos utilizados estão: o método de clorofórmio-fumigação-incubação (CFI), descrito por Jenkinson & Powlson (1976); o método de clorofórmio-fumigação-extração (CFE), descrito por Vance et al. (1987); o método de respiração induzida por substrato, descrito por Andersom & Domsch (1978); e o método de observação e contagem direta de células microbianas por microscopia direta. Em trabalhos recentes os métodos CFI e CFE são os mais utilizados (LI et al., 2004; ARAÚJO et al., 2008; ZHOU et al., 2013; MARDOMINGO et al., 2013; QUANYING et al., 2014).

No método CFI, a determinação do C microbiano baseia-se na medição de um pico de produção de CO₂ liberado pelas amostras de solo fumigadas (com clorofórmio) e não-fumigadas após um período de incubação, em média 10 dias. O pico de CO₂ liberado nas amostras fumigadas é resultante da decomposição do material liberado pelos microrganismos mortos, enquanto que nas amostras não-fumigadas o fluxo de CO₂ se dá pela respiração basal do solo (JENKINSON & POWLSON, 1976). O método de CFE baseia-se na quantificação do

C microbiano pela diferença da extração de C dos solos fumigados (clorofórmio) e não-fumigados, e são extraídos por uma solução de K_2SO_4 (sulfato de potássio) e quantificados por uma solução de dicromato e H_2SO_4 (VANCE et al., 1987).

Roscoe et al. (2006) e Oliveira et al. (2001) salientaram que ambos os métodos, CFI e CFE apresentam vantagens e desvantagens. Para o método de CFI a vantagem está na simplicidade analítica e no fato que os valores da taxa de respiração microbiana (liberação de CO_2) também podem ser determinados. Entre suas limitações, destacam-se o fato que o método não deve ser utilizado em áreas que receberam adições recentes de material orgânico e solos com pH em água inferior a 5,0. Para o método CFE, a principal vantagem é que não há dependência do estado fisiológico da população microbiana do solo. Entre as desvantagens, destaca-se o fato que, os procedimentos analíticos para determinação do C extraído das amostras são complexos e trabalhosos, envolvendo a utilização de produtos tóxicos, como o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).

2.5.4 Fracionamento físico da MOS

O fracionamento físico do solo é baseado em técnicas de separação das frações da MOS através métodos granulométricos, densimétricos ou com a utilização de energia. Esses métodos têm como objetivo principal a separação da MO com diferente composição e grau de associação com a matriz do solo (ROSCOE et al., 2006). Roscoe & Machado (2002) afirmaram que os métodos físicos são considerados menos destrutivos e mais relacionados com a função a estrutura da MOS.

Método densimétrico

O fracionamento densimétrico é um método que se baseia na separação de compartimentos das frações orgânica e mineral do solo, mediante uso de soluções com densidades variando de 1,1 a 2,4 $kg\ dm^{-3}$ (CONCEIÇÃO et al., 2007; DEMOLINARI et al., 2008). O método de fracionamento densimétrico tradicional admite a obtenção de três frações da MO, as quais se diferenciam em relação à dinâmica e estabilidade, à localização na estrutura do solo e ao grau de interação com a matriz mineral (PINHEIRO et al., 2004; RANGEL et al., 2007).

A fração leve livre (FLL) ou interagregados possui composição molecular comparável à de materiais vegetais e o principal mecanismo de proteção atuante é a recalitrância intrínseca da biomolécula. A fração leve oclusa (FLO) ou intragregados compreende um diversificado conjunto de compostos orgânicos com grau de decomposição geralmente mais avançado em comparação à FLL, e os mecanismos de estabilização atuantes são a recalitrância molecular e a proteção física por oclusão em agregados de solo. A fração pesada (FP) é composta basicamente pela MO associada aos minerais do solo, apresentando estágio mais avançado de decomposição. Nessa fração, há uma forte interação da MO com a matriz mineral, conferindo a esse compartimento maior contribuição para o armazenamento de CO no solo (SANTOS et al., 2013; CONCEIÇÃO et al., 2014; CONCEIÇÃO et al., 2015).

As soluções usualmente utilizadas em estudos de fracionamento densimétrico da MO são predominantemente inorgânicas, com destaque para as soluções de iodeto de sódio (NaI) e de politungstato de sódio (PTS), basicamente em razão da sua menor toxidez em comparação às soluções orgânicas inicialmente empregadas (tetrabrometano ($C_2H_2Br_4$) ó 2,96 g cm⁻³, bromofórmio ($CHBr_3$) ó 2,88 g cm⁻³, tetraclorometano (CCl_4) ó 1,59 g cm⁻³) (LUTZOW et al., 2007; SANGIL & ROVIRA, 2013).

Método granulométrico

Cambardella & Elliott (1992) e Bayer et al. (2004) descreveram que o fracionamento granulométrico consiste na separação da MOS associada a partículas minerais de diferentes tamanhos separadas por dispersão e peneiramento, dividindo-se em duas frações orgânicas: o carbono orgânico particulado (COp) e o carbono orgânico associado aos minerais (COM).

O COp consiste na fração orgânica associada à fração areia (> 53µm), sendo caracterizado como partículas derivadas de resíduos de plantas e hifas com estruturas celulares reconhecíveis, cuja permanência no solo está condicionada à proteção física desempenhada por agregados (LOSS et al. 2009; CARMO et al. 2012). O COM é a fração orgânica associada às frações silte e argila (< 53µm), sendo definida como a fração da MOS que interage com a superfície de partículas minerais, formando complexos organominerais, estando protegida pelo mecanismo de proteção coloidal (LOSS et al. 2009; CARMO et al. 2012).

Lutzow et al. (2007), em trabalho sobre diferentes métodos de fracionamento da MOS, relataram que, para solos de clima temperado, a tendência de em média 50-75 % do COT estarem associados a partículas de argila (2 mm), 20-40 % com partículas de silte (2 -63 mm)

e <10 % com partículas de areia (4 - 63 μm). Para solos tropicais ainda são escassos dados que reportem a quantificação da MOS associada a fração mineral. Leite & Mendonça (2003) descreveram, em trabalho sobre modelos matemáticos de ciclagem da MOS, que a formação da MO passiva é controlada pelo conteúdo de argila e que o fluxo de C da MO ativa e/ou MO lenta para MO passiva consiste em uma função linear ao conteúdo de argila no solo.

Ultrassonificação do solo

A energia ultrassônica vem sendo amplamente utilizada em ciência do solo com propósitos distintos, como no fracionamento físico da MOS (LEIFELD & KNABNER, 2005; NEVES et al., 2005) e determinação granulométrica do solo (SÁ et al., 1999; SÁ et al., 2002). No método de sonificação, uma quantidade de solo é colocada em um recipiente com água e submetido a um determinado nível de energia.

A quebra dos agregados do solo é causada pela cavitação, ou seja, pela formação de bolhas de ar no líquido, que ocorre principalmente na superfície dos agregados e em suas fendas e linhas de fraqueza. O colapso das bolhas de ar causa desagregação e dispersão dos microagregados (SÁ & LIMA, 2005). Existem dois tipos de sonificadores, tipo tanque (banho) e tipo haste (contato com a solução do solo). Sá & Lima (2005) ressaltaram que o primeiro tipo de sonificador é menos eficiente na cavitação, pois a energia aplicada não penetra de forma uniforme no recipiente utilizado.

Dentre os fatores que influenciam a cavitação nos agregados do solo estão: a falta de padronização da energia utilizada na dispersão pelo ultrassom (SÁ et al., 2004), a profundidade de imersão da amostra, o tipo de recipiente utilizado (SÁ et al., 1999; SÁ & LIMA, 2005). Raine & So (1994), em estudo sobre a eficiência da ultrassonificação, relataram que a eficiência da dispersão pelo ultrassom decresce com o aumento da temperatura, onde deve ser mantida abaixo dos 35 °C.

Sá et al. (2002), em trabalho sobre interferência de níveis de energia na estabilidade de agregados do solo, relataram que na exposição à energia ultrassônica não há destruição das partículas elementares do solo, havendo apenas a quebra dos agregados. Neste mesmo trabalho, os autores observaram que a melhor faixa de energia ultrassônica para desestabilização do solo está entre 30 e 90 J mL^{-1} e a estabilidade dos agregados é influenciada pelos teores de carbono orgânico e argila no solo (SÁ et al., 1999).

2.5.5 Fracionamento químico da MOS

Substâncias Húmicas (SHs)

As SHs são formadas pelo processo de humificação e são constituídas por moléculas complexas, heterogêneas e polidispersas, modificadas química e biologicamente (PESSOA et al. 2012) e constituem aproximadamente 70 a 80 % da MOS (PRIMO et al., 2011). As SHs são compostas pelas frações ácidos fúlvicos (AF), ácidos húmicos (AH) e humina (HUM), determinadas com base na solubilidade em meio ácido ou alcalino (FONTANA et al. 2006). A fração AF é solúvel em qualquer valor de pH da solução; a fração AH é solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido e a fração HUM é insolúvel e permanece ligada a fração mineral do solo (FASSARELLA et al. 2012).

Roscoe & Machado (2002) relataram que o método de SHs pouco tem contribuído para a identificação de compartimentos da MOS. Tal afirmação possui duas prováveis razões: (i) AH e AF, em geral, apresentam baixa taxa de transformação, desta forma, dificilmente se relacionam com processos de curto prazo; (ii) extrações alcalinas e ácidas são altamente seletivas e ligadas à solubilidade dos compostos orgânicos, o que leva a extração de compostos semelhantes de compartimentos ou reservatórios da MOS completamente diferentes.

Hidrólise ácida

Entre os métodos químicos utilizados para quantificar as frações de C do solo está à hidrólise ácida, que tem sido utilizada em trabalhos internacionais (COLLINS et al., 2000; ROVIRA & VALLEJO, 2000; ROVIRA & VALLEJO, 2002; SILVEIRA et al., 2008), mas, de forma escassa no Brasil, para distinguir as frações ativas e resistentes da MO. A fração hidrolisável é amplamente composta por proteínas, ácidos nucleicos e polissacáridos (ROVIRA & VALLEJO, 2002), enquanto o resíduo não hidrolisável contém principalmente gorduras, ceras e resinas (ROVIRA E VALLEJO, 2000).

O protocolo mais adotado na hidrólise ácida utiliza ácido clorídrico (HCl) 6N (COLLINS et al., 2000; SILVEIRA et al., 2008) ou ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 5N (ROVIRA E VALLEJO, 2002). Rovira & Vallejo (2000) afirmaram que as hidrólises com HCl ou H₂SO₄ têm sido igualmente aplicadas, para separar a fração mais recalcitrante, material mais

antigo, do hidrolisado. Silveira et al. (2008) relataram, em trabalho sobre quantificação da fração lábil do solo, que a hidrólise ácida é capaz de extrair cerca de 90 % dos carboidratos com HCl 6N, sem haver mudanças significativas nas frações alifáticas, aromática e recalcitrantes da MOS.

Carbono solúvel em água

A matéria orgânica solúvel em água (MOSA) representa uma pequena proporção da MO total no solo (CHANTIGNY, 2003) e consiste em um reservatório lábil da MOS, que inclui a biomassa microbiana, bem como carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos (GHANI et al., 2003), além de ser uma fração móvel, podendo refletir os efeitos de diferentes sistemas de manejo (SILVEIRA, 2005).

Chantigny (2003), em trabalho de revisão sobre a MOSA, relatou que o uso da terra é considerado como o fator que mais exerce influência sobre a MOSA, uma vez que a vegetação é a principal fonte de MO no ecossistema. Fatores ambientais como clima, relevo, umidade e textura do solo, influenciam a dinâmica da MO em escala local e global. Neves et al. (2006), analisando o efeito do manejo do solo e da MOS solúvel em água, observaram correlação entre o teor de carbono solúvel em água e a estabilidade dos agregados, pressupondo que o carbono solúvel é um dos componentes da matéria orgânica responsáveis pela manutenção da estrutura do solo.

Chantigny et al. (2014) testaram a influência da temperatura e do tempo sobre o carbono solúvel da MO em solos agrícolas da Nova Zelândia, extraíndo as frações solúveis com água quente e fria. Observaram aumento das frações solúveis nas primeiras 4h a 80 °C, seguido por taxas mais lentas. Em temperatura de 20 °C, as concentrações das frações solúveis tiveram seu máximo na primeira hora, não mostrando alterações posteriores.

Resultados semelhantes aos encontrados por Chantigny et al. (2014) também foram encontrados em outros trabalhos (MARTINEZ et al., 2003; SILVEIRA et al., 2008; CHANTIGNY et al., 2010), que discutiram que a temperatura de extração pode influenciar a composição e a biodegradabilidade das frações solúveis em água. Os autores relataram que os carboidratos medidos na extração por água em temperaturas distintas eram predominantemente de origem microbiana, havendo diminuição da proporção dos carboidratos microbianos com o aumento da proporção de carboidratos oriundos da vegetação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O experimento em campo foi conduzido na estação experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), no município de Itambé, PE. A estação experimental ocupa uma área de 240 ha, está localizada na Zona da Mata Norte de Pernambuco (área de transição entre a Zona da Mata seca e Agreste de Pernambuco), com coordenadas geográficas de 7°24'50"S e 35°06'30"W, altitude de 190m, clima do tipo Asø (Köppen), tropical chuvoso (quente e úmido) com verão seco, pluviosidade média anual de 1.200 mm (chuvas concentradas entre maio e julho), temperatura média anual de 25 °C, com máxima de 30 °C e mínima de 20 °C, umidade relativa do ar média de 80 % (ENCARNAÇÃO, 1980), com solo predominante classificado segundo à SBCS (2013) como Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico (FERREIRA et al., 2007).

3.2 Amostragem do solo

O solo foi coletado sob dois usos distintos da terra: mata nativa e cana-de-açúcar. As amostragens da mata nativa e cana-de-açúcar foram realizadas em 24 de março de 2015. Em cada uso do solo foram realizadas amostragens simples em nove pontos distintos; em seguida o solo coletado foi homogeneizado e retirado uma subamostra composta. Para as análises de hidrólise enzimática as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em caixa de isopor em baixa temperatura até o momento da análise. As amostras utilizadas para quantificação do carbono orgânico, caracterização química e física foram mantidas em temperatura ambiente.

As amostras foram coletadas na camada de 0 a 20 cm. Após a coleta as amostras foram enviadas ao Laboratório de Energia da Biomassa no Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras utilizadas para as caracterizações químicas e físicas e quantificação do C foram secas ao ar, destorroadas e passadas em peneira de malha de 2 mm, obtendo-se terra fina seca ao ar (TFSA). Nas amostras utilizadas no processo de hidrólise enzimática foi feita uma limpeza manual para a retirada de restos de raízes e posteriormente foram passadas em peneira de malha de 2 mm e resfriadas a aproximadamente 4 °C (com o objetivo de diminuição do metabolismo microbiano).

As determinações das propriedades químicas e físicas do solo foram realizadas no IPA, no município de Recife, onde foram realizadas análises de pH em água, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, sódio, alumínio, capacidade de troca catiônica (CTC), granulometria, densidade do solo e classe textural (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Atributos químicos em um Argissolo sob dois diferentes sistemas de usos da terra (mata nativa e cana-de-açúcar) na Zona da Mata do estado de Pernambuco.

Usos	pH	P (mg/dm ³)	----- (cmol/dm ³) -----					S	CTC	v (%)	m
			Ca	Mg	Na	K	Al				
Mata	4,9	3,0	3,0	0,9	0,1	0,1	1,0	4,1	16,5	25	21
Cana	5,5	3,3	3,7	0,7	0,04	0,1	0,3	4,6	12,6	36	8,5

P = fósforo, Ca = cálcio, Mg = manganês, Na = sódio, K = potássio, Al = alumínio, S = enxofre, v = saturação por bases, m = saturação por alumínio

Tabela 4. Atributos físicos em um Argissolo sob dois diferentes sistemas de usos da terra (mata nativa e cana-de-açúcar) na Zona da Mata do estado de Pernambuco.

Usos	Densidade (g/cm ³)	Areia	Areia	Silte	Argila	Classe textural
		grossa	fina			
		----- (%) -----				
Mata	1,3	46,7	19	16	18,3	Franco arenoso
Cana	1,4	44,7	20,7	11,7	23	Franco argilo-arenoso

3.3 Metodologias de quantificação do carbono orgânico

3.3.1 Carbono orgânico total (COT)

Os teores de COT foram quantificados pelo método descrito por Yeomans & Bremner (1998). Para as análises de quantificação do COT, foram utilizados 0,1 g de solo acrescido de 5 mL da solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇ 0,167 mol.L⁻¹) e 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, mantidos a 170 °C por 30 minutos. Posteriormente foram quantificados os teores de CO pelo método titulométrico com sulfato ferroso amoniacal 0,2 mol.L⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.2 Carbono solúvel em água quente (CSAQ)

Os teores do carbono solúvel em água quente foram obtidos seguindo a metodologia descrita nos trabalhos de Rovira & Vallejo (2007) e Silveira et al. (2008). Os compostos solúveis foram removidos utilizando 5 g de solo (TFSA) com 25 mL de água deionizada em tubo com fundo cônico, tipo falcon, com capacidade para 50 mL a 20 °C por 30 minutos sob agitação, centrifugado durante 10 minutos a 7342 rpm (6037 g) e filtrado (filtro de papel de 45 µm de diâmetro do poro). Posteriormente, no mesmo recipiente, ao resíduo remanescente de solo foi adicionado 25 mL de água deionizada a 80 °C por 30 minutos com agitação, centrifugado durante 10 minutos a 7342 rpm (6037 g) e adicionado a filtragem idêntica a descrita anteriormente. Os extratos foram armazenados e resfriados a 4 °C (período máximo de armazenamento de 7 dias), até serem utilizados na quantificação do carbono orgânico em analisador de carbono TOC (Shimadzu TOC-V CSH).

Como método auxiliar à quantificação do carbono orgânico em analisador TOC, foram realizadas análises utilizando o método de demanda química de oxigênio (DQO) de acordo com Standard Methods (APHA, 1992). O método consiste na quantificação do oxigênio (em mgO₂/L) consumida pela matéria orgânica existente no sobrenadante por um agente químico oxidante forte (dicromato de potássio em meio ácido). Para as análises de DQO, foram utilizados 2,5 ml do hidrolisado (sobrenadante), acrescidos por 1,5 mL da solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇ 0,025N) e 3,5 mL da solução catalizadora (ácido sulfúrico e sulfato de prata), mantidos a 150 °C por 2h. A posteriori foram quantificados os teores de O₂ pelo método titulométrico com sulfato ferroso amoniacal (0,025N). As análises foram realizadas em triplicata.

3.4 Quantificação do carbono orgânico do solo por hidrólise enzimática

3.4.1 Determinação da atividade das enzimas

A enzima utilizada no experimento foi a FibreZyme™ LDI (Dyadic International Inc., Jupiter, USA), que é um complexo enzimático composto por xilanase, -glicosidase e celulase. As padronizações das atividades enzimáticas foram realizadas com suas respectivas dosagens no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, sendo os resultados expressos em

U/mL, onde uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de grupos redutores (glicose) por minuto. Para as análises de atividade enzimática as enzimas foram diluídas em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5.

3.4.3 Determinação da atividade da Carboximetilcelulase (CMCase)

A atividade endoglucanásica do complexo enzimático (FibreZyme) foi quantificada de acordo com o método descrito por Ghose (1987), modificado. Em microtubos Eppendorfs de 2 mL foram adicionados 50 μL do extrato enzimático (diluído 10 vezes em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5), em seguida foram adicionados 50 μL de solução de carboximetilcelulose (CMC) (SIGMA, USA) a 1 % pH 5 em tampão acetato de sódio 50 mM. A mistura foi incubada imediatamente a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Decorrido o tempo reacional, foram adicionados 100 μL de reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS, seguido de incubação a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Após este período, foram adicionados 800 μL de água deionizada, seguido de homogeneização. A intensidade da cor formada foi detectada em espectrofotômetro a 540 nm, após a calibração do equipamento com o branco reacional.

A determinação de açúcares redutores foi feita de acordo com Miller (1959), utilizando glicose como padrão, sendo uma unidade de atividade definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de grupos redutores (glicose) por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.4 Determinação da atividade da α -glucosidase

A dosagem de α -glucosidase do complexo enzimático (FibreZyme) foi quantificada de acordo com a metodologia descrita por Tan et al. (1987). Foram adicionados 85 μL do extrato enzimático (diluído 50 vezes em tampão acetato de sódio pH 5, 50 mM) e 335 μL de p-nitrofenil-beta-glicopiranosídeo (pNPG) 0,2 % tamponado em acetato de sódio a 50 mM, pH 5. Posteriormente foram incubados por 30 minutos a 50 $^{\circ}\text{C}$ e a reação foi interrompida ao adicionar 835 μL de bicarbonato de sódio a 10 %. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 405 nm, após a calibração do equipamento com o branco reacional. Uma unidade internacional (IU) de atividade de α -glucosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de α -PNP por minuto, sob as condições do ensaio, utilizando α -PNP como padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.5 Determinação da atividade xilanolítica

A atividade xilanolítica do complexo enzimático (FibreZyme) foi determinada por meio da incubação de 50 µL do extrato enzimático (diluído 50 vezes em tampão acetato de sódio pH 5, 50 mM), com 75 µL de solução de xilano de Birchwood (SIGMA, USA) a 1 % (tampão acetato de sódio pH 5, 50 mM), por 10 minutos a 50 °C, formando o complexo enzima/substrato. Decorrido o tempo reacional, foram adicionados 125 µL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) no complexo enzima/substrato, seguido de incubação a 100 °C por 5 minutos, e adição de 1000 µL de água deionizada, seguido por leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda a 540 nm, após a calibração do equipamento com o branco reacional. A determinação de açúcares redutores foi feita segundo Miller (1959) utilizando xilose como padrão, sendo uma unidade de atividade definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 mol de xilose por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.6 Hidrólise enzimática do solo

Amostras de 5 g de solo foram pesadas em triplicata e adicionadas a um volume fixo de 120 mL de tampão e enzima (correspondendo aproximadamente as dosagens: 0, 1, 2, 4 mL de enzima). A hidrólise enzimática foi realizada em meio tamponado sob agitação de 150 rpm, temperatura média de 45 °C nos tempos de 0, 96 e 168 horas.

Cada dosagem de enzima utilizando acetato de sódio (50 mM, pH 5) como tampão corresponde a um tratamento distinto. O tratamento 1 (T1) corresponde a 120 mL do tampão acetato de sódio e 5 g de solo e o tratamento 2 (T2) a 1 mL do complexo enzimático, 119 mL do tampão acetato de sódio e 5 g de solo. Cada tratamento foi feito em triplicata e os brancos (tratamento testemunho) tiveram apenas as dosagens enzimáticas e o tampão acetato.

Para os tratamentos utilizando água deionizada, cada dosagem de enzima utilizada corresponde a um tratamento distinto. O tratamento 1 (T1) teve 120 mL de água deionizada e 5 g de solo; o tratamento 2 (T2) teve 1 mL do complexo enzimático, 119 mL de água deionizada e 5 g de solo; o tratamento 3 (T3) teve 2 mL do complexo enzimático, 118 mL de água deionizada e 5 g de solo; e o tratamento 4 (T4) teve 4 mL do complexo enzimático, 116 mL de água deionizada e 5 g de solo. Cada tratamento foi triplicado e os brancos (tratamento testemunho) tiveram apenas as dosagens enzimáticas e água deionizada.

A quantificação do carbono orgânico para os tratamentos utilizando o tampão acetato de sódio se deu pelos compostos solvidos na solução (hidrolisados), tendo sido coletados 15 mL do sobrenadante nos tempos de 0, 96 e 168 horas e acondicionado em tubo com fundo cônico, tipo falcon, com capacidade para 50 mL, centrifugados durante 10 minutos a 7342 rpm (6037 g) e filtrados (filtro de papel de 45 μm de diâmetro do poro). Os extratos foram armazenados e resfriados a 4 °C (período máximo de armazenamento de 7 dias) até serem utilizados posteriormente na quantificação do carbono orgânico em analisador TOC.

Para quantificação da matéria orgânica nos tratamentos utilizando água deionizada como tampão, foi utilizado o método de demanda química de oxigênio (DQO), de acordo com Standard Methods (APHA, 1992).

3.5 Extração sequencial do carbono orgânico por hidrólise enzimática

Para liberação e quantificação dos compostos de carbono das frações da MOS através da hidrólise enzimática, foi realizada uma sequência analítica constituída por 2 etapas:

(i) Extração do carbono solúvel em água quente (item 3.3.2.). Os compostos solúveis em água foram removidos e o resíduo do solo foi resfriado a 4 °C (período máximo de armazenamento de 7 dias) até a análise posterior.

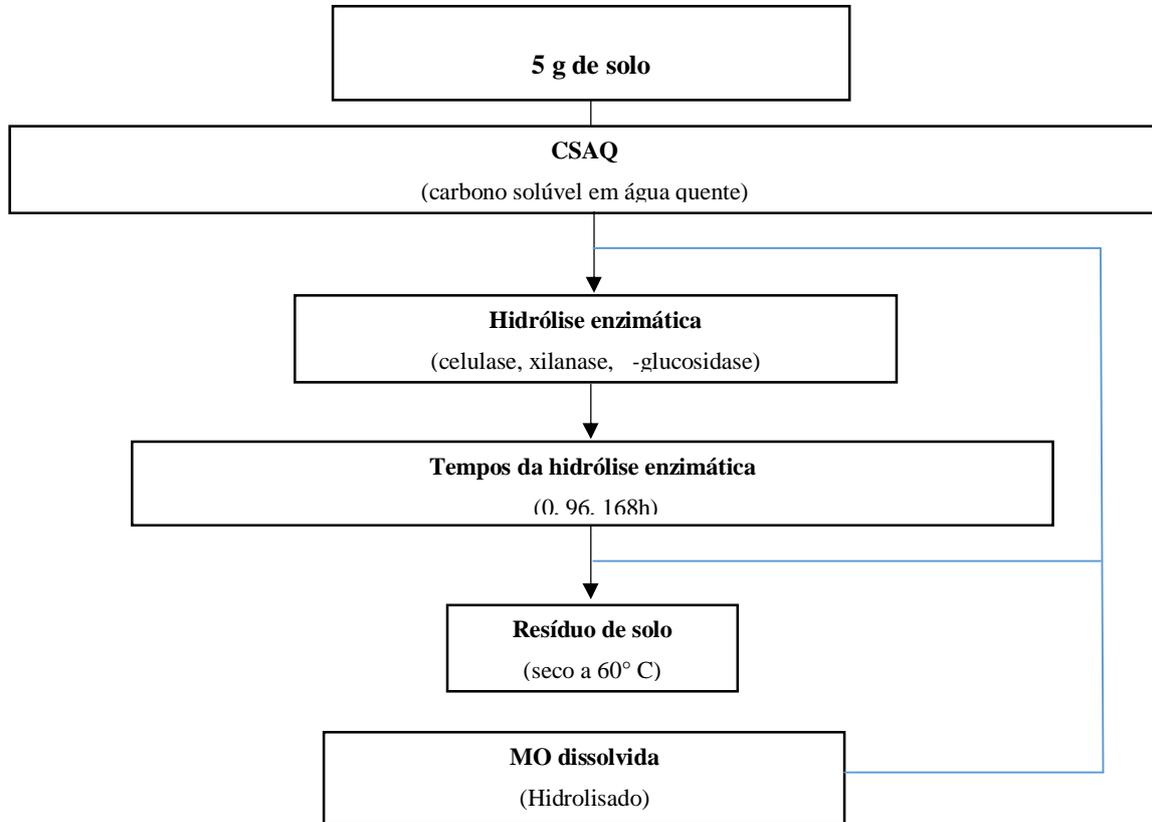
(ii) Hidrólise enzimática (item 3.4.6.). Os resíduos de solo foram hidrolisados com cargas enzimáticas e tempos distintos.

A metodologia sequencial está descrita na Figura 2.

3.6 Análise Estatística

Os dados de CO derivados dos diferentes tratamentos e tempos de extração foram submetidos a análises não paramétricas, utilizando o teste de Friedman em relação à variação da quantidade de MO extraída nos diferentes tempos reacionais; o teste de Spearman correlacionando as quantidades de teores de MO extraída nos diferentes tratamentos; o teste de Kruskal-Wallis comparando os diferentes tratamentos dentro de cada tempo de extração e o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para comparar os teores de MO extraída entre os dois diferentes métodos (analisador de carbono orgânico e demanda química de oxigênio). Os testes estatísticos foram realizados aplicando o software estatístico R.

Figura 2. Fluxograma da metodologia analítica sequencial de hidrólise enzimática do carbono orgânico do solo em Argissolo sob dois diferentes sistemas de uso da terra: mata nativa e cana-de-açúcar, na Zona da Mata do estado de Pernambuco.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Carbono orgânico total (COT)

Os teores de COT encontrados nos solos foram de 17,39 e 6,62 mgC g⁻¹ solo nas áreas sob mata nativa e cultivo de cana-de-açúcar, respectivamente (Tabela 5.). Os maiores teores de COT na área de mata nativa estão provavelmente associados a uma maior incorporação de material vegetal ao solo, assim como a uma maior ciclagem de nutrientes. Por outro lado, o menor teor de COT na área de cana demonstra o impacto negativo da conversão de mata em agricultura, do ponto de vista do estoque de C no sistema.

A marcante diferença nos teores de carbono (C) do solo entre os dois usos da terra utilizados era esperada, pois a intenção era testar a capacidade das metodologias de fracionamento em identificar as quantidades de C com diferentes labilidades no solo. Nesse caso, espera-se que o solo sob cultivo de cana-de-açúcar apresente menores quantidades de carbono orgânico e menores proporções de carbono lábil, uma vez que as práticas de cultivo estimulam a decomposição dessa fração.

5.2. Quantificação do CO no processo de hidrólise enzimática

Quantificação do carbono solúvel em água quente

O carbono solúvel em água quente (CSAQ) quantificado através foi de 0,32 e 0,26 mgC g⁻¹ solo (Tabela 5.) para mata nativa e cana-de-açúcar, respectivamente, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os usos. O teor médio de carbono solúvel em água quente (CSAQ) na área de mata foi de 2 %, enquanto, na área de cana foi de 4 % do COT. Pode-se inferir que a MO dissolvida em água representa a fração prontamente disponível a microbiota do solo, constituída por aminoácidos, ácidos nucléicos, proteínas e açúcares.

Pode-se perceber que, em solos agricultáveis, há maior mineralização da MOS, por conseguinte uma maior perda de C para o meio. Em área de mata há uma contínua incorporação de material vegetal, portanto, há um balanço entre o ganho e a perda de C (CHANTIGNY, 2003). Desta forma, pode-se inferir que em área de mata há um maior teor de carbono solúvel em água. Entretanto, este valor representa uma mínima parte do COT em relação à área de cana-de-açúcar.

Tabela 5. Quantificação do carbono orgânico total (COT) e do carbono solúvel em água quente (CSAQ) do solo antes do tratamento de hidrólise enzimática em um Argissolo sob dois diferentes sistemas de uso da terra (mata nativa e cana-de-açúcar) na Zona da Mata do estado de Pernambuco.

Usos	COT	CSAQ
	----- mgC/gsolo -----	
Mata	17,39±2,62*	0,32±0,06*
Cana	6,62±2,61	0,26±0,03

*indica que há diferença significativa entre as médias

Utilizando o método de demanda química de oxigênio (DQO), que consiste na quantificação do oxigênio liberado através da oxidação da MO por dicromato de potássio, os teores de CSAQ foram de 0,43 e 0,39 mgO₂ g⁻¹ solo sob mata e cana-de-açúcar, respectivamente. Estes resultados não mostraram diferença significativa (p<0,05) quando comparados aos resultados apresentados em analisador TOC, demonstrando que o método de DQO é válido na quantificação de pequenos teores de MO do solo após extração com água quente.

Quantificação do CO nos hidrolisados utilizando acetato de sódio (50 mM, pH 5) como tampão

Os resultados dos ensaios de hidrólise enzimática do solo utilizando acetato de sódio (50 mM, pH 5) como tampão estão apresentados na Tabela 6. Houve diferença significativa (p<0,05) entre os tempos de 0, 96 e 168h para o tratamento (T1), que contém o tampão acetato e 5 g de solo em meio reacional, nos dois usos da terra. Não foi observada diferença significativa (p>0,05), na quantificação da MO extraída das amostras de solo dos dois usos da terra entre os tempos reacionais. Estes resultados devem-se provavelmente a adição de C ao meio reacional pelo tampão acetato de sódio (C₂H₃NaO₂.3H₂O). Com a utilização do tampão orgânico foram adicionados em média ao meio reacional 1283,95 mgC g⁻¹ solo. A utilização de um tampão orgânico causou um ruído em termos percentuais de em média 50% na detecção do CO, em relação ao C introduzido pela amostra de solo ~86 mgC.

Por esse motivo, a leitura do C liberado nos hidrolisados através da hidrólise enzimática em analisador (TOC) perdeu precisão. Sendo assim, seriam necessários estudos adicionais que testassem métodos alternativos de quantificação, como por exemplo, a quantificação dos açúcares liberados pelo processo de hidrólise através de cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE). Estes resultados poderiam indicar com maior precisão se há um fracionamento da MOS através do uso de enzimas ao excluir o ruído decorrente da adição do C presente na molécula do tampão.

Tabela 6. Carbono orgânico nos hidrolisados (sobrenadante) de solo obtidos com a utilização de enzimas em diferentes tratamentos e tempos reacionais.

Usos	COT (mgC.g ⁻¹)					
	----- Tratamentos/ Tempos (h) -----					
	T1			T2		
	0h	96h	168h	0h	96h	168h
Mata	3857,17	2616,13	3342,25	1595,46*	2218,52	514,72*
Cana	3917,65	2913,37	3262,33	1710,29*	3627,50	116,46*

(T1) Padrão (tampão acetato de sódio 50mM + 5g solo); (T2) 1% (1ml enzima + 5g solo + tampão acetato).

**indica que há diferença significativa entre as médias.*

Avaliação do pH dos hidrolisados utilizando água deionizada

Em continuidade aos ensaios, devido à interferência da introdução de C no meio reacional pela utilização de um tampão orgânico, foram conduzidos experimentos para reavaliar o método com a incorporação de um tampão inorgânico. Nessa avaliação, buscou-se um tampão inorgânico, visando manter o pH na faixa de 4 ó 5,5 nos períodos de tempo de 0, 96 e 168h. Para isso, foram realizados testes com água deionizada (pH 5,56), levando-se em consideração o próprio poder tampão do solo e a variação de pH do complexo enzimático com o tempo.

Nos tratamentos T2 e T3 utilizando solo de cana-de-açúcar houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos reacionais. No tratamento T2, contendo 1 ml do complexo enzimático mais 5 g solo a média do pH foram de 4,72 a 6,22 nos tempos 0 a 96h, respectivamente e no tratamento (T3) contendo 2 ml do complexo enzimático mais 5g de solo, houve uma variação média de pH de 3,86 para o tempo 96h a 6,48 no tempo 168h. Estas variações podem estar relacionadas a própria variação de pH da reação; a instabilidade da utilização da água como tampão e/ou a uma tendência de aumento do pH ao longo do tempo, podendo haver uma neutralização do meio reacional ao decorrer do processo de hidrólise.

Na maioria dos ensaios, o pH do meio manteve-se ~5,0 para a reação enzimática de interesse, com exceção de dois tratamentos sob cultivo de cana, em que o pH ficou acima de 6,0. Sendo assim, aparentemente, o uso da água como tampão é adequado para a condução da reação de hidrólise enzimática.

Quantificação da matéria orgânica nos hidrolisados utilizando água deionizada

Comparando isoladamente os tempos reacionais de cada tratamento, assim como para os tratamentos testemunha contendo apenas água e enzima nas dosagens utilizadas (Figura 4), houve diferenças significativas em todos os tratamentos ($p < 0,05$). No tratamento T1 contendo apenas água deionizada e solo, houve tendência de aumento da matéria orgânica (MO) em relação ao tempo, tal tendência foi observada a partir do tempo reacional de 96h, mantendo-se estabilizado no tempo de 168h. Os valores foram de $0,60 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo}$ no tempo 0h e de $6,10 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo}$ nos tempos de 96 e 168h. Estes valores demonstram a capacidade da água em hidrolisar os compostos orgânicos de maior labilidade da MOS ao longo do tempo de reação testado. Silveira et al (2008), em trabalho de hidrólise ácida da MOS, observaram que, a partir de 2h há uma maior liberação do carbono orgânico extraído com água quente e após este período há uma estabilidade na hidrólise dos compostos orgânicos. Esta estabilidade na hidrólise pode estar relacionada à pouca eficiência da extração da matéria orgânica mais recalcitrante pela água.

No tratamento T2, ou seja, com carga de 1 ml de enzima, foram observados maiores teores de MO no tempo 0h ($68,57 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo}$), e um decréscimo a partir de 96 e 168h ($43,92$ e $32,20 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo}$), sendo estes valores diferentes significativamente apenas nos tempos 0 e 96h. No tratamento T3, o maior valor também foi observado em 0h ($246,40 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo}$), que foi significativamente maior que em 96 e 168h ($156,80$ e $171,20 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo}$). No tratamento T4 os maiores valores de MO extraída foram nos tempos 0 e 96h ($388,55$ e $382,66 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo}$), que não diferiram estatisticamente entre si, seguidos de diminuição significativa em 168h ($247,26 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo}$).

O decréscimo dos teores de MO nos tratamentos pode estar relacionado à interferência de elementos presentes no solo, causando possíveis inativações da atividade enzimática; à falta de precisão do método analítico empregado; à perda de MO durante o processo reacional e/ou à incorporação da MO ao substrato (solo). Todos esses processos merecem ser melhor estudados para a compreensão dessas reações durante a hidrólise enzimática.

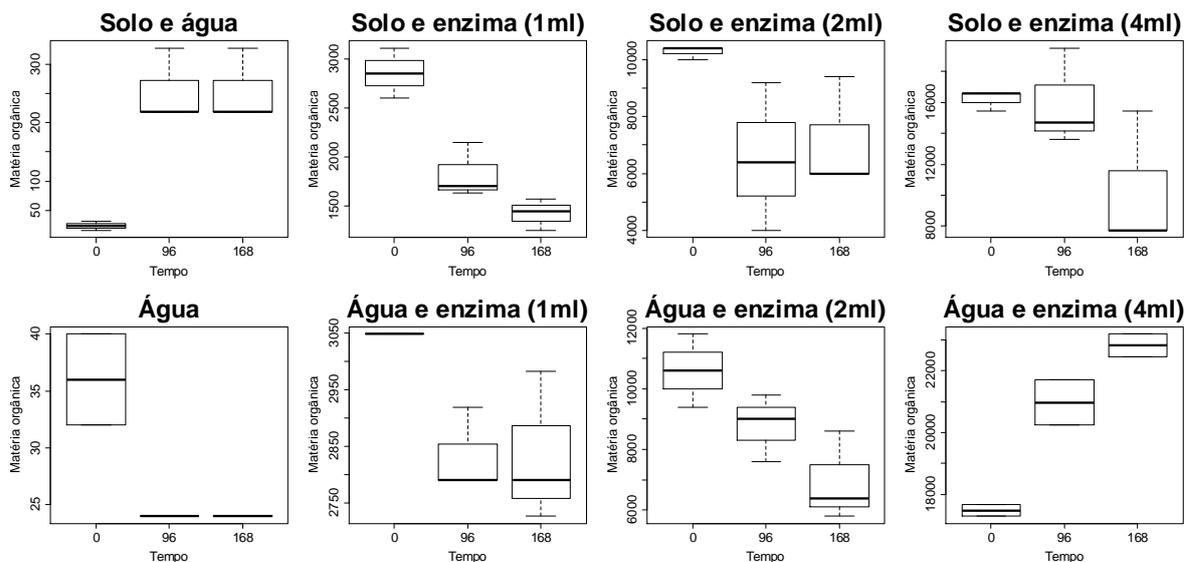
Os resultados também podem estar diretamente relacionados à fatores que controlam o rendimento da hidrólise enzimática, como por exemplo, tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e taxa de agitação (SUN & CHENG, 2002;

CASTRO & JR, 2010; DYK & PLETSCHKE, 2012; WANDERLEY et al., 2013; YANG & FANG, 2014;).

Os tratamentos testemunha, contendo apenas água deionizada e as quantidades do complexo enzimático utilizados, também tenderam à diminuição nos teores de MO extraída ao longo dos tempos reacionais, exceto o tratamento (T4), contendo 4 ml do complexo enzimático, que demonstrou aumento da MO ao longo do tempo de reação.

Em todos os ensaios com o tratamento testemunha, observou-se a formação de uma fase semissólida aglomerada no hidrolisado ao longo do tempo reacional. A formação desse aglomerado, que pode conter substâncias contendo C, pode explicar a diminuição dos teores de MO quantificados nos hidrolisados ao longo do tempo. Não foi possível identificar a composição desse aglomerado e nem a razão de sua formação.

Figura 3. Variação da matéria orgânica presente no sobrenadante de solo hidrolisado com diferentes cargas de enzima e tempos de reação.



Ao comparar os teores de MO entre os tratamentos e os tempos reacionais, foi observada diferença significativa entre todos os tratamentos e incremento da MO com o aumento da dosagem enzimática. Este incremento variou de 73,14 mgO₂ g⁻¹solo utilizando 1 ml do complexo enzimático a 532,78 mgO₂/gsolo utilizando 4 ml do complexo enzimático. Esses resultados indicam que o C presente nas moléculas do complexo enzimático interferiu a determinação da MO extraída do solo.

Este acréscimo de MO ao meio reacional dificulta os testes de fracionamento da MOS, pois pode inibir a atuação da própria enzima, como também interferir na relação enzima-solo,

e assim causar ruídos na quantificação dos teores de MO. Ao final, torna-se muito difícil a diferenciação da MO proveniente do solo ou da enzima ao longo do processo de hidrólise. Desta forma, recomenda-se um novo delineamento amostral em relação à hidrólise enzimática com abordagens alternativas como a utilização de técnicas de pré-tratamento mais eficazes para a disponibilização da MO ao ataque enzimático e aumento da massa de solo para as dosagens enzimáticas utilizadas ou diminuição da carga enzimática utilizada nos tratamentos.

6 CONCLUSÃO

Nos testes utilizando enzimas no fracionamento da matéria orgânica, foi observado decréscimo dos teores da MO em relação ao tempo, podendo estar relacionado a interferência de elementos presentes no solo, à falta de precisão do método analítico empregado, à perda de MO durante o processo reacional e/ou à incorporação da MO ao substrato (solo). A adição de enzimas no processo de fracionamento da MOS, introduz quantidades significativas de C ao meio reacional, o que indica que serão necessárias mudanças no método analítico.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, M.; et al. Differences in soil respiration between different tropical ecosystems. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 258-265. 2006.
- ALVES, T. S.; et al. Biomassa e atividade microbiana de solo sob vegetação nativa e diferentes sistemas de manejos. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 341-347, 2011.
- ANDERSON, J.P.E. & DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochemistry*, v. 10, p. 215-221, 1978.
- APHA ó American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington D.C., 20th ed, 1992.
- ARAÚJO, A. S. F & MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 66-75, 2007.
- ARAUJO, K. D.; et al. Avaliação da atividade microbiana baseada na produção de C-CO₂ em uma área de Caatinga no Cariri Paraibano. **Revista Caatinga**. Mossoró, v. 21, n. 3, p. 221-230. 2008.
- ARAÚJO, A. S. F. & MELO, W. J. Soil microbial biomass in organic farming system. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 2419-2426, 2010.
- BANDICK, A. K. & DICK, R. P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 1471-1479, 1999.
- BAYER, C.; et al. Armazenamento de carbono em frações lábeis da matéria orgânica de um Latossolo Vermelho sob plantio direto. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p.677-683, 2004.
- BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Dinâmica e função da Matéria Orgânica. p. 7-16. In: Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo Ecossistemas Tropicais e Subtropicais, 636p. 2008.
- BAYER, C.; et al. Estabilização do carbono no solo e mitigação das emissões de gases de efeito estufa na agricultura conservacionista. **Tópicos de Ciência do Solo**, v. 7, p. 55-118, 2011.
- BATJES, N. H. Total carbono and nitrogen in the soils of the world. **European Journal of Science**, v. 47, p. 151-163, 1996.

- BEZERRA, R. P. M.; et al. Formas de carbono em latossolo sob sistemas de plantio direto e integração lavoura-pecuária no Cerrado, Goiás. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 34, n. 6, p. 2637-2654, 2013.
- BITTAR, I. M. B.; et al. Influência da textura do solo na atividade microbiana, decomposição e mineralização do carbono de serapilheira de sítios do bioma Cerrado sob condições de incubação. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 1952-1960, 2013.
- BURNS, R. G. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. **Soil Biol. Biochem.** v. 14, p. 423-427, 1982.
- BURNS, R. G.; et al. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 58, p. 216-234, 2013.
- BUSO, W. H. D.; KLIEMANN, H. J. Relações de carbono orgânico e de nitrogênio total e potencialmente mineralizável com o nitrogênio absorvido pelo milheto. **Pesquisa Agrônômica Tropical**, v. 33, p. 97-105. 2003.
- BOECHAT, C. L.; et al. Industrial and urban organic wastes increase soil microbial activity and biomass. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1629-1636, 2012.
- BRONICK, C. J. & LAL, R. Soil structure and management: a review. **Geoderma**, v. 124, p. 3-22, 2005.
- BRUUN, S.; et al. Measuring and modeling continuous quality distributions of soil organic matter. **Biogeosciences**, v. 7, p. 27-41, 2010.
- CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. **Pedobiologia**, v. 49, p. 637-644, 2005.
- CAMBARDELLA, C.A.; ELLIOTT, E.T. Particulate soil organic matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.56, p.777-783, 1992.
- CANELLAS, L. P.; et al. Frações da matéria orgânica em seis solos de uma topossequência no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 35, n. 1, p. 133-143, 2000.
- CANELLAS, L. P.; et al. Estoque e qualidade da Matéria Orgânica de um solo cultivado com cana-de-açúcar por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 331-340, 2007.
- CARMO, F. F.; et al. Frações granulométricas da matéria orgânica em Latossolo sob plantio direto com gramíneas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, p. 420-431, 2012.

- CARNEIRO, M. A. C.; et al. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronossequências de reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 621-632, 2008.
- CARVALHO, J. L., N.; et al. Potencial de sequestro de carbono em diferentes biomas do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 277-289, 2010.
- CASTRO, A. M. & JR., N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.
- CENCIANI, K.; et al. Microbial enzymatic activity and termal effect in a tropical soil treated with organic materials. **Scientia Agrícola**, v. 65, p. 674-680, 2008.
- CHANTIGNY, M. Dissolved and water-extractable organic matter in soils: a review on the influence of land use and management practices. **Geoderma**, v. 113, p. 357-380. 2003.
- CHANTIGNY, M.H.; et al. Influence of temperature on water extractable organic matter and ammonium production in mineral soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 74, p.517-524, 2010.
- CHANTIGNY, M. H.; et al. Temperature and duration of extraction affect the biochemical composition of soil water extractable organic matter. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 75, p. 161-166. 2014.
- CHENG, L.; et al. Dynamics of labile and recalcitrant soil carbon pools in a sorghum free-air CO₂ enrichment (FACE) agroecosystem. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 2250-2263, 2007.
- COLLINS, H. P.; et al. Soil carbon pools and fluxes in long-term corn belt agroecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 157-168. 2000.
- CONCEIÇÃO, P. C.; et al. Eficiência do politungstato de sódio no fracionamento densimétrico da matéria orgânica do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1301-1310, 2007.
- CONCEIÇÃO, P. C.; et al. Fracionamento físico da matéria orgânica e índice de manejo de carbono de um Argissolo submetido a sistemas conservacionistas de manejo. **Ciência Rural**, v. 44, p. 794-800, 2014.
- CONCEIÇÃO, P. C.; et al. Eficiência de soluções densas no fracionamento físico da matéria orgânica do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 490-497, 2015.
- COSTA, F. S.; et al. Estoque de carbono orgânico no solo e emissões de dióxido de carbono influenciadas por sistema de manejo no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 323-332, 2008.

- COUTINHO, R. P. Estoque de carbono e nitrogênio e emissão de N₂O em diferentes usos do solo na Mata Atlântica. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 45, n. 2, p. 195-203, 2010.
- CUI, J. & HOLDEN, N. M. The relationship between soil microbial activity and microbial biomass, soil structure and grassland management. **Soil & Tillage Research**, v. 146, p. 32-38, 2015.
- DEMOLINARI, M. S. M.; et al. Efeito da solução de separação densimétrica na quantidade e qualidade da matéria orgânica leve e na quantificação do carbono orgânico da fração pesada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 871-879, 2008.
- DENG, S. P. & TABATABAI, M. A. Cellulase activity of soils. **Soil Bid. Biochem.**, v. 26, p. 1347-1354, 1994.
- DENG, S. P. & TABATABAI, M. A. Cellulase activity of soils: effect of trace elements. **Soil Biol. Biochem.**, v. 27, p. 971-979, 1995.
- DILLY, O. Ratios of microbial biomass estimates to evaluate microbial physiology in soil. **Biology Fertil Soils**, v. 42, p. 241-246. 2006.
- DIXON, R. K.; et al. Carbon pools and flux of Global Forest Ecosystems. **Science**, v. 263, p. 185-191, 1994.
- DYK, J. S. V. & PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes- Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1458-1480, 2012.
- ENCARNAÇÃO, C. R. F. Observações meteorológicas e tipos climáticos das unidades e campos experimentais da empresa IPA Recife: **Empesa Pernambucana de Pesquisas Agropecuária**, 110p. 1980.
- 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, p. 1251-1262, 2012.
- FERNANDES, S. A. P.; et al. Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. **Applied Soil Ecology**, v. 30, p. 65-77, 2005.
- FERREIRA, L. R. C.; et al. Deposição e acúmulo de matéria seca e nutrientes em serapilheira em um bosque de Sabiá (*Mimosa caesalpiniiifoliabenth*). **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 7-12, 2007.

- FOLLETT, R. F. Soil management concepts and carbon sequestration zin cropland soils. **Soil & Tillage**, v. 61, p. 77-92. 2001.
- FONTANA, A.; et al. Caracterização de susbtâncias húmicas da camada superficial do solo sob diferentes coberturas vegetais. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 22, n. 1, p. 49-56, 2010.
- FASSARELLA, K. M.; et al. Caracterização quali-quantitativa da matéria orgânica do solo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 5, p. 18-30, 2012.
- FRANKENBERGER, W. T. & JOHANSON, J. B. Effect of ph on enzyme stability in soils. **Soil Bid. Biochem.** v. 14, p. 433-437, 1982.
- FREITAS, I. C. V.; et al. Microbial and enzymatic activity in soil after organic composting. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 757-764, 2010.
- GALVÃO, S. R. S.; et al. Frações de carbono e nitrogênio em função da textura, do relevo e do uso do solo na microbacia do Agreste em Vaca Brava (PB). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 955-962, 2005.
- GARCÍA, M. C. V.; et al. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. **Waste Management**, v. 30, p. 7716778, 2010.
- GATTO, A.; et al. Comparação de métodos de determinação do carbono orgânico em solos cultivados com eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p.735-740, 2009.
- GHANI, A.; DEXTER, M.; PERROTT, K.W. Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilisation, grazing and cultivation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 3, p. 1231-1243, 2003.
- GHINI, R.; MENDES, M. D. L.; BETTIOL, W. Métodos de hidrólise de diacetato de floresceína (FDA) como indicador da atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 24, n. 3-4, p. 239-242, 1998.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & App. Chem.**, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GIANFREDA, L & RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 339-354, 2004.

- GONÇALVES, G. A. L.; et al. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 72, p. 16-24, 2015.
- GUERRA, J. G. M.; et al. Macromoléculas e substâncias húmicas. p. 19-25. In: SANTOS, G. A.; et al. Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo Ecossistemas Tropicais e Subtropicais. 636p. 2008.
- GREENFIELD, L. G.; et al. Acid hydrolysis to define a biologically-resistant pool is compromised by carbon loss and transformation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 64, p. 122-126, 2013.
- GRÉGGIO, T. C. & NAHAS, E. Atividade enzimática do solo sob dois fragmentos florestais. **Científica**, v.35, p.179-187, 2007.
- ISLAM, K.R.; WEIL, R.R. Soil quality indicator properties in mid-atlantic soils as influenced by conservation management. **Journal Soil Water Conservation**, v. 55, p. 69-78. 2000.
- JENKINSON, D.S. & POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-I. Fumigation with chloroform. **Soil Biology Biochemistry**, v. 8, p. 167-177, 1976.
- JHA, P.; MOHAPATRA, K. P. Soil respiration under different forest species in the riparian buffer of the semi-arid region of northwest India. **Current Science**, v. 100, n. 9, p. 1412-1420, 2011.
- KUMMER, L.; et al. Respiração e biomassa microbiana em solo sob diferentes sistemas de uso. **Scientia Agraria**, Curitiba. v. 9, n. 4, p. 559-563, 2008.
- LAGOMARSINO, A.; et al. Soil organic carbon distribution drives microbial activity and functional diversity in particle and aggregate-size fractions. **Pedobiologia**, v. 55, p. 101-110, 2012.
- LAL, R. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. **Geoderma**, v. 123, p. 1622. 2004.
- LEIFELD, J.; KOGEL-KNABNER, I. Soil organic matter fractions as early indicators for carbono stock changes under different land-use? **Geoderma**, v. 124, p. 143- 155. 2005.
- LEITE, L. F. C.; MENDONÇA, E. S. Modelo century de dinâmica da matéria orgânica do solo: Equações e pressupostos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 4, p. 679-686, 2003.

- LEITE, L. F. C.; et al. Simulação pelo modelo Century da dinâmica da matéria orgânica de um Argissolo sob adubação mineral e orgânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 347-358, 2004.
- LEHMANN, J.; et al. Organic matter stabilization in soil microaggregates: implications from spatial heterogeneity of organic carbon contents and carbon forms. **Biogeochemistry**, v. 85, p. 45657, 2007.
- LI, F. M.; et al. Dynamics of soil microbial biomass C and soil fertility in cropland mulched with plastic film in a semiarid agro-ecosystem. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1893-1902, 2004.
- LIMA, A. M. N.; et al. Frações da matéria orgânica do solo após três décadas de cultivo de eucalipto no Vale do Rio Doce-MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1053-1063. 2008.
- LONGO, R. M.; et al. Recuperação de solos degradados na exploração mineral de cassiterita: biomassa microbiana e atividade da desidrogenase. **Bragantia**, v. 70, p.132-138, 2011.
- LOSS, A.; et al. Atributos químicos e físicos de solos de tabuleiros sob diferentes coberturas vegetais na região Norte Fluminense. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, p. 150-162, 2007.
- LOSS, A.; et al. Carbono e frações granulométricas da matéria orgânica do solo sob sistemas de produção orgânica. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1077-1082, 2009.
- LUTZOW, M. V.; et al. SOM fractionation methods: Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 2183-2207, 2007.
- MACHADO, L. V.; et al. Fertilidade e compartimentos da matéria orgânica do solo sob diferentes sistemas de manejo. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, n. 3, p. 289-299, 2014.
- MADARI, B. et al. No tillage and crop rotation effects on soil aggregation and organic carbono in a Rhodic Ferralsol from southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 80, n.1, p. 185-200, 2005.
- MALH. Y.; GRACE. J. Tropical forests and atmospheric carbon dioxide. **Tree**, v. 15, n. 8, p. 332-337, 2000.
- MARDOMINGO, J. I.; et al. Seasonal changes in microbial activity in a semiarid soil after application of a high dose of different organic amendments. **Geoderma**, v. 206, p. 40-48, 2013.
- MARTINEZ, C.E.; et al. Aging and temperature effects on DOC and elemental release from a metal contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 122, p. 135-143. 2003.

- MATIAS, M. C. B. S.; et al. Biomassa microbiana e estoques de C e N do solo em diferentes sistemas de manejo, no Cerrado do Estado do Piauí. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 517-521. 2009.
- MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. Química e mineralogia do solo. Sociedade brasileira de ciência do solo, 1° ed., 1380p., 2009.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. Lavras, UFLA, 626p, 2006.
- NEVES, C. S. V. J.; FELLER, C.; LARROUY, M. C. L. Matéria orgânica nas frações granulométricas de um Latossolo vermelho distroférico sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 17-26, 2005.
- NEVES, C. S. V. J.; et al. Efeito do manejo do solo e da matéria orgânica solúvel em água quente na estabilidade de agregados de um latossolo argiloso. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p.1410-1415, 2006.
- OLIVEIRA, J. R. A.; et al. Cerrado sob vegetação nativa e sob cultivo: Avaliação dos métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 863-871, 2001.
- PAUSTIAN, K.; et al.. Management options for reducing CO2 emissions from agricultural soils. **Biogeochemistry**, v.48, p.147-163, 2000.
- PARTON, W.J. et al. Analysis of factors controlling soil organic matter levels in great plains grasslands. **Soil Science Society America Journal**, v.51, p.1173-1179, 1987.
- PESSOA, P. M. A.; et al. Frações de Carbono orgânico de um Latossolo Húmico sob diferentes usos no agreste brasileiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 97-104, 2012.
- PILLON, C. N.; et al. Dinâmica da matéria orgânica no ambiente. **EMBRAPA Clima Temperado**, 41 p., 2002.
- PILLON, C. N.; et al. Carbono e nitrogênio de um Argissolo Vermelho sob floresta, pastagem e mata nativa. **Ciência Rural**, v. 41, p. 447-453, 2011.
- PINHEIRO, E. F. M.; PEREIRA, M. G.; ANJOS, L. H. C. Agregates distribution and soil organic matter under different tillage system for vegetable crops in a Red Latosol from Brasil. **Soil and Tillage Research**, v. 77, p. 79-84. 2004.
- PLANTE, A. F.; et al. Biological, chemical and thermal indices of soil organic matter stability in four grassland soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 1051-1058, 2011.

- PRIMO, D. C.; et al. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1 -13, 2011.
- QUANYING, W.; et al. Impacts of 9 years of a new conservational agricultural management on soil organic carbon fractions. **Soil & Tillage Research**, v. 143, p. 1-6, 2014.
- RAINE, S. R.; SO, H. B. An energy based parameter for the assessment of aggregate bond energy. **Journal of Soil Science**, v. 44, p. 249-259, 1994.
- RANGEL, O. J. P.; et al. Estoque e frações da matéria orgânica de Latossolo cultivado com café em diferentes espaçamentos de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1341-1353, 2007.
- RHEINHEIMER, D. S.; et al. Comparação de métodos de determinação de carbono orgânico total no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 435-440, 2008.
- ROVIRA, P.; VALLEJO, V. R. Examination of Thermal and Acid Hydrolysis Procedures in Characterization of Soil Organic Matter. *Commun. Soils Ci.Plant*, v. 31, p. 81-100, 2000.
- ROSCOE, R. & MACHADO, P. L. O. A. Fracionamento físico do solo em estudos da matéria orgânica. **EMBRAPA Agropecuária Oeste**, 86 p., 2002.
- ROSCOE, R.; et al. Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas: modelagem matemática e métodos auxiliares. **Embrapa Agropecuária**, 304 p., 2006.
- ROVIRA, P.; VALLEJO, V. R. Labile and recalcitrant pools of carbon and nitrogen in organic matter decomposing at different depths in soil: an acid hydrolysis approach. **Geoderma**, v. 107, p. 109-141, 2002.
- ROVIRA, P.; VALLEJO, V. R. Labile, recalcitrant, and inert organic matter in Mediterranean forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 202-215, 2007.
- SÁ, M. A. C.; et al. Índice de desagregação do solo baseado em energia ultra-sônica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 525-531, 1999.
- SÁ, M. A. C.; LIMA, J. M.; MELLO, C. R. Nível de energia ultra-sônica para estudo da estabilidade de agregados de um Latossolo sob diferentes usos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1649-1655, 2002.
- SÁ, M. A. C. & LIMA, J. M. Energia ultra-sônica: uma ferramenta em ciência do solo. **Embrapa Cerrados**, Planaltina, 29 p. 2005.
- SANGIL, L. L. & ROVIRA, P. Sequential chemical extractions of the mineral-associated soil organic matter: An integrated approach for the fractionation of organo-mineral complexes. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 62, p. 57-67, 2013.

- SANTOS, L. M.; et al. Estudo comparativo de métodos para a determinação da concentração de carbono em solos com altos teores de Fe (Latosolos). **Química Nova**, v. 31, p. 94-97, 2008.
- SANTOS, L. F. & ISHII, P. L. Xilanases: Principais Metodologias e Parâmetros Cinéticos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p. 7-15, 2011.
- SANTOS, D. C.; et al. Fracionamento químico e físico da matéria orgânica de um Argissolo Vermelho sob diferentes sistemas de uso. **Ciência Rural**, v. 43, p. 838-844, 2013.
- SILVA, C. F.; et al. Carbono orgânico total, biomassa microbiana e atividade enzimática do solo de áreas agrícolas, florestais e pastagem no médio Vale do Paraíba do Sul (RJ). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1680-1689. 2012.
- SILVEIRA, M. L. A. Dissolved organic carbon and bioavailability of n and p as indicators of soil quality. **Sci. Agric.** Piracicaba, v. 62, n. 5, p. 502-508, 2005.
- SILVEIRA, M. L.; et al. Characterization of soil organic carbon pools by acid hydrolysis. **Geoderma**, v. 144, p. 405-414. 2008.
- SIMOES, S. M. O.; et al. Carbono orgânico e biomassa microbiana do solo em plantios de *Acacia mangium* no Cerrado de Roraima. **Acta Amazônica**, v. 40, p. 23-30. 2010.
- SIX, J.; et al. Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils ó Effects of no-tillage. **Agronomie**, v. 22, p. 755-775. 2002a.
- SIX, J.; et al. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. **Plant and Soil**, v. 241, p. 155-176, 2002b.
- SOLLINS, P.; et al. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. **Geoderma**, v. 74, p. 65-105, 1996.
- STROSSER, E. Methods for determination of labile soil organic matter: An overview. **Juornal Agrobiology**, v. 27, p. 49-60. 2010.
- SUN, Y. & CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83p. 1-11, 2002.
- TABATABAI, M. A. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties. Madison: Soil Science Society of America, p. 775-833, 1994.
- THEVENOT, M.; et al. Fate of lignins in soils: A review. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 1200-1211, 2010.

- TOTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. In: ALVAREZ, V. H.; et al. Tópicos em ciência do solo, Viçosa, MG, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p. 196-276, 2002.
- TRANNIN, I. C. B.; et al. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de bio sólido industrial e cultivo de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1173-1184, 2007.
- TRUMBORE, S. Age of soil organic matter and soil respiration: radiocarbon constraints on belowground C dynamics. **Ecological Society of America**, v. 10, p. 399-411, 2000.
- TRUMBORE, S.; CAMARGO, P. B. Soil carbon dynamics. **Amazonia and Global Change, Geophysical Monograph**, v. 186, p. 451-462, 2009.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C. & JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biology Biochemistry*, v. 19, p. 703-707, 1987.
- YANG, C. Y & FANG, T. J. Combination of ultrasonic irradiation with ionic liquid pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 198-202, 2014.
- YI, Z. et al. Partitioning soil respiration of subtropical forests with different successional stages in South China. **Forest Ecology and Management**, v. 243, p. 178-186, 2007.
- WALKLEY, A.; BLACK, I. A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v. 37, n. 2, p. 29-38, 1934.
- WANDERLEY, M. C. A.; et al. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 448-453, 2013.
- WAKSMAN, S. Principles of soil microbiology. 2ª ed. Baltimore, Williams & Wilkins Company, 1952. 894 p.
- WANG, Z. X. Some Applications of Statistical Mechanics in Enzymology. Effects of pH on Enzyme. **J. theor. Biol.**, v. 143, p. 473-484, 1990.
- YEOMANS, J.C. & BREMNER, J.M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Comm. Soil Science Plant Anal*, v. 19, p. 1467-1476, 1988.
- ZAIA, F.C.; GAMA-RODRIGUES, A.C. & GAMA-RODRIGUES, E.F. Formas de fósforo no solo sob leguminosas florestais, floresta secundária e pastagem no Norte Fluminense. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, p. 1191-1197, 2008.
- ZHANG, Y. H. P; et al. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHOU, X.; et al. Soil extractable carbon and nitrogen, microbial biomass and microbial metabolic activity in response to warming and increased precipitation in a semiarid Inner Mongolian grassland. **Geoderma**, v. 206, p. 24-31, 2013.