

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

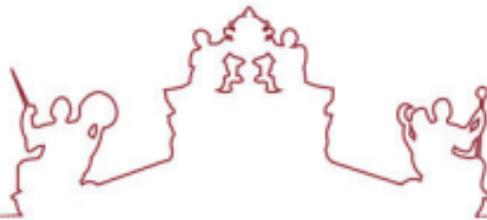
Dissertação

Caracterização espacial de uma vinha: parâmetros fisiológicos e atividade microbológica do solo.

Inês Isabel Vilela Vieira

Orientador(es) | Isabel Brito
Ana Alexandre

Évora 2023



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

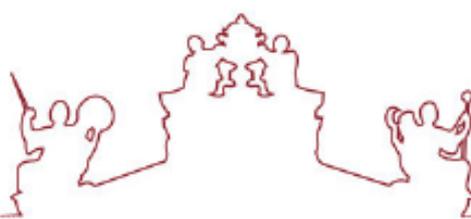
Caracterização espacial de uma vinha: parâmetros fisiológicos e atividade microbiológica do solo.

Inês Isabel Vilela Vieira

Orientador(es) | Isabel Brito
Ana Alexandre

Évora 2023





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Elisa Rato (Universidade de Évora)
Isabel Brito (Universidade de Évora) (Orientador)

Agradecimentos

A realização desta dissertação só foi possível graças à colaboração de pessoas a quem aqui deixo o meu agradecimento.

À empresa Agrosustentável, mais concretamente ao Pedro e Filipa Tereso, por nos terem proposto este estudo, pela ajuda na recolha das amostras e pela disponibilidade para esclarecer questões que foram surgindo ao longo da elaboração do trabalho.

Às minhas orientadoras, as professoras Ana Alexandre e Isabel Brito, pela disponibilidade, orientação e apoio prestado ao longo da elaboração deste trabalho.

À Taiana Conceição, por toda a orientação fundamental que me facultou durante a elaboração da componente laboratorial.

À professora Margarida Vaz e ao Nicásio Jiménez-Morillo, pelo apoio na determinação dos parâmetros fisiológicos das plantas.

Ao Rúben Vicente, pelo tempo, apoio e explicações relativas à utilização do programa QGIS.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional.

Aos meus amigos, por toda a força que me deram.

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 A agricultura	4
2.2 Solo	6
2.3 Microrganismos do solo	7
2.4 Sustentabilidade da Gestão de Solo	10
2.5 Vinha	11
2.6 Avaliação da atividade microbiana do solo	13
2.6.1 Carbono da biomassa microbiana e respiração basal do solo	13
2.6.2 Quantificação de bactérias e fungos culturáveis	14
2.6.3 Taxa de colonização micorrízica.....	15
2.6.4 Atividade Enzimática	15
2.6.4.1 Atividade da enzima desidrogenase	16
2.6.4.2 Atividade da enzima arilsulfatase.....	17
2.6.4.3 Atividade da enzima β -glucosidase.....	17
2.6.4.4 Atividade enzimática da enzima fosfatase	18
2.7 Parâmetros fisiológicos da planta	19
2.7.1 Teor de clorofila	19
2.7.2 Isótopos C^{12} e C^{13}	19
2.7.3 Fv/Fm – fluorescência variável/fluorescência máxima	21
3. Materiais e Métodos	22
3.1 Descrição do local e da amostragem.....	23
3.2 Capacidade de Retenção de Água do Solo	25
3.3 Humidade do Solo	26

3.4	Carbono da Biomassa Microbiana (C-Mic)	26
3.4.1	Fumigação e obtenção do extrato.....	26
3.4.2	Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana (C-Mic).....	28
3.5	Respiração Basal do Solo (RBS)	28
3.6	Determinação da atividade enzimática da desidrogenase	29
3.7	Quantificação de bactérias e fungos culturáveis	30
3.8	Taxa de colonização micorrízica.....	31
3.9	Determinação da atividade enzimática da arilsulfatase, β – glucosidase e fosfatase.....	32
3.10	Teor de Clorofila e Fv/Fm	34
3.11	Análise Isotópica	34
3.12	Análise química de solo, análise da seiva e dados de produção da vinha	36
3.13	Análise estatística.....	36
3.14	Programa QGIS.....	36
4.	Resultados.....	37
4.1	Respiração Basal do Solo (RBS)	38
4.2	Carbono da Biomassa Microbiana	38
4.3	Atividade Enzimática da Desidrogenase (DHA)	39
4.4	Atividade Enzimática da Arilsulfatase	40
4.5	Atividade enzimática da β -glucosidase	40
4.6	Atividade enzimática da Fosfatase	41
4.7	Quantificação de bactérias culturáveis.....	42
4.8	Quantificação de fungos culturáveis	42
4.9	Taxa de Colonização Micorrízica Arbuscular	43
4.10	Teor de Clorofila	44
4.11	Razão entre a Fluorescência variável e a Fluorescência máxima (Fv/Fm) ...	44
4.12	Isótopos de Carbono	45
4.13	Produção da Vinha (kg/ha)	46
4.14	Análises químicas do solo	46

4.15	Análises à seiva.....	48
4.16	Análise Estatística	48
5.	Discussão	50
5.1	Atividade microbiana geral – RBS, C-Mic e atividade enzimática da DHA. ...	51
5.2	Quantificação de bactérias e fungos culturáveis	52
5.3	Enzimas relacionadas com os ciclos do carbono, fósforo e enxofre	55
5.4	Taxa de colonização micorrízica arbuscular	58
5.5	Parâmetros foliares – teor de clorofila, razão entre a fluorescência variável e máxima e isótopos de carbono	59
5.6	Produção de uva	60
6.	Conclusão.....	61
7.	Referências Bibliográficas	64
	Anexos	76
	Anexo I: Preparação de soluções	77
	Anexo II: Resultados obtidos – C-Mic, DHA e RBS.....	79
	Anexo III: Resultados obtidos – Taxa de micorrização e quantificação de bactérias e fungos culturáveis.....	80
	Anexo IV: Resultados obtidos – Atividade enzimática.....	81
	Anexo V: Resultados obtidos – Parâmetros foliares	82

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Representação da produção de CO ₂ que contribui para a respiração basal do solo.....	14
Figura 2.2 - Reação enzimática da arilsulfatase.....	17
Figura 3.1 - Representação dos pontos amostrados na vinha e distribuição das castas.....	24
Figura 3.2 - Fotografia de uma das videiras amostradas.....	24
Figura 3.3 - Crivagem do solo.....	25
Figura 3.4 - Encharcamento do solo.....	26
Figura 3.5 - Fumigação das amostras de solo dentro do exsicador.....	27
Figura 3.6 - Filtração do sobrenadante das sub-amostras de solo.....	27
Figura 3.7 - Tubos de ensaio com amostra de solo e solução de TTC a 1%, após incubação.....	29
Figura 3.8 - Meios de cultura NA e PDA em placas de Petri.....	30
Figura 3.9 - Raízes numa cassete de histologia, antes de prosseguir com os restantes passos da coloração.....	31
Figura 3.10 - Observação de raízes com fungos micorrízicos, ao microscópico.....	32
Figura 3.11 - Representação da microplaca de 96 poços utilizada para a realização do ensaio.....	33
Figura 3.12 - Fotografia das cápsulas de estanho utilizadas.....	34
Figura 3.13 - Set-up do EA - IRMS para a medição simultânea dos isótopos de ¹³ C.....	35
Figura 4.1 - Mapa QGIS da respiração microbiana.....	38
Figura 4.2 - Mapa QGIS do C-Mic.....	39
Figura 4.3 - Mapa QGIS da atividade enzimática da desidrogenase.....	39
Figura 4.4 - Mapa QGIS da atividade enzimática da enzima arilsulfatase.....	40
Figura 4.5 - Mapa QGIS da atividade enzimática da β-glucosidase.....	41
Figura 4.6 - Mapa QGIS da atividade enzimática da enzima fosfatase.....	41
Figura 4.7 - Mapa QGIS da quantificação de bactérias culturáveis.....	42
Figura 4.8 - Mapa QGIS da quantificação de fungos culturáveis.....	43
Figura 4.9 - Mapa QGIS da taxa de colonização micorrízica arbuscular (AC).....	43
Figura 4.10 - Mapa QGIS do teor de clorofila (µg/cm ²) das folhas das videiras.....	44
Figura 4.11 - Mapa QGIS da razão entre a fluorescência variável e máxima.....	45
Figura 4.12 - Mapa QGIS da análise de isótopos de carbono.....	45
Figura 4.13 - Mapa QGIS da produção da vinha no ano de 2020, em kg/ha.....	46

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Produção de uva em Portugal Continental e na região do Alentejo no ano de 2020.....	12
Tabela 3.1 - Preparação dos padrões de carbono.	28
Tabela 3.2 – Concentrações utilizadas de TPF e metanol na realização na curva de calibração.	30
Tabela 3.3 - Enzimas e respetivo substrato enzimático	32
Tabela 3.4 - Preparação da curva de calibração do para-nitrofenol em microplaca de 96 poços.	33
Tabela 4.1 - Análise ao solo, correspondente aos pontos 4, 5, 6, 13, 17 e 24.....	47
Tabela 4.2 - Análise ao solo, correspondente aos pontos 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22 e 23	47
Tabela 4.3 - Análises de seiva realizadas na casta Alicante Bouschet	48
Tabela 4.4 - Valores de correlação de Pearson para os parâmetros analisados.....	49

Resumo

A agricultura atual pretende manter a produtividade, assegurando proteção dos ecossistemas. Neste contexto é importante a gestão e preservação do solo. O microbioma do solo é responsável por processos de extrema importância, como a decomposição da matéria orgânica e consequente disponibilização de nutrientes para as plantas. A monitorização da variação espacial da atividade microbiana e de parâmetros fisiológicos da videira, permite aferir eventuais relações de causa-efeito, contribuindo para a gestão mais sustentável da vinha. Assim, para uma vinha em Montemor-o-Novo, quantificou-se a biomassa microbiana, a respiração microbiana do solo, as bactérias e fungos culturáveis, a colonização micorrízica, a atividade enzimática da desidrogenase, arilsulfatase, β -glucosidase e fosfatase. Foi ainda avaliado o teor de clorofila das videiras, os isótopos C^{12} e C^{13} e a razão entre fluorescência variável e máxima. O padrão de variação espacial destes parâmetros e a análise da sua interação, permitiu identificar zonas distintas, que poderão ser geridas de forma diferenciada.

Palavras-chave: agricultura; solo; vinha; atividade microbiana; parâmetros fisiológicos.

Abstract

Spatial characterization of a vineyard: physiological parameters and soil microbial activity.

Current agriculture aims to maintain productivity while ensuring the protection of ecosystems. In this context, soil management and preservation is important. The soil microbiome is responsible for extremely important processes, such as the decomposition of organic matter and the consequent availability of nutrients for plants. Monitoring the spatial variation of microbial activity and the grapevine's physiological parameters allows the assessment of cause-effect relationships, contributing to a more sustainable management of the vine. Thus, for a vineyard in Montemor-o-Novo, microbial biomass, soil microbial activity, cultivable bacteria and fungi, mycorrhizal colonization, enzymatic activity of dehydrogenase, arylsulfatase, β -glucosidase and phosphatase were quantified. The chlorophyll content of the vines, the C12 and C13 isotopes and the ratio between fluorescence variable and maximum were also evaluated. The pattern of spatial variation of these parameters and the analysis of their interaction, allowed the identification of, which can be managed differently.

Keywords: agriculture; soil; vineyard; microbial activity; physiological parameters.

Lista de abreviaturas, siglas e acrônimos

AMF – (do Inglês *arbuscular mycorrhizal fungi*) fungo micorrízico arbuscular

ATP – adenosina trifosfato

C-Mic – carbono da biomassa microbiana

DHA - desidrogenase

Fv/Fm – fluorescência variável/fluorescência máxima

IRMS – (do Inglês *isotopes ratio mass spectrometer*) Espectrometria de Massa de Relação Isotópica

NA – (do Inglês *nutrient agar*) agar nutritivo

PDA – (do Inglês *potato dextrose agar*) agar batata dextrose

PNG – p-nitrofenol- β -D-glucopiranosídeo

PNP – para-nitrofenol

PNF- fosfato de p-nitrofenol

PNS – sulfato de p-nitrofenol

RBS – respiração basal do solo

TPF - *triphenylformazan*

TTC – cloreto de trifeniltetrazólio

1. Introdução

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar uma vinha localizada no concelho de Montemor-o-Novo, na Herdade da Amoreira de Cima, no que diz respeito à variação espacial de diversos parâmetros relativos à atividade microbiológica do solo, bem como parâmetros fisiológicos da própria videira. A avaliação da variação espacial de parâmetros relacionados com a atividade microbiana, juntamente com outras avaliações a nível da fisiologia da videira permitem aferir eventuais relações de causa-efeito que irão contribuir com informação relevante para a gestão do agroecossistema da vinha. No que diz respeito à caracterização da atividade microbiana do solo, foi quantificada a biomassa microbiana e a respiração microbiana, foi realizada a quantificação de bactérias e fungos culturáveis, bem como a avaliação da atividade enzimática das enzimas desidrogenase, arilsulfatase, β -glucosidase e fosfatase. Tendo em conta a importância dos fungos micorrízicos, foi determinada a taxa de colonização micorrízica de raízes de plantas encontradas no solo amostrado. Relativamente aos parâmetros fisiológicos da videira, foi determinado o teor de clorofila, foram discriminados os isótopos C^{12} e C^{13} e foi determinada a razão entre fluorescência variável e máxima (F_v/F_m).

Num contexto agronómico, a análise conjunta de parâmetros associados ao solo e às culturas proporciona uma análise global da sua interação e variabilidade espacial dentro da área em estudo, revestindo-se de grande utilidade no apoio à decisão agronómica para o local.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 A agricultura

A agricultura permite ao Homem a produção de bens através da manipulação dos ecossistemas, podendo ser definida como o conjunto de intervenções humanas nestes, de modo a maximizar o rendimento do produto desejado e minimizar as perdas de energia nas cadeias tróficas associadas (Ehlers, 2009). Os ecossistemas modificados pela prática da agricultura são designados por agroecossistemas. Consistem, portanto, num ecossistema manipulado pelo Homem de modo a maximizar a produção de alimentos (Envirothon & Issue, 2019) e de outros bens e serviços derivados da agricultura. Os agroecossistemas são caracterizados por um menor número de espécies, comparativamente a um ecossistema natural que não foi manipulado pelo Homem. A diminuição do número de espécies é resultado da necessidade de reduzir perdas de energia nas cadeias tróficas nos ecossistemas agrícolas, com o objetivo de remover transferências de energia indesejadas (para parasitas, patógenos, plantas concorrentes, entre outros) e está normalmente associado com a diminuição da cadeia trófica.

A autonomia energética dos agroecossistemas é relativamente baixa, uma vez que depende dos inputs fornecidos pelo Homem (Feres & Villalobos, 2016). Estes inputs são externos e podem ser fertilizantes minerais ou orgânicos, inóculos de microrganismos, pesticidas, entre outros, que são aplicados pelo homem de modo a maximizar a produtividade das culturas e o seu conseqüente retorno económico, sendo colocados de parte os seus efeitos secundários, na grande maioria das vezes, nocivos para o meio ambiente envolvente (Bünemann *et al.*, 2006).

Como a estratégia das práticas agrícolas consiste na manipulação do meio ambiente e da comunidade vegetal de forma a otimizar o rendimento dos bens produzidos, os critérios aplicados à gestão de qualquer sistema agrícola devem ter em consideração os diversos fatores que serão afetados pelas decisões tomadas pelo produtor. Assim, devem ser considerados não apenas os processos de produção animal e vegetal, tendo em consideração os objetivos económicos, mas também os efeitos no solo, recursos hídricos, bem-estar animal, saúde humana, biodiversidade, entre outros.

A partir do início do século XX, a agricultura tradicional sofreu uma transformação relativamente à sua produtividade devido, principalmente, à aplicação de fertilizantes e fitofármacos, e também devido à intensificação da mecanização agrícola (Passioura, 2002). Após este período, a agricultura sofreu uma série de alterações relativamente ao seu modo produtivo de forma a diminuir as restrições do meio ambiente e a necessidade de trabalho agrícola, de modo a conseguir alimentar uma população em crescimento constante. A produção agrícola disparou devido à emergência de novas tecnologias, à intensificação da mecanização, à utilização de produtos químicos e a políticas

governamentais que favoreceram a maximização da produção juntamente com redução acentuada de preços destes bens (Envirothon & Issue, 2019) principalmente no pós-guerra. Neste período, a agricultura desenvolveu-se significativamente e, como resposta à preocupante escassez alimentar no período pós Segunda Guerra Mundial, surgindo a Revolução Verde.

A Revolução Verde surgiu na década de 1960 e consistiu na modernização dos sistemas agrícolas a nível global, visando a maximização do rendimento agrícola em situações ecológicas diferentes. O objetivo da Revolução Verde foi elevar ao máximo o potencial agrícola, de modo a gerar as condições ecológicas ideais, afastando predadores naturais através da utilização de fitofármacos e contribuindo para a nutrição das culturas recorrendo à fertilização química. A utilização intensiva de pesticidas e de fertilizantes químicos, juntamente com o melhoramento desenvolvimento genético de culturas, contribuiu para o aparente sucesso da Revolução Verde, conseguindo, assim, aumentar a produção agrícola mundial (Matos, 2011). Deste modo, a Revolução Verde permitiu o aumento da produtividade das culturas, melhorou a qualidade nutricional dos alimentos produzidos e reduziu os custos de produção destes (Rosset *et al.*, 2000). No entanto, este processo teve um elevado custo para o meio ambiente, tendo afetado de modo significativo a estabilidade ecológica dos agroecossistemas, tanto no equilíbrio físico, químico e biológico dos solos, como na suscetibilidade das culturas face a ataques de pragas e doenças (Ehlers, 2009). Verificou-se um aumento da erosão do solo, do consumo de água doce, da contaminação de reservatórios e linhas de água com nitratos devido à utilização excessiva de fertilizantes, com consequente eutrofização destes, da emissão de gases com efeito estufa devido à intensificação da mecanização e devido à realização de queimadas agrícolas (Savci, 2012). Verificou-se ainda a emergência de novas ameaças à saúde humana devido à disseminação de novos agentes patogénicos, o aumento da concentração económica nas indústrias alimentares e agrícolas e a desintegração de comunidades rurais, entre outros (Rosset *et al.*, 2014). Para além disto, durante a Revolução Verde, verificou-se um esgotamento a nível de nutrientes do solo, o que teve um impacto negativo na vida microbiana na camada superior deste e também se verificou uma redução na fração de matéria orgânica do solo, devido à diminuição do retorno de resíduos das culturas e de matéria orgânica ao solo, causando a sua deterioração. Foi ainda verificado a extinção de variedades de plantas nativas, devido à redução da utilização destas favorecendo as variedades de alto-rendimento. Relativamente à saúde humana, a utilização intensiva de pesticidas originou problemas de saúde humana do foro nervoso, endócrino, reprodutivo e do sistema imunitário (Daisy & Giridhara, 2021). Assim, a substituição de ecossistemas complexos, diversificados e em equilíbrio por sistemas produtivos altamente simplificados, provocou uma série de impactos negativos a nível

económico e ambiental (Ehlers, 2009) A nível do solo, a agricultura tornou-se numa prática desgastante, uma vez que os solos são manipulados intensivamente por máquinas pesadas, e são aplicados fertilizantes e fitofármacos, resultando na sua compactação e na degradação das suas propriedades físicas, químicas e biológicas, sendo, deste modo, insustentável manter os atuais sistemas de produção agrícola.

2.2 Solo

O solo é o meio que sustenta a vida, nomeadamente a vida de organismos de extrema importância com diversas atividades e funções: é a partir do solo que se inicia o fluxo de energia e de matéria nos ecossistemas, sendo que este fluxo faz parte de todos os ciclos ecológicos do planeta. (Vezzani, 2015). É um recurso natural onde se dão inúmeros processos ecológicos de extrema importância: para além de ser o meio de crescimento de plantas, tem a capacidade de regular o fluxo de água no meio ambiente e serve como um tampão na formação, atenuação e degradação de compostos naturais e xenobióticos (Komatsuzaki & Ohta, 2007).

O solo apresenta uma estrutura heterogénea, sendo composto por partículas elementares (areia, limo e argila), ar, água e matéria orgânica. As partículas elementares agrupam-se dando origem a agregados de maior dimensão. A formação dos diferentes agregados do solo representa diferentes etapas na génese da estrutura de um determinado tipo de solo e possui mecanismos físicos, químicos e biológicos bastante distintos envolvidos na sua formação. Solos férteis apresentam uma elevada proporção dos seus componentes associados a agregados estáveis, uma vez que nestes há uma melhor penetração radicular por parte das raízes de plantas, um melhor arejamento e drenagem, uma difusão mais rápida de água e solutos, uma maior capacidade de trocas iónicas e um teor mais elevado de conteúdo húmico. Desta forma, suportam uma elevada biomassa microbiana bastante diversificada (Burns & Davies, 1986). Tendo em conta a estrutura heterogénea do solo e a sua composição por agregados, é possível a formação de uma grande diversidade de microhabitats em função das suas características físicas, químicas e biológicas, disponibilidade de nutrientes e, também e em função do tempo. A formação de microhabitats está associada à formação de agregados de solo com diferentes proporções de areia, argila e limo, que funcionam como um suporte físico para a aderência dos microrganismos e, para além disto, proporcionam ainda diferentes condições de arejamento e de disponibilidade de nutrientes que possibilitam a coexistência de milhares de microrganismos com diferentes capacidades metabólicas (Cardoso & Andreote, 2016; FAO - Food and Agricultural Organization, n.d.). As plantas interagem com microrganismos da rizosfera, fazendo estes microrganismos parte do microbioma da planta. Estes

microrganismos afetam o crescimento das plantas e respondem a exsudados das raízes, podendo ter um impacto positivo na saúde das plantas e na sua produtividade, uma vez que a presença de determinados microrganismos na rizosfera pode diminuir a incidência de doenças e aumentar a taxa de utilização de nutrientes. Um caso particular deste tipo de interações são as relações simbióticas mutualistas, como as que se estabelecem com os fungos micorrízicos arbusculares ou com grupos particulares de bactérias, como por exemplo os rizóbios. As plantas, por sua vez, são uma fonte de nutrientes para estes microrganismos (Xiong *et al.*, 2021). À medida que as raízes das plantas se desenvolvem, estas alteram as propriedades do solo e desta forma alteram a vida microbiana do solo. Os exsudados ativos das raízes apresentam a capacidade de condicionar a presença de determinados microrganismos na rizosfera. Células radiculares livres, possivelmente derivadas da zona da coifa de raízes jovens, fornecem um bom substrato para o desenvolvimento microbiano. Os níveis de dióxido de carbono, oxigênio e água na região do solo adjacente às raízes difere das zonas não-adjacentes as raízes e isso também afeta a atividade microbiana do solo na região sobre a influência radicular (Burgess & Raw, 1967).

2.3 Microrganismos do solo

O microbioma do solo tem a capacidade de alterar o meio envolvente através do seu metabolismo: consegue modificar a solubilidade dos componentes minerais do solo, reduzir quimicamente componentes orgânicos, modificar a estrutura do solo, oxidar compostos inorgânicos e utilizar uma variedade de compostos do solo como aceitadores de elétrons no seu metabolismo (Tate, 2021). Tendo em consideração a diversidade e capacidade adaptativa dos microrganismos, estes podem ser utilizados na agricultura sustentável, uma vez que desempenham vários papéis chave a nível do solo, fundamentais para a prática da agricultura, entre os quais: decomposição de matéria orgânica e aumento consequente da disponibilidade de nutrientes do solo, reciclagem e transporte de nutrientes, agregação de partículas do solo e estabilidade estrutural deste, fixação de azoto atmosférico, sequestro de carbono e degradação de compostos xenobióticos (Miransari *et al.*, 2013).

Relativamente à decomposição de matéria orgânica, os microrganismos desempenham um papel chave na mineralização de matéria orgânica, uma vez que os microrganismos decompositores possuem a capacidade de quebrar moléculas complexas em moléculas mais simples, degradando a matéria orgânica e libertando nutrientes para o meio, que poderão ser assimilados pelas plantas (Davet, 2001).

Também possuem a capacidade de contribuir para a agregação de partículas do solo e para a estabilidade estrutural deste: a qualidade da estrutura do solo depende da

estabilidade do seus agregados. Raízes e hifas de fungos, nomeadamente hifas de fungos micorrízicos, têm a capacidade de estabilizar macroagregados; os micróbios do solo conseguem também estabilizar microagregados através da produção de uma cápsula constituída por polissacarídeos e glicoproteínas e da secreção de polissacarídeos extracelulares, formando uma camada mucoide à volta da colónia. Assim, tanto a cápsula segregada como a camada mucoide promovem a aderência de partículas de solo, estabilizando, dessa forma, os microagregados do solo (Tisdall, 1994; Davet, 2001).

Para além disto, determinados microrganismos fazem parte do processo de fixação de azoto atmosférico: as bactérias fixadoras de azoto, como os rizóbios, que estabelecem simbioses com leguminosas e conseguem transformar o azoto atmosférico em compostos azotados assimiláveis pelas raízes das plantas (Chen et al., 2003).

A contaminação ambiental global por compostos xenobióticos tornou-se um problema ambiental grave. Muitos destes compostos têm um impacto ambiental nocivo, devido à sua toxicidade, persistência prolongada no meio e biodegradabilidade limitada. A degradação de compostos xenobióticos através da utilização de micróbios foi considerada a abordagem mais eficaz e benéfica. Alguns microrganismos apresentam um potencial catabólico elevado, devido à presença de determinados genes, enzimas e vias de degradação implicadas no processo de biodegradação destes compostos. (Mishra *et al.*, 2021).

Os microrganismos de solo promovem ainda o sequestro de carbono: a concentração de dióxido de carbono no solo é bastante mais elevada do que a concentração de dióxido de carbono na atmosfera. (Grover et al., 2015). O sequestro de carbono da atmosfera envolve plantas e microrganismos, incluindo bactérias, algas, fungos e leveduras através de duas vias, a fotossintética e a não-fotossintética. Os organismos autotróficos e heterotróficos incorporam o dióxido de carbono em vários produtos de carbono orgânico, como a celulose, lignocelulose, quitina, hemicelulose, entre outros. O sequestro de carbono ecologicamente correto pode ser alcançado através da utilização adequada destes organismos (Gayathri et al., 2021).

Como a flora microbiana do solo varia dependendo das condições deste, o tipo e quantidade de matéria orgânica que entra no solo determina o estado a nível microbiano. Assim, o input orgânico ótimo modifica as populações microbianas, as cadeias alimentares e os processos biológicos envolvidos na transformação de nutrientes no solo (Yadav *et al.*, 2018). Deste modo, é de extrema importância a boa gestão, preservação e manutenção do solo (Cardoso & Andreote, 2016; FAO - Food and Agricultural Organization, n.d.).

Assim, os microrganismos desempenham um papel fundamental uma vez que exercem funções chave em processos de extrema importância para todo o ecossistema (Elsas *et al.*, 2019)., principalmente no que toca à fertilidade do solo e à saúde das plantas.

A possibilidade de gerir os microrganismos do solo é um componente importante na agricultura sustentável, no sentido de capitalizar os serviços de ecossistema que proporcionam para melhorar produção agrícola. Esta gestão deve desejavelmente ser feita pela adoção de práticas agronómicas que favoreçam o desenvolvimento e diversidade do microbioma do solo, sendo que em algumas circunstâncias se pode ainda recorrer à inoculação de microrganismos benéficos (Higa & Parr, 1994), como por exemplo, a inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal e/ou fungos de solo, como *Trichoderma* sp. e fungos micorrízicos (Lopes *et al.*, 2018).

As rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) são bactérias que colonizam a rizosfera de plantas e têm a capacidade de promover o crescimento vegetal, beneficiando de exsudados das raízes, exercendo efeitos benéficos sobre as plantas, como por exemplo: fixação biológica de azoto, solubilização de fosfatos, produção de fitohormonas, ativação de mecanismos de defesa de plantas face a situações de stress, podem ainda ter um efeito antagonista face a microrganismos patogénicos para as plantas, entre outros (Ahemad & Kibret, 2014; Rahman *et al.*, 2018). Dentro das RPCV temos os géneros *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, entre outros, sendo capazes de promover o crescimento vegetal, aumentar a produtividade das culturas, aumentar a taxa de emergência de sementes, a biomassa vegetal, a resiliência das culturas face a doenças e, conseqüentemente, o rendimento de colheitas (Kang *et al.*, 2019). No entanto, devido a algumas incongruências relativamente a trabalhos de pesquisa sobre estes microrganismos a nível de condições de campo, são poucas as espécies de RPCV que são realmente utilizadas e transformadas em produtos comerciais para utilização em larga escala (Steffen *et al.*, 2015).

Relativamente aos fungos, estes também apresentam a capacidade de promover o crescimento de plantas, nomeadamente o género *Trichoderma* sp e os fungos micorrízicos. Os fungos do género *Trichoderma* são fungos de vida livre e a sua relevância está no seu grande potencial de aplicação do ponto de vista agrícola, (Chagas *et al.*, 2017), uma vez que este fungo é um fungo antagonista, apresentando a capacidade de inibir o desenvolvimento de fungos patogénicos, podendo ser utilizado em larga escala no controlo biológico de diferentes agentes patogénicos de plantas. Relativamente aos fungos micorrízicos, estes apresentam uma importância ecológica significativa, uma vez que colonizam uma vasta maioria das espécies vegetais. A simbiose mutualista entre estes fungos e as plantas apresenta inúmeros benefícios: aumentam o sistema radicular das plantas permitindo uma melhor absorção de água e de nutrientes, conferem uma maior resistência às plantas relativamente à seca, podem ser utilizadas como um método de controlo de patógenos de plantas, podem ser utilizadas como canais de drenagem de carbono da atmosfera para o solo, via planta, uma vez que têm acesso direto às fontes de

carbono da planta e ainda, associações entre plantas e rizóbios ajudam a superar problemas nutricionais de fósforo e azoto em solos degradados. (Berude *et al.*, 2015).

Apesar de todo o conhecimento já existente, continua a ser necessária investigação aprofundada sobre o ambiente, as culturas, as condições de solo, as interações entre estes microrganismos e o microbioma nativo do solo, bem como acerca do isolamento de compostos bioativos de interesse industrial, de forma a contribuir para o avanço do conhecimento e da aplicabilidade destes microrganismos e/ou compostos em sistemas agrícolas (Kang *et al.*, 2019).

Por todas as razões acima referidas, torna-se importante a monitorização da atividade microbiana do solo no contexto dos agroecossistemas, uma vez que permitirá avaliar processos importantes como a decomposição da matéria orgânica, ciclo de nutrientes e, de uma forma mais global, será um bom indicador da saúde do solo.

2.4 Sustentabilidade da Gestão de Solo

O desenvolvimento sustentável faz com que seja possível a satisfação das necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de satisfazer as suas próprias necessidades (WCED - *World Commission on Environment and Development* & UN - *United Nations*, 1987). Assim, a gestão do solo é sustentável quando não se altera a capacidade do solo de assegurar as necessidades das gerações futuras.

Para um solo saudável e produtivo, é necessário a presença de microrganismos (bactérias, fungos e actinobactérias, protozoários) e micro e meso fauna (nemátodes e artrópodes). A utilização de produtos químicos como fungicidas, inseticidas e herbicidas tem contribuído para a contaminação e poluição do solo, da água e da atmosfera (Steffen *et al.*, 2011) e, também, para a diminuição da vida microbiana no solo de tal forma que, de modo a produzir colheitas com produções elevadas, é necessário a utilização de grandes quantidades de fertilizante, originando solos quase estéreis, incapazes de gerar a sua própria matéria orgânica (Leite & Araújo, 2007).

Devido aos custos ambientais elevados da agricultura, como o aumento da emissão de gases com efeito estufa, o aumento do consumo de água, a disseminação de novos agentes patogénicos, a utilização de pesticidas e fertilizantes que despoletou uma deterioração do solo, surgiu a necessidade de implementar práticas que permitam a intensificação sustentável da agricultura. Esta deve ser capaz de garantir a conservação de recursos naturais e, ao mesmo tempo, deve ser capaz de produzir bens de boa qualidade e em quantidade suficiente para alimentar uma população em crescimento constante (Ehlers, 2009). Assim, tem-se a agricultura sustentável como um sistema produtivo que garante uma manutenção a longo prazo dos recursos naturais e da

produtividade agrícola, com o mínimo de efeitos negativos no meio ambiente, contribuindo para a otimização da produção de culturas com uma utilização mínima de produtos químicos, que satisfaça as necessidades humanas de alimentos (e outros produtos de origem agrícola) (Robertson, 2015). Para além disto, compreende ainda uma gestão dos agroecossistemas de modo a minimizar o desperdício e promover a resiliência, autorregulação e evolução destes. O maior desafio da agricultura sustentável é a produção de alimentos, e de outros bens agrícolas, a um custo ambiental muito baixo, comparativamente aos custos ambientais da agricultura tradicional, e que não coloque em risco a segurança alimentar nem o bem-estar das gerações futuras. A agricultura sustentável tem ainda de ser equacionada num contexto de alterações climáticas, perda de biodiversidade e num ambiente saturado com excesso de azoto e de outros poluentes, o que requer novas abordagens e novas ferramentas no delineamento e na implantação de novas soluções viáveis (Robertson, 2015). Dentro das novas abordagens, temos a possibilidade de tirar partido da atividade microbiana do solo de modo a capitalizar os seu benefícios na produção agrícola e contribuir para uma gestão mais eficiente dos recursos.

2.5 Vinha

A vinha é um excelente exemplo de um sistema em que muitos estudos se têm dedicado a investigar a influência do microbioma do solo no desenvolvimento das plantas e nas características do vinho (Chou *et al.*, 2018; Coller *et al.*, 2019; Gilbert *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2019).

Uma das técnicas desenvolvidas para uma gestão mais sustentável da vinha é o enrelvamento, que consiste no revestimento da entrelinha da vinha com cobertura vegetal espontânea ou instalada.

A escolha da cobertura vegetal a instalar passa por espécies anuais, como gramíneas e leguminosas, que produzam semente antes do período em que a competição pela água possa comprometer a produtividade da vinha. Esta cobertura vai competir com espécies infestantes de difícil controlo, sendo que estas, a longo prazo, tenderão a reduzir a sua presença no espaço, contribuindo para a redução de custos de manutenção da vinha. Para além disto, o enrelvamento também contribui para a redução da erosão hídrica e para o aumento do teor de matéria orgânica no solo, melhorando a sua estrutura, bem como a atividade e diversidade biológica (Monteiro *et al.* 2012; Barros, 2020). O aumento da biomassa microbiana e atividade nas zonas onde se pratica enrelvamento está concentrado nas camadas superiores do solo (0 – 5cm) como consequência do aumento do conteúdo de carbono do solo, ou seja, em consequência da maior disponibilidade de nutrientes para os microrganismos (Abad *et al.*, 2021).

A vinha é uma cultura de extrema importância a nível económico, uma vez que a uva é utilizada diretamente na alimentação, bem como na produção de vinho. Na região do Alentejo produz-se cerca de 30% da uva para vinho e 60% da uva de mesa, do total nacional (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Produção de uva em Portugal Continental e na região do Alentejo no ano de 2020.
Fonte: Instituto Nacional de Estatística, 2020

Produção	Portugal continental	Alentejo
Uva de mesa (toneladas)	17 723	10 723
Uva para vinho (toneladas)	830 132	241 849

A zona do Alentejo tem um enorme potencial de produção vitivinícola, tendo assegurado em 2020 cerca de 1813 mil hectolitros de vinho (30% da produção nacional), sendo por isto uma importante região produtora de vinho em Portugal (Infovini, 2009). Em geral, as vinhas são instaladas em solos de baixa fertilidade, devido à sua rusticidade, uma vez que solos de maior fertilidade são utilizados para outro tipo de culturas (cerealíferas e explorações agropecuárias) (Correia, 2015). É ainda importante referir que, na cultura da vinha, o clima é um dos principais condicionantes na sua produção, uma vez que a temperatura é um fator determinante no desenvolvimento da videira, sendo responsável pela regulação de funções fenológicas desta (desde a plantação, abrolhamento e maturação, até à colheita) (López & Ruiz, 2019). Assim, a temperatura desempenha um papel fundamental na composição do fruto, especialmente no que diz respeito ao teor de açúcar e acidez da uva, cujo equilíbrio é essencial para a produção de vinhos de elevada qualidade. Temperaturas elevadas levam a um amadurecimento precoce do fruto, conferindo ao vinho um elevado teor alcoólico e baixa acidez; temperaturas mais baixas têm o efeito oposto, ou seja, impedem a completa maturação do fruto, produzindo vinhos com um elevado teor de acidez, baixo teor de açúcar e sabores mais cítricos (Jones & Davis, 2000). Assim, em regiões onde há uma predominância de dias quentes e secos no verão e dias frios e chuvosos no inverno, dá-se a produção de uva de qualidade e, consequentemente, vinhos de qualidade (Gil, 2021), como acontece no caso de vinhas instaladas no Alentejo, onde se verifica a junção destas condições favoráveis para o desenvolvimento da videira. O sistema de rega utilizado na instalação de vinhas é o sistema de rega gota-a-gota, uma vez que consiste num sistema de rega localizada que promove uma irrigação das plantas controlada e uma gestão de água eficiente.

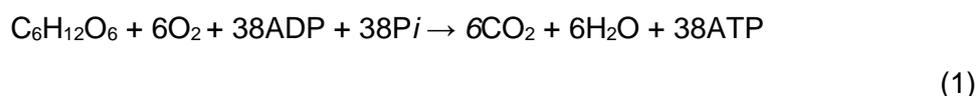
2.6 Avaliação da atividade microbiana do solo

2.6.1 Carbono da biomassa microbiana e respiração basal do solo

Atendendo à importância da atividade microbiana do solo como principal responsável da decomposição de matéria orgânica, a quantificação do carbono da biomassa microbiana (C-Mic) e da respiração basal do solo (RBS) são importantes parâmetros na aferição geral desta atividade.

O carbono da biomassa microbiana é uma medida do carbono contido na componente viva da matéria orgânica do solo (principalmente bactérias e fungos). A biomassa microbiana é definida como a fração da matéria orgânica no solo que é constituída por microrganismos de tamanho entre 5 a 10 μm^3 . O interesse em estimar este parâmetro está relacionado com a função dos microrganismos como reservatório de nutrientes e com o seu papel na formação e estabilização de agregados no solo. O carbono da biomassa microbiana também pode ser visto como um marcador ecológico (Alef & Nannipieri, 1995), uma vez que este parâmetro responde de forma bastante rápida a alterações nas condições ambientais do meio, podendo ser considerado como um «alerta precoce» destas alterações, muito antes de serem detetadas nas plantas. Por isto, a sua determinação é um parâmetro bastante útil a nível da proteção de solo (Joergensen & Brookes, 2005).

A respiração microbiana do solo é um indicador da atividade microbiana do solo, uma vez que representa a oxidação da matéria orgânica realizada pelos microrganismos aeróbios do solo, que utilizam oxigénio no seu metabolismo, convertendo-o em dióxido de carbono (Moreira & Siqueira, 2006), através da respiração aeróbia. A respiração aeróbia é a forma de metabolismo presente na maioria dos microrganismos do solo, sendo de elevada importância para o processo de decomposição de matéria orgânica (Bini *et al.*, 2016). Consiste numa série de reações catalisadas por enzimas, nas quais se dá a transferência de eletrões a partir de moléculas como a glucose, para moléculas de oxigénio, sendo este utilizado como o aceitador final de eletrões da reação. Esta reação é a via principal de obtenção de energia dos microrganismos aeróbios, fornecendo ATP e outros metabolitos secundários a outras vias de síntese secundárias das células. A respiração aeróbia em microrganismos é traduzida pela equação (1) (Talaro & Chess, 2018):



Desta forma, é possível avaliar a atividade microbiana do solo através da medição da produção de dióxido de carbono (Moreira & Siqueira, 2006), sendo possível realizar

inferências sobre o teor e a decomposição de matéria orgânica, para além de refletir a capacidade do solo de sustentar vida, através da atividade dos microrganismos.

A respiração basal do solo (RBS) pode, então, ser definida como a soma total de todas as funções metabólicas a nível do solo nas quais existe produção de dióxido de carbono (Evangelista Da Silva *et al.*, 2007) (Figura 2.1). No entanto, se a análise for realizada numa pequena amostra de solo crivado, pode considerar-se que a RBS corresponde à respiração microbiana.

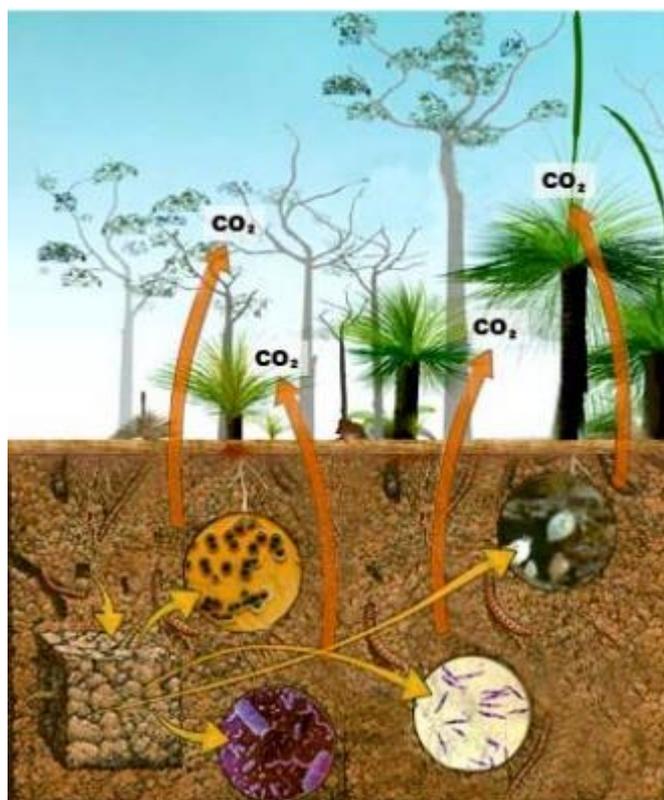


Figura 2.1 - Representação da produção de CO₂ que contribui para a respiração basal do solo.
Fonte: Evangelista Da Silva *et al.*, 2007

2.6.2 Quantificação de bactérias e fungos culturáveis

A matriz do solo é considerada o maior reservatório de microrganismos que interagem com plantas, sendo considerado o ecossistema com maior biodiversidade do planeta. O microbioma do solo é responsável por processos de extrema importância para o ambiente e estão diretamente relacionados com o bem-estar das plantas que nele habitam. Apesar da presença de microrganismos nas plantas ser, frequentemente, relacionada com a ocorrência de doenças nestas, a maioria dos microrganismos não são agentes causais de danos nas plantas. Considerando o microbioma do solo como um componente ativo do solo, é de esperar que responda a alterações nas condições do

ambiente, tanto bióticas como abióticas, sendo importante compreender que fatores afetam a composição do seu microbioma (Andreote *et al.*, 2014).

Assim, a quantificação de bactérias e fungos culturáveis reveste-se de particular importância, uma vez que estes grupos microbianos desempenham funções vitais para o equilíbrio e dinâmica a nível do solo e, conseqüentemente, a nível de todo o ecossistema (Sun *et al.*, 2017). Importa referir que, uma vez que se trata da avaliação de microrganismos culturáveis, representa uma quantificação parcial da população total, uma vez que muitos microrganismos não são culturáveis nas condições utilizadas. De qualquer modo, trata-se de uma avaliação que em termos comparativos e relativos representa uma ferramenta útil de avaliação das populações de fungos e bactérias.

2.6.3 Taxa de colonização micorrízica

As micorrizas consistem numa associação simbiótica mutualista entre os fungos micorrízicos arbusculares e as raízes das plantas. O fungo desenvolve no interior das células da zona cortical da raiz, estruturas típicas, os arbúsculos, e simultaneamente desenvolve no solo uma rede de micélio extrarradicular (MER). Os arbúsculos consistem em estruturas originadas através da invaginação do plasmalema, a partir da penetração de células corticais pelas hifas do fungo. Estas estruturas são os principais locais de troca de metabolitos entre o fungo e planta, sendo assim, do ponto de vista fisiológico, a principal estrutura simbiote do fungo (Hoffmann & Lucena, 2006). Esta associação permite, através do MER, aumentar o volume de absorção de nutrientes, sobretudo os pouco móveis como o fósforo, e de água pela planta hospedeira. Em retorno, o fungo recebe da planta compostos orgânicos e lípidos para o seu desenvolvimento. Para além da absorção de nutrientes e água, estes fungos têm a capacidade de aumentar a resistência das plantas a stresses bióticos e abióticos.

Atendendo ao facto de que os fungos micorrízicos arbusculares estabelecem relações simbióticas mutualistas com as raízes das plantas, a análise da taxa de colonização micorrízica das plantas na entrelinha numa cultura perene como a vinha, pode funcionar como um bom aferidor da presença desta simbiose no sistema, ilustrando a capacidade de absorção de nutrientes pelas plantas, a resistência contra pragas e doenças transmitidas pelo solo, a resistência à seca e a tolerância a metais pesados no solo, contribuindo deste modo para o seu desenvolvimento (Gosling *et al.*, 2006).

2.6.4 Atividade Enzimática

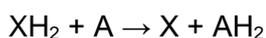
A decomposição de matéria orgânica a nível do solo é mediada por microrganismos através da atividade de enzimas que catalisam inúmeras reações necessárias ao seu

metabolismo, e que por sua vez vão influir no ciclos de nutrientes. A maioria das enzimas presentes no solo são produzidas por microrganismos e são sintetizadas continuamente, podendo ser acumuladas, inativadas e/ou decompostas no solo (Liborio & Chaves, 2010). Existem enzimas intracelulares e extracelulares com diferentes origens que podem ser sintetizadas por plantas, animais e microrganismos. As enzimas intracelulares encontram-se dentro de células vivas; estas células produzem e secretam enzimas extracelulares, que funcionam fora da célula que as sintetizou, tanto como enzimas livres no solo como enzimas que, apesar de livres, estão associadas a superfícies radiculares ou a células microbianas. A utilização de enzimas para determinar a qualidade do solo assenta no facto de que são extremamente sensíveis às práticas agronómicas, à decomposição de matéria orgânica e são de fácil análise (Adetunji *et al.*, 2017). Assim, a atividade enzimática é uma componente de extrema importância na dinâmica dos ciclos de nutrientes do solo, sendo considerada como um importante fator ilustrativo da atividade microbiana do solo e da sua qualidade (Kremer, 1994). Para uma melhor percepção da atividade microbiana diretamente relacionada com os ciclos de alguns dos principais elementos, e a sua disponibilidade para as plantas, a atividade das diferentes enzimas envolvidas nestes ciclos pode fornecer informação funcional mais detalhada, nomeadamente a atividade da desidrogenase (atividade microbiana no geral), da arilsulfatase (ciclo do enxofre), da β – glucosidase (ciclo do carbono) e da fosfatase (ciclo do fósforo) (Albiach *et al.*, 2000).

2.6.4.1 Atividade da enzima desidrogenase

A atividade enzimática da desidrogenase (DHA) no solo fornece informações relativamente à atividade biológica da sua população microbiana. A atividade desta enzima consiste num processo de degradação oxidativo, sendo considerada uma oxirredutase, que catalisa a oxidação de compostos orgânicos através da separação de átomos de H_2 (Kumar *et al.*, 2013). Este processo enzimático ocorre intracelularmente em todas as células microbianas viáveis e a sua avaliação fornece informação relativamente à atividade microbiana do solo.

A atividade desta enzima dá-se pela equação (2) (Adetunji *et al.*, 2017):



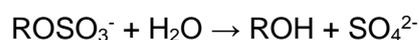
(X – composto orgânico; A – molécula aceitadora) (2)

A determinação da atividade da DHA é um ensaio não específico, uma vez que representa atividade de diferentes enzimas (Sinsabaugh *et al.*, 2002) e em condições laboratoriais avalia-se a desidrogenação da matéria orgânica através da transferência de hidrogénio e eletrões do substrato para a molécula aceitadora, neste caso o 2,3,5 - cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).

2.6.4.2 Atividade da enzima arilsulfatase

A importância do enxofre na nutrição das plantas assenta no facto de que este nutriente desempenha um papel estrutural em diversas moléculas importantes do metabolismo, como por exemplo aminoácidos como a metionina, cisteína e cistina, os quais são necessários para a formação de proteínas. A dinâmica do enxofre no solo envolve reações de oxirredução, mineralização, imobilização e adsorção de sulfato em colóides do solo (Paiva & Nicodemo, 1993). As plantas absorvem o enxofre principalmente sob a forma oxidada de sulfato, reduzem-no e incorporam-no em vários componentes celulares e metabolitos. A assimilação de sulfato é, portanto, uma via essencial do metabolismo primário da planta (de Kok *et al.*, 2017), uma vez que está interligada com o metabolismo e assimilação de azoto.

Relativamente à análise da atividade da arilsulfatase, esta enzima catalisa a hidrólise de éster de sulfato orgânico, pela equação (3) (Adetunji *et al.*, 2017):



(3)

A arilsulfatase hidrolisa um vasto número de ésteres de sulfato orgânicos no solo, entre os quais, o sulfato de p-nitrofenol, o sulfato de 4-nitrocatecol e o sulfato de fenolftaleína, sendo que apenas o produto do sulfato de p-nitrofenol (PNS) extraído do solo pode ser quantificado, uma vez que, contrariamente aos outros dois substratos, não é altamente reativo com compostos fenólicos do solo (Figura 2.2) (Tabatabai & Dick, 2002). A quantificação da atividade desta enzima no solo é realizada através da determinação colorimétrica do produto da reação, o para-nitrofenol (PNP), produzido após incubação com o substrato sulfato de p-nitrofenol (PNS).

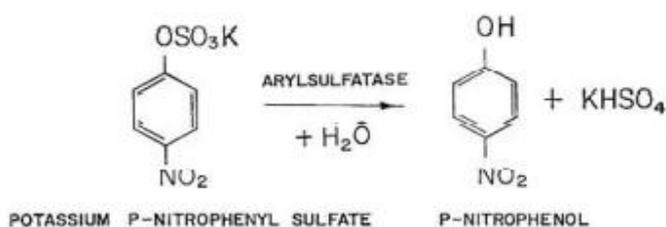


Figura 2.2 - Reação enzimática da arilsulfatase.

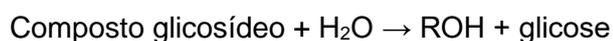
Fonte: Tabatabai & Dick, 2002

2.6.4.3 Atividade da enzima β-glucosidase

A β-glucosidase é uma enzima amplamente distribuída na natureza e está relacionada com o ciclo do carbono. A importância da atividade desta enzima assenta no facto de que da sua atividade na hidrólise de compostos glicosídeos, resulta a produção

de açúcares indispensáveis como fonte de energia para os microrganismos do solo (Elvazrt & Tabatabai, 1990; Ferraz de Almeida *et al.*, 2015). Mais concretamente, esta enzima está envolvida na degradação enzimática da celulose, que é o principal componente dos polissacarídeos de origem vegetal. A molécula de celulose consiste num polissacarídeo formado por cadeias poliméricas de β -1,4-glucose e a sua degradação enzimática ocorre da seguinte forma: é iniciada pela β -1,4-endoglucanase, que quebra as moléculas de celulose em unidades de menor tamanho; de seguida, dá-se a ação da celobiohidrolase que cliva o dímero de celobiose (duas unidades de β -1,4-glicose ligadas); após a ação destas duas enzimas, a β -glucosidase completa o processo de hidrólise da molécula de celulose, libertando/produzindo duas moléculas de glicose por molécula de celobiose, regulando o fornecimento de glicose a microrganismos do solo que não são capazes de absorver diretamente a molécula de celobiose (Turner *et al.*, 2002).

A reação da enzima dá-se pela equação (4) (Adetunji *et al.*, 2017):



(4)

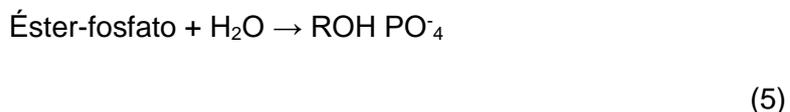
Como esta enzima é extremamente sensível a alterações a nível do solo, é considerada, tal como as outras enzimas analisadas neste trabalho, um indicador da qualidade do solo (Ferraz De Almeida *et al.*, 2015). A determinação da concentração desta enzima no solo é realizada através da determinação colorimétrica do produto da reação, o para-nitrofenol (PNP) produzido, após incubação no substrato p-nitrofenol- β -D-glucopiranosídeo (PNG).

2.6.4.4 Atividade enzimática da enzima fosfatase

O fósforo, tal como o azoto e o potássio, é um elemento-chave da nutrição vegetal. Desempenha um papel de extrema importância em praticamente todos os processos metabólicos da planta, incluindo a fotossíntese, transferência de energia, biossíntese macromolecular, respiração e fixação de azoto em leguminosas. Embora seja considerado um elemento abundante nos solos, tanto na forma orgânica como inorgânica, é um fator limitante no desenvolvimento de plantas, uma vez que se encontra maioritariamente como fósforo inorgânico em complexos minerais insolúveis, sendo a sua absorção pela raiz das plantas impossível. A matéria orgânica é um importante reservatório de fósforo imóvel (Sharma *et al.*, 2013), pelo que a ação da enzima fosfatase é de extrema importância na sua libertação.

A enzima fosfatase catalisa a hidrólise de ligações éster-fosfato, levando à libertação de fósforo que pode ser absorvido pelas plantas ou pode ser utilizado no metabolismo de microrganismos (Nannipieri *et al.*, 2011).

A reação da fosfatase dá-se pela equação (4) (Adetunji *et al.*, 2017):



A produção da enzima fosfatase por microrganismos do solo é resultado de modificações bioquímicas a nível celular desencadeadas, principalmente, pela diminuição de fósforo no solo, o que explica o aumento da sua atividade quando os sistemas têm baixos níveis de fósforo disponível (Bini & Lopez, 2016). A determinação da concentração desta enzima no solo é realizada através da determinação colorimétrica do produto da reação, o para-nitrofenol (PNP) produzido, após incubação no substrato fosfato de p-nitrofenol (PNF).

2.7 Parâmetros fisiológicos da planta

2.7.1 Teor de clorofila

As plantas necessitam de um fornecimento contínuo de macro e micronutrientes no seu meio de crescimento para conseguirem desempenhar as suas funções fisiológicas básicas. A presença de concentrações apropriadas de azoto, fósforo, potássio, cálcio, enxofre, magnésio e ferro é essencial para o desenvolvimento ótimo das plantas (Hansatech Instruments Ltd, 2022). Carências em qualquer um destes nutrientes podem manifestar-se, para além das características que dependem do nutriente em questão, numa redução no teor de clorofila nas folhas. A diminuição do teor de clorofila da planta reduz a quantidade de radiação que pode ser absorvida pelas plantas, limitando a eficiência dos processos fotossintéticos e, deste modo, diminuindo a produção fotossintética primária. Assim, medições do teor de clorofila aplicadas à agricultura fornecem aos produtores informações importantes relativamente ao desenvolvimento das plantas e ao rendimento destas, de forma rápida e eficiente, permitindo o desenvolvimento de estratégias de fertilização otimizadas e direcionadas (Kalaji *et al.*, 2017).

2.7.2 Isótopos C¹² e C¹³

As plantas terrestres possuem três vias fotossintéticas distintas: C3, C4 e CAM. A maioria das plantas de climas temperados são espécies C3. A fotossíntese do tipo C3 é a via fotossintética ancestral e ocorre em todos os grupos taxonómicos de plantas; esta via fotossintética assenta no facto de que o primeiro produto deste tipo de fotossíntese é uma

molécula de três carbonos. A via fotossintética C4 ocorre em monocotiledóneas, como gramíneas e ciperáceas, mas não é muito comum entre espécies dicotiledóneas (maioria das árvores e arbustos). Por fim, a via fotossintética CAM ocorre em plantas de regiões áridas, como suculentas e epífitas (Ehleringer & Cerling, 2002).

A disponibilidade de água é considerada como o principal fator limitante na produção de biomassa nos agroecossistemas, uma vez que o desenvolvimento das plantas está intimamente ligado a dois processos: a fotossíntese e a transpiração. A necessidade de compreender a eficiência de uso de água pelas plantas deve-se ao facto de que, por um lado, ao aumentar a eficiência do uso da água será possível reduzir a necessidade hídrica para um determinado rendimento da cultura, podendo ajudar a economizar uma quantidade considerável de água na irrigação; por outro lado, uma melhoria na eficiência do uso da água pelas plantas pode aumentar significativamente a produção de biomassa total (Adiredjo *et al.*, 2014).

A análise isotópica de C^{12} e C^{13} está relacionada com as condições climáticas a que a planta esteve sujeita durante o seu desenvolvimento, mais concretamente com a disponibilidade de água e de nutrientes, juntamente com a intensidade de luz e temperatura a que foi submetida. Isto acontece devido ao facto de que a composição isotópica do oxigénio da água das folhas das plantas varia consoante a composição isotópica da água utilizada pela planta, do vapor da atmosfera e também do rácio de ar/pressão de vapor a nível da folha. Assim, diferenças a nível de altitude, precipitação, stress hídrico e processos de evaporação e transpiração afetam a composição isotópica da água presente nas folhas (Rodrigues *et al.*, 2009). Deste modo, a análise isotópica de C^{12} e C^{13} é uma técnica extremamente útil na análise com rigor, e ao longo do tempo, da eficiência do uso da água pelas plantas em estudo, o que juntamente com o estudo de outros parâmetros fisiológicos, é indicativo do estado de conforto ou stress a que a planta está ou esteve sujeita, o que acaba por ter consequências a nível dos parâmetros produtivos da mesma.

A composição isotópica de tecidos vegetais, mais concretamente a nível de C^{13} , é função, principalmente, do fracionamento isotópico do CO_2 durante a fotossíntese. A difusão do CO_2 através dos estomas foliares e a redução enzimática do CO_2 pela enzima RuBisCo durante a carboxilação contribuem para o fracionamento (discriminação) do isótopo C^{13} , já que ambos os processos favorecem o isótopo de C^{12} mais leve.

A vinha insere-se dentro da via fotossintética C3, sendo que nestas plantas, são esperados valores do isótopo C^{13} entre -22‰ a -30‰. Como a fotossíntese é o principal determinante da assinatura de C^{13} das plantas, as condições ambientais a que estas estão ou foram sujeitas podem afetar o valor deste isótopo, entre elas o stress hídrico (Inácio & Urquiaga, 2017).

2.7.3 Fv/Fm – fluorescência variável/fluorescência máxima

Este parâmetro está relacionado com a emissão de fluorescência pela folha da planta e consiste na razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima, que por sua vez reflete a eficiência do aparelho fotossintético da planta. Para plantas em condições ideais de desenvolvimento, o valor deste parâmetro deverá ser 0,8 ou um valor próximo. Em plantas em condições de secura, o valor será inferior a 0,8, sendo que se o valor for entre 0,7 e 0,8 os danos sofridos pela planta ainda são reversíveis; se os valores estiverem abaixo de 0,7, então os danos serão irreversíveis e só no ano seguinte é que a planta terá a oportunidade de recuperar, isto se as condições de desenvolvimento desta melhorarem (Maxwell & Johnson, 2000). É um indicador bastante sensível da performance fotossintética da planta, pelo que valores baixos deste parâmetro podem indicar stress, fotoinibição ou alguma desregulação a nível do aparelho fotossintético da planta (Jägerbrand & Kudo, 2016).

O contributo direto destas análises para a gestão agronómica não é ainda uma realidade (Morgan *et al.*, 2017), uma vez que estão em falta estudos que incluam este tipo de abordagens na gestão de sistemas agrícolas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Descrição do local e da amostragem

A vinha da Herdade da Amoreira de Cima localiza-se no concelho de Montemor-o-Novo. Trata-se de uma vinha regada, constituída por plantas da espécie *Vitis vinifera* L., com enrelvamento na entrelinha, com uma área de 4 hectares, atravessada transversalmente por uma vala de drenagem e composta por três castas: Alicante Bouschet, Cabernet Sauvignon e Touriga Nacional. A casta Alicante Bouschet ocupa uma área de 2,32 hectares e localiza-se na zona Norte da propriedade. A casta Cabernet Sauvignon ocupa uma área de 0,3 hectares e localiza-se na zona Sudeste da propriedade. A casta Touriga Nacional ocupa uma área de 1 hectare e encontra-se na zona Sul da propriedade. As linhas têm uma orientação Norte-Sul na zona da propriedade acima da linha de drenagem e uma orientação Este-Oeste abaixo daquela linha (Figura 3.1). A zona em estudo apresenta um declive ligeiro e tem um povoamento disperso de azinheiras e sobreiros (quatro árvores). Esta vinha é conduzida em modo biológico, com aplicação de cobre, enxofre, algas e extratos de cavalinha e mimosas.

A amostragem foi realizada em julho de 2020 quando a vinha estava na fase de pintor (Figura 3.2). A área da vinha foi dividida em quadrículas tendo-se definido os 24 pontos de amostragem assinalados na Figura 3.1. As amostras de solo para avaliação dos parâmetros em estudo foram recolhidas na entrelinha, sendo que cada amostra recolhida corresponde a um ponto da Figura 3.1. As amostras de solo foram recolhidas com auxílio de uma sonda a uma profundidade de 15cm, sendo que cada amostra final constitui uma amostra composta de 4 picadas da sonda na proximidade de cada ponto de amostragem. As amostras de folhas para avaliação de isótopos foram colhidas de videiras próximas do ponto de amostragem de solo, tendo sido retiradas entre três a cinco folhas por planta. Nas mesmas plantas foi medido o teor de clorofila, a fluorescência variável e a fluorescência máxima

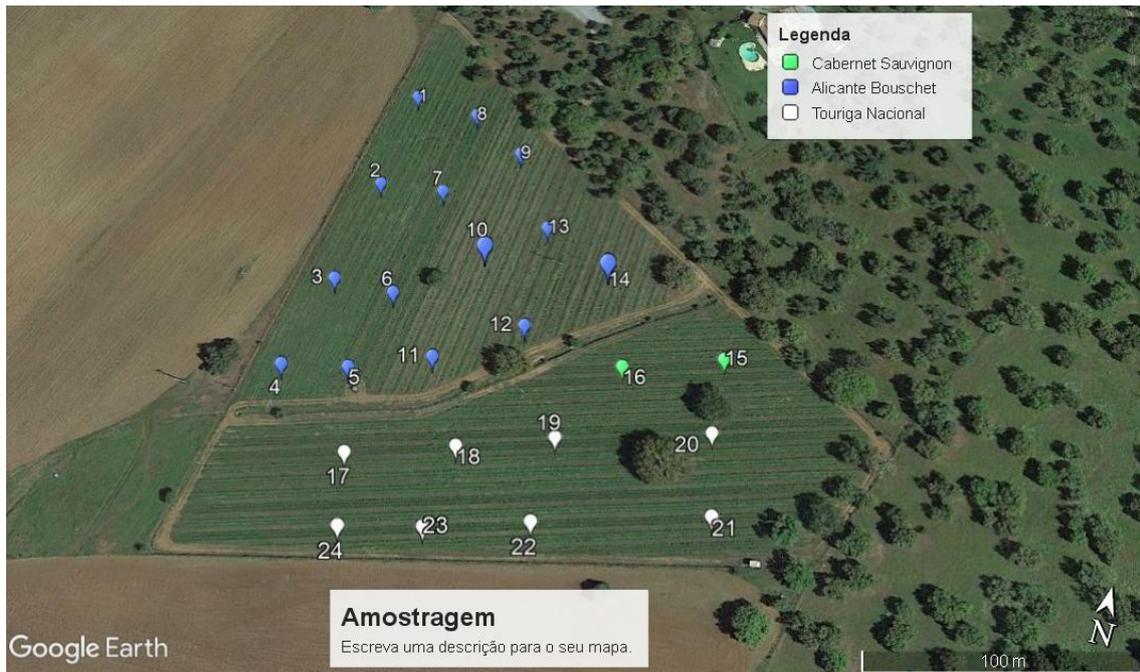


Figura 3.1 - Representação dos pontos amostrados na vinha e distribuição das castas.
Fonte: Google Earth



Figura 3.2 - Fotografia de uma das videiras amostradas.

Após a amostragem e já no laboratório, o solo foi crivado (crivo de 1mm) (Figura 3.3) e foram recolhidas raízes de plantas da entrelinha que iriam ser utilizadas na análise da taxa de colonização micorrízica. A crivagem tem também a finalidade de homogeneizar a amostra. As folhas amostradas foram maceradas em azoto líquido e preservadas a -20C até serem analisadas.



Figura 3.3 - Crivagem do solo.

3.2 Capacidade de Retenção de Água do Solo

Para o cálculo da capacidade de retenção de água (CRA) foi colocado, num *erlenmeyer*, um funil de vidro forrado com papel de filtro. No seu interior colocaram-se 20g de solo crivado. De seguida, humedeceu-se lentamente o solo até à capacidade de campo, adicionando-se água ao solo até que o funil começasse a gotejar e aguardou-se que parasse (Figura 3.4). De seguida retiraram-se 10g do solo encharcado que foram colocadas em placas de Petri de vidro previamente pesadas. As placas contendo o solo foram colocadas na estufa a 105°C durante 24 horas, sendo que, após este período, as amostras foram retiradas da estufa, procedeu-se à sua pesagem de modo a obter o valor de peso seco do solo e o seu teor em água à capacidade de campo



Figura 3.4 - Encharcamento do solo.

3.3 Humidade do Solo

Pesaram-se 10g de cada amostra de solo crivado para placas de Petri previamente pesadas e colocou-se as placas com o solo na estufa durante 24h a 105°C. Após este período, retiraram-se as amostras de solo da estufa, foram pesadas novamente de modo a obter o teor de água no solo amostrado.

3.4 Carbono da Biomassa Microbiana (C-Mic)

O protocolo para a determinação da biomassa microbiana foi dividido em duas partes: fumigação e obtenção do extrato; e determinação da biomassa microbiana.

3.4.1 Fumigação e obtenção do extrato

Para cada amostra foram preparados quatro frascos com 20g de solo corrigido para 60% da CRA: dois frascos foram utilizados para fumigação (duas réplicas técnicas) e dois foram mantidos sem fumigação (duas réplicas técnicas). Para proceder à fumigação, foi utilizada uma atmosfera saturada com clorofórmio. Juntamente com os frascos das amostras, colocaram-se quatro frascos com 25mL de clorofórmio dentro do exsiccador (Figura 3.5), o mais afastados possível do centro, desfasados 90° entre si, criou-se vácuo e tapou-se o exsiccador com papel de alumínio de modo a evitar a entrada de luz. Todas as amostras ficaram em repouso no escuro durante 24 horas, tanto as que foram colocadas dentro do exsiccador como as restantes (não-fumigadas). Passado 24 horas, para as amostras fumigadas, removeu-se o vácuo criado no exsiccador. Foram adicionados 80mL de solução de sulfato de potássio a 0.1M (solução extratora) a cada amostra, tanto nas fumigadas como nas não-fumigadas. Por fim, as amostras foram

colocadas no agitador vaivém a 200 rpm durante uma hora, o sobrenadante foi filtrado, usando papel de filtro, para novos frascos (Figura 3.6) e pipetou-se 1mL do filtrado para tubos de ensaio para proceder à determinação da biomassa.

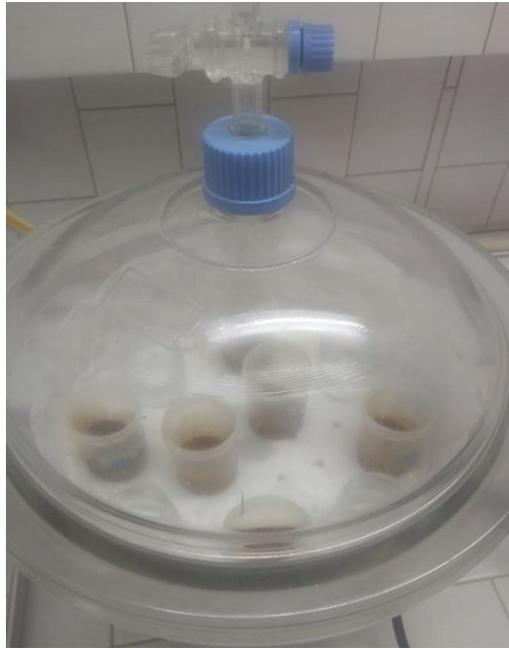


Figura 3.5 - Fumigação das amostras de solo dentro do exsicador.



Figura 3.6 - Filtração do sobrenadante das sub-amostras de solo.

3.4.2 Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana (C-Mic)

A determinação do C-Mic foi realizada de acordo com o protocolo de fumigação-extração descrito por (Vance *et al.*, 1987). Para determinar a biomassa microbiana, adicionaram-se aos tubos de ensaio com 1ml de filtrado, 1mL de solução de manganês III pirofosfato a 0.1M e 1mL de ácido sulfúrico concentrado (95%) e homogeneizou-se. Paralelamente, procedeu-se à preparação de padrões com 0, 20, 40, 60, 80, 100, e 120 mg/L de carbono, utilizando ácido oxálico e solução extratora de carbono como solvente (Tabela 3.1). De seguida, pipetou-se 1mL de cada padrão para um novo tudo, adicionou-se 1mL de solução manganês III pirofosfato e 1mL de ácido sulfúrico e homogeneizou-se. Por fim, os padrões e as amostras incubaram *overnight* e procedeu-se à leitura da absorvância no espectrofotómetro a 495nm.

Tabela 3.1 - Preparação dos padrões de carbono.

mg/L	0	20	40	60	80	100	120
Ácido oxálico	0 mL	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.4mL	0.5mL	0.6mL
Solução extratora	5 mL	4.9 mL	4.8 mL	4.7 mL	4.6mL	4.5mL	4.4mL

Foi construída uma curva padrão com estes resultados de forma a ser possível calcular o teor de carbono das amostras. Os valores de C-Mic são dados pelo teor de carbono do solo fumigado subtraído do teor de carbono do solo não fumigado, dividido pela proporção de C microbiano do solo (kc). Foi utilizado o valor de Kc recomendado por (Joergensen & Mueller, 1996). Os resultados são expressos em miligramas de carbono por quilograma de solo.

3.5 Respiração Basal do Solo (RBS)

Pesaram-se 50g de cada amostra de solo crivado para um frasco de vidro de 2L e procedeu-se à correção da humidade do solo para 60% da capacidade de campo. Dentro deste frasco colocou-se ainda um recipiente com 10mL de hidróxido de sódio a 1M. Tapou-se o frasco de 2L com película aderente e fechou-se com a tampa de modo a evitar trocas gasosas com o exterior. Nos frascos controlo foi apenas colocado o recipiente com 10mL de hidróxido de sódio a 1M e foram fechados da mesma forma que frascos com as amostras. De seguida colocaram-se os frascos a incubar durante sete dias, à temperatura ambiente (25 - 28°C) num local escuro.

Para quantificar o dióxido de carbono respirado, foi necessário realizar uma titulação. Após a incubação, retiraram-se os frascos com hidróxido de sódio de dentro dos frascos de 2L e adicionou-se cloreto de bário a 10% de forma a que o dióxido de

carbono precipitasse e homogeneizou-se a solução. Adicionou-se três gotas de fenolftaleína a 1%, e e, sob agitação constante, realizou-se a titulação com uma solução de ácido clorídrico a 0,5M.

3.6 Determinação da atividade enzimática da desidrogenase

Para a obtenção deste parâmetro foi seguido o protocolo descrito por Casida et al., 1964). Pesaram-se 5g de cada amostra de solo para tubos de ensaio. De seguida, adicionou-se 5mL de solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% e procedeu-se à incubação dos tubos de ensaio durante 24 horas a 37°C (Figura 3.7). Após a incubação, adicionou-se 1mL de metanol e agitaram-se os tubos. Após verificar que o solo se depositou no fundo do tubo, retirou-se o sobrenadante para proceder à sua centrifugação e à leitura da absorvância no espectrofotómetro a 485nm. É importante referir que a análise de cada amostra foi realizada em triplicado e para cada amostra existia um tubo de ensaio de controlo, apenas com a solução de TTC a 1% e metanol.



Figura 3.7 - Tubos de ensaio com amostra de solo e solução de TTC a 1%, após incubação.

Para proceder ao cálculo da atividade da desidrogenase, foi necessário efetuar uma curva de calibração, com TPF (trifenilformazan), produto resultante da redução do TTC pela desidrogenase, e metanol, com as seguintes concentrações indicadas na Tabela 3.2. Foi com base nesta curva que se calculou a atividade da DHA nas amostras.

Tabela 3.2 – Concentrações utilizadas de TPF e metanol na realização na curva de calibração.

µg/mL	0	200	500	1000	1500	2000
TPF	0 mL	1 mL	2.5 mL	5 mL	7.5 mL	10 mL
Metanol	50 mL	49 mL	47.5 mL	45 mL	42.5 mL	40 mL

3.7 Quantificação de bactérias e fungos culturáveis

Prepararam-se os seguintes meios de cultura: agar nutritivo (NA) para o crescimento de bactérias e *potato-dextrose-agar* (PDA) para o crescimento de fungos, sendo que foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Após a sua preparação, foram esterilizados na autoclave durante quinze minutos a 121°C. De seguida, após o meio arrefecer até cerca de 50°C, adicionou-se um antibiótico, cloranfenicol a 25mg/ml, ao meio de crescimento para fungos (PDA) de modo a evitar o crescimento indesejado de bactérias; e um fungicida, ciclohexamida a 25mg/ml, ao meio de crescimento de bactérias (NA) de forma, neste caso, a evitar a proliferação de fungos neste meio. Os meios de cultura foram depois colocados em placas de Petri de 90 mm (Figura 3.8).

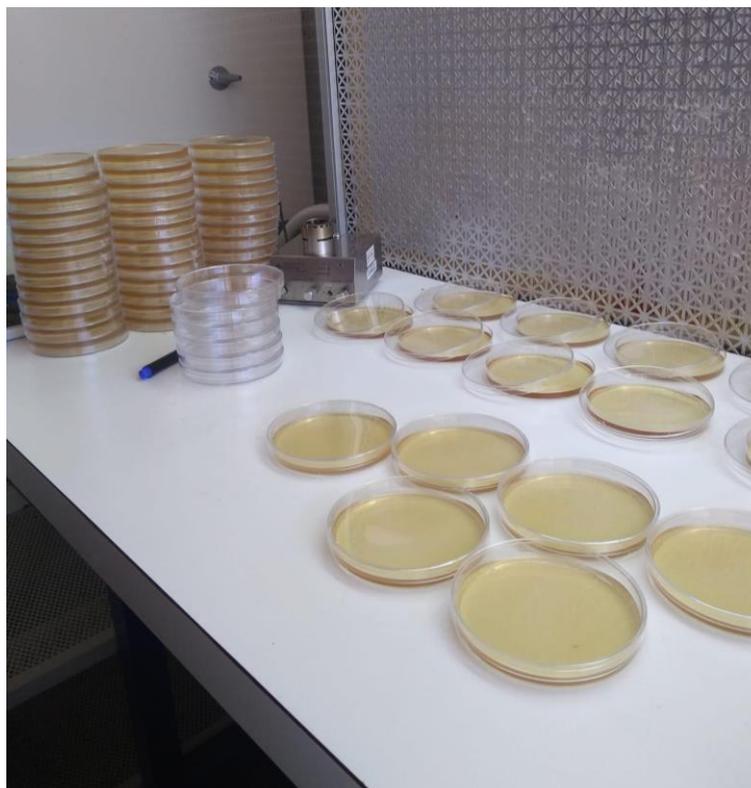


Figura 3.8 - Meios de cultura NA e PDA em placas de Petri.

Para a preparação da suspensão de solo, pesaram-se 10g de solo de cada amostra para *erlenmeyers* esterilizados e adicionou-se 90mL de solução salina também esterilizada (diluição 1/10). Foram depois realizadas diluições decimais seriadas até à concentração 10^{-7} , num volume final de 10mL. Cada placa de Petri foi inoculada por espalhamento com 100 μ L das diluições 10^{-3} a 10^{-7} (para cada diluição foram realizadas 3 réplicas técnicas). As placas de Petri com NA foram incubadas a 37°C durante 24 horas e as placas de Petri com PDA foram incubadas durante 48 horas a 27°C. Após o período de incubação, a contagem de colónias foi realizada na diluição que apresentava um valor entre 30 e 300 colónias.

3.8 Taxa de colonização micorrízica

Para se conseguir visualizar os AMF nas raízes das plantas foi necessário proceder à sua coloração. As raízes foram lavadas e cortadas de modo a ser possível colocá-las dentro de cassetes de histologia como mostra a Figura 3.9. Seguiu-se uma autoclavagem em hidróxido de potássio a 10%, a 121°C durante quinze minutos. De seguida, foram novamente lavadas e colocadas em azul tripano, a 0.1% em lactoglicerol, em banho-maria, durante dez minutos a 70°C. As cassetes foram com as amostras depois colocadas em glicerol a 50% e guardadas até à sua observação.



Figura 3.9 - Raízes numa cassete de histologia, antes de prosseguir com os restantes passos da coloração.

Para proceder à observação das raízes, estas foram colocadas numa lâmina previamente identificada e passou-se à observação das raízes ao microscópio com uma ampliação de 200x para avaliação da taxa de colonização micorrízica (Figura 3.10). Nesta avaliação foi utilizada a técnica de McGonigle *et al.*, 1990 .

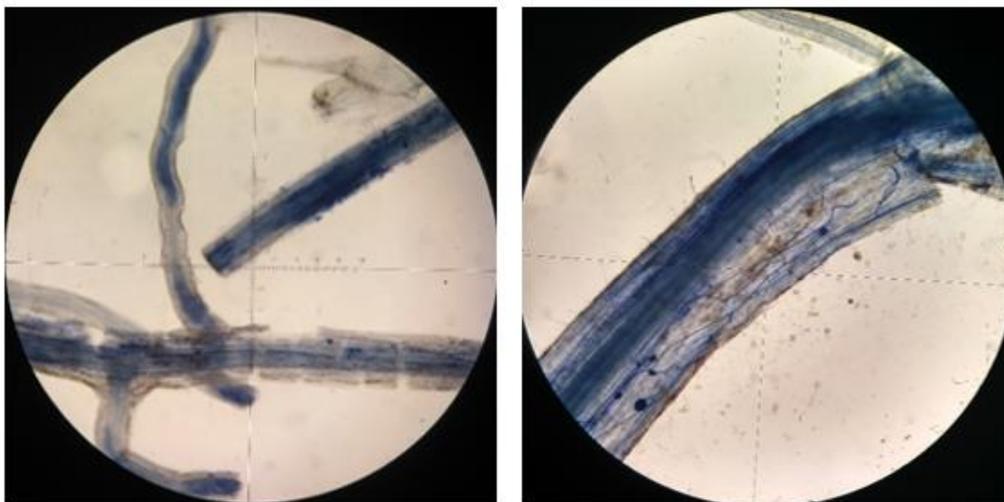


Figura 3.10 - Observação de raízes com fungos micorrízicos, ao microscópico.

3.9 Determinação da atividade enzimática da arilsulfatase, β – glucosidase e fosfatase

A determinação da atividade enzimática da arilsulfatase, β -glucosidase e fosfatase foi realizada de acordo com a ISO 20130:2018(E). Pesaram-se 4g de solo de cada amostra, adicionou-se 25mL água desmineralizada e colocou-se em agitação num agitador orbital a 190 rpm durante 10 minutos (em triplicado para cada amostra). De forma a garantir a homogeneidade da amostra a ser analisada, as suspensões de solo foram colocadas sobre um agitador magnético e diretamente daí, usando uma pipeta multicanal, pipetaram-se 125 μ L da suspensão de solo para cada poço de uma microplaca. Fizeram-se seis réplicas para cada suspensão de solo e duas réplicas para o controlo: um controlo da amostra, apenas com amostra de solo sem substrato enzimático e um controlo do substrato enzimático, contendo apenas o substrato enzimático utilizado (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Enzimas e respetivo substrato enzimático

Enzima	Substrato Enzimático
Arilsulfatase	PNS (sulfato de p-nitrofenol)
β - glucosidase	PNG (p-nitrofenol- β -D-glucopiranósido)
Fosfatase	PNF (fosfato de p-nitrofenol)

Para a incubação das enzimas arilsulfatase, β -glucosidase e fosfatase procedeu-se do seguinte modo, numa microplaca de 96 poços (Figura 3.11):

1. Amostra: 125 μ L da suspensão de solo;

2. Adição do substrato enzimático - PNS para a arilsulfatase, PNG para a enzima β -glucosidase e PNF para a fosfatase: 25 μ L em todos os poços da microplaca, exceto nos controlos;
3. Incubação durante quatro horas no caso da arilsulfatase, uma hora para a β -glucosidase e trinta minutos para a fosfatase, todas a 37°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Amostra 1						Amostra 2					
C												
D	Ct	Ct					Ct	Ct				
E												
F	Amostra 3						Amostra 4					
G												
H	Ct	Ct					Ct	Ct				

Figura 3.11 - Representação da microplaca de 96 poços utilizada para a realização do ensaio (Ct – corresponde aos poços de controlo da amostra)

Após a incubação das amostras nos substratos enzimáticos PNS, PNG e PNF, para terminar a reação enzimática, adicionou-se:

4. 25 μ L de cloreto de cálcio em todos os poços da microplaca (controlos incluídos).
5. 100 μ L de tampão Tris pH 12 em todos os poços da microplaca (controlos incluídos).
6. 25 μ L de PNS, PNG ou PNF nos poços de controlo.

De modo a ser possível realizar a leitura das absorvâncias de forma a quantificar o para-nitrofenol produzido em cada reação enzimática, as microplacas foram centrifugadas a 1500g durante cinco minutos e foram transferidos, para uma nova microplaca, 200 μ L do sobrenadante de cada poço. A leitura da absorvância foi realizada num leitor de placas a 405nm.

As curvas de calibração foram preparadas de acordo com a Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Preparação da curva de calibração do para-nitrofenol em microplaca de 96 poços.

[PNP] nmol/ml	0	14	29	72	140	220	290	360
PNP (μ l)	0	5	10	25	50	75	100	125
Água desmineralizada (μ l)	150	145	140	125	100	75	50	25

Para revelar a cor amarela do para-nitrofenol, adicionou-se 25µl de cloreto de cálcio a 0.5M e 100µl de solução tampão Tris pH 12 a 0.1M. Após homogeneização, transferiu-se 200µl de cada poço para outra microplaca e leu-se a absorvância a 405nm.

3.10 Teor de Clorofila e Fv/Fm

A medição do teor de clorofila foi realizada com auxílio de um medidor de clorofila CL-01 Chlorophyll Meter da Hansatech Instruments. Realizaram-se três medições por planta, em folhas diferentes, tendo sido amostradas um total de 24 plantas (uma por ponto de amostragem).

Relativamente às medições da fluorescência das folhas, foram realizadas recorrendo ao equipamento Pocket PEA da Hansatech Instruments. Para realizar a medição colocaram-se as pinças específicas do equipamento nas folhas a analisar, durante cerca de 30 minutos, de forma a que a zona da folha a analisar não estivesse em contacto com a luz. Também foram realizadas três medições por planta, em diferentes folhas, e em 24 videiras (uma por ponto de amostragem).

3.11 Análise Isotópica

Para analisar os isótopos C¹² e C¹³ nas folhas das videiras, foi necessário a realização da moagem das folhas amostradas com azoto líquido. De seguida, pesaram-se até 0,3mg de cada amostra para cápsulas de estanho e estas foram seladas. Após a preparação das amostras de folhas, as cápsulas de estanho (Figura 3.12) foram analisadas no IRMS (*isotope ratio mass spectrometry* - espectrómetro de massa de razões isotópicas) (Figura 3.13).



Figura 3.12 - Fotografia das cápsulas de estanho utilizadas.

Este equipamento permite a medição precisa de pequenas diferenças a nível da abundância de isótopos estáveis, tais como $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. O seu princípio de funcionamento assenta na conversão das amostras em gases, tais como H_2 , CO_2 , N_2 e CO , antes desta entrar em contato com a fonte de iões do equipamento (Kaklamanos *et al.*, 2020).

As cápsulas com as amostras foram colocadas dentro do analisador elementar, onde se deu a sua combustão, a uma temperatura de 1020°C , na presença de oxigénio. Os gases resultantes desta combustão foram oxidados no forno de combustão do equipamento, a 1020°C , na presença de óxido de cromo e de óxido de cobalto. Após este processo, deu-se a remoção do excesso de água, uma vez que esta interfere com a análise do $^{13}\text{CO}_2$. Os gases resultantes deste processo de combustão, mais precisamente o CO_2 , foi varrido por um fluxo de hélio, de modo a se proceder à sua separação numa coluna de cromatografia gasosa. Após estes processos, os gases foram introduzidos no IRMS e obtiveram-se os valores dos isótopos de carbono (Rodrigues *et al.*, 2013).

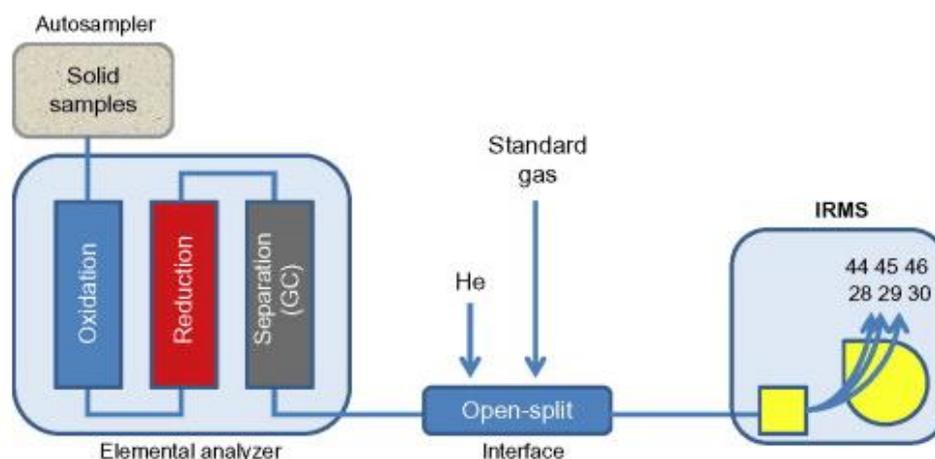


Figura 3.13 - Set-up do EA - IRMS para a medição simultânea dos isótopos de ^{13}C .

Fonte: Rodrigues *et al.*, 2013.

3.12 Análise química de solo, análise da seiva e dados de produção da vinha

Os resultados de algumas análises efetuadas pelo gestor da propriedade (Herdade da Amoreira) foram incluídos no âmbito deste trabalho e são descritos nos capítulos seguintes. É o caso das análises químicas do solo e análises de seiva nas videiras da casta Alicante Bouschet, realizadas pelo laboratório AGQ Labs. Foram ainda fornecidos pelo gestor da propriedade os dados de produção da vinha.

3.13 Análise estatística

A análise estatística dos diferentes parâmetros analisados foi realizada com recurso ao programa IBM SPSS *Statistics*. Foi realizada a correlação de Pearson entre os resultados dos diferentes parâmetros de forma a perceber qual o nível de correlação existente entre estes.

3.14 Programa QGIS

O programa QGIS é um software de livre acesso que permite a criação de mapas com várias camadas usando diferentes projeções. Estes mapas podem ser configurados em diferentes formatos e para diferentes usos, possibilitando a perceção da variabilidade espacial dos diferentes parâmetros numa determinada área, o que torna mais simples a visualização da comparação de diferentes parâmetros.

Os valores obtidos para os diferentes parâmetros foram analisados através da utilização do *software* QGIS 3.22.6, e foram obtidos mapas, onde é possível perceber a distribuição espacial dos diferentes parâmetros estudados.

4. Resultados

A análise dos resultados obtidos foi realizada com recurso ao programa QGIS 3.22.6, através do qual foram obtidos os mapas abaixo (Figuras 4.1 a 4.13).

4.1 Respiração Basal do Solo (RBS)

A RBS apresenta níveis relativamente uniformes ao longo da parcela amostrada, com o valor mais elevado no ponto 13 e o valor mais baixo no ponto 1 (ambos os pontos situados na zona Noroeste da área em estudo), referentes à mesma casta, Alicante Bouschet (Figura 4.1).

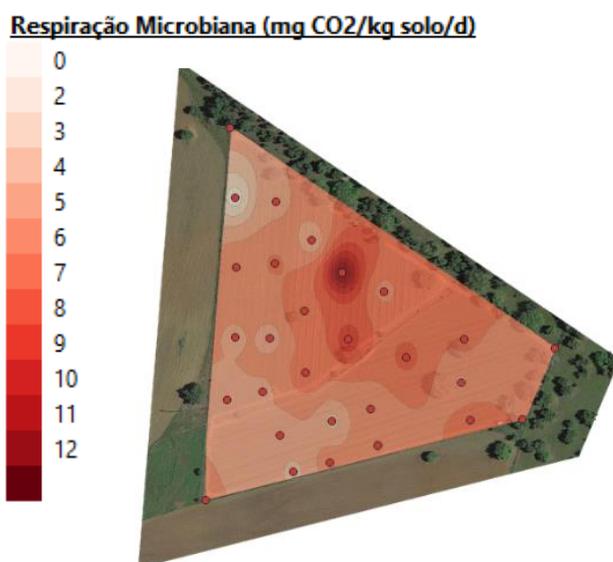


Figura 4.1 - Mapa QGIS da respiração microbiana

4.2 Carbono da Biomassa Microbiana

O C-Mic apresenta valores mais elevados na zona Noroeste da área estudada, onde se encontra a casta Alicante Bouschet, e no ponto 15, com a casta Cabernet Sauvignon. Apresenta valores mais baixos na zona Sul da área estudada, onde está instalada a casta Touriga Nacional. Através do mapa, podemos verificar que alguns dos valores mais elevados encontram-se perto de árvores - pontos 11 e 15 (Figura 4.2).

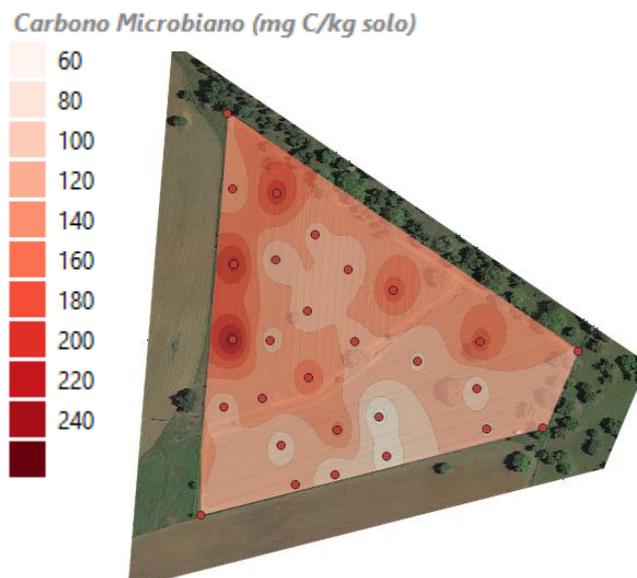


Figura 4.2 - Mapa QGIS do C-Mic

4.3 Atividade Enzimática da Desidrogenase (DHA)

A atividade enzimática da DHA apresenta valores mais elevados na zona Noroeste da parcela, onde está instalada a casta Alicante Bouschet, registando-se apenas um valor mais elevado na área da casta Touriga Nacional (ponto 17). Relativamente aos valores mais baixos, estes encontram-se na zona Este da parcela, onde se encontra a casta Touriga Nacional e Alicante Bouschet (Figura 4.3).

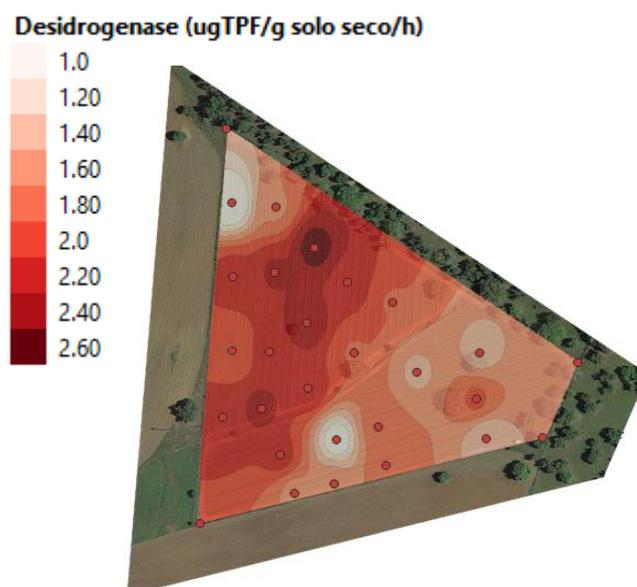


Figura 4.3 - Mapa QGIS da atividade enzimática da desidrogenase

4.4 Atividade Enzimática da Arilsulfatase

A atividade enzimática da arilsulfatase apresenta uma distribuição espacial bastante uniforme ao longo da parcela, com um valor mais elevado no ponto 2 e um valor mais baixo no ponto 4 (zona Noroeste da área em estudo), encontrando-se, em ambos os pontos, a casta Alicante Bouschet (Figura 4.4).

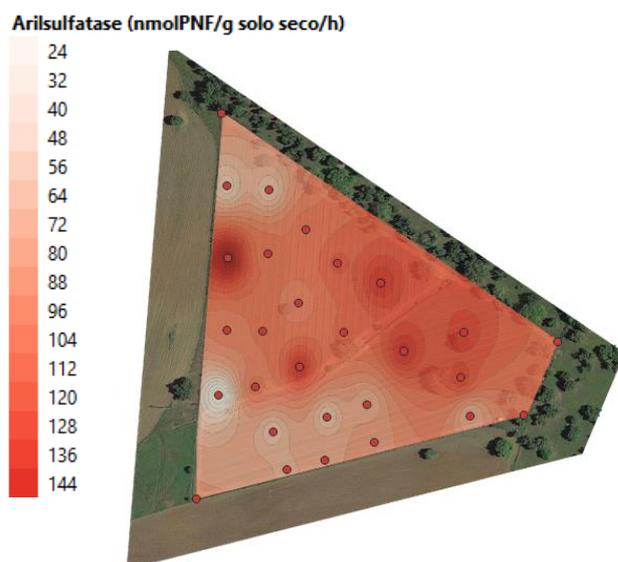


Figura 4.4 - Mapa QGIS da atividade enzimática da enzima arilsulfatase

4.5 Atividade enzimática da β -glucosidase

A atividade da enzima β – glucosidase apresenta valores baixos para a generalidade da parcela amostrada, com exceção de uma pequena área com valores mais elevados, na zona Norte da parcela amostrada, incluindo pontos com a casta Alicante Bouschet e Cabernet Sauvignon (Figura 4.5).

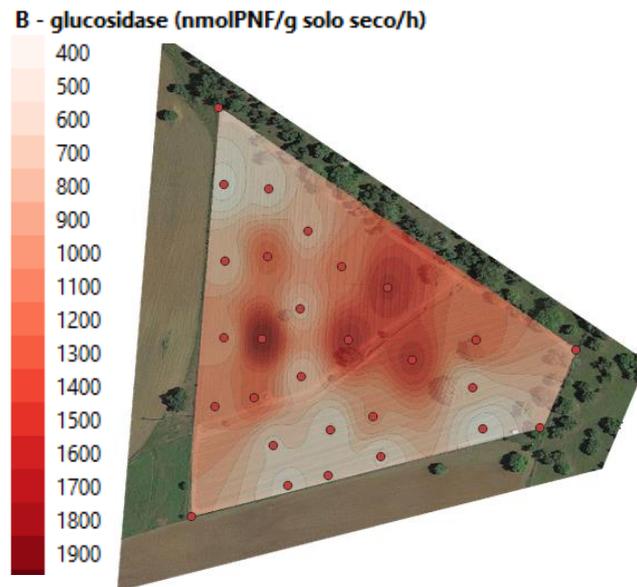


Figura 4.5 - Mapa QGIS da atividade enzimática da β -glucosidase

4.6 Atividade enzimática da Fosfatase

A atividade da enzima fosfatase apresenta, em geral, valores elevados ao longo da área em estudo, com exceção de alguns pontos na zona Noroeste da parcela (pontos 1, 8, 10 e 11, localizados na área da casta Alicante Bouschet) e de alguns pontos na zona Sul (pontos 18, 21 e 23, localizados na área da casta Touriga Nacional) (Figura 4.6).

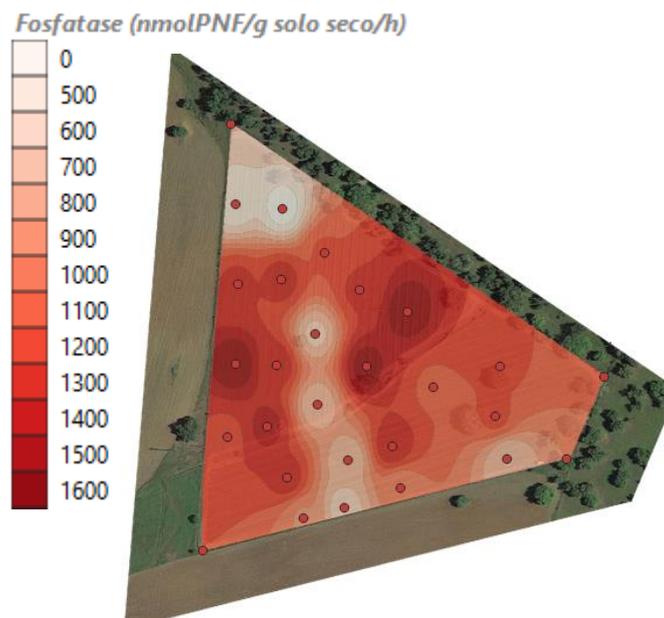


Figura 4.6 - Mapa QGIS da atividade enzimática da enzima fosfatase

4.7 Quantificação de bactérias culturáveis

A quantificação de bactérias culturáveis apresenta uma distribuição de valores relativamente heterogénea: valores mais baixos na zona Norte da área em estudo onde se encontram as castas Cabernet Sauvignon e Alicante Bouschet, com exceção dos pontos 13 e 14, que apresentam valores mais elevados; valores intermédios na região correspondente à casta Touriga Nacional (Figura 4.7).

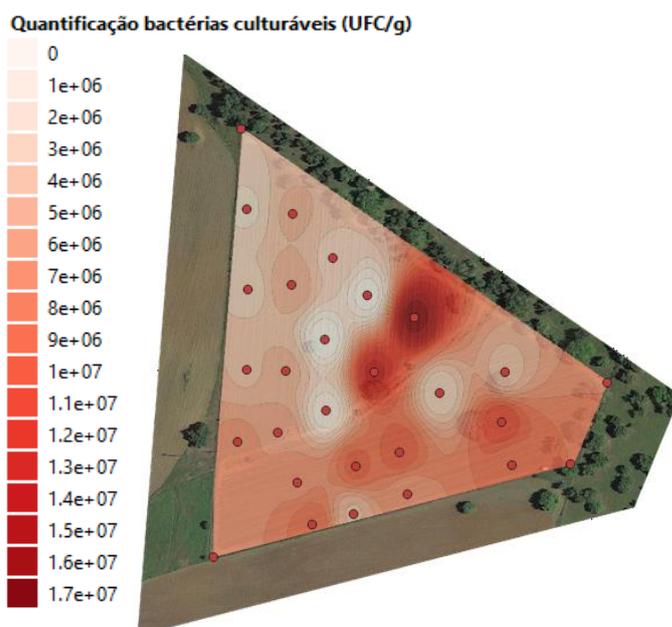


Figura 4.7 - Mapa QGIS da quantificação de bactérias culturáveis

4.8 Quantificação de fungos culturáveis

Este parâmetro quantificação de fungos culturáveis apresenta valores uniformemente baixos ao longo da parcela, com exceção dos pontos 2 e 10 (zona Noroeste da área em estudo), na área onde se encontra a casta Alicante Bouschet (Figura 4.8).

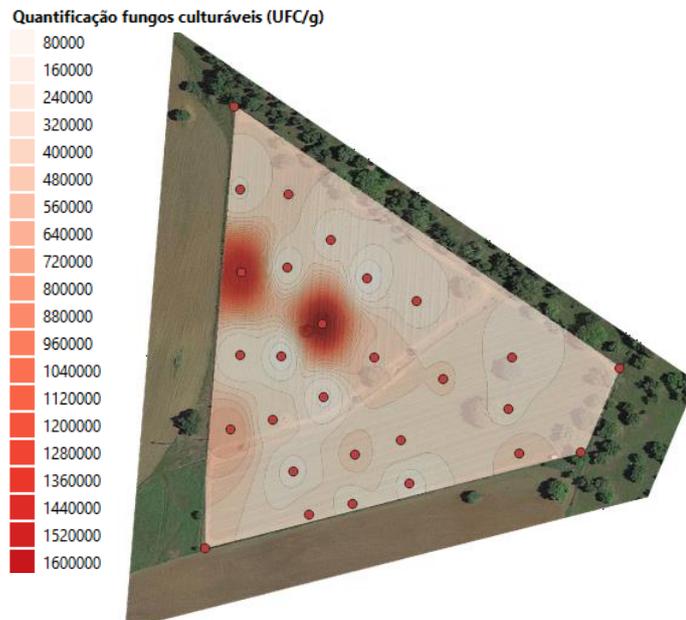


Figura 4.8 - Mapa QGIS da quantificação de fungos culturáveis

4.9 Taxa de Colonização Micorrízica Arbuscular

A distribuição da taxa de colonização micorrízica arbuscular não ocorre de forma uniforme na área amostrada: apresenta zonas com valores máximos (zonas Noroeste e Sudeste), onde se encontram instaladas as castas Alicante Bouschet e Touriga Nacional, respetivamente, e apresenta uma zona com atividade mais baixa (zona central da parcela) (Figura 4.9).

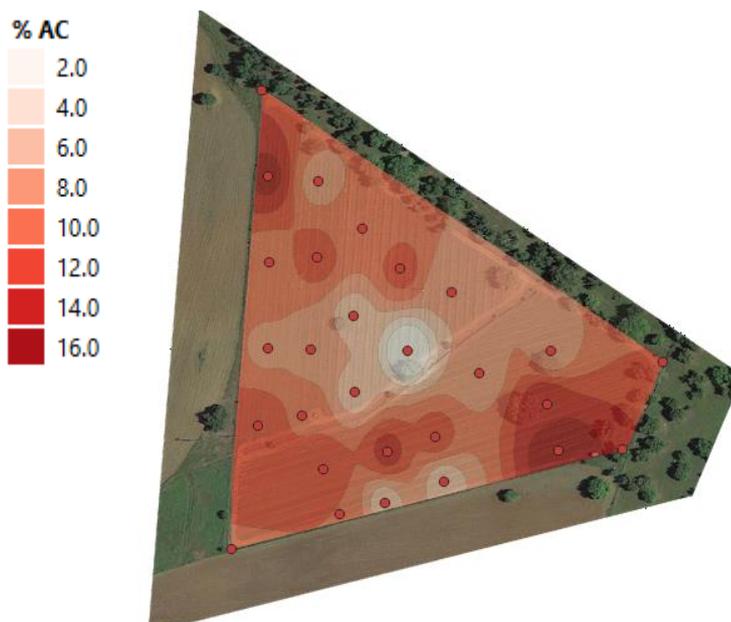


Figura 4.9 - Mapa QGIS da taxa de colonização micorrízica arbuscular (AC)

4.10 Teor de Clorofila

O teor de clorofila apresenta valores uniformemente baixos ao longo da parcela, com exceção dos pontos 3, 5 a 7, 9 a 11 (zonas Noroeste da área em estudo), onde se encontra a casta Alicante Bouschet e do ponto 18 (zona Sudoeste) onde está instalada a casta Touriga Nacional (Figura 4.10).

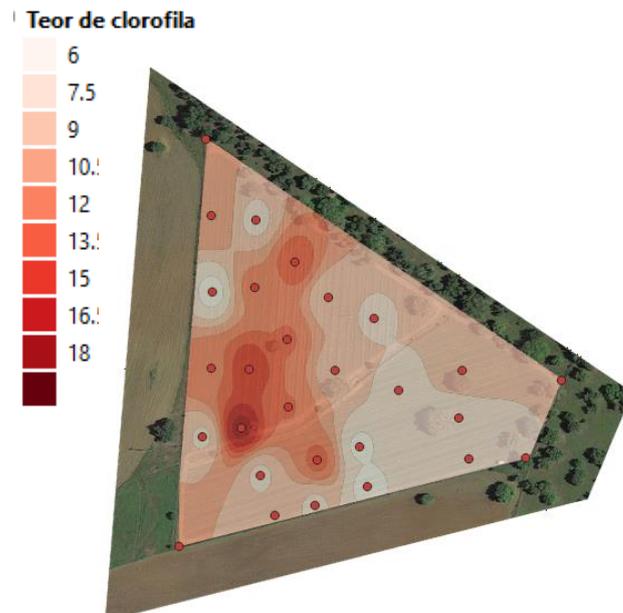


Figura 4.10 - Mapa QGIS do teor de clorofila ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) das folhas das videiras

4.11 Razão entre a Fluorescência variável e a Fluorescência máxima (F_v/F_m)

Ao longo da parcela, a razão F_v/F_m apresenta valores uniformemente elevados, com exceção dos pontos 7 e 10 (zona Noroeste da área em estudo), do ponto 14 (zona Nordeste) e dos pontos 20 e 23 (zonas Sudeste e Sudoeste, respetivamente), que correspondem a diferentes castas (Alicante Bouschet e Touriga Nacional) (Figura 4.11).

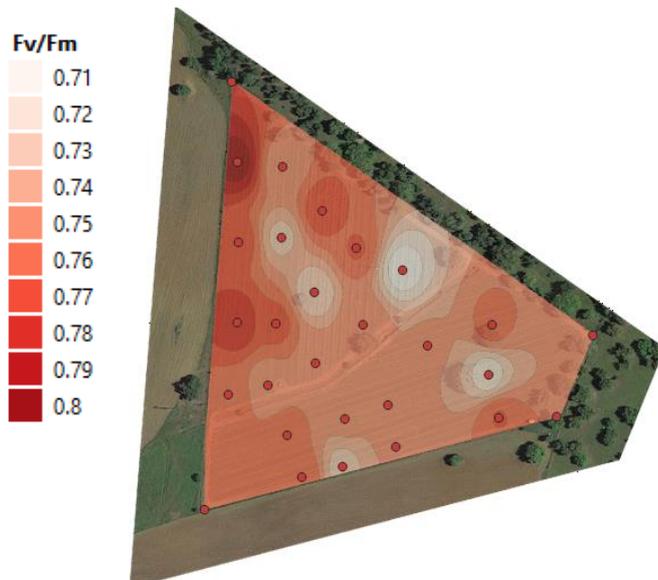


Figura 4.11 - Mapa QGIS da razão entre a fluorescência variável e máxima

4.12 Isótopos de Carbono

A avaliação dos isótopos de carbono apresenta valores uniformemente elevados ao longo da parcela amostrada, com exceção do ponto 24 (zona Sudoeste da área em estudo) que apresenta o valor mínimo observado (Figura 4.12).

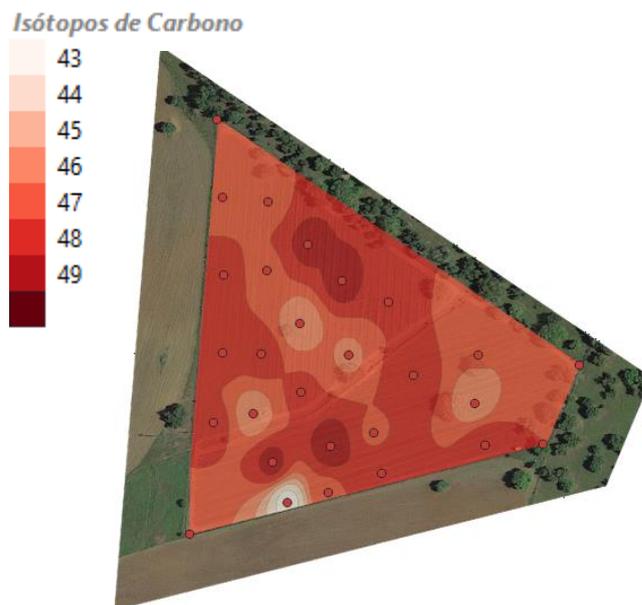


Figura 4.12 - Mapa QGIS da análise de isótopos de carbono (‰)

4.13 Produção da Vinha (kg/ha)

A produção de uva (kg/ha) foi superior na zona Norte da área estudada, com valores entre os 400 e 1600kg/hectare, onde se encontra instalada a casta Alicante Bouschet. A zona Sul apresentou uma produção mais baixa, zona esta onde estão inseridas as castas Touriga Nacional (zona Sul) e Cabernet Sauvignon (zona Sudeste), com valores entre 0 a 200kg/hectare. Apesar do aparente efeito casta nos valores de produção, é de referir que dentro da área onde se encontra a casta Alicante Bouschet regista-se a existência de vários pontos com níveis bastante baixos de produção (Figura 4.13).

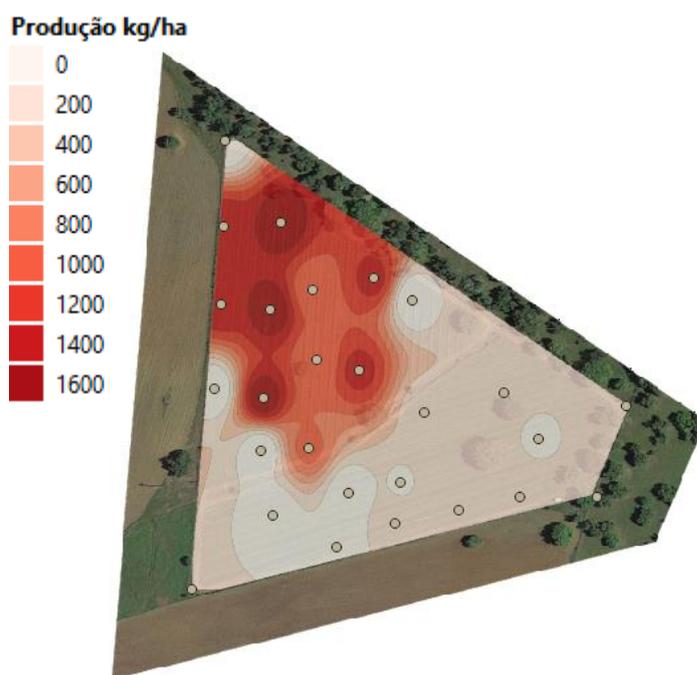


Figura 4.13 - Mapa QGIS da produção da vinha no ano de 2020, em kg/ha

4.14 Análises químicas do solo

Em janeiro de 2019 foram realizadas análises químicas ao solo da área amostrada e os resultados fornecidos pelo gestor da propriedade (Tabelas 4.1 e 4.2).

Tabela 4.1 - Análise ao solo, correspondente aos pontos 4, 5, 6, 13, 17 e 24.

Parâmetro	Resultado	Estado*
Azoto Dumas (mg/kg)	436	Muito baixo - Baixo
Fósforo (mg/kg)	< 9,80	Muito baixo - Baixo
pH	7,29	Normal
Matéria Orgânica (%)	0,70	Muito baixo - Baixo
Calcário Ativo (% CaCO ₃)	0,750	Muito baixo - Baixo
Potássio Assimilável (mg/kg)	< 10,0	-

* De acordo com os critérios do laboratório onde a análise foi efetuada.

Tabela 4.2 - Análise ao solo, correspondente aos pontos 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22 e 23

Parâmetro	Resultado	Estado*
Azoto Dumas (mg/kg)	492	Muito baixo - Baixo
Fósforo (mg/kg)	< 9,80	Muito baixo - Baixo
pH	6,73	Normal
Matéria Orgânica (%)	0,78	Muito baixo - Baixo
Calcário Ativo (% CaCO ₃)	< 0,500	Muito baixo - Baixo
Potássio Assimilável (mg/kg)	< 10,0	-

* De acordo com os critérios do laboratório onde a análise foi efetuada.

De acordo com os resultados de ambas as análises ao solo (Tabela 7 e 8), podemos verificar que os valores obtidos para os vários parâmetros não diferem grandemente entre si, sendo que o único parâmetro que apresenta um valor considerado normal no solo analisado é o pH (todos os outros valores são considerados muito baixo - baixo).

4.15 Análises à seiva

Em julho 2020, foram realizadas análises de seiva nas videiras da casta Alicante Bouschet por um laboratório externo (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Análises de seiva realizadas na casta Alicante Bouschet

Parâmetro	Resultado	Estado
Açúcares totais (%)		
- Folhas recentes	1.3	Baixo
- Folhas antigas	2.3	Normal
pH		
- Folhas recentes	3.1	Baixo – aceitável
- Folhas antigas	3.7	Normal
Eletrocondutividade (mS/cm)		
- Folhas recentes	6.5	Normal
- Folhas antigas	7.3	Normal
Azoto total (ppm)		
- Folhas recentes	387	Normal
- Folhas antigas	253	Baixo
Enxofre (ppm)		
- Folhas recentes	211	Normal
- Folhas antigas	322	Normal
Fósforo (ppm)		
- Folhas recentes	477	Normal
- Folhas antigas	215	Baixo

* De acordo com os critérios do laboratório onde a análise foi efetuada.

Relativamente aos resultados das análises de seiva, as folhas recentes apresentam valores considerados baixos no que toca aos açúcares totais e no pH, sendo que os outros parâmetros apresentam valores normais. Quanto às folhas mais antigas, apenas apresentam valores considerados baixos no fósforo, os restantes parâmetros estão normais.

4.16 Análise Estatística

A correlação utilizada na análise estatística foi a correlação de Pearson. As correlações mais significativas encontram-se assinaladas a negrito na Tabela 4.4. A correlação entre as variáveis é elevada para valores iguais ou superiores a 0.5, é moderada se os valores se encontrarem dentro do intervalo 0.49 a 0.3 e é baixa para valores inferiores a 0.3.

Pode-se observar que existem diversos parâmetros que estão correlacionados de forma positiva (RBS – Arilsulfatase; DHA – β -glucosidase e fosfatase; Arilsulfatase - β -glucosidase), sendo a correlação positiva mais forte entre as enzimas β -glucosidase e fosfatase (0.69), sendo que outros parâmetros se correlacionam de forma negativa,

sendo que a correlação negativa mais forte foi observada entre a β -glucosidase e a taxa de colonização micorrízica (-0.46).

Tabela 4.4 - Valores de correlação de Pearson para os parâmetros analisados. As correlações mais significativas encontram-se assinaladas a negrito

	C-Mic	RBS	DHA	Arilsulf	B-gluco	Fosfat	%AC	Bactérias	Fungos
C-Mic	1								
RBS	-0.10	1							
DHA	-0.02	0.32	1						
Arilsulf	0.33	0.43	0.31	1					
β -gluco	0.08	0.37	0.43	0.42	1				
Fosfat	0.08	0.24	0.46	0.37	0.69	1			
% AC	-0.15	-0.35	-0.25	-0.37	-0.46	-0.16	1		
Bact	0.12	-0.17	-0.23	-0.10	0.17	0.37	0.02	1	
Fungos	0.18	0.05	0.20	0.15	-0.12	-0.15	-0.14	-0.25	1

(Legenda: Arilsulf – arilsulfatase; β -gluco - β – glucosidase; Fosfat – fosfatase; %AC – percentagem de colonização micorrízica arbuscular; Bact – bactérias)

5. Discussão

5.1 Atividade microbiana geral – RBS, C-Mic e atividade enzimática da DHA.

A atividade microbiana geral do solo pode ser refletida por parâmetros tais como a RBS, o C-Mic ou a DHA. Trata-se de parâmetros associados a atividade de todas as células microbianas vivas e que estão a contribuir para os processos biológicos que ocorrem no solo, tratando-se desta forma de potenciais indicadores da sua qualidade.

A atividade microbiana do solo é fortemente influenciada pela presença das raízes das plantas. A rizosfera, que consiste na zona biologicamente ativa do solo em redor das raízes das plantas, na qual se dão interações entre microrganismos, plantas e o solo, é uma zona de intensa atividade microbiana, uma vez que os exsudados, lisados e mucilagens presentes nesta zona constituem uma fonte de carbono e de outros nutrientes para os microrganismos, favorecendo inclusivamente o estabelecimento de relações simbióticas entre estes e as plantas (Singh et al., 2004; Peña et al., 2005; Silveira & Freitas, 2007). As próprias raízes, quando morrem, constituem uma fonte de carbono para os microrganismos heterotróficos do solo, estimulando também por essa via o desenvolvimento microbiano – rizodeposição.

Considerando o C-Mic como diretamente proporcional à biomassa microbiana, este parâmetro é usado como um bom indicador da dimensão população microbiana presente num dado local (Ren et al., 2017), assim como permite perspetivar a sua atividade, uma vez que constitui um marcador ecológico pela forma rápida como reage a alterações nas condições ambientais do meio (Alef & Nannipieri, 1995). Por sua vez a biomassa microbiana é também ela própria uma fonte de carbono, azoto, fósforo e enxofre e outros elementos para os distintos microrganismos do solo (*microbial loop*) (Brookes, 2001).

O facto de a vinha apresentar enrelvamento na entrelinha faz com que haja uma distribuição de raízes relativamente homogénea em toda a área estudada o que permite uma distribuição também relativamente homogénea da atividade microbiana geral ao longo da área amostrada, como se verifica pelas Figuras 4.1 (RBS) e 4.2 (C-Mic). Note-se que a análise espacial do C-Mic e da RBS, mostra que para ambos os parâmetros, os valores máximos encontram-se maioritariamente na zona Norte da parcela e os valores mais baixos encontram-se na zona Sul.

Um outro parâmetro que reflete a atividade microbiana geral do solo é a atividade da enzima desidrogenase, uma vez que esta enzima desempenha um papel significativo na oxidação biológica da matéria orgânica do solo e a sua atividade pode ser assumida como proporcional à biomassa dos microrganismos no solo (von Mersi & Sehinner, 1991). A Figura 4.3 ilustra a distribuição da atividade desta enzima e pode notar-se uma maior heterogeneidade dentro da área amostrada do que a observada para a RBS ou

C-Mic. A DHA é extremamente sensível e fatores tais como o teor de água no solo, a disponibilidade de matéria orgânica, o potencial de oxidação-redução, a contaminação com metais pesados ou fertilizantes e pesticidas podem afetar de forma significativa a sua atividade (Wolińska & Stępniewska, 2019), pelo que é expectável uma maior variação deste parâmetro na área estudada. Contudo, os valores observados para a desidrogenase corroboram a tendência já observada para a RBS ou C-Mic, de uma maior atividade microbiana na zona Norte da propriedade.

Uma vez que a RBS depende da biomassa microbiana (proporcional ao C-Mic) e está diretamente ligada com a sua atividade enzimática, é possível relacionar estes três parâmetros (Frankenberger & Dick, 1983). Através da análise dos mapas das Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, podemos verificar que: a RBS, apesar de apresentar uma distribuição relativamente uniforme na área em estudo, possui um valor máximo no ponto 13. Esta zona coincide com os maiores valores de DHA observados; o ponto 2 é um ponto máximo comum na entre o C-Mic e a DHA, indicando que na zona adjacente a este ponto, existem condições para uma intensa atividade microbiana; tanto a RBS como a DHA apresentam um mínimo em comum, correspondente ao ponto 1, indicando uma baixa atividade microbiana neste ponto.

Curiosamente as zonas de maior disponibilidade de matéria orgânica e pH mais próximo do seu ótimo de funcionamento (6.5 a 6.7) (Tabela 4.2) não parecem coincidir com as zonas de maior DHA. Atendendo à sensibilidade desta enzima, existirão certamente outros fatores que estão a condicionar de forma mais marcante a sua atividade, como por exemplo o teor de humidade do solo à data da amostragem ou o estado de arejamento do solo, uma vez que estes fatores condicionam o potencial de oxidação-redução e a taxa de difusão de O₂ (Wolinska & Stepniewsk, 2012).

5.2 Quantificação de bactérias e fungos culturáveis

A quantificação de bactérias e fungos culturáveis fornece informação relativa à fração viva do solo capaz de crescer nos meios de cultura generalistas utilizados (agar nutritivo e *potato dextrose agar*).

Existem vários fatores que influenciam a presença e o desenvolvimento dos microrganismos no solo. Tanto bactérias como fungos são influenciados pela temperatura e humidade do solo, a capacidade de armazenamento de água e a possibilidade de trocas gasosas, a disponibilidade de matéria orgânica ou presença de microhabitats com condições favoráveis ao seu desenvolvimento, entre outros (Fraga *et al.*, 2012).

A quantificação das bactérias culturáveis apresenta uma distribuição irregular na área em estudo (Figura 4.7): valores mais baixos na zona Noroeste da parcela e valores intermédios uniformes nas restantes zonas, com exceção da zona Nordeste com dois pontos mais elevados. Estes dois pontos encontram-se na proximidade de árvores e de um curso de água, fazendo com se dê uma diminuição da temperatura do solo e um aumento da humidade deste, favorecendo o desenvolvimento microbiano nestes dois pontos, ainda que existam outros pontos próximos de árvores e da zona de água que apresentam valores intermédios e baixos. As amostras foram recolhidas em julho de 2020, um mês com temperaturas elevadas (máximas próximas de 40°C) e baixa disponibilidade hídrica. Tendo em consideração que a temperatura ótima de crescimento para as bactérias ronda os 30°C e necessitam sempre de alguma disponibilidade hídrica, a população microbiana da parte mais superficial do solo apresentou valores mais baixos do que os observados nos locais em que estas condições foram amenizadas pela presença de sombra e da linha de água.

Exatamente nos pontos em que o número de bactérias culturáveis foi superior (pontos 12 e 14) foi também registada maior atividade da fosfatase e da β -glucosidase. Também os valores de atividade da arilsulfatase são mais elevados nesta região. Assim, é provável que uma parte das bactérias que habitam na zona dos pontos com valores mais elevados sejam bactérias solubilizadoras de fósforo e de enxofre, contribuindo para a disponibilidade destes dois nutrientes no solo.

A quantificação de fungos culturáveis apresenta uma distribuição uniformemente baixa (Figura 4.8), ao longo da zona estudada, com exceção de dois pontos máximos na zona Noroeste, que ocorrem de forma muito isolada e muito provavelmente decorrem de uma situação pontual. Um destes dois pontos, o ponto 10, corresponde ao valor mínimo no mapa da quantificação de bactérias (Figura 4.7); isto poderá indicar a proliferação de fungos, na zona deste ponto, com propriedades inibitórias do desenvolvimento bacteriano. Tanto as bactérias como os fungos culturáveis reagem de forma diferente a diferentes práticas agrícolas. A população de fungos, por norma, aumenta a uma taxa superior à das bactérias (cerca de 1.0 a 2.3) (Bailey *et al.*, 2002), para além disso em situações de não mobilização do solo, como é o caso, a população de fungos deveria ser favorecida. O facto de a contagem de fungos culturáveis apresentar uma distribuição uniformemente baixa e inferior à de bactérias é relativamente surpreendente e pode dever-se ao facto da contagem efetuada recair apenas nos fungos culturáveis no meio de cultura usado (PDA) e estes representarem apenas uma pequena parte de população total.

Tal como para as bactérias, também os fungos se encontravam fora das suas condições mais favoráveis de crescimento à data de amostragem. As condições ideais

de desenvolvimento de fungos são temperaturas amenas (21°C - 28°C) e teores de humidade relativamente elevados. Muito provavelmente a maior parte da população destes organismos encontrava-se à data da amostragem na forma de esporos, pelo que a sua quantificação *in vitro* pode ter subestimado a população, embora não a sua distribuição pela área em estudo. A quantificação de bactérias e fungos culturáveis (Figuras 4.7 e 4.8) está diretamente ligada aos parâmetros gerais de atividade microbiana: RBS, C-Mic e DHA (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3). Através da análise dos mapas destes parâmetros, podemos verificar que embora não haja uma coincidência exata dos pontos amostrados, verifica-se que a concentração de bactérias e fungos culturáveis se encontra associada a zonas com atividade respiratória também elevada. A quantificação de bactérias apresenta uma distribuição mais irregular ao longo da parcela do que os fungos culturáveis, que apresentam uma distribuição bastante homogénea, apenas com dois picos bem evidentes. O perfil encontrado para a distribuição da RBS é mais coincidente com a distribuição de bactérias culturáveis do que o dos fungos, pelo que se pode suspeitar de que a atividade bacteriana foi mais influente neste parâmetro.

A distribuição de valores associados à DHA e do C-Mic corroboram estes resultados, verificando-se que também estes indicadores gerais da atividade microbiana do solo apresentam valores mais elevados em zonas em comum com as bactérias culturáveis, como é o caso dos picos das bactérias na zona nordeste e o caso da zona sul, com valores intermédios uniformes.

Tendo em consideração que C-Mic está ligado à fração viva da matéria orgânica do solo constituída por microrganismos e o interesse em estimar este parâmetro está relacionado com a sua função de reservatório de nutrientes com o posterior fornecimento destes às plantas e na sua capacidade de desempenhar funções de marcador ecológico, é possível relacionar a biomassa microbiana com a quantificação de bactérias e de fungos culturáveis. Um dos pontos máximos de C-Mic, situado na zona Noroeste, também está presente no mapa da quantificação de fungos culturáveis (ponto 2), enquanto que no mapa da quantificação de bactérias culturáveis corresponde a um ponto mínimo. Isto poderá querer dizer que, naquele ponto, a população de fungos integra a biomassa microbiana em maior quantidade do que a população bacteriana;

No mapa da quantificação de bactérias culturáveis, a zona Nordeste apresenta dois valores máximos (pontos 12 e 14). No mapa do C-Mic, esta zona corresponde a uma zona com valores elevados também, enquanto que no mapa da quantificação de fungos culturáveis corresponde a uma zona de valores baixos. Ou seja, é provável que, nesta zona, as bactérias contribuam, na maior parte, para a biomassa microbiana. A zona Noroeste, que corresponde a um valor intermédio no mapa da C-Mic, corresponde a uma zona de valores mais baixos no mapa da quantificação de bactérias e

corresponde a um ponto máximo no mapa da quantificação de fungos culturáveis. Isto poderá querer dizer que, nesta zona, grande parte da população de microrganismos poderá ser composta por fungos.

5.3 Enzimas relacionadas com os ciclos do carbono, fósforo e enxofre

A enzima β -glucosidase está relacionada com o ciclo do carbono, através da degradação de compostos glicosídeos em glucose, sendo de extrema importância uma vez que da sua atividade resulta a produção de açúcares que irão ser utilizados pelos microrganismos do solo como fonte de carbono e energia para o seu metabolismo, que, por sua vez, têm como função a degradação de compostos que irão ser posteriormente absorvidos e utilizados no metabolismo das plantas. A sua atividade pode ser afetada por diversos fatores. Dentro do intervalo de pH entre 4.5 e 8.5, à medida que o pH do solo aumenta, a atividade desta enzima diminui, podendo, deste modo, ser utilizada como indicador bioquímico de acidificação dos solos. A humidade a nível do solo pode influenciar os processos de transformação de carbono catalisados pela β – glucosidase, sendo que a sua atividade pode decrescer se a humidade do solo diminuir. A influência da escassez de água no solo na atividade desta enzima, origina um *turnover* de nutrientes mais lento e uma redução no fornecimento de nutrientes às plantas. A salinidade ou contaminação por metais pesados também fazem diminuir a sua atividade (Adetunji *et al.*, 2017).

Na Figura 4.5 é possível verificar zonas contrastantes relativamente à atividade da enzima em questão. A zona de maior atividade situa-se na região central da vinha e nos topos Norte e Sul a atividade é francamente mais baixa. Os pontos com valores mais elevados encontram-se na proximidade de árvores e/ou do curso de água da parcela, tendo estas zonas um teor de humidade do solo superior e uma menor temperatura devido ao ensombramento das árvores.

Através da análise dos mapas da β - glucosidase e da quantificação de bactérias culturáveis (Figuras 4.5 e 4.7, respetivamente), verifica-se que existem algumas zonas com valores elevados em comum – zona Noroeste e zona Sudeste da parcela – e zonas com valores mais baixos – zona Norte. Na zona Nordeste da parcela estudada existe uma forte atividade desta enzima, muito possivelmente devido à proximidade com árvores, resultando numa maior humidade do solo e numa maior disponibilidade de biomassa vegetal devida à folhada, cuja celulose pode ser degradada pela enzima, resultando na produção de compostos açucarados e na sua utilização pelos microrganismos do solo. Para além disto, o pH do solo destes pontos é favorável para o funcionamento desta enzima.

A enzima fosfatase está relacionada com o ciclo do fósforo, pelo que indica que nos pontos com valores de atividade enzimática da fosfatase mais baixos – uma linha com a direção Norte/ Sul que atravessa a propriedade a meio - deverá existir uma menor disponibilidade deste nutriente para as plantas, contrariamente à restante área amostrada. Juntamente com a informação contida nas análises do solo fornecidas pelo produtor, realizadas em 2019, os pontos com níveis de fósforo mais baixos poderão ter apresentado uma melhoria; no entanto, em 2020, outros pontos apresentaram baixos níveis deste nutriente no solo, ou seja, uma baixa disponibilidade de fósforo para as plantas. É importante referir que as análises de solo de 2019 indicam que os níveis de fósforo estão baixos (Tabelas 4.1 e 4.2). Apesar disto, as análises de seiva às videiras da zona Norte da parcela em 2020 (Tabela 4.3) indicam que os níveis deste nutriente estão aceitáveis, com exceção de um valor das folhas antigas (215 ppm), tendo-se verificado um aumento de mais do dobro do fósforo nas folhas mais jovens, sendo assim verificado uma melhoria nesta área da vinha.

A atividade da fosfatase pode ser influenciada por diversos fatores: pelo pH dos solos, uma vez que à medida que o pH aumenta, a atividade desta também aumenta; pela seca, sendo que em solos em que se verifique uma diminuição de humidade também se verifica uma redução da atividade da fosfatase e pela presença de metais pesados, que também diminuem a atividade desta enzima (Adetunji *et al.*, 2017). Assim, uma vez que a distribuição desta enzima é maioritariamente elevada ao longo da parcela, é possível que zonas com valores mais baixos estejam relacionadas com uma menor disponibilidade hídrica e com um pH do solo mais baixo, tal como indicado pelas análises químicas do solo (Tabela 4.1 e 4.2).

Importa salientar que existe uma sobreposição entre atividade de β -glucosidase e da fosfatase, como é possível verificar pelas Figuras 4.5 e 4.6 e como atesta o forte coeficiente de correlação apresentado na Tabela 4.4 (0.69). Assim, existindo uma limitação no carbono disponível no solo para a atividade microbiana, as bactérias solubilizadoras de fósforo terão, também, a sua atividade reduzida e, conseqüentemente, observando-se uma menor atividade da fosfatase. É possível verificar que a zona de valores mais baixos nas enzimas β -glucosidase e fosfatase (eixo norte/sul a meio da parcela) é também uma zona coincidente com os mapas do C-Mic e das bactérias culturáveis (Figuras 4.2 e 4.7, respetivamente). Deste modo, podemos aferir que a disponibilidade de carbono poderá influenciar a atividade das bactérias solubilizadoras de fósforo e, conseqüentemente, a atividade microbiana a nível do solo.

Para além da atividade da fosfatase ser bastante coincidente com a atividade da β -glucosidase, apresenta também alguns valores elevados em comum com a DHA (Figura 4.3). Uma vez que a DHA fornece informações relativamente à atividade

microbiana geral, é provável que parte da população microbiana presente na zona desses pontos esteja ligada ao ciclo do fósforo. Para além de valores elevados em comum com a DHA, ambas as enzimas apresentam duas zonas com valores elevados também em comum com as bactérias (Figura 4.7), corroborando a afirmação de que, nessas zonas, uma parte da população microbiana poderá estar ligada ao ciclo do fósforo.

A enzima arilsulfatase está envolvida no ciclo de enxofre, hidrolisando um vasto número de compostos em sulfatos, de forma que as plantas os consigam assimilar. É possível verificar que na parcela amostrada a disponibilidade de enxofre para as plantas é relativamente uniforme atendendo à atividade desta enzima. É ainda importante realçar que, apesar de existirem valores uniformes, os valores na zona Sul da parcela são um pouco mais baixos e na zona Este são mais elevados.

Através da análise da seiva da casta Alicante Bouschet – zona Norte da parcela - (Tabela 4.3), podemos verificar que os valores de enxofre na seiva se encontram aceitáveis, tanto nas folhas mais antigas como nas mais recentes, ou seja, que a absorção de enxofre foi, realmente, uniforme na casta Alicante Bouschet, estabelecida na zona Norte da parcela.

A atividade da arilsulfatase apresenta uma correlação positiva com a β -glucosidase (0,42) e com a fosfatase (0,37) assim como com a RBS (0,43) (Tabela 4.4). Assim, tanto a β -glucosidase como a fosfatase como a RBS, quando a atividade da arilsulfatase aumenta, então a atividade destes três parâmetros vai também aumentar, sendo possível verificar isto através da comparação das Figuras 4.1, 4.4, 4.5 e 4.6, onde se nota zonas elevadas e zonas baixas em comum.

Relativamente ao C-Mic e à atividade das várias enzimas, é possível identificar várias zonas da propriedade onde os valores observados são sobreponíveis em termos de tendência: o ponto 2 (zona Noroeste) apresenta um máximo para o C-Mic, sendo também elevada a DHA, arilsulfatase e fosfatase, o que pode significar que uma porção da população microbiana poderá estar relacionada com os ciclos do enxofre e do fósforo, existindo uma elevada disponibilidade destes nutrientes naquela zona. A zona do ponto 3 é outro máximo no C-Mic, sendo também elevado na DHA e fosfatase. Isto pode querer dizer que nesta zona, uma grande porção da população microbiana esteja relacionada com o ciclo do fósforo, provavelmente existindo uma maior disponibilidade deste nutriente na zona deste ponto. O C-Mic apresenta valores mais baixos na zona Sul da propriedade, zona esta também coincidente com menor atividade β -glucosidase. Esta zona corresponde a uma zona intermédia relativamente aos valores das bactérias culturáveis, é possível não exista uma grande disponibilidade de açúcares para a flora

microbiana nem uma grande disponibilidade de fósforo para as plantas na zona Sul da parcela.

Tendo em consideração as análises ao solo realizadas no ano anterior a este estudo, em 2019 (Tabelas 4.1 e 4.2), podemos verificar que os níveis de fósforo do solo da zona correspondente a este ponto se encontravam baixos. Posto isto, é possível que, do ano 2019 para o ano 2020, se tenha verificado um aumento no teor de fósforo do solo amostrado.

Relativamente às análises de seiva (Tabela 4.3), realizadas no ano da amostragem (2020), podemos verificar que os níveis de enxofre estavam normais, ou seja, que a planta conseguiu assimilar enxofre em quantidade suficiente, através do solo. Assim sendo, é provável que uma parte da população microbiana poderá estar relacionada com o ciclo do enxofre, com uma elevada disponibilidade deste nutriente, na zona do ponto 2 (zona noroeste).

5.4 Taxa de colonização micorrízica arbuscular

As micorrizas arbusculares consistem numa simbiose mutualista entre os fungos micorrízicos arbusculares e as raízes das plantas. Esta associação permite aumentar o volume de solo explorado pela planta e desta forma aumentar também a absorção de nutrientes e de água por parte da planta hospedeira. O fungo recebe da planta compostos orgânicos essenciais para o seu metabolismo (White, 2015). Estes fungos têm ainda a capacidade de aumentar a resistência das plantas a stresses bióticos e abióticos, aumentando a sua resiliência e resistência condições adversas.

Como a vinha possui enrelvamento na entrelinha, grande parte das raízes analisadas pertenciam às plantas da entrelinha. Esta análise permite aferir a presença desta simbiose, uma vez que se está presente nas plantas da entrelinha, também está presente nas plantas da linha, via micélio extrarradicular (MER): este, para além de absorver água e nutrientes do solo, tem a capacidade colonizar as raízes das plantas adjacentes. Assim sendo, a taxa de colonização micorrízica da entrelinha, é, desta forma, um bom indicador da taxa de colonização micorrízica das plantas da linha. É importante referir que não foi realizada a análise da taxa de colonização micorrízica das plantas da linha (ou seja, nas videiras) por dificuldade de acesso e por não ser possível realizar a amostragem sem danificar o sistema radicular destas.

A distribuição da taxa micorrízica arbuscular, ao longo da área amostrada, não é uniforme. As Norte e Sudeste correspondem às zonas dos pontos onde se verifica a taxa de colonização micorrízica mais elevada. As zonas com valores mínimos – zonas

mais claras na Figura 4.9 - correspondem às zonas em que as plantas poderão ter uma menor capacidade de resistência a fatores adversos e uma menor resiliência.

Apesar de a maioria das plantas ter a capacidade de formar este tipo de relações simbióticas, algumas plantas presentes na vegetação espontânea são pouco ou nada micotróficas. Desta forma, é provável que na zona central da propriedade, onde a taxa de colonização micorrízica é mais baixa, sejam mais abundantes plantas deste tipo. Relativamente à análise estatística, a taxa de colonização micorrízica apresenta uma correlação negativa com a β -glucosidase (-0,46) – com o aumento da enzima, a taxa de colonização micorrízica diminui e vice-versa, como é possível verificar pelas Figuras 4.5 e 4.9.

5.5 Parâmetros foliares – teor de clorofila, razão entre a fluorescência variável e máxima e isótopos de carbono

A disponibilidade de determinados macronutrientes (azoto, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) e micronutrientes (ferro, boro, cobre, zinco, manganês, entre outros) para o crescimento e desenvolvimento das plantas tem implicações no seu teor de clorofila, que pode assim funcionar como indicador do desenvolvimento e rendimento das plantas. A clorofila está diretamente relacionada com a absorção de radiação por parte da planta, e com a produção fotossintética primária. Verifica-se que, ao longo de grande parte da parcela amostrada, as plantas possuem um teor de clorofila baixo, apresentando também uma baixa produção, principalmente na zona Sul. Relativamente à zona Norte, esta apresenta valores mais elevados, sendo que as plantas apresentam também uma produção mais elevada.

A razão entre fluorescência variável e a fluorescência máxima (F_v/F_m) fornece informações relativamente à eficiência do aparelho fotossintético das plantas. Estas apresentam, de um modo geral, uma boa eficiência no que toca ao seu aparelho fotossintético. Quanto às plantas com níveis mais baixos, os danos sofridos devido a condições de secura são ainda danos reversíveis nesse ano, uma vez que estes valores se encontram entre 0,7 e 0,8, pelo que ainda é possível que estas voltem a ter uma eficiência fotossintética elevada nesse mesmo ano produtivo. As plantas com eficiências fotossintéticas mais baixas pertencem à zona norte, incluindo áreas com as castas Alicante Bouschet (pontos 7, 10 e 14) e a Touriga Nacional (pontos 20 e 23), e, portanto, situadas aleatoriamente ao longo da área estudada (Figura 4.11).

A análise isotópica de C^{12} e C^{13} (Figura 4.12) está relacionada com as condições climáticas a que a planta esteve sujeita durante o seu desenvolvimento, mais concretamente com a disponibilidade de água, nutrientes, intensidade de luz e

temperatura, sendo um indicador do estado de conforto ou stress a que a planta esteve sujeita. Assim, podemos verificar que todas as plantas amostradas, com exceção da planta do ponto 24, não passaram por situações de stress extremo a nível de água, nutrientes, luminosidade e temperatura, durante o seu desenvolvimento.

Os vários parâmetros foliares estudados apresentam algumas zonas com tendências similares entre si. A zona Norte apresenta valores mais elevados, podendo isto querer dizer que é uniforme que, nessa zona, as plantas apresentam um rendimento elevado, não apresentam danos devido à seca nem passaram por situações de stress extremo durante o seu desenvolvimento. Relativamente aos mínimos, os três parâmetros não apresentam zonas em comum.

5.6 Produção de uva

Relacionando a produção de uva (kg/ha) com os parâmetros estudados, podemos afirmar que a produção de uva foi superior na zona Norte da área estudada, onde está instalada a casta Alicante Bouschet, sendo isto expectável uma vez que, em quase todos os parâmetros estudados, foi uma zona que apresentou resultados mais uniformes e razoáveis.

A zona sul da parcela foi a zona que apresentou uma produção mais baixa, zona esta onde se encontram instaladas as castas Touriga Nacional (zona Sul) e Cabernet Sauvignon (zona Sudeste), sendo esta zona coincidente com resultados mais baixos no que toca aos parâmetros estudados, sendo possível a sua relação com a baixa produtividade nesta zona.

É importante salientar que existem zonas com produção de 0kg/ha (zona Sul), onde se encontra instalada a casta Touriga Nacional. Foi verificado que, nesta zona, as plantas não se encontravam saudáveis, segundo a informação fornecida pelo produtor.

6. Conclusão

O objetivo deste trabalho foi a caracterização de uma vinha no concelho de Montemor-o-Novo, no que diz respeito a diversos parâmetros relativos à atividade microbiológica do solo, bem como parâmetros fisiológicos da própria videira, tentando aferir possíveis relações causa-efeito que irão contribuir com informação relevante para a gestão do agrossistema da vinha. Após a análise dos mapas e da distribuição espacial dos diferentes parâmetros analisados, foi possível perceber que:

- A existência de coberto vegetal nas entrelinhas, que por sua vez leva a distribuição de raízes de forma homogênea, permitiu uma distribuição também homogênea da atividade microbiana geral (RBS e C-Mic);

- Pontos próximos a árvores e curso de água apresentam uma maior carga e atividade microbiana;

- A disponibilidade de carbono poderá influenciar a atividade das bactérias solubilizadoras de fósforo e, conseqüentemente, a atividade microbiana específica deste grupo de microrganismos;

- Alguns dos parâmetros estudados apresentaram relações entre si: nos pontos em que o número de bactérias cultiváveis foi superior foi também registada maior atividade da fosfatase e da β -glucosidase e também os valores de atividade da arilsulfatase são mais elevados nesta região, sendo bastante provável que uma parte das bactérias que habitam na zona destes pontos sejam bactérias solubilizadoras de fósforo e de enxofre, contribuindo para a disponibilidade destes dois nutrientes no solo;

- A quantificação de bactérias está diretamente ligada aos parâmetros gerais de atividade microbiana - RBS, C-Mic e DHA;

- Valores pontualmente elevados de fungos cultiváveis podem estar associados à inibição da população de bactérias;

- O perfil encontrado para a distribuição da RBS foi mais coincidente com a distribuição de bactérias cultiváveis do que o dos fungos, pelo que se pode suspeitar de que a atividade bacteriana foi mais influente neste parâmetro e a distribuição de valores associados à DHA e do C-Mic corroboraram, também, estes resultados;

- O enrelvamento impactou de forma positiva a taxa de colonização micorrízica, mas, no entanto, não foi o único fator, uma vez que a distribuição desta não foi uniforme ao longo da área estudada. Assim, é provável que outro fator que influenciou a colonização micorrízica foi a presença de espécies na vegetação espontânea pouco ou nada micotróficas. Para além disto, também se verificou que, com o aumento da atividade enzimática da enzima β -glucosidase, a taxa de colonização micorrízica diminuiu;

- Os parâmetros foliares estudados – teor de clorofila, Fv/Fm e isótopos de carbono – apresentaram tendências em comum entre si, pelo que confirmaram ser bons indicadores do estado fisiológico das plantas.

Uma vez que a produção de uva foi superior na zona Norte da parcela, zona esta onde se verificaram valores mais elevados e uniformes dos parâmetros analisados, é possível inferir que a produção da vinha pode estar diretamente relacionada com a atividade microbiana do solo.

Assim, a informação fornecida por resultados deste tipo de análises será uma mais valia para o produtor, uma vez que será possível realizar uma melhor gestão da vinha: a nível de necessidades nutritivas das plantas (através de análises à atividade enzimática do solo e microbiana) e do estado das plantas, nomeadamente a sua resistência e resiliência a fatores adversos durante o seu desenvolvimento, eficiência do aparelho fotossintético e estado de conforto/stress a que as plantas estiveram sujeitas durante o seu desenvolvimento. Assim, complementando análises à fertilidade do solo e à seiva das plantas com este tipo de análises será uma vantagem para o produtor, no sentido de ter uma informação mais completa e que permitirá realizar uma melhor e mais sustentável gestão da vinha, com a possibilidade de fazer uma gestão diferenciada na propriedade, de acordo com as necessidades de cada local.

Relativamente a trabalhos futuros, seria interessante complementar este trabalho com o desenvolvimento de estudos envolvendo uma dinâmica temporal, ou seja, seria interessante estudar e perceber que alterações nos diferentes parâmetros analisados ocorrem com o decorrer dos anos e qual o motivo e, também, qual o impacto que a gestão diferenciada da propriedade teria na produção de uva, recorrendo a este tipo de análises como monitorização e adotando práticas para melhorar os resultados obtidos.

7. Referências Bibliográficas

- Abad, J., Hermoso De Mendoza, I., Marín, D., Orcaray, L., & Santesteban, L. G. (2021). Cover crops in viticulture. A systematic review (1): Implications on soil characteristics and biodiversity in vineyard. In *Oeno One* (Vol. 55, Issue 1, pp. 295–312). Vigne et Vin Publications Internationales. <https://doi.org/10.20870/OENO-ONE.2021.55.1.3599>
- Adetunji, A. T., Lewu, F. B., Mulidzi, R., & Ncube, B. (2017). The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. In *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 17, Issue 3). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000300018>
- Adiredjo, A. L., Navaud, O., Lamaze, T., & Grieu, P. (2014). Leaf carbon isotope discrimination as an accurate indicator of water-use efficiency in sunflower genotypes subjected to five stable soil water contents. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(6), 416–424. <https://doi.org/10.1111/jac.12079>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. In *Journal of King Saud University - Science* (Vol. 26, Issue 1, pp. 1–20). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., & Ingelmo, F. (2000). Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00030-4)
- Alef, Kassem., & Nannipieri, Paolo. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-513840-6.X5014-9>
- Andreote, F. D., & Cardoso, E. J. B. N. (2016). Introdução à Biologia do Solo. In E. J. B. N. Cardoso & F. D. Andreote (Eds.), *Microbiologia do solo* (2nd ed., pp. 9–22). <https://doi.org/10.11606/9788586481567>
- Andreote, F. D., Gumiere, T., & Durrer, A. (2014). Exploring interactions of plant microbiomes. In *Scientia Agricola* (Vol. 71, Issue 6, pp. 528–539). *Scientia Agricola*. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0195>
- Bailey, V. L., Smith, J. L., & Bolton, H. (2002). Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration. www.elsevier.com/locate/soilbio

- Barros, J. F. C. (2020). Controlo de Infestantes na Vinha com Enrelvamento. Departamento de Fitotecnia. Escola de Ciências e Tecnologia. Universidade de Évora.
- Berude, M., Almeida, D. ., Riva, M. ., Cabanêz, P., & Amaral, A. . (2015). Micorizas e a sua importância agroecológica. *Enciclopédia Biosfera*, 11(22). <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/1368>
- Bini, D., & Lopez, M. V. (2016). Transformações microbianas de fósforo. In E. J. B. N. Cardoso & F. D. Andreote (Eds.), *Microbiologia do Solo* (2nd ed, pp. 149–166). <https://doi.org/10.11606/9788586481567>
- Bini, D., Lopez, M. V., & Cardoso, E. J. (2016). Metabolismo Microbiano. In E. J. B. N. Cardoso & F. D. Andreote (Eds.), *Microbiologia do Solo* (2nd ed., pp. 61–80). <https://doi.org/10.11606/9788586481567>
- Brookes, P. (2001). The Soil Microbial Biomass: Concept, Measurement and Applications in Soil Ecosystem Research (Vol. 16, Issue 3). <https://doi.org/10.1264/jsme2.2001.131>
- Burges, A., & Raw, F. (1967). Soil Biology. <https://doi.org/10.1086/406214>
- Bünemann, E. K., Schwenke, G. D., & van Zwieten, L. (2006). Impact of agricultural inputs on soil organisms - A review. In *Australian Journal of Soil Research* (Vol. 44, Issue 4, 379–406). <https://doi.org/10.1071/SR05125>
- Burns, R. G., & Davies, J. A. (1986). The microbiology of soil structure. *Biological Agriculture and Horticulture*, 3(2–3), 95–113. <https://doi.org/10.1080/01448765.1986.9754465>
- Casida, L. E., Klein, D. A., & Santoro, T. (1964). Soil Dehydrogenase Activity. *Soil Science*, 371–376. <https://doi.org/10.1097/00010694-196412000-00004>
- Cardoso, E. J. B. N., Tsai, S. M., & Neves, M. C. P. (1992). *Microbiologia do solo* (pp. 33-39). Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. <https://doi.org/10.11606/9788586481567>
- Chagas, L. F. B., Junior, A. F. C., Soares, L. P., & Fidelis, R. R. (2017). Trichoderma na promoção do crescimento vegetal. <https://doi.org/10.32404/rean.v4i3.1529>
- Chen, G., Zhu, H., & Zhang, Y. (2003). Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. In *Research in Microbiology* (Vol. 154, Issue 6, pp. 393–398). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00082-2)

- Chou, M. Y., Vanden Heuvel, J., Bell, T. H., Panke-Buisse, K., & Kao-Kniffin, J. (2018). Vineyard under-vine floor management alters soil microbial composition, while the fruit microbiome shows no corresponding shifts. *Scientific reports*, 8(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29346-1>
- Coller, E., Cestaro, A., Zanzotti, R., Bertoldi, D., Pindo, M., Larger, S., Albanese, D., Mescalchin, E., & Donati, C. (2019). Microbiome of vineyard soils is shaped by geography and management. *Microbiome*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0758-7>
- Correia, A. (2015). A Vitivinicultura na região do Alentejo: A passagem de um setor tradicional para um setor inovador O caso da sub-região vitivinícola de Reguengos de Monsaraz.
- Daisy, J. A., & Giridhara, B. A. (2021). Lessons from the aftermaths after Green Revolution on Food Systems and Health. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.644559>
- Davet, P. (2001). *Microbial Ecology of the Soil and Plant Growth*. <https://doi.org/10.1093/aob/mci286>
- De Kok, L. J., Hawkesford, M. J., Haneklaus, S. H., & Schnug, E. (Eds.) (2017). *Sulfur Metabolism in Higher Plants: Fundamental, Environmental and Agricultural Aspects*. (Proceedings of the International Plant Sulfur Workshop; Vol. 3). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56526-2>
- Ehleringer, J. R., & Cerling, T. E. (2002). *C3 and C4 Photosynthesis*. Wiley.
- Ehlers, E. (2009). *O que é agricultura sustentável*. Brasiliense.
- Elsas, J. D. van, Trevors, J. T., Rosado, A. S., & Nannipieri, P. (2019). *Modern Soil Microbiology (Third Edit)*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/9781420015201>
- Elvazrt, F., & Tabatabai, M. A. (1990). Factors Affecting Glucosidase and Galactasidase Activities in Soils. In *Sod Bid. Btochrm* (Vol. 22, Issue 7). <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302706910>
- Envirothon, P., & Issue, C. E. (2019). 2019 Current Environmental Issue “Agriculture and the Environment: Knowledge and Technology to Feed the World.” (1–41).

- Evangelista Da Silva, E., Sabadin De Azevedo, P. H., & De-Polli, H. (2007). Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂).
- Fereres, E., & Villalobos, F. J. (2016). Agriculture and Agricultural Systems. In F. J. Villalobos & E. Fereres (Eds.), *Principles of Agronomy for Sustainable Agriculture* (pp. 1–12). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46116-8>
- Ferraz De Almeida, R., Rezende Naves, E., & Pinheiro Da Mota, R. (2015). Soil quality: Enzymatic activity of soil β -glucosidase. In *Global Journal of Agricultural Research and Reviews* (Vol. 3, Issue 2).
- Fraga, M. E., Braz, D. M., Rocha, J. F., Pereira, M. G., & Figueiredo, D. V. (2012). Interação microrganismo, solo e flora como condutores da diversidade na Mata Atlântica. In *Acta Botanica Brasilica* (Vol. 26, Issue 4). <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000400015>
- Frankenberger Jr, W. T., & Dick, W. A. (1983). Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil science society of America journal*, 47(5), 945-951. <https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700050021x>
- Gayathri, R., Mahboob, S., Govindarajan, M., Al-Ghanim, K. A., Ahmed, Z., Al-Mulhm, N., Vodovnik, M., & Vijayalakshmi, S. (2021). A review on biological carbon sequestration: A sustainable solution for a cleaner air environment, less pollution and lower health risks. In *Journal of King Saud University - Science* (Vol. 33, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101282>
- de Castro Gil, E. R. (2021). *Vitivinicultura e Mudanças Climáticas: Um estudo sobre as Regiões do Alentejo e Vinhos Verdes sob a ótica da sustentabilidade*. Universidade do Porto.
- Gilbert, J. A., van der Lelie, D., & Zorraonaindia, I. (2014). Microbial terroir for wine grapes. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 111, Issue 1, pp. 5–6). <https://doi.org/10.1073/pnas.1320471110>
- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., & Bending, G. D. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, ecosystems & environment*, 113(1-4), 17-35. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.09.009>
- Grover, M., Maheswari, M., Desai, S., Gopinath, K. A., & Venkateswarlu, B. (2015). Elevated CO₂: Plant associated microorganisms and carbon sequestration. In

- Applied Soil Ecology (Vol. 95, pp. 73–85). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.006>
- Gupta, V. V. S. R., Bramley, R. G. V., Greenfield, P., Yu, J., & Herderich, M. J. (2019). Vineyard soil microbiome composition related to rotundone concentration in Australian cool climate “peppery” Shiraz grapes. *Frontiers in Microbiology*, 10(JULY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01607>
- Hansatech Instruments Ltd. (2022). Chlorophyll Meter Measurements.
- Higa, T., & Parr, J. F. (1994). *Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Environment*.
- Hoffmann, L. V., & Lucena, V. S. (2006). *Entender as Micorrizas Arbusculares*.
- Inácio, C. de T., & Urquiaga, S. (2017). *Aplicações da Análise de Isótopos Estáveis na Agricultura*.
- Infovini. (2009). O Portal do Vinho Português - Alentejo.
<https://infovini.com/pagina.php?codNode=3907>
- Instituto Nacional de Estatística. (2020). Estatísticas Agrícolas.
https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICAC_OESpub_boui=437147278&PUBLICACOESmodo=2
- ISO 20130. (2018). Soil quality - Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates.
- Jägerbrand, A. K., & Kudo, G. (2016). Short-term responses in maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) to ex situ temperature treatment of populations of bryophytes originating from different sites in Hokkaido, Northern Japan. *Plants*, 5(2), 455–465. <https://doi.org/10.3390/plants5020022>
- Joergensen, R. G., & Mueller, T. (1996). The Fumigation-Extraction Method to Estimate Soil Microbial Biomass. In *Soil Biol. Biochem* (Vol. 28, Issue 1).
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00101-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00101-8)
- Jones, G. V., & Davis, R. E. (2000). Using a Synoptic Climatological Approach to Understand Climate-Viticulture Relationships. In *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLIMATOLOGY Int. J. Climatol* (Vol. 20). [https://doi.org/10.1002/1097-0088\(20000630\)20:8<813::AID-JOC495>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0088(20000630)20:8<813::AID-JOC495>3.0.CO;2-W)

- Kaklamanos, G., Aprea, E., & Theodoridis, G. (2020). Mass spectrometry: principles and instrumentation. In *Chemical Analysis of Food* (pp. 525–552). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813266-1.00011-5>
- Kalaji, H. M., Dąbrowski, P., Cetner, M. D., Samborska, I. A., Łukasik, I., Brestic, M., Zivcak, M., Tomasz, H., Mojski, J., Kociel, H., & Panchal, B. M. (2017). A comparison between different chlorophyll content meters under nutrient deficiency conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 40(7), 1024–1034.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1263323>
- Kang, S. M., Khan, A. L., Waqas, M., Asaf, S., Lee, K. E., Park, Y. G., Kim, A. Y., Khan, M. A., You, Y. H., & Lee, I. J. (2019). Integrated phytohormone production by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus tequilensis* SSB07 induced thermotolerance in soybean. *Journal of Plant Interactions*, 14(1), 416–423.
<https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1640294>
- Komatsuzaki, M., & Ohta, H. (2007). Soil management practices for sustainable agro-ecosystems (Vol. 2, pp. 103-120). Springer-Verlag..
<https://doi.org/10.1007/s11625-006-0014-5>
- Kremer, R. J. (1994). Determination of soil phosphatase activity using a microplate method1. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25(3–4), 319–325.
<https://doi.org/10.1080/00103629409369039>
- Kumar, S., Chaudhuri, S., & Maiti, S. K. (2013). Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil - A review. In *Middle East Journal of Scientific Research* (Vol. 13, Issue 7, pp. 898–906).
<https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.13.7.2801>
- Leite, L. F. C., & Araújo, A. S. F. (2007). *Ecologia Microbiana do Solo*.
- Liborio, E. B., & Chaves, J. C. D. (2010). Enzymatic activity and mineralization of carbon and nitrogen in soil cultivated with coffee and green manures.
<https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000500010>
- Lopes, R., Tsui, S., Gonçalves, P. J. R. O., & de Queiroz, M. V. (2018). A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 34, Issue 7). Springer Netherlands.
<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2479-7>

- López, R. C., & Ruiz, V. S. (2019). El sector vitivinícola frente al desafío del cambio climático.
- Marques, E., Martins, I., & de Mello, S. C. M. (2018). Potencial antifúngico de extratos brutos de trichoderma spp. *Biota Neotropica*, 18(1). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0418>
- Maxwell1, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.345.659>
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115(3), 495–501. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>
- Miransari, M., Riahi, H., Eftekhar, F., Minaie, A., & Smith, D. L. (2013). Improving Soybean (*Glycine max* L.) N₂ Fixation under Stress. 909–921. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9335-7>
- Mishra, S., Lin, Z., Pang, S., Zhang, W., Bhatt, P., & Chen, S. (2021). Recent advanced technologies for the characterization of xenobiotic-degrading microorganisms and microbial communities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.632059>
- Monteiro, A., Silva, F. G. D., & Jorge, R. (2012). Gestão e conservação da flora e da vegetação de Portugal e da África Lusófona. In *Honorium do Professor Catedrático Emérito Ilídio Rosário dos Santos Moreira. Gestão e conservação da flora e da vegetação de Portugal e da África Lusófona*, 1-478. <http://hdl.handle.net/10400.5/5055>
- Morgan, H. H., du Toit, M., & Setati, M. E. (2017). The grapevine and wine microbiome: Insights from high-throughput amplicon sequencing. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue MAY). *Frontiers Media S.A.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00820>
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In E. K. Bunemann, A. Oberson, & E. Frossard (Eds.), *Phosphorus in Action - Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling* (26th ed., pp. 215–243). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_9

- Paiva, P. J. R., & Nicodemo, M. L. F. (1993). Enxofre no sistema solo-planta-animal. EMBRAPA-CNPQC.
- Passioura, J. B. (2002). Environmental biology and crop improvement. *Functional Plant Biology*, 29(5), 537-546. <https://doi.org/10.1071/FP02020>
- Pellegrini, P., & Fernández, R. J. (2018). Crop intensification, land use, and on-farm energy-use efficiency during the worldwide spread of the green revolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), 2335–2340. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717072115>
- Peña, M. L., Marques, R., Jahnel, M. C., & Anjos, A. dos. (2005). Respiração Microbiana como Indicador da Qualidade do Solo em Ecossistema Florestal. <https://doi.org/10.5380/rf.v35i1.2435>
- Ren, C., Zhao, F., Shi, Z., Chen, J., Han, X., Yang, G., Feng, Y., & Ren, G. (2017). Differential responses of soil microbial biomass and carbon-degrading enzyme activities to altered precipitation. *Soil Biology and Biochemistry*, 115, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.08.002>
- Robertson, G. P. (2015). A sustainable agriculture? *Daedalus*, 144(4), 76–89. https://doi.org/10.1162/DAED_a_00355
- Rodrigues, C. I., Maia, R., Miranda, M., Ribeirinho, M., Nogueira, J. M. F., & Máguas, C. (2009). Stable isotope analysis for green coffee bean: A possible method for geographic origin discrimination. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(5), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.06.010>
- Rodrigues, C., Maia, R., Lauteri, M., Brugnoli, E., & Máguas, C. (2013). Stable isotope analysis. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 60, pp. 77–99). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59562-1.00004-9>
- Rosset, J. S., Coelho, G. F., Greco, M., Strey, L., & Junior, A. C. G. (2014). Agricultura convencional versus sistemas agroecológicos: modelos, impactos, avaliação da qualidade e perspectivas. *Scientia Agraria Paranaensis*, 13(2), 80-94. <https://doi.org/10.18188/sap.v13i2.7351>
- Rosset, P., Collins, J., & Lappé, F. M. (2000). Lessons from the green revolution. *Third World Resurgence*, 11-14. https://nature.berkeley.edu/srr/Alliance/lessons_from_the_green_revolutio.htm

- Savci, S. (2012). An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 73. <https://doi.org/10.7763/IJESD.2012.V3.191>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. In *SpringerPlus* (Vol. 2, Issue 1). SpringerOpen. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Silveira, A. P. D. da, & Freitas, S. dos S. (2007). A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas. In A. P. D. da Silveira & S. dos S. Freitas (Eds.), *Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental* (Vol. 2, pp. 79–96). Instituto Agronômico Campinas.
- Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S., & Murrell, J. C. (2004). Unravelling rhizosphere-microbial interactions: Opportunities and limitations. In *Trends in Microbiology* (Vol. 12, Issue 8, pp. 386–393). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.06.008>
- Sinsabaugh, R. L., Carreiro, M. M., & Alvarez Sergio. (2002). Enzyme and Microbial Dynamics of Litter Decomposition. In R. G. Burns & R. P. Dick (Eds.), *Enzymes in the Environment - Activity, Ecology and Applications* (pp. 249–264).
- Steffen, G. P. K., Maldaner, J., Missio, E. L., & Steffen, R. B. (2015). Trichoderma controla fitonematodes e aumenta produtividade da soja, *Campos & Negócios*.
- Steffen, G. P. K., Steffen, R. B., & Antonioli, Z. I. (2011). Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. *Tecno-lógica*, 15(1), 15-21. <https://doi.org/10.17058/tecnolog.v15i1.2016>
- Sun, S., Li, S., Avera, B. N., Strahm, B. D., & Badgley, B. D. (2017). Soil bacterial and fungal communities show distinct recovery patterns during forest ecosystem restoration. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14). <https://doi.org/10.1128/AEM.00966-17>
- Tabatabai, M. A., & Dick, W. A. (2002). Enzymes in Soil - Research and Developments in Measuring Activities. In R. G. Burns & R. P. Dick (Eds.), *Enzymes in the Environment - Activity, Ecology and Applications* (pp. 567–596). <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2005.06.003>
- Talaro K. P. & Chess B. (2018). *Foundations in microbiology* (Tenth). McGraw-Hill Education.

- Tate, R. L. (2021). The Soil Ecosystem: Biological Participants. In *Soil Microorganisms* (3rd ed., pp. 45–66). John Wiley & Sons, Inc.
- Tisdall, J. M. (1994). Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. In *Plant and Soil* (Vol. 159). <https://doi.org/10.1007/BF00000100>
- Turner, B. L., Hopkins, D. W., Haygarth, P. M., & Ostle, N. (2002). β -glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology*, 20(2), 157-162. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00020-3)
- UN WCED 1987 Brundtland Report. (1987).
- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). An Extraction Method For Measuring Soil Microbial Biomass C. In *Soil Biol. Biochem* (Vol. 19, Issue 6). [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Matos, A. K. V. (2011). Revolução verde, biotecnologia e tecnologias alternativas. *Cadernos da FUCAMP*, 10(12), 1-17.
- Vezzani, F. M. (2015). Solos e os Serviços Ecosistêmicos. http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/arquivo
- von Mersi, W., & Sehinner, F. (1991). An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chloride. In *Biol Fertil Soils* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1007/BF00335770>
- White, R. E. (2015). *Understanding Vineyard Soils: Vol. Segunda Edição*. <https://doi.org/10.1111/sum.12200>
- Wolinska, A., & Stepniewsk, Z. (2012). Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. In *Dehydrogenases*. InTech. <https://doi.org/10.5772/48294>
- Xiong, Q., Hu, J., Wei, H., Zhang, H., & Zhu, J. (2021). Relationship between plant roots, rhizosphere microorganisms, and nitrogen and its special focus on rice. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/agriculture11030234>
- Yadav, S. K., Soni, R., & Rajput, A. S. (2018). Role of Microbes in Organic Farming for Sustainable Agro-Ecosystem. In D. G. Panpatte, H. N. Shelat, Y. K. Jhala, & R. v. Vyas (Eds.), *Microorganisms for Green Revolution* (Vol. 2, pp. 241–252). Springer. <https://doi.org/10.29322/IJSRP.10.10.2020.p10661>
- Zhang, Y., Zou, J., Meng, D., Dang, S., Zhou, J., Osborne, B., Ren, Y., Liang, T., & Yu, K. (2020). Effect of soil microorganisms and labile C availability on soil respiration

in response to litter inputs in forest ecosystems: A meta-analysis. In *Ecology and Evolution* (Vol. 10, Issue 24, pp. 13602–13612). John Wiley and Sons Ltd.
<https://doi.org/10.1002/ece3.6965>

8. Anexos

Anexo I: Preparação de soluções

Biomassa Microbiana

Solução Mn III pirofosfato (KMnO_4) – sob um agitador magnético, adicionou-se, a 100mL de água destilada, pela seguinte ordem: 75mL de solução de pirofosfato ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 0,1M, 12mL de ácido sulfúrico 0,5M, 5mL de permanganato de potássio 0,1M e 20mL de sulfato de manganês. Depois, adicionou-se água destilada até atingir os 250mL de solução.

Solução de sulfato de potássio (K_2SO_4) (solução extratora) – pesou-se 350g de sulfato de potássio, adicionou-se quatro litros de água destilada e colocou-se sob agitação num agitador magnético.

Solução de permanganato de potássio (KMnO_4) – pesou-se 1,58g de permanganato de potássio, adicionou-se 100mL de água destilada e colocou-se a solução sob agitação num agitador magnético.

Solução de pirofosfato ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) – pesou-se 4,46g de pirofosfato, adicionou-se 100mL de água destilada e colocou-se a solução sob agitação num agitador magnético.

Solução de sulfato de manganês (MnSO_4) – pesou-se 1,69g de sulfato de manganês, adicionou-se 100mL de água destilada e colocou-se a solução sob agitação num agitador magnético.

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5M - através da fórmula $M_1V_1 = M_2V_2$, foi calculada o volume de ácido sulfúrico necessário para obter um solução a 0,5M: $M_1V_1 = M_2V_2$ $17,82 \cdot V_1 = 0,5 \cdot 100 \text{ mL}$ $V_1 = 2,805$ de ácido sulfúrico em 97,195mL de água destilada.

Atividade enzimática da desidrogenase

Solução de cloreto 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1% - a 5g de TTC adicionou-se 500 mililitros de água destilada.

Solução de TPF: pesou-se 100mg de TPF para um balão de 100mL e perfazeu-se com metanol, até aos 100mL.

Quantificação de bactérias e fungos culturáveis

Cálculo das dosagens de cloranfenicol e de ciclohexamida:

Pela fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$, sendo que C_1V_1 corresponde aos valores da solução stock (antibiótico ou fungicida) e C_2V_2 corresponde à solução final (meio de cultura com o antibiótico ou fungicida).

Cálculo do volume de cloranfenicol: $M_1V_1 = M_2V_2 \Leftrightarrow 25 \text{ mg/mL} \cdot V_1 = 50\mu\text{g/mL} \cdot 500\text{mL PDA} \Leftrightarrow V_1 = 1\text{mL}$ para 500mL de meio de cultura PDA.

Cálculo do volume de ciclohexamida: $M_1V_1 = M_2V_2 \quad 25 \text{ mg/mL} \cdot V_1 = 50\mu\text{g/mL} \cdot 500\text{mL NA} \Leftrightarrow V_1 = 1\text{mL}$ para 500mL de meio de cultura NA.

Atividade enzimática

Tris base 100 mmol/L pH $12 \pm 0,1$ – dissolveu-se 12,11g de tris-hidroximetil aminometano em 800ml de água desmineralizada e foi ajustado o pH para 12 com hidróxido de sódio (5M). Perfazeu-se com água desmineralizada até aos 1000mL.

Cloreto de cálcio – dissolveu-se 14,7g de cloreto de cálcio dihidratado em 200mL de água desmineralizada.

Para-nitrofenol – dissolveu-se 10mg de para-nitrofenol em 20mL de água desmineralizada. A solução foi utilizada nos ensaios com uma diluição de 1/10 (1mL da solução preparada em 9mL de água desmineralizada).

Anexo II: Resultados obtidos – C-Mic, DHA e RBS

Amostra	Carbono Microbiano mg C/Kg solo	Desidrogenase $\mu\text{gTPF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ solo seco} \cdot \text{hora}^{-1}$	Respiração Microbiana (mg CO ₂ /Kg solo/d)
1	125,23	0,81	1,61
2	163,16	2,09	5,51
3	193,93	1,80	4,88
4	72,56	2,14	4,48
5	151,20	1,58	4,84
6	60,60	2,22	6,11
7	73,42	2,08	4,55
8	95,21	2,26	4,84
9	78,55	2,48	4,17
10	72,56	2,35	6,97
11	116,58	2,17	6,91
12	72,14	2,15	12,33
13	80,68	1,79	8,70
14	131,54	1,80	5,73
15	131,54	1,33	6,10
16	64,87	1,37	7,32
17	52,91	2,07	4,37
18	110,60	0,88	3,73
19	15,30	1,71	5,28
20	55,90	1,83	4,90
21	61,88	1,24	6,50
22	31,97	1,74	6,04
23	48,63	1,48	5,28
24	60,60	1,55	3,70

Anexo III: Resultados obtidos – Taxa de micorrização e quantificação de bactérias e fungos culturáveis

Amostra	Taxa Micorrização	Quantificação microrganismos	
	Taxa Colonização	Bactérias (UFC/g)	Fungos (UFC/g)
1	14	2,85E+06	2,21E+05
2	9	3,38E+06	1,54E+06
3	8	4,44E+06	1,53E+05
4	12	6,75E+06	5,67E+05
5	7	4,82E+06	2,97E+05
6	11	5,40E+06	1,62E+05
7	7	1,66E+06	4,05E+04
8	10	6,48E+06	2,61E+05
9	9	3,38E+06	1,76E+05
10	5	4,50E+04	1,76E+06
11	5	1,04E+06	6,75E+04
12	11	4,50E+05	4,50E+04
13	0	1,30E+07	3,56E+05
14	6	1,62E+07	1,89E+05
15	7	4,10E+06	1,85E+05
16	7	2,88E+06	2,97E+05
17	12	7,43E+06	1,35E+05
18	13	9,41E+06	3,11E+05
19	11	1,00E+07	2,66E+05
20	14	1,10E+07	2,07E+05
21	16	8,55E+06	3,24E+05
22	5	6,62E+06	1,35E+05
23	5	4,50E+06	2,03E+05
24	10	9,05E+06	2,57E+05

Anexo IV: Resultados obtidos – Atividade enzimática

	Arilsulfatase	B-glucosidase	Fosfatase
Amostra	nmolPNF.g ⁻¹ solo seco.h ⁻¹	nmolPNF.g ⁻¹ solo seco.h ⁻¹	nmolPNF.g ⁻¹ solo seco.h ⁻¹
1	51,4	374,6	839,2
2	184,1	724,1	1524,0
3	98,7	920,9	1779,7
4	16,4	1001,2	1474,1
5	55,2	556,4	754,8
6	108,2	1240,2	1546,1
7	106,5	1895,2	1564,1
8	108,3	1245,1	1636,9
9	108,1	759,3	1409,5
10	96,5	783,8	973,2
11	150,5	718,4	1011,2
12	122,0	1132,3	1521,5
13	114,1	1652,8	1751,9
14	145,7	1613,4	1768,5
15	134,4	1201,3	1415,7
16	147,1	1532,4	1383,2
17	56,3	590,9	1551,1
18	55,3	498,2	1018,0
19	70,0	909,3	1589,9
20	133,6	633,3	1422,7
21	69,6	346,5	998,3
22	83,6	494,9	1225,8
23	76,7	504,3	942,9
24	69,0	459,1	1192,5

Anexo V: Resultados obtidos – Parâmetros foliares

	Teor de Clorofila	Isótopos Carbono	Fv/Fm
Planta	Média	d13C	Média
1	10,46	-27,60	0,79
2	5,66	-28,75	0,77
3	11,70	-28,77	0,78
4	7,37	-27,13	0,76
5	7,19	-27,14	0,74
6	10,87	-29,37	0,73
7	14,87	-27,48	0,76
8	16,93	-28,35	0,74
9	12,97	-27,89	0,77
10	12,10	-29,17	0,72
11	12,03	-28,47	0,75
12	7,68	-27,03	0,76
13	8,15	-28,31	0,75
14	7,30	-29,25	0,70
15	8,41	-27,25	0,75
16	6,94	-27,90	0,74
17	7,28	-26,36	0,76
18	12,33	-25,65	0,74
19	5,82	-27,90	0,75
20	6,71	-27,10	0,71
21	6,88	-30,61	0,76
22	5,66	-31,65	0,74
23	7,31	-29,05	0,73
24	7,51	-29,01	0,76