

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DAIANE HYEDA

**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS COMO INDICADORES DE QUALIDADE DO
SOLO EM PLANTIO DE EUCALIPTO COM APLICAÇÃO DE BIOCHAR.**

PONTA GROSSA – PR

2020

DAIANE HYEDA

**ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS COMO INDICADORES DE QUALIDADE DO
SOLO EM PLANTIO DE EUCALIPTO COM APLICAÇÃO DE BIOCHAR.**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de Concentração: Agricultura. Linha de Pesquisa: Uso e Manejo do Solo. Como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agricultura.

Orientadora: Prof. Dra. Carolina Weigert Galvão.
Co – orientadora: Dra. Krisle da Silva.

PONTA GROSSA – PR

2020

H995 Hyeda, Daiane
Atributos microbiológicos como indicadores de qualidade do solo em plantio de eucalipto com aplicação de biochar / Daiane Hyeda. Ponta Grossa, 2020. 71 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão.

Coorientadora: Profa. Dra. Krisle da Silva.

1. Biocarvão. 2. Indicadores biológicos. 3. Enzimas do solo. I. Galvão, Carolina Weigert. II. Silva, Krisle da. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Agricultura. IV.T.

CDD: 631

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

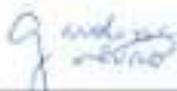
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: **Atributos microbiológicos como indicadores de qualidade do solo em plantio de eucalipto com aplicação de biochar.**

Nome: **Dalane Hyeda**

Orientador: **Carolina Weigert Galvão**

Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Carolina Weigert Galvão



Dr. Ricardo Trigueira dos Guimarães Peixoto



Prof. Dr. Daniel Ruz Palma Gonçalves

Data da Realização: 27 de fevereiro de 2020

“Felicidade é a certeza de que nossa vida não está se passando inutilmente “

Erico Veríssimo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus o qual permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de toda a minha vida, e não somente nestes anos como universitária, é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Agradeço a minha mãe, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu pai que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu, amo vocês.

Obrigada meu irmão que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre fez entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente, te amo polaco.

Aos meus orientadores Professores Rafael e Carolina, pelos ensinamentos, dedicação e confiança, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções, incentivos, por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação de caráter e afetividade no processo de formação profissional, me permitindo a experiência de encontrar entre os colegas de laboratório uma segunda família. Obrigada! A toda a família LABMOM pelo incentivo e ajuda na hora do sufoco!

Em especial aos meus irmãos científicos em especial a Hely e Raphael pelo apoio, parceria e momentos de desabafo em meio às diluições, os meus filhos científicos: Ronaldo, Larissa pela confiança, ajuda em todos os momentos que necessitei e quantas placas enchidas, e longas conversas no fluxo, paciência para aprendermos juntos e companheirismo inabalável, Tamires e Pedro meus “meios” filhos científicos, Laís, Willian, Fernanda, por toda ajuda, a Laís pela tranquilidade nos momentos de angústia, Willian pelos momentos de descontração e muitas perguntas, o qual fazia estudar mais para ter certeza se realmente estávamos no caminho, a Salomé e Ligia pelos ensinamentos e todos que me estenderam a mão sempre que precisei.

Meus agradecimentos aos amigos, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação, em especial à Agda por ser minha irmã de coração, que sempre me deu suporte, orientou e aconselhou, mesmo com a distância, a correria e minha ausência, à Leticia por ensinar a paixão pela pesquisa, orientar, dar puxões de orelha e por ser parceira não só no laboratório, mais na vida, ao Breno que me atura a anos, me suportando, dando conselhos e muitas gordices, que essa amizade perdure e a minha prima Grazielle que está comigo em todas as batalhas e prima/ irmã/ amiga, não tenho palavras e nem sei como agradecer vocês, mais saibam que amo vocês.

Alguém especial que chegou de mansinho, teve paciência de ouvir meus pit do mestrado com a indecisão da vida pessoal, que me deu colo nas necessidades, conselhos na hora da indecisão, abraços e palavras de conforto na hora do desespero, que sempre incentivou em seguir em frente e não deixar os sonhos ficarem para trás, te adoro mil milhões.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à PETROBRAS pelo suporte financeiro.

Também à Embrapa Florestas e a todos os pesquisadores envolvidos ao projeto de pesquisa “**Biochar em solos sob plantio de eucalipto: aspectos agrônômicos e ambientais**” vinculado ao contrato de parceria técnica Campos Verdes Agroflorestal/Embrapa - Biochar - SAIC/AJU nº 21500.16/0145-6, projeto co-Financiado na Embrapa 33.17.00.031.00.00 (código no Sistema Embrapa de Gestão), que foi inicialmente coordenado pela Claudia Maia e atualmente pela Lucília Parron, em especial ao laboratório de microbiologia do solo por ceder espaço, materiais e todo o conhecimento adquirido durante as análises de solo e à SLB do Brasil pelo suporte técnico e financeiro para a realização das

atividades de pesquisa. À Universidade Estadual de Ponta Grossa pelos recursos físicos, educacionais e humanos.

Todos os laboratórios de pesquisa da UEPG, especialmente da Agronomia que cederam espaço, matérias e alunos para o desenvolvimento das análises. Em especial ao laboratório de Fertilidade do solo, Nutrição de plantas e Física do solo.

Aos colegas e amigos que o projeto uniu, Alisson, Lucia e em especial à Ariane por ajudar nas coletas, viagens e muitos conselhos, além de sempre estar disposta em me ajudar no que fosse preciso, meu muito obrigada.

A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados que sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

RESUMO

O biochar é um material rico em carbono, obtido de biomassa carbonizada sob baixa atmosfera de oxigênio, para uso como condicionador de solos. A aplicação de biochar tem potencial de alterar as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, elevando a disponibilidade de água e nutrientes para as plantas. Três importantes estratégias, porém, devem estar associadas ao conceito do biochar: a reciclagem de resíduos orgânicos, a geração de energia renovável e a agricultura de baixa emissão de carbono. No presente trabalho foi avaliado o efeito do biochar, produzido a partir de resíduos da colheita de eucalipto e diferentes doses de adubação, nas atividades microbianas e enzimas do solo de uma área comercial de cultivo de *Eucalyptus urograndis* instalado em um Latossolo vermelho-amarelo, em São Jerônimo da Serra, Paraná. O experimento foi desenhado em blocos casualizados com parcelas subdivididas, em esquema fatorial 2 x 3, variando-se a dose de biochar (0 ou 3,23 Mg ha⁻¹) e de adubação (0, 120 e 150 g árvore⁻¹ da fórmula NPK 4:42:6) com quatro repetições. Amostras compostas de solo foram obtidas (1) a partir de amostras simples coletadas próximas às mudas centrais de eucalipto de cada parcela e (2) a partir de amostras simples coletadas aleatoriamente em zigue-zague na parcela. A população de bactérias envolvidas no ciclo de nitrogênio foi avaliada a partir da determinação do Número Mais Provável (NMP) de bactérias amonificadoras, nitrificadoras e fixadoras de Nitrogênio. Além disso, foi avaliada a atividade das enzimas do solo envolvidas no ciclo do nitrogênio (urease) e carbono (Beta- Glucosidase). A determinação do Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana e a quantificação de glomalina também foram realizadas nos primeiros dois anos de crescimento do eucalipto e em dois períodos do ano. Apesar da respiração basal não ter variado entre os tratamentos a cada tempo avaliado, essa apresentou valores superiores no início do desenvolvimento do eucalipto. Diante de uma maior estabilidade do solo, 2 anos após o plantio, houve um aumento no carbono da biomassa microbiana, principalmente nos tratamentos com a aplicação de biochar. A atividade das enzimas β -glucosidase e urease foram afetadas pela presença de biochar, sendo que a primeira foi drasticamente reduzida ao longo dos dois anos de análise, enquanto que a urease diminuiu ao longo dos 24 meses avaliados, a presença da dose completa de fertilizante não induziu o aumento da atividade da enzima urease. No entanto a enzima urease apresentou uma redução da sua atividade nos dois últimos períodos amostrais, os quais podem ter influenciado os microrganismos amonificadores do solo, pois a enzima urease é responsável por produzir amônia a partir da ureia. Assim a redução pode estar relacionada a disponibilidade do nitrogênio químico, que foi aplicado somente nos meses iniciais da cultura.

Palavras-chave: Biocarvão, indicadores biológicos, enzimas do solo.

ABSTRACT

Biochar is a carbon-rich material, obtained from carbonized biomass under low oxygen atmosphere, for use as a soil conditioner. The application of biochar has the potential to change the physical, chemical and microbiological properties of the soil, increasing the availability of water and nutrients for plants. Three important strategies, however, must be associated with the concept of biochar: the recycling of organic waste, the generation of renewable energy and low-carbon agriculture. In the present work, the effect of biochar, produced from residues from the eucalyptus harvest and different doses of fertilization, on the microbial activities and enzymes of the soil of a commercial cultivation area of *Eucalyptus urograndis* installed in a red-yellow Latosol, in São Jerônimo da Serra, Paraná. The experiment was designed in randomized blocks with subdivided plots, varying the dose of biochar (0 or 3.23 Mg ha⁻¹) and fertilization (0, 120 and 150 g tree⁻¹ of the NPK formula 4: 42: 6) with four repetitions. Samples composed of soil were obtained (1) from simple samples collected near the central eucalyptus seedlings of each plot and (2) from simple samples collected randomly in zigzag in the plot. The population of bacteria involved in the nitrogen cycle was evaluated based on the determination of the Most Probable Number (NMP) of ammonifying, nitrifying and Nitrogen fixing bacteria. In addition, the activity of soil enzymes involved in the nitrogen (urease) and carbon (beta-Glucosidase) cycle was evaluated. The determination of carbon and nitrogen in the microbial biomass and the quantification of glomalin were also carried out in the first two years of eucalyptus growth and in two periods of the year. Although basal respiration did not vary between treatments at each time evaluated, it showed higher values at the beginning of eucalyptus development. Due to the greater soil stability, 2 years after planting, there was an increase in the carbon of the microbial biomass, mainly in the treatments with the application of biochar. The activity of the enzymes β -glucosidase and urease were affected by the presence of biochar, the first of which was drastically reduced over the two years of analysis, while the urease decreased its activities over the 24 months evaluated. The presence of the full dose of fertilizer did not induce an increase in urease enzyme activity. However, the urease enzyme showed a reduction in the last two sample periods, which may have influenced the soil ammonifying microorganisms, since the urease enzyme is responsible for producing ammonia from urea, thus, the decrease may be related to nitrogen availability chemical, which was applied only in the initial months of the crop.

Keywords: Biochar, biological indicators, soil enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado do ciclo do nitrogênio; as flechas em verde indicam o caminho do nitrogênio dentro do ciclo; as caixas em verde indicam os produtos dos processos de transformação do nitrogênio; as palavras em negrito indicam os processos de transformação do nitrogênio.....	20
Figura 2 - Vista aérea da área experimental de estudo (delimitada pela caixa vermelha).....	27
Figura 3 - Layout do experimento.....	30
Figura 4 - Croqui coleta de solo microbiológico, o solo amostrado em zigue – zague, com 8 pontos aleatórios próximos as plantas. Solo das 8 plantas centrais como demonstra o croqui usado a cima pela equipe da UEPG, sendo as 8 plantas centrais das 2 linhas centrais, com marcação em marrom. O retângulo representa o limite da parcela.....	31
Figura 5 - Esquema da diluição seriada.....	38
Figura 6 - Ilustração da placa utilizada para realizar os testes das diluições seriadas dos solos amostrados.....	39
Figura 7 - Teste para microrganismos oxidantes de nitrito. Os poços transparentes indicam a presença de oxidantes de nitrito (NO_2^-) e os poços de cor purpura indicam a ausência dos mesmos.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Análise química de rotina e análise granulométrica de amostras da área experimental. pH= Potencial hidrogeniônico; Ca ²⁺ =Cálcio; Mg ²⁺ = Magnésio; Al ³⁺ = Alumínio; K ⁺ =Potássio; H+Al=acidez potencial; P= fósforo.	28
TABELA 2 - Curva de calibração para determinação da concentração de amônio.....	32
TABELA 3 - Curva de calibração para determinação da concentração de p-nitrofenol.	34
TABELA 4 - Curva Padrão de Soro Albumina Bovina.	37
TABELA 5 - Composição para o meio de cultura para microrganismos amonificadores.....	38
TABELA 6 - Composição para as soluções estoque e para o preparo do meio de cultura para microrganismos nitrificantes.	40
TABELA 7 - composição da solução de micronutrientes utilizada para preparo do meio de cultura para microrganismos nitrificantes.	40
TABELA 8 - Composição do meio de cultura NFb em sua forma semissólida.	42
TABELA 9 - composição da solução de micronutrientes utilizada no meio NFb.....	42
TABELA 10 - Carbono da biomassa microbiana (CBM) do solo não rizosférico amostrado após o plantio do eucalipto (em mg Cmic. Kg ¹ de solo), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).	44
TABELA 11 - Respiração basal do solo não rizosférico amostrado períodos após o plantio do eucalipto (em µg C-CO ₂ /Kg/h), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).	46
TABELA 12 - Quociente metabólico (qCO ₂) do solo não rizosférico amostrado períodos após o plantio do eucalipto (em µg C-CO ₂ /gBMS-C/h), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).	48
TABELA 13 - Glomalina do solo não rizosférico amostrado vinte quatro meses após o plantio de eucalipto (mg g ⁻¹ de solo) , glomalina facilmente extraída (GFE), glomalina total (GT), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).	49
TABELA 14 - Atividade da enzima Urease em solo de eucalipto 3 meses após o plantio (em µg NH ₄ -N g de solo ⁻¹ h ⁻¹), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).	50
TABELA 15 - Atividade da enzima urease do solo não rizosférico amostrados períodos após o plantio (em µg NH ₄ -N g de solo ⁻¹ h ⁻¹). na presença de biochar (CB) e ausência de biochar	

(SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação). 51

TABELA 16 - Atividade da enzima β -glucosidase do solo amostrado três meses após o plantio (em ug p-nitrofenol g^{-1} solo seco h^{-1}), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação). 53

TABELA 17 - Atividade da enzima β -glucosidase do solo não rizosférico amostrado doze meses após o plantio (em ug p-nitrofenol g^{-1} solo seco h^{-1}), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação). 54

TABELA 18 - Número mais provável (NMP) de microrganismos amonificadores presentes no solo amostrado três meses após o plantio (em UFC g^{-1} de solo), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação). 55

TABELA 19 - Número mais provável (NMP) de microrganismos amonificadores presentes no solo não rizosférico amostrados períodos após o plantio (em UFC g^{-1} de solo). 55

TABELA 20 - Número mais provável (NMP) de microrganismos fixadores biológicos de nitrogênio (FBN) presentes no solo rizosférico amostrado três meses após o plantio (em UFC g^{-1} de solo), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação). 57

TABELA 21 - Número mais provável (NMP) de microrganismos nitrificadores presentes no solo não rizosférico amostrado períodos após o plantio (em UFC g^{-1} de solo), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação). 58

LISTA DE ABREVIATURAS

μL - microlitro
AMO – Amônia monoxigenase
AOA – Arquéias Oxidantes de Amônio
BOA- Bactérias oxidantes de amônio
ADP- Adenosina difosfato
ATP- Adenosina tri-fosfato
C - Carbono
BMC- S- carbono da biomassa microbiana do solo
 CO_2 – Gás Carbônico
FBN – Fixação Biológica do Nitrogênio
FMAs- fungos micorrizicos arbusculares
GFE- Glomalina facilmente extraída
GT- Glomalina total
HAO – Hidroxilamina oxireductase
LABMOM- Laboratório de Biologia Molecular Microbiana
MOS- matéria orgânica do solo
N - Nitrogênio
 N_2 – Nitrogênio atmosférico
NFb – Meio semissólido livre de nitrogênio
NMP – Número mais provável
 NH_3 – Amônia
 NH_4^+ - Amônio
 NO_2^- - Nitrito
 NO_3^- - Nitrato
 N_2O – Óxido Nitroso
BON- bactérias oxidantes de nitrato
NPK – nitrogênio fosforo e potássio
 O_2 – Oxigênio
UEPG – Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFC- Unidades formadoras de colônia
 qCO_2 - quociente metabólico
RBS- respiração basal do solo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 HIPÓTESE	16
4 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	17
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCHAR	17
4.2 MICRORGANISMOS DO SOLO	19
4.2.1 Ciclo do Nitrogênio.....	19
4.2.2 Ciclo do Carbono	23
4.2.3 Enzimas do Solo.....	24
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
5.1 ÁREA EXPERIMENTAL.....	27
5.2 ADUBAÇÃO E PLANTIO.....	28
5.3 APLICAÇÃO DE BIOCHAR.....	28
5.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	29
5.5 AVALIAÇÕES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS	30
5.5.1 Avaliações Biológicas	31
5.5.1.1 <i>Determinação da atividade enzimática da urease</i>	31
5.5.2 Determinação da Enzima Beta -Glucosidase	33
5.5.3 Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana (BMC).....	34
5.5.4 Respiração Basal e Quociente Metabólico	35
5.5.6 Diluição Seriada.....	37
5.5.7 Quantificação de Microrganismos Amonificadores.....	38
5.5.8 Quantificação de Microrganismos Nitrificadores	39
6 ANÁLISE DOS DADOS.....	43
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
7.1 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA (CBM), RESPIRAÇÃO BASAL, QUOCIENTE METABÓLICO E GLOMALINA	44
7.2 ENZIMAS DO SOLO.....	50
7.3 QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO CICLO DO NITROGÊNIO.....	54
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.) uma espécie florestal exótica, originária da Austrália, foi trazido ao Brasil, adaptou-se as condições climáticas e ao solo, fatores estes altamente favoráveis para o seu desenvolvimento, porém, seu crescimento é limitado pela disponibilidade hídrica e nutricional do ambiente (BRASIL, 2019).

A diversificação do uso da madeira vem ganhando importância no cenário mundial por substituir produtos oriundos de fontes de recursos não renováveis e utilizar materiais oriundos de fontes renováveis, como as florestas plantadas (JUNIOR; COLODETTE, 2013). Entretanto, as colheitas geram resíduos de folhas, galhos, ápice da árvore e casca, os quais ficam em campo, sem uso. Para realizar um melhor aproveitamento, pode ser feito a pirólise deste material, transformando em biochar (LEI; ZHANG *et al.*, 2013).

O biochar, é um composto orgânico derivado do aquecimento da biomassa em condições de baixa ou nenhuma oxigenação (pirólise) em temperaturas que variam de 300 a 1000°C, sendo rico em carbono, variando entre 55- 80% (LONE *et al.*, 2015). O interesse em seu uso baseia-se principalmente nas descobertas da “Terra preta de índio” na região amazônica, onde as práticas de manejo agrícola indígena levam à criação grandes manchas de terra, solos antropogênicos que foram identificados como férteis e de alta qualidade do solo (TALBERG, 2009, MAIA, 2011; RITTLL; ARTS; KUYPER, 2015). Este apresenta um alto potencial como condicionador de solo que pode contribuir para melhorar a produtividade agrícola, normalmente, faz-se a aplicação combinada entre o biochar e fertilizantes, visto que o biochar sozinho não possui uma grande quantidade de nutrientes prontamente disponíveis (LYCHUK *et al.*, 2014).

Sua incorporação no solo induz mudanças nas propriedades físicas como: textura, estrutura, porosidade, diâmetro dos poros, distribuição granulométrica e densidade (PETTER, 2010). Nas propriedades químicas atua na estabilidade e aumento dos estoques de carbono, melhora da qualidade do solo, diminuindo a lixiviação de nutrientes, reduz os requisitos de irrigação e fertilizantes (LI *et al.*, 2017). As interações do biochar com os microrganismos do solo geram alterações de pH, das taxas de decomposição da matéria orgânica, bem como da disponibilidade de energia e NH₄ para as plantas (DU *et al.*, 2014). Além disso, o biochar gera habitats de proteção para esses microrganismos (PETTER, 2010).

Esse estudo tem por finalidade a compreensão dos efeitos do biochar sobre as atividades microbianas e enzimáticas do solo, uma vez que se utilizou resíduos da colheita de

eucalipto para produzir o biochar, reduzindo os impactos ambientais dos restos se deixados ao campo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da aplicação do biochar e de fertilizantes minerais na atividade microbiana e enzimática do solo relacionadas ao ciclo do nitrogênio e carbono em uma área comercial de cultivo de *Eucalyptus urograndis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o carbono da biomassa microbiana em solos com cultivo de Eucaliptos e aplicação de biochar.
- Determinar a atividade microbiana do solo na área de cultivo de eucalipto, através da quantificação da atividade das enzimas urease e beta- glucosidase
- Quantificar a população bacteriana de amonificadores, nitrificadores e fixadores de Nitrogênio.
- Avaliar as alterações nos indicadores biológicos do solo ao longo de dois anos.

3 HIPÓTESE

- A aplicação de biochar produzido de resíduos da colheita de eucalipto aumenta a quantidade dos microrganismos relacionados ao ciclo do nitrogênio;
- A aplicação de biochar possibilita a redução de 20% da adubação padrão comercial na cultura do eucalipto com o aumento da atividade microbiana.
- O uso de biochar aumenta a atividade microbiana (avaliada por ciclagem C e N).

4 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

A silvicultura sempre se baseou no conhecimento das propriedades físicas e químicas para avaliar a capacidade do solo em desenvolver florestas produtivas. Nos últimos anos, a necessidade de avaliar estas propriedades tem aumentado, devido ao interesse do público em determinar as consequências das práticas de manejo na qualidade do solo e relação a sustentabilidade das funções do ecossistema florestal, além da produtividade das plantas (SCHOENHOLTZ; MIEGROET; BURGER, 2000).

O eucalipto, planta originária da Austrália, foi trazido ao Brasil, adaptou-se as condições climáticas e ao solo, fatores estes altamente favoráveis para o seu desenvolvimento (VECHI; JUNIO, 2017). A diversificação do uso da madeira vem ganhando importância no cenário mundial por substituir produtos oriundos de fontes de recursos não renováveis. Utilizar materiais oriundos de fontes renováveis, como as florestas plantadas, é importante para minimizar a pressão sobre as florestas nativas e contribuir para a manutenção da qualidade de vida do planeta (JUNIOR; COLODETTE, 2013).

Desta maneira, ao longo do tempo, o eucalipto vem sendo propagado nos diversos estados brasileiros e a sua utilização passou a agregar alto valor econômico a comercialização, despertando atenção ao melhor aproveitamento da planta, pois a mesma é de rápida produção (JUNIOR; COLODETTE, 2013).

A colheita do eucalipto para madeira gera resíduos das árvores, os quais não são aproveitados pela indústria madeireira e normalmente são deixados no campo causando danos ao ambiente (libera óleos dos resíduos não permitindo que as plantas se multipliquem naquele local), além de acabar atrapalhando os produtores na continuidade do manejo do solo. Os resíduos são compostos de folhas, galhos, ápice da árvore e casca. Para que seja realizado um melhor aproveitamento, pode ser realizado a pirólise deste material, transformando em biochar (LEI; ZHANG *et al.*, 2013).

Quando se reutiliza esses resíduos para produzir biochar, ele pode atuar reduzindo a necessidade de uso de fertilizantes químicos, atuar como condicionador de solo, aumentar a produtividade, reduzir os impactos ambientais, auxiliar no aumento da microbiota do solo, e influenciar no melhor desenvolvimento das plantas (KANOUO *et al.*, 2017).

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCHAR

O termo biochar surgiu das Terras Pretas de Índio, na bacia amazônica, áreas com até dois metros de profundidade, onde o solo apresentava-se rico em carvão e matéria orgânica. A

ocorrência da terra preta somente é identificada em áreas habitadas, isso indica que provavelmente o homem é o responsável por sua criação (NEVES, 2004).

Foi constatado que o teor de carbono destes solos é de até cinco vezes maior que os solos adjacentes. A explicação para o maior acúmulo de carbono foi atribuída à riqueza do biochar em compostos poli aromáticos condensados, cujos tem resistência à degradação térmica, química e luminosa, conferindo estabilidade do carbono que foi adicionado ao solo (NOVOTNY *et al.*, 2009).

Alguns cientistas sugerem que essa terra preta era gerada através do corte para limpeza da vegetação e a queima dos resíduos posteriormente dentro de uma cova coberta. Através dessas teorias foram desenvolvidas formas de produzir o que hoje chamamos de biochar (TALBERG, 2009).

Biochar ou biocarvão é o termo adotado para toda biomassa carbonizada, produzido pela queima de matéria orgânica, como madeira e resíduos sob baixas concentrações de oxigênio, sendo sólido à base de carbono obtido por pirólise de biomassa, a mesma é composta em grande parte por compostos orgânicos, como celulose, hemicelulose e lignina (FAHMI *et al.*, 2008).

As temperaturas de pirólise geralmente empregadas variam de 300 a 1000 ° C. Durante a pirólise, a água e os compostos orgânicos da biomassa podem volatilizar, aumentando assim o conteúdo aromático. A fonte de biomassa e a temperatura de pirólise afetam as propriedades físico-químicas do biocarvão obtido. Por exemplo, a temperatura de pirólise é o principal controle na razão atômica e na composição estrutural (LIU *et al.*, 2010). Embora a biomassa bruta seja ligeiramente ácida, a pirólise em altas temperaturas aumenta sua alcalinidade (AL-WABEL *et al.*, 2017).

É um material rico em carbono (contém mais de 50% de carbono), pode aumentar o rendimento das culturas e reduzir a emissão de gases do efeito estufa (CO₂, CH₄ e N₂O), melhorar a qualidade do solo, diminuir a lixiviação de nutrientes, reduzir os requisitos de irrigação e fertilizantes, e melhorar a microbiota do solo (LI *et al.*, 2017), o biochar apresenta alteração nas propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos (BUTNAN *et al.*, 2015; OLESZCZUK *et al.*, 2014).

Atraiu a atenção da comunidade científica devido à sua aplicabilidade promissora em diferentes áreas (QIAN *et al.*, 2015). A adição de biochar pode afetar as propriedades físicas do solo através de meios indiretos e diretos (BURRELL *et al.*, 2016). Pode contribuir para aumentar o pH, corrigindo os solos ácidos, disponibilizar nutrientes, e melhorar a fertilidade do solo (LIMA *et al.*, 2015). Nas condições biológicas do solo, o biochar age influenciando a

composição, a diversidade e a atividade microbiana do solo (WANG *et al.*, 2015; PAN *et al.*, 2016).

4.2 MICRORGANISMOS DO SOLO

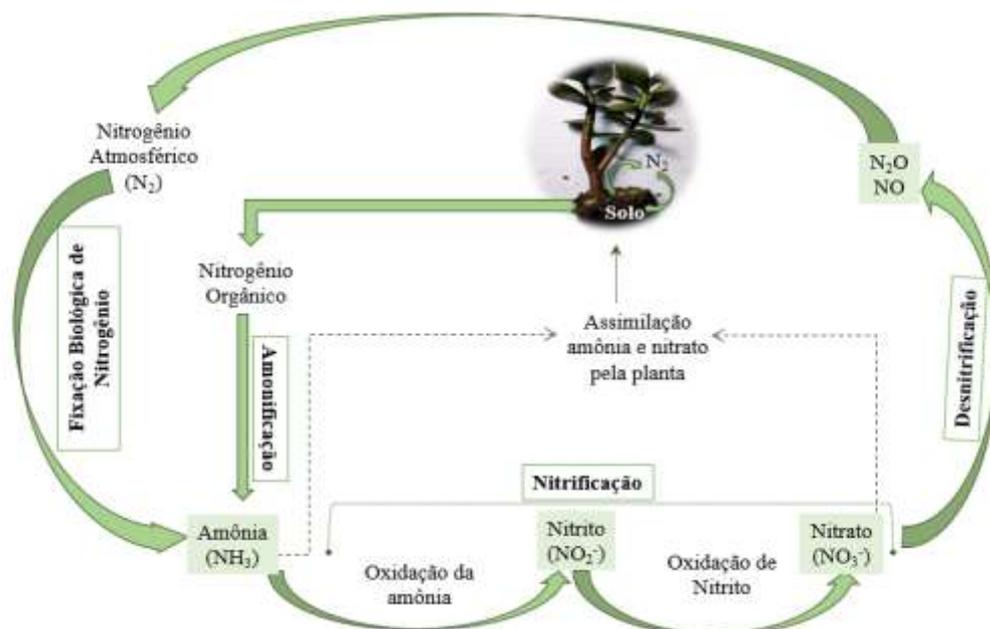
4.2.1 Ciclo do Nitrogênio

Enquanto as plantas, por meio da fotossíntese, fazem a conexão da atmosfera com o solo, os microrganismos (cerca de 70 %), são os responsáveis diretos pelo “funcionamento” do solo, participando de processos que vão desde a sua gênese até a decomposição de resíduos orgânicos, resultando na reciclagem dos nutrientes minerais utilizados pelas raízes das plantas (22%) , depositados em seus tecidos e macrofauna (8%) apresenta uma estreita inter-relação com os componentes físicos e químicos, os quais influenciam em conjunto não só a produtividade das culturas, mas também a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (MENDES *et al.*, 2019).

O nitrogênio é o nutriente mais abundante na atmosfera, correspondendo a cerca de 78% de sua fração gasosa. Contudo, em sua forma molecular (N_2), é um gás inerte que não reage quimicamente em condições naturais, não sendo prontamente assimilado pelas plantas (BACA *et al.*, 2000).

O ciclo do nitrogênio, mediado quase em sua totalidade por microrganismos, é responsável pela ciclagem desse elemento no ambiente (Figura 1). Dentre os processos microbiológicos do ciclo do nitrogênio, destacam-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN), a amonificação (transformação do N orgânico em N mineral ou inorgânico) e a nitrificação (conversão do amônio (NH_4^+) ou amônia (NH_3^+) a nitrato (NO_3^-), consideradas como uma das etapas mais importantes do ciclo do nitrogênio (VARGAS; HUNGRIA, 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; DIAS, 2016).

Figura 1: Esquema simplificado do ciclo do nitrogênio; as flechas em verde indicam o caminho do nitrogênio dentro do ciclo; as caixas em verde indicam os produtos dos processos de transformação do nitrogênio; as palavras em negrito indicam os processos de transformação do nitrogênio.



Fonte: A autora

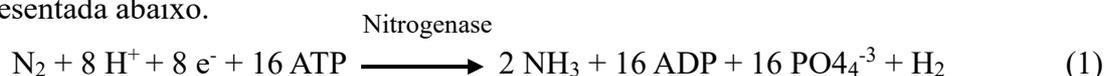
Os microrganismos são sensíveis a alterações ou perturbações feitas no solo principalmente os fixadores de nitrogênio, amonificadores e nitrificantes (INNEREBNER *et al.*, 2006; ABRIL, 2003; BIEDERBECK *et al.*, 2005).

A entrada do nitrogênio em sistemas biológicos pode ocorrer de três maneiras: por descargas elétricas (10% da contribuição global), através da produção de adubo pela indústria de fertilizantes (25% da contribuição global) ou pela fixação biológica do nitrogênio (FBN) (60% da contribuição global), sendo este processo o maior responsável pela disponibilização de nitrogênio para o solo em ecossistemas naturais (DÖBEREINER, 1992; BACA *et al.*, 2000; BALDANI; BALDANI, 2005).

As bactérias e arqueias que atuam no grupo de microrganismos do solo que realizam o processo de fixação biológica do nitrogênio, a principal entrada de nitrogênio no solo em ecossistemas naturais (VARGAS; HUNGRIA, 1997). Estes possuem a enzima nitrogenase, capaz de romper a tripla ligação ente às duas moléculas de nitrogênio, posteriormente reduzindo-as a NH_3 (forma assimilável de nitrogênio pelas plantas) (SIQUEIRA *et al.*, 1994).

As duas unidades do complexo enzimático da nitrogenase interagem cooperativamente durante o processo de FBN, onde a dinitrogenase redutase, ou Ferro proteína, é responsável

pela transferência de elétrons para que ocorra a redução do N_2 , e, em virtude de sua atividade redox, geralmente é mais sensível ao oxigênio que a dinitrogenase propriamente dita. A dinitrogenase, por sua vez, é a enzima que apresenta o sítio ativo da reação, onde são encontradas condições adequadas para a redução do N_2 (REIS; TEIXEIRA, 2006). A reação está representada abaixo.



Após a redução do N_2 à NH_3^+ , a amônia em contato com água presente no citoplasma das bactérias é rapidamente convertida em amônio (NH_4^+), que, por sua vez, inibe a fixação do nitrogênio, precisando então, ser transportada para fora da célula (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; REIS; TEIXEIRA, 2006).

As bactérias e arqueias responsáveis pelo processo de fixação biológica do nitrogênio são chamadas de diazotróficas e podem ser chamadas de bactérias associativas, que vivem na rizosfera, colmo ou dentro da planta hospedeira, podendo resultar na formação de nódulos nas raízes quando leguminosas, ou de vida livre, podendo sobreviver livremente no solo e colonizar a rizosfera, ou o interior e superfície das plantas (EVANS; BURRIS, 1992). Sendo as bactérias diazotróficas de vida livre as mais abundantes e também as primeiras a serem reconhecidas e estudadas.

Os microrganismos do solo estão envolvidos em diferentes processos, na decomposição de matéria orgânica, fixação biológica de N, ação antagônica a patógenos, produção de substâncias de crescimento e ciclagem de nutrientes (MELO *et al.*, 2014).

A entrada de matéria orgânica no solo institui um ambiente favorável para a atividade microbiana (BALOTA; CHAVES, 2011). As bactérias que participam ativamente do ciclo do nitrogênio, exercem um importante papel na decomposição de matéria orgânica que pode estar presente nos restos vegetais e animais depositados na superfície ou perfil do solo (serapilheira, biomassa, húmus, matéria orgânica, etc.), e na forma inorgânica através do nitrogênio gasoso N_2 contido na atmosfera, óxido nitroso (N_2O), amônia (NH_3^-) ou na forma de íons (NO_3^- , NO_2^- , e NH_4^+ , etc.) (BRANDÃO, 1992).

Na forma orgânica existem bactérias que atuam na transformação do N orgânico em N mineral (inorgânico), processo também denominado de amonificação, o amônio, resultante do processo é o substrato para o processo de nitrificação (OCHOA *et al.*, 2015).

A amonificação é o processo de desaminação de compostos orgânicos nitrogenados ($R-N_2 \rightarrow NH_4^+$), onde, pelo processo de decomposição ou como resíduo da fixação biológica de nitrogênio, ocorre a liberação de amônia (NH_3^-). Ao entrar em contato com a água do solo

a amônia forma hidróxido de amônio que, ao ser ionizado produz amônio (NH_4^+), tornando-se prontamente assimilável pelas plantas (FAGERIA *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2018). A predominância de amônio ou amônia depende da faixa de pH do meio, sendo as faixas de pH mais ácido favorável a síntese de amônio enquanto faixas de pH mais básico favorecem a síntese de amônia (DIAS, 2016).

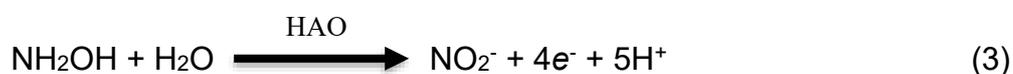
O processo de amonificação pode ser realizado por uma diversa gama de microrganismos, sendo o amônio resultante da reação substrato para o processo de nitrificação, iniciado por um grupo específico de bactérias e arqueias, denominadas bactérias oxidantes de amônio (AOB) e arqueias oxidantes de amônia (AOA) respectivamente (OCHOA *et al.*, 2015).

O amônio pode ficar retido no biochar, quando os microrganismos amonificadores se encontram em simbiose com o mesmo, assim pode ser absorvido pelas plantas ou por outros microrganismos do solo e (VICTORIA *et al.*, 1992) em condições ambientais específicas, também pode ser lixiviado pela água que percola no perfil do solo (TRIVELIN *et al.*, 2002).

Tendo em vista a importância ambiental desses microrganismos, torna-se relevante a sua quantificação, principalmente no monitoramento de sistemas biológicos de tratamento desenvolvidos para promover a nitrificação (RAIJ, 2011; OCHOA *et al.*, 2015).

A nitrificação ocorre principalmente nas camadas mais superficiais dos solos, já que as bactérias e Arqueas oxidantes de amônio necessitam de oxigênio para sua respiração, consequentemente há uma limitação do processo em solos ricos em argila e com maior grau de compactação (DIAS, 2016).

A nitrificação é mediada por um grupo de microrganismos denominados bactérias oxidantes de amônio (AOB), pertencente principalmente aos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitosolobus* e *Nitrosobrio*, catalisada pelas enzimas amônia monoxigenase (AMO), responsável pela conversão da NH_4^+ em hidroxilamina (NH_2OH) e hidroxilamina oxireductase (HAO), responsável pela oxidação da hidroxilamina a nitrito (Equações 2 e 3 respectivamente) (ANDRADE, HAMAKAWA; MIYAZAWA, 1994; FAGERIA, 2014; MORO *et al.*, 2016).



A enzima amônia monoxigenase também é capaz de oxidar uma variedade de outros compostos de baixo peso molecular como fenol, metanol e compostos halogênicos e alifáticos (PAUL, 2014).

As arqueias oxidantes de amônio (AOA) possuem genes homólogos a amônia monoxigenase, apresentando um importante papel no processo de nitrificação em ambientes terrestres e aquáticos (OCHOA *et al.*, 2015). Sendo que as AOA tem capacidade de crescer tanto em ambientes com baixa quanto em alta concentração de amônia, enquanto as AOB demonstram melhor capacidade de crescimento em ambientes com alta concentração de amônia, indicando uma maior afinidade das AOA a amônia em relação as AOB (VERHAMME *et al.*, 2011; OCHOA, *et al.*, 2015).

Já a nitratação é mediada por bactérias oxidantes de nitrato (NOB), exclusivas do gênero *Nitrobacter*, através da enzima nitrito oxireductase, responsável pela oxidação do nitrito a nitrato (Equação 4). O nitrato é uma das principais formas de nitrogênio assimilável pelas plantas, sendo também a forma mais móvel de N inorgânico no solo (PAUL, 2014; OCHOA *et al.*, 2015).



A nitratação é uma conversão que ocorre rapidamente, assim, raramente ocorre acúmulo de nitrito no solo (ANDRADE, HAMAKAWA; MIYAZAWA, 1994; MORO *et al.*, 2016).

4.2.2 Ciclo do Carbono

Estudos com doses de biochar indicam aumento da fertilidade do solo e manutenção ou favorecimento da vida microbiológica do mesmo (SANTOS, 2013). Manyá (2012) afirma que o biochar tende a elevar a área superficial específica e porosidade podendo favorecer a capacidade de sorção e aumentando a biomassa microbiana do solo.

De acordo com Mechri e colaboradores (2014) as mudanças na biomassa microbiana do solo podem ser atribuídas ao fato de que alguns ácidos fenólicos podem ligar-se a uma fonte de carbono adicional, que estimula o crescimento da microbiota do solo. A biomassa microbiana de um solo são excelentes indicadores de fertilidade, porque eles respondem ativamente e diretamente a alterações no solo e o meio ambiente, particularmente o efeito de sistemas de produção (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2006).

O biochar tem efeitos variáveis em diferentes solos, por isso, os microrganismos são catalisadores que desempenham um papel importante na modulação das respostas dos

ecossistemas às mudanças abióticas (no estado nutricional do solo ou na qualidade da matéria orgânica do solo) e condições bióticas (WANG *et al.*, 2015).

A respiração do solo é muito sensível às mudanças ambientais porque pode ser afetada por uma variedade de fatores, como temperatura do solo, umidade do solo (DAVIDSON *et al.*, 1998), comunidade microbiana, serrapilheira superficial e tipos de vegetação (YAN *et al.*, 2006; FEKETE *et al.* 2014). Uma pequena mudança na respiração do solo pode ter impactos profundos sobre o balanço global C e consequentes feedbacks às mudanças climáticas (DAVIDSON; JANSSENS, 2006). Portanto, mensuração da respiração do solo em resposta a mudanças ambientais torna-se relevante como fonte de informações sobre a influência do uso da terra na atividade microbiana (FEKETE *et al.*, 2014).

Características microbiológicas, abundância e atividade de microrganismos são geralmente utilizados como indicadores de fertilidade do solo e sustentabilidade, tentando explicar a multifuncionalidade dos organismos que são sensíveis a impactos produzidos no solo (OCDE, 2001).

A glomalina é uma glicoproteína de natureza hidrofóbica e recalcitrante. Sua presença no solo favorece a estabilidade de agregados, o sequestro de metais pesados, e o estoque de C e N. Ela atua como agente cimentante na formação e estabilidade de agregados (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998) o que contribui com melhorias nos aspectos físicos, químicos e biológicos do solo melhorando a porosidade, a capacidade de infiltração e retenção de água, os teores de matéria orgânica (RILLIG *et al.*, 1999). Conhecer os estoques de glomalina em diferentes ecossistemas pode ajudar a compreender melhor sua dinâmica (SOUSA *et al.*, 2012) e suas relações com a estabilidade dos agregados e com os estoques de carbono do solo, principalmente em solos pouco desenvolvidos.

A formação e estabilização dos agregados estão também ligados à ação dos fungos que através do crescimento de hifas e secreção de substâncias, em especial a glomalina, contribui nesse processo. As comunidades de fungos micorrízicos arbusculares (FMA's) organismos que influenciam na produção de glomalina e consequentemente nas concentrações de carbono no solo (NOBRE, 2014).

4.2.3 Enzimas do Solo

Os processos biogeoquímicos, que resultam na ciclagem de nutrientes, são mediados pelos microrganismos, raízes das plantas e animais do solo. Todas as reações bioquímicas envolvidas nesses processos são catalisadas por enzimas intra ou extracelulares

(TABATABAI, 1994). As enzimas catalisam todas as reações metabólicas intracelulares que ocorrem nos seres vivos. Além disso, as enzimas extracelulares desempenham papel fundamental, atuando em várias reações hidrolíticas e oxidativas que resultam na decomposição de resíduos orgânicos (ligninases, celulases, proteases, glucosidases, galactosidases), ciclagem de nutrientes (fosfatases, sulfatases, urease), formação da matéria orgânica do solo e da estrutura do solo (MENDES *et al.*, 2019).

O impacto do biochar na atividade enzimática do solo depende do tipo de solo, da sua interação com os substratos alvos das enzimas, do pH ideal da enzima alvo (BAILEY *et al.*, 2011). Por sua vez, o efeito do pH depende da composição química do resíduo, que também pode influenciar os nutrientes do solo (FOSTER *et al.*, 2016).

O biochar possui potencial de neutralização da acidez do solo, tornando o meio propício para os microrganismos e também favorece o aumento de carbono orgânico. Assim melhora a retenção de nutrientes que se tornam acessíveis aos microrganismos na superfície da partícula do solo (LEHMANN *et al.*, 2011).

A atividade enzimática do solo é um bom indicador de sua qualidade porque é sensível a alterações. As enzimas como β -glucosidase e urease podem ser consideradas como um indicador de qualquer perturbação no solo e desempenham um papel importante na transformação de carbono e outros nutrientes (JAIN *et al.*, 2016).

A enzima β -glucosidase hidrolisa os resíduos da celobiose, atuando no processo final da decomposição da celulose (EIVAZI; TABATABAI, 1988); podem ser indicadores sensíveis a irrigação do solo, as condições de temperatura e de umidade, sendo sensíveis a impactos no solo. O aumento da enzima β -glucosidase acompanha o incremento da matéria orgânica do solo (MOS), quando a MOS começa a se consolidar em materiais mais recalcitrantes e estáveis, os microrganismos podem se multiplicar (ABRIL *et al.*, 2005; PAUL; CLARK, 1989, ABRIL, 2003, BIEDERBECK *et al.*, 2005).

A urease, outro importante indicador enzimático de qualidade do solo, participa da mineralização do nitrogênio, um dos principais nutrientes exigidos pelas plantas. Esta é uma enzima que realiza a hidrólise da uréia em dióxido de carbono e amônia (TABATABAI; BREMNER, 1972).

Portanto, a utilização e estudo sobre a influência do biochar nas culturas e seu desempenho no solo são de extrema importância, onde objetiva-se alta produtividade agredindo o mínimo possível o meio ambiente. O estudo dos efeitos do biochar sobre as propriedades microbianas do solo é de fundamental importância, uma vez que essa é uma

variável sensível as mudanças do meio e é indicadora da qualidade do solo (KHADEM; RAIESI, 2017).

As relações de diversidade microbiana nos solos com biochar também foram pouco abordados, porém estudos têm mostrado que ambas as técnicas tradicionais de isolamento de microrganismos do solo, como também técnicas moleculares independentes de cultivo, que possibilitam o melhor acesso a diversidade microbiana no solo (CHEN *et al.*, 2013; NAVARRETE *et al.*, 2010).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto de dissertação está vinculado ao projeto de pesquisa “Biochar em solos sob plantio de eucalipto: aspectos agrônômicos e ambientais” vinculado ao contrato de parceria técnica Campos Verdes Agroflorestal/Embrapa - Biochar - SAIC/AJU n° 21500.16/0145-6, projeto co-Financiado na Embrapa 33.17.00.031.00.00 (código no Sistema Embrapa de Gestão), que foi inicialmente coordenado pela Claudia Maia e atualmente pela Lucília. A empresa Campos Verde Agroflorestal que é associada ao Grupo SLB (<http://www.slbgrupe.com>), do qual faz parte a SLB do Brasil.

5.1 ÁREA EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado na Fazenda Esperança, propriedade da Urophylla Agroflorestal Ltda, associada à SLB do Brasil, localizada em São Jerônimo da Serra, Paraná, 23°47'33" S 50° 39' 16" W, em altitude média de 1.116 metros. A área apresenta um relevo variando de plano (0% a 3% de declividade), suave ondulado (3% a 6% de declividade) e suave ondulado a ondulado (6% a 10% de declividade) (figura 2).

O clima na região é classificado como Cfb, segundo Köppen, quente e temperado. A temperatura média é 17,9 °C e a pluviosidade média anual de 1442 mm.

Figura 2: Vista aérea da área experimental de estudo (delimitada pela caixa vermelha).



Fonte: Google Earth.

O solo é um Latossolo Vermelho- Amarelo, distrófico típico, de textura argilosa, (DOS SANTOS *et al.*, 2018), com horizonte A úmido. Antes do plantio de eucalipto, a área encontrava-se mantida com o cultivo de Braquiária (*Brachiaria* spp) para fins de pastejo.

5.2 ADUBAÇÃO E PLANTIO

Para caracterização química inicial da área, coletaram-se 48 amostras indeformadas na camada de 0-10, 10-20, e 20-40 cm ao longo do relevo. Baseado nos resultados de análise química do solo (Tabela 1) calculou-se a calagem para eucalipto através do seguinte procedimento (GONÇALVES, 1995): $10\{[20-(Ca+Mg)]/PRNT\}$, em T/ ha⁻¹. Sendo Ca+ Mg, dados em mmol_c/dm³ solo. Obteve-se a média de 1,625 cmol_c/dm³ de Ca+Mg, para a camada 0-20 cm, ou 16,25 mmol_c/dm³. Considerando um PRNT de 100%, chegou-se a: $10\{[20-(16,25) / 100]\} = 375 \text{ kg/ ha}^{-1}$, a ser incorporado na camada 0-20 cm.

Tabela 1: Análise química de rotina e análise granulométrica de amostras da área experimental. pH= Potencial hidrogeniônico; Ca²⁺=Cálcio; Mg²⁺= Magnésio; Al³⁺= Alumínio; K⁺=Potássio; H+Al=acidez potencial; P= fósforo.

Prof. (cm)	pH		Al ³⁺ mg dm ⁻³	H + Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	T	Areia	Argila	Silte
	CaCl ₂	SMP									
0-10	4,2	5,1	2,4	11,5	1,4	0,5	0,3	13,7	518	326	156
10-20	4,2	5,0	2,3	11,9	1,0	0,3	0,2	13,4	509	358	133
20-40	4,1	5,0	2,8	12,3	0,7	0,1	0,1	13,2	482	374	144

A adubação foi feita com auxílio de matraca. Três doses de adubo NPK foram adotadas: zero; 120 g por árvore (dose de adubação reduzida) e 150 g por árvore (dose de adubação completa) distribuídas em duas covas de 60 ou 75 g cada, a 10 cm da muda, no sentido da linha. O adubo usado foi NPK 4:42:6, composto de mono-amônio fosfato (MAP), superfosfato simples e cloreto de potássio. As mudas de eucalipto (clone 144 do híbrido *E. urograndis*) foram transplantadas no sistema rocambole no dia sete de novembro de 2017.

5.3 APLICAÇÃO DE BIOCHAR

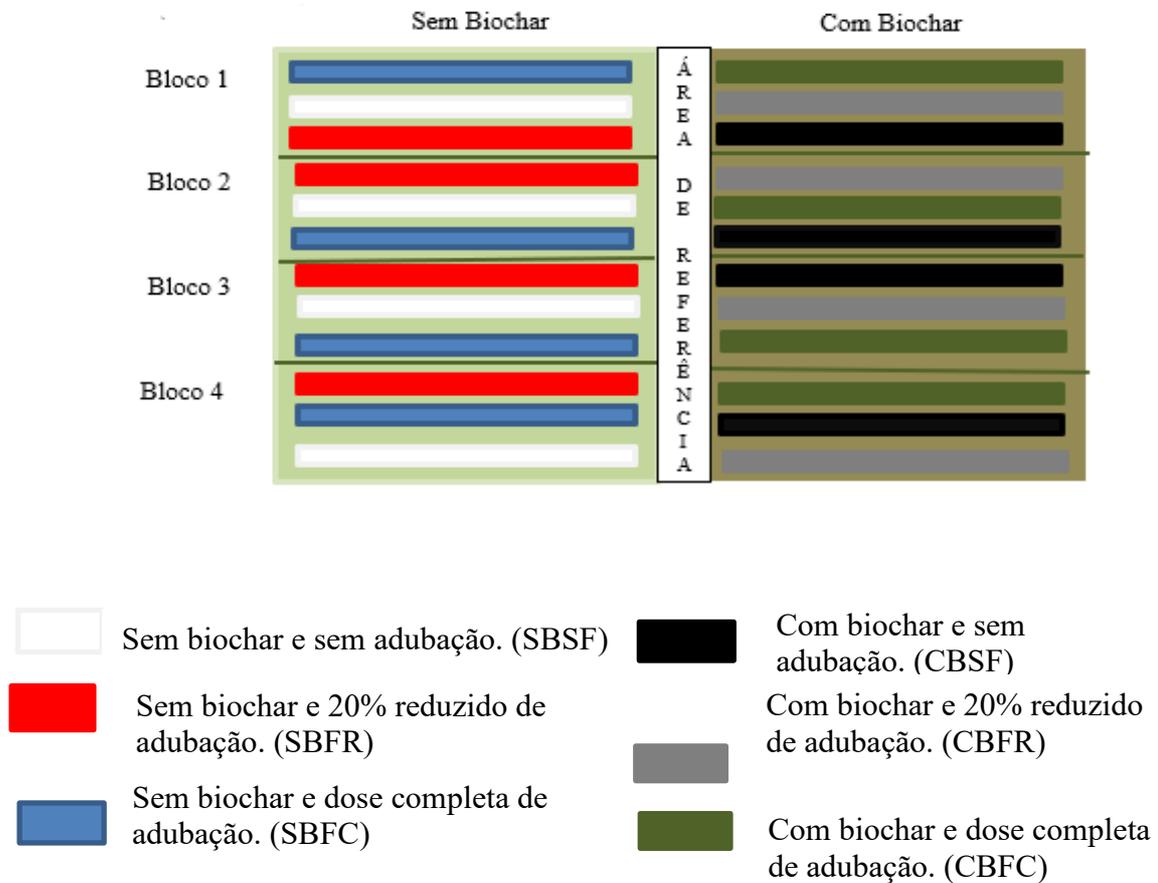
O biochar foi produzido a partir de pequenos cavacos de eucalipto, da madeira de debaste de quatro anos de florestas de eucalipto, pirolisada lentamente, em pirolizador SuperChar 1000, Carbon Gold®, na temperatura de 450 °C durante 8 horas. O biochar apresentou 0,16 Mg m⁻³ de densidade, 1,57 Mg m⁻³ de densidade de partícula. O biochar apresenta os seguintes compostos: 8,34% Cinzas (base seca); 3,63 % Umidade; e 27,75% de material volátil. O pH CaCl₂ foi de 6,14. O material foi moído até obter tamanho de partículas menores que 10 mm.

Na data de 10 de outubro de 2017, o biochar foi aplicado a lanço na superfície do solo, em uma faixa de 1,0 m, estando a linha de plantio no centro desta faixa e em 16 de outubro de 2017 incorporou-se o biochar ao solo, na profundidade de 0,15m, com duas passagens de grade de disco ajustada na largura de 1 metro. Cada planta de eucalipto recebeu a aplicação de 1 kg de biochar, resultando em 9 kg aplicados por sulco de plantio. A dose de biochar utilizada para todo o experimento foi de 3,23 Mg ha⁻¹.

5.4 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental instalado foi em blocos casualizados em parcelas subdivididas, com esquema fatorial 2x3 sendo com e sem biochar e foram estabelecidos três tratamentos: sem fertilizante; dose de fertilizante reduzida em 20% e dose de fertilizante comercial completa. O experimento foi dividido em parcelas variando os tratamentos: com aplicação de biochar na dose de 3,23 Mg ha⁻¹ (B1) e sem aplicação de biochar (B0). Os tratamentos secundários foram: sem adubação (F0), adubação completa (150 g planta⁻¹ de 04-42-06 de NPK aos 15 dias da cultura do eucalipto (F2), 200g planta⁻¹ de 15-05-30 de NPK + 1% de B e Zn aos 90 dias e 110 g planta⁻¹ de KCl aos 9 meses) e adubação reduzida (uso de apenas 80% da adubação completa) (F1). Contendo 4 blocos, sendo 6 parcelas por bloco, totalizando 24 parcelas experimentais (Figura 4).

Figura 3: Layout do experimento.



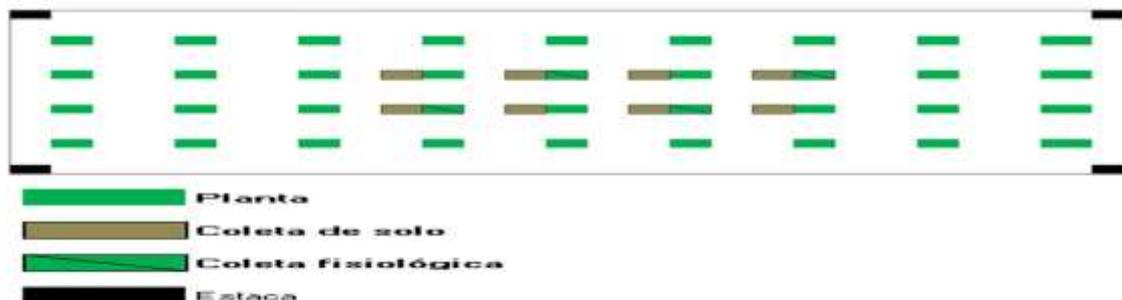
As parcelas são formadas por 4 linhas de plantio contendo nove árvores definitivas e oito mudas que foram temporárias, que foram retiradas aos 3 meses de idade para avaliação de raízes e coleta de solo rizosférico.

O espaçamento entrelinhas foi de 3 m e entre mudas 1,5 m, sendo que o espaçamento entre mudas definitivas é de 3 m. Todas as parcelas foram totalmente cercadas por uma linha de bordadura.

5.5 AVALIAÇÕES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS

Foram realizadas três coletas de solo (tabela 2), utilizado para a amostragem de solo as linhas centrais de plantio, especificamente nas 8 plantas centrais (figura 4) e 8 pontos em zigue-zague aleatoriamente na parcela, próximo às mudas de eucaliptos, sendo coletadas com o trado holandês (0- 10 cm), oito amostras simples dentro de cada parcela para formar uma amostra composta. Posteriormente acondicionado em caixa térmica com gelo até a chegada ao Laboratório de Biologia Molecular Microbiologia (SULEIMAN *et al.*, 2013). O solo foi então peneirado, em peneira de 2 mm para remoção de raízes.

Figura 4: Croqui coleta de solo microbiológico, o solo amostrado em zigue – zague, com 8 pontos aleatórios próximos as plantas. Solo das 8 plantas centrais como demonstra o croqui usado a cima pela equipe da UEPG, sendo as 8 plantas centrais das 2 linhas centrais, com marcação em marrom. O retângulo representa o limite da parcela.



5.5.1 Avaliações Biológicas

Foram determinadas as atividades das enzimas relacionadas com o ciclo biogeoquímico do carbono, nitrogênio, denominadas β -glucosidase e Urease, respectivamente, assim como quantificado o carbono da biomassa microbiana, a respiração basal e a glomalina, além do número mais provável dos amonificadores, oxidantes de nitrito e fixação biológica de nitrogênio. Tais análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Microbiana (LABMOM) da UEPG, e no Laboratório de Microbiologia do solo da Embrapa Florestas.

5.5.1.1 Determinação da atividade enzimática da urease

Determinada segundo método descrito por Kandeler e Gerber (1988). Após acondicionar 5g de solo em frascos (Frascos de 50 mL) com tampa, foi adicionado 2,5 mL de solução de ureia ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) ou 2,5mL de água destilada no caso do tubo branco. Posteriormente, foi adicionado 20 mL de tampão borato (pH 10) (30g de tetraborato de-sódio (livre de água) – ajuste de pH com NaOH (20%)). Após incubação das amostras a 37°C por 2 horas, a reação foi interrompida pela adição de 30 mL da solução de KCl acidificado (1M) (74,6g de KCl em 300 mL de água destilada e adicionado 10 mL de 1M HCl (32% HCl = 10 M) / 1000 mL) e agitado por 30 minutos a $25^\circ\text{C} - 28^\circ\text{C}$.

Imediatamente após adicionar a solução do KCl (1M) no branco, adicionou -se 2,5 mL da solução de ureia. Após a agitação alíquotas de 1,4 mL da suspensão de solo foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas a 22.000 G-force/100mm por 10 min. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi retirado e misturado com 9 mL de água destilada, 5 mL da solução salicilato (5%) / nitroprussiato de sódio (0,1%) / hidróxido de sódio (0,12%) e

2 ml da solução de dicloroisocianúrico de sódio (0,1%), deixando 1 hora em repouso em temperatura ambiente. Então, mediu-se a densidade ótica a 690 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. Todas as análises foram feitas em triplicata biológica.

Para a curva de calibração realizada em um tubo de ensaio de vidro, foi preparada uma solução estoque de 100 $\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$, a partir da adição de 1 mL da solução de cloreto de amônio (1000 $\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$) a 9 ml da solução de KCl (1M). Essa solução foi diluída 10X, resultando na solução que foi usada para elaborar a curva de calibração apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Curva de calibração para determinação da concentração de amônio.

Concentração de $\text{NH}_4\text{-N}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cloreto de amônio (10 $\mu\text{g NH}_4\text{-N mL}^{-1}$) (mL)	Água destilada (mL)
0,00	0	9,00*
0,50	0,5	9,50
1,00	1,0	9,00
1,25	1,25	8,75
1,50	1,50	8,50
1,75	1,75	8,25
2,00	2,00	8,00

*Adiciona 1 mL da solução de KCl (1M) para atingir o volume final de 10mL.

A cada diluição foi adicionado os 5 mL da solução salicilato (5%) / nitroprussiato de sódio (0,1%) / hidróxido de sódio (0,12%) (1:1:1) e 2 mL da solução de dicloroisocianúrico (0,1%) deixando 1 hora em repouso em temperatura ambiente. Fez-se a leitura como mencionado para as amostras.

Para calcular a atividade da enzima urease, baseada na determinação da reação: $(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_4$ (N amoniacal), foi aplicada a seguinte formula:

$$\mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1} \text{ seco h}^{-1} = \frac{((A - B) / F) \times V \times D}{M \times ms} \quad (5)$$

A = absorvância da amostra

B = absorvância do padrão (branco)

F = equação da reta (coeficiente angular)

V= volume da amostra/ reagentes

D = fator de diluição geralmente é 10x

M = peso do solo analisado (5g)

ms (massa seca) = fator da matéria seca (umidade).

5.5.2 Determinação da Enzima Beta -Glucosidase

A atividade da enzima Beta -Glucosidase foi determinada seguindo a metodologia descrita por Tabatabai (1982) e adaptada por Eivazi e Tabatabai (1988). Essa baseia-se na determinação do p-nitrofenol liberado após incubação do solo com substrato p-nitrofenil glucosidade. Um grama de solo (livre de resíduos orgânicos) foi colocado num frasco de 50 mL, seguido de 4 mL de MUB a pH 6.0 (MUB = 12.1g de THAM (Tris (hydrxymethyl) aminomethan), 11.6g de ácido maleico, 14.0g de - ácido cítrico monohidratado, 6.3g de ácido bórico, 488 mL de hidróxido de sódio (1M), completando para 1000mL com água destilada).

Posteriormente 2,0 mL de para-nitrofenol (PNG, 0,1 %), foi adicionado a todos os frascos excetos nos controles (branco) e o frasco incubado por uma hora a 37° C com tampas de borracha (para evitar evaporação). Então foi adicionado 1 mL de CaCl₂ (0,5 M) e 4 mL de THAM (12.2 g de Tris-Hydroxymethyl-Amino-Metano (THAM) em 1000 mL de água destilada, ajustando o pH para 12, com NaOH 0.5M (aproximadamente 15 mL)) a pH 12. Por fim, 1 mL de PNG foi adicionado aos controles, e as amostras foram filtradas usando papel de filtro Whatman nº. 2. A leitura da densidade óptica foi feita a 420 nm no espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. Diluições foram realizadas em água destilada, quando necessário.

Para calcular a atividade da enzima beta – glucosidase, a qual catalisa a seguinte reação:

Glicosídeo-R + H₂O -> glicose + R-OH, foi aplicada a seguinte formula:

$$\mu\text{g p-nitrofenol /g x h} = \frac{(A - B) \times F \times D}{M \times \text{ms}} \quad (6)$$

A = absorvância da amostra

B = absorvância do padrão (branco)

F = equação da reta (coeficiente angular)

D = fator de diluição geralmente é 10x

M = peso do solo analisado (1g)

ms (massa seca) = fator da matéria seca (umidade).

Obs.: Para cada amostra foi realizado 3 repetições biológicas mais o controle.

Para a curva padrão da beta -glucosidase, foi preparado a solução estoque de p-nitrofenol (para-nitrofenol), dissolvendo 5 g de p-nitrofenol (Sigma 104-8) em 500 mL de H₂O destilada, armazenado sempre em geladeira a solução. Para preparar a curva foi então diluído 1mL da solução estoque padrão em 100 mL de água destilada num balão volumétrico (= “Solução padrão diluída”), a partir dela pipete-se alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL da “solução padrão diluída” em erlenmeyers de 50 mL, completando com água destilada para 5mL (explicando melhor a preparação da curva tabela 3) e procede como se fosse uma

amostra de solo, ou seja adiciona 1 mL de $\text{CaCl}_2 0.5\text{M}$; 4mL de NaOH, mistura e filtra. Essas alíquotas representarão 0, 10, 20, 30 40 e 50 ug de p-nitrofenol.

Tabela 3: Curva de calibração para determinação da concentração de p-nitrofenol.

Concentração (ug de p-nitrofenol)	mL de água	mL de solução padrão diluída	CaCl_2 (mL)	NaOH (mL)
0	5	0	1	4
10	4	1	1	4
20	3	2	1	4
30	2	3	1	4
40	1	4	1	4
50	0	5	1	4

** Observação importante: Se as amostras excederem o ponto da curva padrão referente a 50 ppm (ug/l), as amostras devem ser diluídas preferencialmente com THAM 0.1 M, pH=10 ou com água destilada, até que a leitura caia dentro dos limites da curva de calibração.

5.2.3 Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana (BMC)

Para a determinação do carbono da biomassa microbiana do solo utilizou-se adaptação da metodologia de fumigação-extração proposta por Vance e colaboradores (1987). O processo de fumigação consistiu em incubar 20 g de solo úmido das amostras em dessecador ligado a bomba a vácuo, sob atmosfera de clorofórmio, retirando-se o ar do interior do dessecador com auxílio de uma bomba de vácuo, repetindo esta operação até a percepção do borbulhamento dos 50 mL de clorofórmio. Após 18 horas de fumigação no escuro, as amostras fumigadas e não fumigadas segue-se o mesmo procedimento das amostras fumigadas, apenas foi substituído o clorofórmio por água destilada no dessecador, após seguiram para o processo de extração. Para tal, foram adicionados 20 mL da solução de K_2SO_4 (0,5 M) com pH ajustado para 6,5–6,8 e os frascos foram agitados por uma hora em agitador horizontal a 220 rpm. Um volume de 20 mL de cada amostra foi transferido para tubos Falcon os quais foram centrifugados por 8 minutos a 448 G- Force/100mm. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo e armazenado em freezer -20 C°.

Os extratos filtrados foram utilizados para determinação do carbono microbiano por titulação. Sendo assim, 8 mL do extrato ou 8 mL da água (no caso do branco) foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida foi adicionado 2 mL de dicromato de potássio (66mM) (para oxidar o carbono), 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (para auxiliar na reação de oxidação).

Depois de resfriado em capela (em torno de 30 min) foi adicionado 40 mL de ácido orto-fosfórico (6,25%), 3 gotas de difenilamina (1%) diluída em ácido sulfúrico concentrado.

A titulação foi feita com sulfato ferroso amoniacal (33 mM), a partir da mudança de coloração de violeta para verde.

No método de fumigação-extração ocorre a liberação do carbono microbiano no solo pelo rompimento da parede celular dos microrganismos após a morte. O carbono microbiano é recuperado pela extração química na presença de sulfato de potássio, e posterior reação de oxidação do dicromato de potássio em meio ácido com sulfato ferroso amoniacal. O excesso de dicromato é titulado com o sulfato ferroso amoniacal, determinando a quantidade de dicromato utilizada na oxidação, assim, indiretamente a quantidade de carbono extraída (JENKINSON; POWLSON, 1976; SPARLING; WEST, 1988).

Cálculo da concentração do Carbono extraído foi determinado pela fórmula:

$$\text{BMC (ug C/g solo)} = \frac{(V_2 - V_1) \times M \times 0,003 \times 20 \times 10^6 \times F}{8 \times \text{ms}} \quad (7)$$

Onde:

BMC = Carbono da biomassa microbiana

V_2 = volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do controle (branco);

V_1 = volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra;

M = concentração molar do sulfato ferroso amoniacal 0,033 M;

20 = volume da solução extratora de K_2SO_4 0,5M (20mL);

0,003 = número de equivalentes – gramas (meq ou Eq) do C;

8 = alíquota titulada do extrato 8mL;

10^6 = conversão da unidade g para ug;

ms = massa de solo seco;

F = fator de padronização do sulfato ferroso amoniacal.

5.2.4 Respiração Basal e Quociente Metabólico

A taxa respiração basal é estimada através da quantificação do CO_2 liberado do solo durante um período de 7 dias de incubação, utilizando a metodologia proposta por Silva e colaboradores (2007). Amostras de 50 g de solo foram colocadas em recipientes de vidro de 500 mL (frascos de conserva) hermeticamente fechados e, mantidas em estufa com temperatura entre 28°C e 25°C. O CO_2 liberado foi capturado por 20 mL de uma solução de NaOH (1 M). Após 7 dias de incubação, o NaOH 1 M foi quantificado por titulação com solução de HCl (0,5 M), sendo adicionado imediatamente antes 2 mL de BaCl_2 10% (m/v), para impedir que o Na_2CO_3 formado através do processo de respiração seja desdobrado em NaOH + CO_2 . Posteriormente, foram acrescentadas três gotas de indicador ácido/base fenolftaleína 1% (m/v) em etanol, realizando a titulação. Os dados da respiração basal do solo foram obtidos através da seguinte fórmula:

$$\text{RBS (mg C de CO}_2 \text{ Kg}^{-1} \text{ solo hora}^{-1}) = \{[\text{Vb} - \text{Va}] \times \text{M} \times 6 \times 1000\} / \text{Ms} / \text{T} \quad (8)$$

RBS= carbono oriundo da respiração basal do solo;

Vb (mL) = volume de ácido clorídrico gasto na titulação dos brancos;

Va (mL) = volume de ácido clorídrico gasto na titulação das amostras;

M = molaridade exata do ácido clorídrico; (5 M HCl);

Ms (g) = massa de solo seco;

T = tempo de incubação das amostras em horas.

Para a determinação do cálculo do quociente metabólico do solo ($q\text{CO}_2$) da respiração basal do solo usou – se a fórmula abaixo:

$$q\text{CO}_2(\text{mg C - CO}_2\text{- g}^{-1} \text{BMS - C.h}^{-1}) = \frac{\text{RBS (mg C de CO}_2 \text{ Kg}^{-1} \text{ solo hora}^{-1})}{\text{BMC (mg C. kg}^{-1} \text{ solo). } 10^{-3}} \quad (9)$$

$q\text{CO}_2$ = Quociente metabólico do solo;

RBS = Respiração basal do solo;

CBM= Carbono da biomassa microbiana.

5.2.5 Determinação de Glomalina no Solo

A extração de glomalina facilmente extraível foi realizada seguindo a metodologia adaptada de Wright e Upadhyaya (1998) Amostras de 1 g de solo foram colocadas em tubos Falcon com capacidade para 15 mL e esses foram autoclavados por 30 minutos a 121°C após a adição de 8 mL de citrato de sódio (20 mM, pH 7). Ainda quentes, os tubos foram centrifugados a 1798 G-Force/100mm por 20 minutos, e o sobrenadante coletado.

A extração da glomalina total foi realizada seguindo a metodologia de Wright e Upadhyaya (1998) adaptada. Amostras de 1 g de solo foram colocadas em tubos Falcon com capacidade para 15 mL e esses foram autoclavados por 60 minutos a 121°C após a adição de 8 mL de citrato de sódio (50 mM, pH 8). Esse procedimento foi repetido 4 a 6 vezes até a solução atingisse coloração clara, ou seja, após a coleta do sobrenadante, ao solo precipitado foi adicionado citrato de sódio novamente e o tubo centrifugado.

A quantidade de glomalina foi determinada pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976), usando soro albumina bovina como padrão e a leitura feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm espectrofotômetro Metash– UV VIS 5100.

Para a curva padrão da glomalina utilizasse reativo de Bradford[] (BRADFORD, 1976), o qual foi dissolvido 50 mg de Coomassie Brilliant – Blue G250 em 25 mL de etanol a 95%, adicionado 50 mL de ácido fosfórico concentrado(P.A) (em capela), e completado com

água destilada suficiente para 100 mL, sendo está a solução estoque mantida em frasco âmbar a -4°C , para uso, foi realizado a diluição (1:5) em balão volumétrico completando com água destilada. Para simular a concentração da glomalina extraída, utilizasse PBS doubeccos 0,0015 M/L pH 7,3 (5 g de cloreto de sódio; 0,2g de cloreto de potássio, 1,15g fosfato de sódio, 0,2g de fosfato de potássio) e BSA (soro albumina bovina) 1 mg/mL. Para montar a curva adicionou 1 mL de PBS nos 6 frascos que constitui a curva e fizemos a diluição sucessiva de BSA (1mL), (Tabela 4).

Tabela 4: Curva Padrão de Soro Albumina Bovina.

Tubos	PBS	Padrão BSA 1 mg /mL	[] dos tubos
	(mL)	(mL)	mg/mL
B	1	-	-
1	1	1,0	500
2	1	1,0 do tubo 1	250
3	1	1,0 do tubo 2	125
4	1	1,0 do tubo 3	62,5
5	1	1,0 do tubo 4	31,5

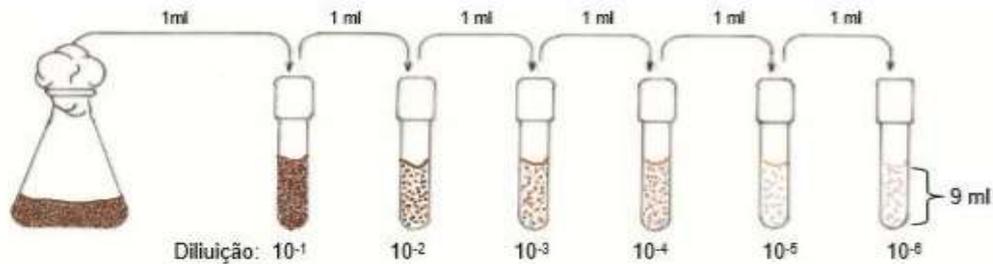
Após a diluição retirava-se 300 uL de cada tubo, adicionando em outro tubo de ensaio com 3 mL reativo de Bradford, homogeneiza e aguarda por 5 minutos para poder fazer a leitura como realizado nas amostras.

5.5.6 Diluição Seriada

Para realização da diluição seriada 10 g de cada amostra foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) e agitados em agitador orbital por 20 minutos a 200 rpm.

Em seguida, foi realizada uma diluição seriada transferindo-se 1 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) (diluição 10^{-2}), agitado em vórtex por 30 segundos, dando continuidade ao processo até a diluição 10^{-6} , (Figura 5).

Figura 5: Esquema da diluição seriada.



Fonte: Adaptado de CASAL et al., 2004.

5.5.7 Quantificação de Microrganismos Amonificadores

Os microrganismos amonificadores foram quantificados pelo método do número mais provável (NMP), adaptado nesse trabalho o método descrito por SARATCHANDRA (1978). Foi utilizada placa de Elisa com 96 poços e o meio cuja composição encontra-se detalhada na Tabela 5.

Tabela 5: Composição para o meio de cultura para microrganismos amonificadores.

Meio de cultura para microrganismos Amonificadores*	
Reagentes	g/L**
Ácido casamino (arginina ou caseína hidrolisada)	10,0
Extrato de levedura	0,1
Fosfato de potássio monoácido (K ₂ HPO ₄)	1,0
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,1
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,01
Sulfato de manganês (MnSO ₄ .4H ₂ O)	0,01
Fenol vermelho	0,02

Fonte: SARATHCHANDRA, 1978.

*Ajustar o pH para 6,5 com solução de KOH ou HCl; **Diluir em 1 litro de água destilada;

Na placa de Elisa foram avaliadas as diluições 10⁻² à 10⁻⁶ e o controle (C), contendo apenas o meio dos amonificadores (220 uL). Nos poços das diluições foi adicionado 200 uL de meio e 20 de amostra. Foram realizadas quatro repetições de cada diluição do controle, e cada placa pôde ser utilizada para analisar 4 amostras de solo (figura 6).

Figura 6: Ilustração da placa utilizada para realizar os testes das diluições seriadas dos solos amostrados.

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

3 amostra

4 amostra

Após 5 dias de incubação a 28°C, no controle o meio se mantinha com a coloração alaranjada e caso houvesse o crescimento bacteriano e a produção de amônia a partir da reação ($R-N_2 \rightarrow NH_4^+$) o meio se tornava rosa. Isso ocorre por conta da presença do indicador vermelho de fenol no meio, o qual se torna rosa em pH acima de 7,0.

A mudança de cor foi avaliada de forma visual. O número estimado de microrganismos amonificadores foi calculado e adaptado nesse trabalho método de NMP de Saratchandra (1978) usando a tabela de número mais prováveis do método de Hungria e Araújo (1994).

5.5.8 Quantificação de Microrganismos Nitrificadores

Os microrganismos nitrificadores foram quantificados pelo método do número mais provável (NMP), adaptando-se o método de Hungria e Araújo (1994), utilizando o método de diluição seriada de 10^{-2} a 10^{-6} em solução salina. Foi utilizada placa de Elisa e o meio de Cultura para Oxidantes de Nitrito (NO_2^-) descrito por Belser (1977), modificado por Schmidt e Belser (1982) e adaptado nesse trabalho (tabela 6).

A distribuição das diluições e controle assim como os volumes usados nas placas de Elisa são os mesmos descritos no item anterior (5.5.7).

Tabela 6: Composição para as soluções estoque e para o preparo do meio de cultura para microrganismos nitrificantes.

Meio de cultura para microrganismos Nitrificantes*	
Reagentes	Meio de cultivo (mL _{sol. est.} /L)
KNO ₂	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	5
K ₂ HPO ₄ (0,2 M)	4
KH ₂ PO ₄ (0,2 M)	1
Solução de Micronutrientes**	1

Fonte: SCHMIDT; BELSER, 1982.

*Ajustar pH para 6,5 com solução de KOH ou HCl;

**De acordo com a Tabela 7;

Tabela 7: composição da solução de micronutrientes utilizada para preparo do meio de cultura para microrganismos nitrificantes.

Solução de Micronutrientes	
Reagentes	mg/100 mL*
NaMoO ₄ .2H ₂ O	10
MnCl ₂	20
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10
CuSO ₄	2

*Diluir em 100 mL de água destilada; Preparar individualmente;

As placas foram incubadas no escuro à 25°C por 6 a 8 semanas. Para revelar o teste foi adicionada uma gota de diazotizing reagente (0,5g de sulfanilamida diluídos em 100 mL de HCl 2,4 N) e uma gota de coupling reagente (0,3g de N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride diluídos em 100 mL de HCl 0,2 N).

A presença de microrganismos oxidantes de nitrito, ou seja, aqueles capazes de realizar a seguinte reação: $2\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_3^-$, foi verificada a partir de uma análise visual (figura 7). A presença do meio incolor indicava a presença de NO₃⁻ no poço, gerado a partir da presença de bactérias oxidantes de NO₂⁻. Se a coloração se apresentava rosa, isso indicava a ausência de bactérias oxidantes de NO₂⁻ na diluição de solo analisada.

Figura 7: Teste para microrganismos oxidantes de nitrito. Os poços transparentes indicam a presença de oxidantes de nitrito (NO_2^-) e os poços de cor púrpura indicam a ausência dos mesmos.



5.5.7 Fixação de Nitrogênio:

Os microrganismos fixadores de nitrogênio foram quantificados pelo método do número mais provável (NMP) utilizando o método de diluição seriada de 10^{-2} a 10^{-6} em solução salina como descrito por Döbereiner e colaboradores (1995).

Uma alíquota de 100 μL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , etc) foi inoculada em triplicata, em frascos de 10mL contendo 3 mL de meio Nfb semissólido livre de nitrogênio (DÖBEREINER; DAY, 1976; DÖBEREINER *et al.*, 1999) (tabela 8) e os frascos foram incubadas em estufa a 30°C.

Do terceiro ao sétimo dia de incubação, os frascos foram avaliados para verificação de formação de película. A partir da determinação do número de frascos que apresentavam película em cada diluição e a utilização da tabela de Mac Crady (BRASIL,2003) foram quantificadas as bactérias diazotróficas.

Tabela 8: Composição do meio de cultura NFb em sua forma semissólida.

Meio NFb semisólido	
Composto	Quantidade usada em 1L de meio
Ácido Málico	5g
Fosfato de Potássio Dibásico	0,5g
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	0,2g
Cloreto de Cálcio Dihidratado	0,02g
Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
Solução de Micronutrientes **	2 mL
Solução de EDTA de Ferro 1,64%	4 mL
Solução de Vitamina (Biotina)*	1 mL
Agar	1,8 g
Extrato de Levedura	-

Fonte: DÖBEREINER; DAY, 1976; DÖBEREINER *et al.*, 1999.

* Solução de vitamina (Biotina 10 mg, Piridoxina 20 mg dissolvido em 100 ml de Água Estéril), deve ser adicionada durante o preparo para inoculação; não deve ser fervido;

** Tabela 9 de solução de micronutrientes.

***Ajustar o pH para 6,5 com solução KOH (10%) ou solução H₂SO₄ (5%);

****Diluir em 1 litro de água destilada

Tabela 9: composição da solução de micronutrientes utilizada no meio NFb

Solução de Micronutrientes		
Reagentes	g/L*	mL/L
Molibdato de ódio (Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O)	1	2
Sulfato de Manganês (MnSO ₄ .H ₂ O)	1,175	2
Ácido Bórico (H ₃ Bo ₃)	1,4	2
Sulfato de Cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,04	2
Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,12	2

*Diluir em água destilada; Preparar individualmente;

6 ANÁLISE DOS DADOS

Todas as análises foram realizadas utilizando pacote ExpDes.pt (R Core Team, 2017). Os resultados foram submetidos ao teste de homogeneidade e normalidade de Shapiro - Wilk e quando adequados, submetidos à análise de variância, apresentando significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas três coletas de solo ao longo do desenvolvimento do eucalipto: aos três, doze e vinte e quatro meses após o plantio, período em que a planta necessita de uma demanda maior de nutrientes. Amostras compostas de solo coletadas de 0-10cm foram submetidas as seguintes análises microbiológicas: enzimas β -glucosidase e Urease, quantificação do carbono da biomassa microbiana, respiração basal e glomalina, além do número mais provável dos amonificadores, oxidantes de nitrito e fixadores de nitrogênio.

7.1 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA (CBM), RESPIRAÇÃO BASAL, QUOCIENTE METABÓLICO E GLOMALINA

A amostragem do solo em zigue zague foi utilizada para a avaliação do carbono da biomassa microbiana, respiração basal, e quociente metabólico do solo. Já para a glomalina, foi utilizada a amostragem do solo próximo as plantas centrais.

A análise do carbono da biomassa microbiana tem como intuito avaliar a porção viva do carbono orgânico do solo, constituído por bactérias, arqueas e fungos, sendo que o compartimento da matéria orgânica do solo está diretamente influenciado por fatores bióticos e abióticos (KASCHUK *et al.*, 2010).

Na primeira coleta (3 meses após o plantio) o carbono da biomassa microbiana (CBM) apresentou valores estatisticamente ($p < 0,05$) mais elevados na ausência de biochar (SB) (227,04 mg Cmic. Kg⁻¹ solo) do que na sua presença (tabela 10). Entre as doses de adubação não foi detectada diferença significativa.

Tabela 10: Carbono da biomassa microbiana (CBM) do solo não rizosférico amostrado após o plantio do eucalipto (em mg Cmic. Kg⁻¹ de solo), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

Amostragem			SF	FR	FC	
3 meses	CB	178,28 b	204,8 Ns	201,23 Ns	201,95 Ns	CV 1%: 12,07
	SB	227,04 a				CV 2%: 11,04
12 meses	CB		142,57 Nsb	55,72 Bb	201,26 Nsa	CV 1%: 10,88
	SB		91,24 Nsb	269,16 Aa	225,48 Nsa	CV 2%: 29,04
24 meses	CB	465,95 Ns	332,28 Ns	437,74 Ns	370,07 Ns	CV 1%: 65,25
	SB	294,1 Ns				CV 2%: 44,99

Legenda: Letras em maiúsculo demonstram o desdobramento da interação de adubação dentro da presença ou ausência de biochar, letras em minúsculo desdobramento da interação de biochar dentro de das doses de adubação, Ns = não significativo. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Doze meses após o plantio (tabela 10), o tratamento com biochar e fertilizante reduzido (CBFR) foi o que apresentou valores superiores de CBM (269,16 mg Cmic. Kg⁻¹ solo) quando analisada a adubação dentro da presença ou ausência de biochar (tabela 10 – letras maiúsculas). Já os valores do CBM que obtiveram o valor mais elevado ao se analisar o biochar dentro das adubações, tanto para SB ou CB, foram os tratamentos com dose completa de adubação (FC) 201,26 mg Cmic. Kg⁻¹ de solo (SBFC) e 225,48 mg Cmic. Kg⁻¹ de solo (CBFC).

Vinte e quatro meses após o plantio, os valores do CBM tiveram um aumento (tabela 10) com biochar 465,95 mg Cmic. Kg⁻¹ de solo, entretanto não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. A biomassa microbiana é altamente sensível às mudanças nas práticas de manejo florestal e está intimamente relacionada à produtividade primária do ecossistema e à saúde do solo (WANG *et al.*, 2017). O aumento da biomassa microbiana geralmente reflete o aumento da abundância microbiana e da diversidade da comunidade. Estudos mostraram que a idade do eucalipto tem um forte impacto na biomassa microbiana do solo e na estrutura da comunidade microbiana (LIU *et al.*, 2018).

O plantio de florestas influencia a biomassa microbiana que está diretamente relacionada a diversas funções do solo, entre elas a decomposição de resíduos orgânicos, a ciclagem e disponibilização de nutrientes, solubilização de nutrientes, estruturação do solo e manutenção dos estoques de carbono do solo, constituindo-se de um atributo de rápida resposta em situações de estresse ambiental (NOGUEIRA *et al.*, 2006). A biomassa microbiana representa ainda o compartimento do solo onde a ciclagem de carbono ocorre de forma mais rápida, permitindo o estudo do fluxo desse nutriente (GAMA-RODRIGUES *et al.*, 2008).

A presença de biochar leva ao equilíbrio bactéria/fungo acarretando o aumento da decomposição de fontes de carbono recalcitrantes e consequente aumento da biomassa microbiana (MIN *et al.*, 2015). Esse efeito é relatado em cultivo de algodão (EGAMBERDIEVA *et al.*, 2010; MIN *et al.*, 2015).

Respiração basal é um índice metabólico que determina a intensidade com que os processos bioquímicos acontecem durante a decomposição pela ação dos microrganismos, servindo como indicativo da taxa de decomposição da matéria orgânica (BARROS, 2013).

A respiração basal no solo 3 meses após o plantio com a presença de biochar ou ausência do mesmo não apresentou diferença estatística (tabela 11). Porém houve diferença estatística quando consideradas as doses de adubação, sendo obtidos valores maiores nas parcelas com a dose completa de adubação (FC) 1,81 µg C-CO₂/Kg/h.

Tabela 11: Respiração basal do solo não rizosférico amostrado períodos após o plantio do eucalipto (em $\mu\text{g C-CO}_2/\text{Kg/h}$), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

Amostragem			SF	FR	FC	
3 meses	CB	1,57 Ns	1,4 ab	1,39 b	1,81 a	CV 1%: 15,71
	SB	1,49 Ns				CV 2%: 20,64
12 meses	CB	0,56 Ns	0,76 a	0,57 b	0,46 b	CV 1%: 27,34
	SB	0,62 Ns				CV 2%: 15,13
24 meses	CB	0,35 Ns	0,38 Ns	0,35 Ns	0,30 Ns	CV 1%: 31,98
	SB	0,34 Ns				CV 2%: 24,59

Legenda: Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os tratamentos que não receberam adubação (SF) (tabela 11) apresentaram maiores índices de respiração basal doze meses após o plantio, $0,76 \mu\text{g C-CO}_2/\text{Kg/h}$ (tabela 12 B). Para o fator biochar não houve diferença estatística significativa.

Não houve diferença estatística na respiração basal entre os tratamentos vinte quatro meses após o plantio do eucalipto (tabela 11), entretanto, de forma geral, esse índice baixou em relação aos valores obtidos 12 meses antes.

A partir dos dados obtidos, pode-se visualizar que a respiração apresentava valores mais altos no início do plantio e reduziu ao longo dos 24 meses avaliados. O revolvimento do solo que ocorreu para instalar o experimento, propiciou um aumento da respiração basal, resultando no aumento da liberação de CO_2 . Posteriormente, com o passar dos meses houve a gradativa incorporação de resíduos (biochar) e estabilização do solo, com isso a atividade biológica tendeu a redução (KUZZYAKOV, 2010). Outro fator que pode ter influenciado nos baixos índices de respiração basal é a natureza das folhas do eucalipto, as quais apresentam compostos alelopáticos que dificultam o processo de decomposição pelos microrganismos (SILVA; COSTA, 2004). Além disso, estes resíduos são mais difíceis de serem decompostos devido a presença de lignina e por não serem tão diversificados como os resíduos de mata nativa, resultando assim em menores valores de respiração (SILVEIRA, 2011).

Segundo Wink e colaboradores (2013), em condições de estresse, os microrganismos derivam uma maior porção de energia para manutenção dos mecanismos celulares, ou seja, há um maior custo de manutenção ou taxa de respiração relativa, em detrimento ao crescimento da biomassa.

Em estudo feito por Jakeleitits e colaboradores (2008), os valores da respiração basal em solo de mata nativa foi de $6,91 \mu\text{g C-CO}_2/\text{Kg/h}$, já Costa Neto e colaboradores (2015) encontraram valor de $1,04 \mu\text{g C-CO}_2/\text{Kg/h}$ solo nas mesmas condições, entretanto Silveira

(2011) obteve em seu estudo valores de 2,2 $\mu\text{g C-CO}_2/\text{Kg/h}$ em solo seco de eucalipto nos anos iniciais e foram reduzindo com o passar dos anos.

A atividade microbiana do solo determinada por Lazzaretti e colaboradores (2019), em seus estudos através da análise de respiração basal, apresentou menor valor na área correspondente ao eucalipto (de 8,37 $\mu\text{g C-CO}_2/\text{Kg/h}$) comparando a área de mata nativa (22,43 $\mu\text{g C-CO}_2/\text{Kg/h}$). A respiração basal no solo de mata nativa é influenciada pela constante incorporação de resíduos, propiciando aumento da biomassa microbiana e da atividade biológica, resultando na liberação de CO_2 (KUZUYAKOV, 2010).

Quando se realiza estudo da comunidade microbiana no solo, já é esperado encontrar valores maiores em áreas de vegetação nativa quando comparados com solos de áreas cultivadas, pois a microbiota é favorecida pela cobertura vegetal, proporcionando maior acúmulo de material orgânico e proporcionando uma maior fonte de nutrientes para que a comunidade microbiana se desenvolva (ALVES *et al.*, 2011).

A atividade microbiana pode ser uma característica importante quando se considera que a decomposição dos resíduos orgânicos irá disponibilizar nutrientes para as plantas. No entanto, uma baixa respiração basal do solo pode liberar menos carbono contido na matéria orgânica estável e comprometer os processos químicos e físicos do solo, como a agregação de partículas e retenção de água e nutrientes (ROSCOE *et al.*, 2006).

A partir dos dados de carbono da biomassa microbiana e respiração basal é possível estimar os valores do quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), correspondente à respiração basal por unidade de biomassa microbiana. O $q\text{CO}_2$ constitui-se de uma medida de eficiência da biomassa microbiana na utilização dos substratos (ANDERSON, 2003). Ambas as variáveis, respiração basal e quociente metabólico, permitem avaliar o nível de estresse a que um ecossistema está sendo submetido, sendo possível avaliar a quão benéfica ou danosa é a prática de manejo utilizada.

Houve diferença significativa no quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) da amostragem de 3 meses após o plantio (tabela 12). O maior valor de $q\text{CO}_2$ foi obtido na sem adubação (SF), seja com biochar: CBSF (14,69 $\mu\text{g C-CO}_2/\text{gBMC/h}$).

Tabela 12: Quociente metabólico (qCO_2) do solo não rizosférico amostrado períodos após o plantio do eucalipto (em $\mu g C-CO_2/gBMC/h$), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

Amostragem			SF	FR	FC	
3 meses	CB		14,69 Aa	2,69 Bc	11,9 Ab	CV 1%: 8,68
	SB		7,23 Bb	8,35 Aab	10,11 Ba	CV 2%: 12,07
12 meses	CB		5,82 Ba	1,96 Bb	2,49 Nsb	CV 1%: 10,76
	SB		20,69 Aa	3,32 Ab	2,04 Nsb	CV 2%: 13,07
24 meses	CB	0,88 Ns	1,41 Ns	1,2 Ns	1,07 Ns	CV 1%: 60,13
	SB	1,58 Ns				CV 2%: 54,25

Legenda: Letras em maiúsculo demonstra o desdobramento da interação de adubação dentro da presença ou ausência de biochar, letras em minúsculo desdobramento da interação de biochar dentro de das doses de adubação, Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na amostragem dos doze meses após o plantio observou-se diferença significativa ocorrendo interação entre biochar x adubação (tabela 12). Quando analisada a adubação dentro do biochar (tabela 12– letras maiúsculas) os valores do qCO_2 foram maiores nos tratamentos sem biochar: SBSF (20,69 $\mu g C-CO_2/gBMC/h$) e SBFR (3,32 $\mu g C-CO_2/gBMC/h$). Ao analisar o biochar dentro das adubações (tabela 13- letras minúsculas) a ausência de adubação (SF) foi superior em relação as outras doses de adubação: SBSF (20,69 $\mu g C-CO_2/gBMC/h$) e SBSF (5,82 $\mu g C-CO_2/gBMC/h$) Nos tratamentos com FC o qCO_2 metabólico do solo é menor do que nas doses SF e FR.

Na análise dos 24 meses de plantio (tabela 12), não houve diferença estatística entre os tratamentos, porém pode-se observar diminuição nos valores entre os tratamentos com o passar dos anos, principalmente na presença de biochar, indicando que o biochar auxiliou na estabilização do solo e na redução do qCO_2 do mesmo.

Quanto menor os valores de qCO_2 , maior é a estabilidade do ambiente encontrando-se mais próximo do equilíbrio, e quando os valores de qCO_2 são mais altos trata-se de um ambiente com estresse e com menor aporte de materiais orgânicos (COSTA NETO *et al.*, 2015). Com isso pode-se observar que a área em estudo apresenta uma tendência da redução de seu qCO_2 indicando ser um ambiente mais próximo do equilíbrio. Liang (2008) observou redução na respiração e aumento no C-biomassa microbiana com a aplicação de biochar e consequentemente aumento na eficiência qCO_2 dos microrganismos.

A glomalina é a glicoproteína resultante da decomposição de esporos e hifas, sendo também excretada pelas hifas externas dos fungos micorrízicos (RILLIG *et al.*, 2003, SOUZA *et al.*, 2012). A glomalina está estreitamente correlacionada com a estabilidade de agregados, com o carbono e o nitrogênio do solo. A sua produção contribui também para o fornecimento de compostos orgânicos ao solo, como pelo acúmulo e estoque de matéria orgânica (NICHOLS; WRIGHT, 2005).

Não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação a quantidade de glomalina facilmente extraída e glomalina total do solo, vinte quatro meses após o plantio do eucalipto.

Tabela 13: Glomalina do solo não rizosférico amostrado vinte quatro meses após o plantio de eucalipto (mg g^{-1} de solo), glomalina facilmente extraída (GFE), glomalina total (GT), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

GFE	SF	FR	FC	GT		SF	2,54 ns
CB	3,28 Ns ns	2,86 Ns ns	2,78 Ns ns	CB	2,46 ns	FR	2,47 ns
SB	2,9 Ns ns	3,14 Ns ns	3,18 Ns ns	SB	2,51 ns	FC	2,48 ns
cv 1%	7,14			cv 1%	5,11		
cv 2%	9,5			cv 2%	10,97		

Legenda: Letras em maiúsculo demonstra o desdobramento da interação de adubação dentro da presença ou ausência de biochar, letras em minúsculo desdobramento da interação de biochar dentro de das doses de adubação, Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em revisão realizada por Sousa e colaboradores (2012) foram observadas maiores concentrações de glomalina em solos de floresta (até 60 mg g^{-1} da glomalina no solo), e menores quantidades em solos agrícolas, que apresentaram concentrações de glomalina facilmente extraída e glomalina total em torno de $0,5$ a 3 mg g^{-1} solo. Em regiões semiáridas foram verificadas as concentrações mais baixas, não ultrapassando $0,3$ a $0,6 \text{ mg g}^{-1}$ solo. Em geral, o teor de glomalina está relacionado ao conteúdo de carbono orgânico do solo, no entanto, não estão evidentes quais fatores determinam suas respectivas taxas de acumulação. Além disso, sua produção é diretamente influenciada pelas características do solo, sistema de uso do solo, tipo de vegetação, práticas de manejo agrícola, dentre outros fatores (SOUSA *et al.*, 2012).

Os fungos tendem a predominar em solos ácidos, pois em solos alcalinos há uma maior concorrência entres estes (PRADE, 2007). Desse modo, como os fungos micorrízicos arbusculares são os responsáveis pela produção de glomalina (SOUSA *et al.*, 2012).

7.2 ENZIMAS DO SOLO

No intuito de avaliar o potencial do solo em produzir amônia a partir da ureia, foi analisada a atividade da enzima urease, utilizando a amostragem de solo em zigue zague. Essa enzima é produzida pelas plantas e bactérias (TABATABAI; BREMNER, 1972) e sua atividade tem se mostrado um bom indicador de qualidade de solo (MENDES *et al.*, 2019).

A atividade da urease do solo rizosférico com biochar (CB) coletado 3 meses após o plantio do eucalipto foi estatisticamente superior ao que não recebeu biochar (7,33 e 5,2 $\mu\text{g NH}_4\text{-N g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, tabela 14). Wu e colaboradores (2012) também verificaram aumento significativo na atividade da urease na presença de biochar. No entanto Zhu e colaboradores (2017) detectaram pequenas alterações na atividade da urease, com a presença do biochar houve incrementos na atividade de urease e isto pode ter efeito direto numa maior mineralização de nitrogênio orgânico.

Tabela 14: Atividade da enzima Urease em solo de eucalipto 3 meses após o plantio (em $\mu\text{g NH}_4\text{-N g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

Amostragem			SF	FR	FC	
Solo Rizosférico	CB	7,33 a	6,47 ns	5,7 ns	6,35 ns	CV 1%: 23,31
	SB	5,02 b				CV 2%: 33,09
Solo Não Rizosférico	CB		12,69 Ab	18,54 Aa	17,06 Ba	CV 1%: 6,48
	SB		10,07 Bns	10,96 B ns	10,86 Ans	CV 2%: 7,47

Legenda: Letras em maiúsculo demonstra o desdobramento da interação de adubação dentro da presença ou ausência de biochar, letras em minúsculo desdobramento da interação de biochar dentro de das doses de adubação, Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

No mesmo período amostral foi feita a análise da enzima urease em solo não rizosférico, com diferença estatística entre os tratamentos e interação biochar x adubação, quando analisado adubação dentro do biochar (tabela 14– letras maiúsculas). Os tratamentos CBSF (12,69 $\mu\text{g NH}_4\text{-N g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$), CBFR (18,54 $\mu\text{g NH}_4\text{-N g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e SFFC (10,86 $\mu\text{g NH}_4\text{-N g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$) apresentaram valores superiores para a enzima urease. Ao analisar o biochar dentro das adubações (tabela 14 - letras minúsculas) para SB não ocorreu significância entre as doses de adubação, entretanto CB a ausência de adubação (SF) SBSF (12,69 $\mu\text{g NH}_4\text{-N g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e CBFR (18,54 $\mu\text{g NH}_4\text{-N g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foram estatisticamente maiores em relação a dose completa de adubação.

Quando avaliado o solo não rizosférico doze meses após o plantio de eucalipto houve diferença estatística para a enzima urease e ocorreu interação entre adubação x biochar, biochar dentro das doses de adubação (tabela 15). Na ausência de biochar com a dose reduzida de adubação (SBFR) foi obtida a menor atividade da enzima urease ($23,25 \mu\text{g NH}_4\text{-N g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Quando foram analisadas as doses de adubação dentro da presença ou ausência de biochar (tabela 15– letras minúsculas), na ausência de biochar não houve diferença estatística entre os tratamentos, porém o tratamento CBSF ($28,32 \mu\text{g NH}_4\text{-N g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$), apresentou atividade da urease significativamente maior.

Tabela 15: Atividade da enzima urease do solo não rizosférico amostrados períodos após o plantio (em $\mu\text{g NH}_4\text{-N g de solo}^{-1} \text{ h}^{-1}$), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

Amostragem			SF	FR	FC	
12 meses	CB		28,32 Nsa	17,12 Bb	20,31 Nsb	CV 1%: 15,47
	SB		25,71 Ns ns	23,25 A ns	24,05 Ns ns	CV 2%: 8,28
24 meses	CB	17 ns	18 ns	14,68 ns	13,46 ns	CV 1%: 54,5
	SB	13,74 ns				CV 2%: 55,59

Legenda: Letras em maiúsculo demonstra o desdobramento da interação de adubação dentro da presença ou ausência de biochar, letras em minúsculo desdobramento da interação de biochar dentro de das doses de adubação, Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Uma hipótese é que o solo está se estabilizando e o biochar acaba atuando como um micro- habitat, que necessita de um tempo maior para se estabilizar, podendo então fazer associação com a microbiota e estar relacionado a esse aumento da atividade, pois a urease é enzima que promove transformação de nitrogênio (HUANG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os tratamentos, a atividade de urease reduziu após doze meses. Além disso, o coeficiente de variação entre os fatores analisados aumentou nessa amostragem realizada vinte e quatro meses após o plantio do eucalipto, demonstrando maior heterogeneidade na área.

Wang e colaboradores (2015) analisando o impacto do biochar de palha de milho observaram um aumento significativo na atividade da enzima urease, pois o biochar apresentou compostos orgânicos e inorgânicos que afetaram as enzimas relacionadas ao ciclo do nitrogênio, isto também foi observado em estudo conduzido por Huang e colaboradores (2017) onde foi analisado o biochar de palha de arroz.

Entretanto, Li e colaboradores (2017) relataram uma relação linear positiva entre nitrogênio total do solo e atividade da urease do solo. A aplicação de alto / baixo nível de

biochar diminuiu a capacidade de fixação do N, alterando o ambiente de inoculação e diminuindo o nitrogênio total do solo e, portanto, diminuindo a atividade da urease do solo durante o ensaio. Isso é consistente com a atividade da urease do solo que é significativamente reduzida (SAUERSTEIN; REUTER; 1988).

A urease do solo pertence à família da hidrolase e, principalmente, acelera a hidrólise da ligação peptídica na molécula de matéria orgânica e serve como indicador do status do nitrogênio orgânico no solo (INSAM; 2001). Foi relatado que a atividade da urease no solo se relaciona positivamente com o nitrogênio orgânico do mesmo (INSAM; 2001).

Os microrganismos do solo desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes, via a decomposição de matéria orgânica na qual diversas enzimas estão envolvidas. A atividade dessas enzimas é sensível a alterações e tem sido utilizada como indicadores da qualidade do solo (LANNA *et al.*, 2010). No entanto, poucos trabalhos têm estudado o efeito da aplicação de biochar na atividade enzimática do solo (ZHU *et al.*, 2017).

Em estudos analisados por Lisboa e colaboradores (2012), foram encontrados valores semelhantes de urease nas áreas de mata nativa. É comum encontrar valores maiores de urease em áreas nativas quando comparadas com áreas de culturas, pois a microbiota do solo é favorecida pela cobertura vegetal, que propicia maior acúmulo de matéria orgânica, fornecendo mais nutrientes contribuindo para o crescimento da comunidade microbiana (SILVA *et al.*, 2012).

A enzima β -glucosidase hidrolisa os resíduos da celobiose, atuando no processo final da decomposição da celulose (EIVAZI; TABATABAI, 1988); portanto, mudanças na atividade dessa enzima podem indicar alterações na qualidade do solo. Ao avaliar a atividade da enzima β -glucosidase, houve interação entre os fatores analisados para ambos os tipos de solo coletados três meses após o plantio em solo rizosférico a presença de biochar e a fertilização completa (CBFC) aumentaram a atividade da enzima, atingindo a média de 77,31 $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1}$ solo seco h^{-1} (tabela 16– letras maiúsculas). Os outros tratamentos não tiveram diferença significativa. Já para adubação dentro do biochar, os tratamentos SBFR e CBFC apresentaram maior atividade da enzima.

Tabela 16: Atividade da enzima β -glucosidase do solo amostrado três meses após o plantio (em $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1}$ solo seco h^{-1}), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

Amostragem		SF	FR	FC	
Rizosférico	CB	60,24 Ns b	63,48 Ns b	77,31 Aa	CV 1%: 7,15
	SB	61,35 Ns ab	66,59 Ns a	53,15 Bb	CV 2%: 7,01
Não Rizosférico	CB	187,85 Ba	212,94 Ns a	103,72 Bb	CV 1%: 6,09
	SB	217,29 Aa	196,76 Ns ab	166,12 Ab	CV 2%: 9,88

Legenda: Letras em maiúsculo demonstra o desdobramento da interação de adubação dentro da presença ou ausência de biochar, letras em minúsculo desdobramento da interação de biochar dentro de das doses de adubação, Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Houve um aumento na atividade da β -glucosidase na ausência de biochar em solo não rizosférico, sendo que os maiores valores obtidos nos tratamentos SF e FC 217,29 e 166,12 $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1}$ solo seco h^{-1} (tabela 16– letras maiúsculas), respectivamente. Ao analisar a influência da adubação, ganham destaque os tratamentos SBSF, CBSF e CBFR, com valores de 217,29; 187,85 e 212,94 $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1}$ solo seco h^{-1} (tabela 16– letra minúscula), respectivamente.

Quando analisamos o solo não rizosférico doze meses após o plantio do eucalipto, houve diferença estatística para a atividade da enzima β -glucosidase e ocorreu interação entre adubação x biochar (tabela 17). Na ausência de biochar e com dose reduzida de adubação (SBFR) e dose completa (SBFC) foram detectados os maiores valores pra enzima β -glucosidase (45,25 e 46,22 $\mu\text{g p-nitrofenol g}$ de solo $^{-1}$ h^{-1} , respectivamente). Já quando analisadas as doses de adubação na presença ou ausência de biochar (tabela 17– letras minúsculas), somente os tratamentos SBSF e CBFC que apresentaram menor atividade da enzima.

Tabela 17: Atividade da enzima β -glucosidase do solo não rizosférico amostrado doze meses após o plantio (em $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1}$ solo seco h^{-1}), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

Amostragem			SF	FR	FC	
12 meses	CB		32,07 Ns a	29,96 Ba	22,37 Bb	CV 1%: 10,42
	SB		35,49 Ns b	45,25 Aa	46,22 Aa	CV 2%: 10,2
24 meses	CB	4,17 Ns	3,68 Ns	4,94Ns	4,18 Ns	CV 1%: 17,97
	SB	4,37 Ns				CV 2%: 20,42

Legenda: Letras em maiúsculo demonstra o desdobramento da interação de adubação dentro da presença ou ausência de biochar, letras em minúsculo desdobramento da interação de biochar dentro de das doses de adubação, Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade da enzima β -glucosidase do solo não rizosférico amostrado 24 meses após o plantio não apresentou diferença estatística entre os tratamentos. Além disso, comparado com a atividade dos meses anteriores, os valores da enzima caíram bruscamente de uma amostragem para a outra.

A β -glucosidase é uma enzima envolvida na mineralização do carbono a partir da degradação da matéria orgânica exógena (KADER *et al.*, 2017). A atividade desta enzima está altamente associada à disponibilidade de substrato de carbono que é facilmente mineralizado sendo um condutor para as alterações da atividade enzimática que pode aumentar devido à adição de biochar (LUO; GU, 2016). O biochar altera a atividade enzimática uma vez que pode servir de substrato e essa alteração varia com a natureza dos resíduos e adsorve a enzima ao substrato para hidrolisá-lo (SUN *et al.*, 2014; SWAINE *et al.*, 2013).

7.3 QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO CICLO DO NITROGÊNIO

A amostragem das plantas centrais foi utilizada para as amostras relacionadas ao ciclo do nitrogênio. Dentre os processos microbiológicos do ciclo do nitrogênio, destacam-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN), realizada exclusivamente por microrganismos diazotróficos, a amonificação (transformação do N orgânico em N mineral ou inorgânico) e a nitrificação (conversão do amônio (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-), consideradas como uma das etapas mais importantes do ciclo do nitrogênio (VARGAS; HUNGRIA, 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; DIAS, 2016).

A presença de comunidades microbianas e sua abundância no solo são fatores críticos na ciclagem de nutrientes no solo. O biochar fornece habitat adequado para microrganismos do solo (por exemplo, melhorando a umidade, aumentando o conteúdo da água, mitigando a compactação do solo etc.) (LAGHARI *et al.*, 2016), também fornece nutrientes para o

crescimento (ZHU *et al.*, 2017), melhorando assim a fertilidade e a produtividade do cultivo (SINGHETAL, 2015).

Não houve diferença estatística no número de microrganismos amonificadores na presença ou ausência de biochar no solo não rizosférico amostrado três meses após o plantio do eucalipto, entretanto, um número maior de microrganismos amonificadores encontra-se presentes nas parcelas com fertilização completa (FC). Nessa condição foram detectados $9,5 \times 10^6$ UFC/ g de solo (tabela 18).

Tabela 18: Número mais provável (NMP) de microrganismos amonificadores presentes no solo amostrado três meses após o plantio (em UFC g⁻¹ de solo), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR– Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

Amostragem			SF	FR	FC	
Rizosférico	CB		$1,3 \times 10^3$ Bb	$1,3 \times 10^5$ Ns b	$1,5 \times 10^5$ Aa	CV 1%: 92,19
	SB		$1,04 \times 10^4$ Ans	3×10^5 Ns ns	$2,7 \times 10^3$ Bns	CV 2%: 121,28
Não Rizosférico	CB	$2,3 \times 10^4$ ns	$9,1 \times 10^5$ b	$1,5 \times 10^5$ b	$9,5 \times 10^6$ a	CV 1%: 148,69
	SB	$5,6 \times 10^4$ ns				CV 2%: 144,35

Legenda: Letras em maiúsculo demonstra o desdobramento da interação de adubação dentro da presença ou ausência de biochar, letras em minúsculo desdobramento da interação de biochar dentro de das doses de adubação, Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey (p<0,05).

No solo rizosférico do mesmo período amostral, o biochar só induziu o aumento do número de microrganismos amonificadores quando associado a fertilização completa (CBFC: $1,5 \times 10^5$ UFC g⁻¹ de solo, tabela 19).

Tabela 19: Número mais provável (NMP) de microrganismos amonificadores presentes no solo não rizosférico amostrados períodos após o plantio (em UFC g⁻¹ de solo).

Amostragem			SF	FR	FC	
12 meses	CB	$8,2 \times 10^5$ ns	$1,04 \times 10^5$ ns	$6,1 \times 10^5$ ns	$6,8 \times 10^5$ ns	CV 1%: 73,57
	SB	$7,3 \times 10^5$ ns				CV 2%: 105,18
24 meses	CB	$4,1 \times 10^6$ ns	$4,9 \times 10^5$ ns	$3,1 \times 10^5$ ns	$5,02 \times 10^5$ ns	CV 1%: 210
	SB	$1,6 \times 10^5$ ns				CV 2%: 216

Legenda: *Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey (p<0,05).

Quando analisados os amonificadores em solo não rizosférico, amostrado doze meses após o plantio, não houve diferença estatística entre presença e ausência de biochar (tabela 19). As doses de adubação também não geraram diferenças significativas, porém na dose

completa de adubação (FC) o número de microrganismos foi maior, $6,8 \times 10^5$ UFC g^{-1} de solo do que nas outras doses.

Não houve diferença estatística quanto ao número de microrganismos amonificadores presentes em solo não rizosférico amostrado 24 meses após o plantio. Entretanto um número maior de microrganismos foi contabilizado na presença de biochar (CB): $4,1 \times 10^6$ UFC/ g de solo (tabela 19), do que na sua ausência (SB): $1,5 \times 10^5$ UFC/ g de solo.

O biochar apresenta influência direta na concentração de nitrogênio do solo, através de uma mudança nas comunidades microbianas do solo. Os microrganismos do solo desempenham papel importante no processo de amonificação da matéria orgânica para o amônio (NH_4^+), reduzindo as perdas de nitrogênio por lixiviação ou fluxos gasosos (LAIRD *et al.*, 2010).

A matéria-prima do biochar e a temperatura de pirólise são os fatores de maior relevância para determinar a influência do biochar no ciclo do nitrogênio (SOLAIMAN; ANAWAR, 2015). A adsorção de algumas formas orgânicas de nitrogênio no biochar diminui as perdas de amônia e nitrato do solo e pode potencialmente controlar a liberação de nutrientes para as raízes das plantas (HAIDER *et al.*, 2017).

O biochar pode influenciar os microrganismos amonificadores, modificando os fatores ambientais do solo como alterações na textura do solo, que podem atuar na retenção de nutrientes, a disponibilidade orgânica de nitrogênio, refletindo nas taxas de mineralização do nitrogênio. A grande porosidade, capacidade de troca catiônica e capacidade de sorção do biochar pode resultar no acúmulo de cátions e ânions nutritivos e, assim, melhorar a concentração de macro nutrientes do solo, como o nitrogênio e a NH_3^+ oriunda da amonificação (ATKINSON *et al.*, 2010).

A FBN é um processo complexo que ocorre em determinadas células procarióticas (Bacteria e Archaea) capazes de transformar Nitrogênio (N_2) em Amônia (NH_3) ao romper a tripla ligação covalente entre os dois átomos de nitrogênio atmosférico (SANTOS *et al.*, 2014).

As bactérias responsáveis pelo processo de fixação biológica do nitrogênio são chamadas de diazotróficas e podem ser simbióticas, vivendo em relação de simbiose com a planta hospedeira, resultando na formação de nódulos nas raízes, ou de vida livre, podendo sobreviver livremente no solo e colonizar a rizosfera, ou o interior e superfície das plantas (EVANS; BURRIS, 1992).

O número de microrganismos fixadores biológicos de nitrogênio em solo rizosférico amostrado três meses após o plantio não demonstraram diferenças estatísticas entre os tratamentos (tabela 20).

Tabela 20: Número mais provável (NMP) de microrganismos fixadores biológicos de nitrogênio (FBN) presentes no solo rizosférico amostrado três meses após o plantio (em UFC g⁻¹ de solo), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR – Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

Amostragem			SF	FR	FC	
3 meses	CB	1,3 x10 ³ ns	2,2 x10 ⁴ ns	6,6 x10 ³ ns	4,4 x10 ³ ns	CV 1%: 54,5
	SB	9,2 x10 ³ ns				CV 2%: 64,45
12 meses	CB	4,2 x10 ³ Ns	0 b	0 b	1,2 x10 ³ a	CV 1%: 82,6
	SB	3,7 x10 ³ Ns				CV 2%: 89,64
24 meses	CB	2,9 x10 ³ ns	3,6 x10 ³ ns	3,8 x10 ³ ns	2,7 x10 ³ ns	CV 1%:119,32
	SB	3,8 x10 ³ ns				CV 2%: 113,44

Legenda: *Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey (p<0,05).

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre a presença ou ausência de biochar, na dose de adubação completa (FC) após doze meses de plantio foi detectado um maior número de diazotrófos, 1,2 x10³ UFC/ g de solo não rizosférico. Porém não houve detecção de diazotrófos nos demais tratamentos nesse período de coleta (tabela 20). Aos vinte e quatro meses, não houve também diferença (p <0,05) no número de diazotrófos presentes nos tratamentos analisados (tabela 20).

Em solos florestais, o biochar tem sido geralmente associado ao aumento da mineralização de nitrogênio, porém não foi o que obtivemos em nosso estudo, a aplicação do biochar no solo do experimento não resultou em nenhuma alteração (BERGLUND *et al.* 2004; DELUCA *et al.*, 2006).

Em um experimento de campo 6 meses após o plantio de eucalipto e utilizando biochar de eucalipto (vapor ativado a 350 ° C) houve um aumento na abundância de microrganismos diazotróficos (DUCEY *et al.*, 2013). Solaiman e colaboradores (2010) e Saranya e Kumutha (2011) também relataram um aumento na fixação biológica de nitrogênio nos solos alterados por biochar, devido aos efeitos indiretos das propriedades químicas do solo.

A nitrificação, realizada por microrganismos quimiolitotróficos em ambiente aeróbio, é o processo de conversão do NH₄⁺ do solo em nitrato (NO₃), através de reações de oxidação. A nitrificação ocorre em duas etapas, nitritação, onde o NH₄⁺ é oxidado a nitrito (NO₂⁻) e

nitratação, onde o nitrito é oxidado à nitrato (NO_3^-) (FAGERIA *et al.*, 2011; DIAS, 2016). Em nosso estudo foi analisada a etapa de nitratação.

Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao número de microrganismos nitrificadores presentes no solo não rizosférico após doze meses de plantio. Porém os valores na presença de biochar (CB), $9,9 \times 10^5$ UFC/ g de solo foram maiores que na ausência de biochar (tabela 21).

Tabela 21: Número mais provável (NMP) de microrganismos nitrificadores presentes no solo não rizosférico amostrado períodos após o plantio (em UFC g^{-1} de solo), na presença de biochar (CB) e ausência de biochar (SB), variando as doses de adubação (SF – sem adubação, FR– Dose reduzida de adubação (80%), FC – dose completa de adubação).

Amostragem			SF	FR	FC	
12 meses	CB	$9,9 \times 10^5$ ns	$1,4 \times 10^6$ ns	$3,1 \times 10^6$ ns	$2,7 \times 10^5$ ns	CV 1%: 69,44
	SB	$2,1 \times 10^6$ ns				CV 2%: 153,58
24 meses	CB	$3,3 \times 10^5$ ns	$5,1 \times 10^3$ ns	$5,3 \times 10^5$ ns	$3,9 \times 10^4$ ns	CV 1%: 141,5
	SB	$3,1 \times 10^4$ ns				CV 2%: 200,2

Legenda: *Ns = não significativo, letras iguais não se diferem estatisticamente. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os tratamentos, na amostragem após vinte e quatro meses de plantio em solo não rizosférico, a quantificação dos microrganismos nitrificadores (tabela 21) na presença de adubação em dose reduzida $5,3 \times 10^5$ n° de células/ g de solo foi maior que nas outras doses de adubação.

As bactérias oxidantes de nitrito são um grupo funcional microbiano que media a nitrificação e são influenciadas pela variedade de fatores ambientais (GLEESON *et al.*, 2010). A adição de biocarvão ao solo pode aumentar significativamente o pH do solo a granel (CHAN *et al.*, 2008) ou alterar o pH do micro sitio local, potencialmente fornecendo um habitat mais favorável para os organismos nitrificantes, em particular os oxidantes de nitrito por serem sensíveis ao pH (DEBOER; KOWALCHUK, 2001). Existem poucos estudos examinando o efeito das adições de biochar nos oxidantes de nitrito, apenas com o estudo de Ball e colaboradores (2010) mostrando um aumento na abundância de oxidantes de nitrito após o fogo, o que eles sugerem que pode estar relacionado ao conteúdo de biochar, levando as alterações resultantes no baixo pH.

Entretanto, a nitrificação aumentou na presença de biochar, indicando assim que qualquer benefício a partir do ‘efeito de calagem’ do biochar foi compensada por um aumento na atividade da população microbiana, pois as taxas de nitrificação são significativamente reduzidas em solos ácidos (DEBOER; KOWALCHUK, 2001).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da respiração basal não ter variado entre os tratamentos a cada tempo avaliado, essa apresentou valores superiores no início do desenvolvimento do eucalipto provavelmente devido ao revolvimento do solo feito para a implantação do experimento, o qual induziu uma maior liberação de CO₂. Diante de uma maior estabilidade do solo, 2 anos após o plantio, houve um aumento no Carbono da biomassa microbiana, principalmente nos tratamentos com a aplicação de biochar.

A atividade das enzimas β -glucosidase e urease foram afetadas pela presença de biochar, sendo que a primeira foi drasticamente reduzida ao longo dos dois anos de análise, essa enzima está relacionada a hidrólise dos resíduos da celobiose, atuando no processo final da decomposição da celulose, portanto, mudanças na atividade dessa enzima podem indicar alterações na qualidade do solo.

A presença da dose completa de fertilizante não induziu o aumento da atividade da enzima urease. No entanto a enzima urease apresentou uma redução nos dois últimos períodos amostrais, os quais podem ter influenciado os microrganismos amonificadores do solo, pois a enzima urease é responsável por produzir amônia a partir da ureia, assim, a baixa atividade pode estar relacionada a disponibilidade do nitrogênio químico, que foi aplicado somente nos meses iniciais da cultura..

Não foi possível identificar a influência do biochar e da adubação nitrogenada no número de microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio. Os microrganismos amonificadores nos três primeiros meses com dose completa de adubação apresentaram alta quantificação, porém nos períodos amostrais seguintes não houve diferença estatística para o solo não rizosférico, assim como os oxidantes de nitrito e os fixadores biológicos de nitrogênio.

O Carbono da biomassa microbiana apresenta valores mais elevados na ausência de biochar três meses após o plantio, porém aos doze meses, os índices são mais altos para a dose reduzida de fertilizante e após vinte quatro meses do plantio, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

A aplicação de biochar com a redução de 20% da adubação padrão comercial na cultura do eucalipto microbiologicamente não apresentou um padrão ou estabilidade nas análises microbiológicas durante os períodos analisados, portanto não foi possível comprovar ou descartar sua influência no ciclo biológico do carbono e do nitrogênio.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, A. ¿Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas? **Ecol. Austral**, v.13 p.195-204, 2003.
- AL-WABEL, M.I., USMAN, A.R., AL-FARRAJ, A.S., OK, Y.S., ABDULJABBAR, A., AL-FARAJ, A.I., SALLAM, A.S., Date palm waste biochars alter a soil respiration, microbial biomass carbon, and heavy metal mobility in contaminated mined soil. *Environ. **Geochem. Health***, p.1–18, 2017.
- ALVES, TATIANE SANTOS DOS; CAMPOS, LIZIA LENZA; NETO, NICOLAU ELIAS; MATSUOKA, MARCIA; LOUREIRO, MARIA FATIMA. Biomassa e atividade microbiana de solo sob vegetação nativa e diferentes sistemas de manejo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.33, n.2, 2011.
- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as PH, on the microbial biomass of forest soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.25, n. 3, p. 393-395, 1993.
- ANDRADE, D. S.; MIYAZAWA, M.; HAMAKAWA, P. J. **Microorganismos amonificadores e nitrificadores**. 1994.
- ATKINSON, C.J., FITZGERALD, J.D., AND HIPPS, N.A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. **Plant Soil** v.337 p. 1–18, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-010-0464-5>.
- BACA, B. E.; SOTO, U. L.; PARDO, R. M. P. **Fijación biológica de nitrógeno**. 2000.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.
- BALL PN, MACKENZIE MD, DELUCA TH, HOLBEN WE. Wildfire and charcoal enhance nitrification and ammonium-oxidizing bacterial abundance in dry montane forest soils. **J Environ Qual**, v. 39 p.1243–1253, 2010.
- BALOTA, ELCIO LIBORIO; CHAVES, JULIO CÉSAR DIAS. Microbial activity in soil cultivated with different summer legumes in coffee crop. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 35-44, 2011.
- BAILEY, V.L., FANSLER, S.J., SMITH, J.L., BOLTON JR., H. Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. **Soil Biol. Biochem.** v. 43, p.296 – 301, 2011.
- BARROS, J. D. S. Contribuições da matéria orgânica do solo para mitigar as emissões agrícolas de gases de efeito estufa. **Polêmica**, v. 12, n. 2, p. 341-351, 2013.
- BELSER, L. W. Nitrate reduction to nitrite, a possible source of nitrite for growth of nitrite-oxidizing bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 34, n. 4, p. 403-410, 1977.

BERGLUND LM, DELUCA TH, ZACKRISSON O. Activated carbon amendments to soil alter nitrification rates in Scots pine forests. **Soil Biol Biochem**, v. 36 p.2067–2073, 2004.

BIEDERBECK, V.; ZENTNER, R.; CAMPBELL, C. Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. **Soil Biol. Biochem.** v.37, n.10, p.1775-84, 2005.

BRADFORD, MARION M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, EDGAR M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. **Microbiologia do solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do solo**, p. 1-15, 1992.

BRASIL, 2003 INSTRUÇÃO NORMATIVA nº. 62, de 26 de agosto de 2003. Anexo I – Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de setembro de 2003, seção 1, p. 14.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura, Tabela 5930 - Área total existente em 31/12 dos efetivos da silvicultura, por espécie florestal. **Sistema IBGE de Recuperação Automática**. Disponível em: Acesso em: 23 abr. 2019.

BURRELL LD, ZEHETNER F, RAMPAZZO N, WIMMER B, SOJA G. Longterm effects of biochar on soil physical properties. **Geoderma**, v.102, p. 282 -96, 2016.

BUTNAN, S., DEENIK, J. L., TOOMSAN, B., ANTAL, M. J., VITYAKONA, P. Biochar characteristics and application rates affecting corn growth and properties of soils contrasting in texture and mineralogy. **Geoderma**. v. 237, p.105–116, 2015.

CASAL, M.; SCHULLER, D.; RODRIGUES, G.; PAIS, C. **Métodos convencionais em microbiologia**. 2004.

CHAN, K.Y., AND XU, Z. (2008). Biochar: Nutrient properties and their enhancement. **In Biochar for Environmental Management**, J. Lehmann, and S. Joseph, eds. (London, UK: Earthscan).

CHEN, J., LIU, X., ZHENG, J., ZHANG, B., LU, H., CHI, Z., WANG, J. Biochar soil amendment increased bacterial but decreased fungal gene abundance with shifts in community structure in a slightly acid rice paddy from Southwest China. **Applied Soil Ecology**, v. 71, p. 33-44, 2013.

COSTA NETO, V.; COSTA NETO, V.; SANTOS, C.; SIQUEIRA, D.; CARVALHO, L. Atributos microbiológicos do solo em área de pastagem degradada e em áreas reabilitadas sob manejo agroecológico. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 2015, Belém. **Diversidade e soberania na construção do bem viver**. Belém, 2015.

DAVIDSON, E. A., BELK, E. & BOONE, R. D. Soil water content and temperature as independent or confounded factors controlling soil respiration in a temperate mixed hardwood forest. **Global Change Biol**. V.4, p. 217–227; 1998.

DAVIDSON, E. A. & JANSSENS, I. A. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. **Nature**, v. 440, p. 165–173, 2006.

DEBOER W, KOWALCHUK GA. Nitrification in acid soil: micro-organisms and mechanisms. **Soil Biol Biochem**. v. 33, p. 853–866, 2001.

DELUCA, T.H., MACKENZIE, M.D., GUNDALE, M.J., AND HOLBEN, W.E. Wildlife-produced charcoal directly influences nitrogen cycling in ponderosa pine forests. **Soil Science**. p.70, n. 2, p. 448–453 2006. <http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2005.0096>.

DIAS, A. C. Transformações do nitrogênio. In: CARDOSO, N. B. J. E; ANDREOTE, F. D. 2 (Ed). **Microbiologia do solo**. 2 ed. Campinas, Piracicaba: ESALQ Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016, p. 99-110.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: **Proceedings of the 1st international symposium on nitrogen fixation**, Washington State University Press Pullman, v.2, p.518-538, 1976.

DÖBEREINER, J.; Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. **Microbiologia do solo**. **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**. p. 173-180, 1992.

DÖBEREINER, JOHANNA; BALDANI, VERA LÚCIA DIVAN; BALDANI, JOSÉ IVO. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. **Embrapa SPI**, 1995.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para prepare de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia**. EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 1999.

DOS SANTOS, H. G., JACOMINE, P. K. T., DOS ANJOS, L. H. C., DE OLIVEIRA, V. A., LUMBRERAS, J. F., COELHO, M. R., ... & CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

DU, Z., WANG, Y., HUANG, J., LU, N., LIU, X., LOU, Y., ZHANG, Q. Consecutive biochar application alters soil enzyme activities in the winter wheat–growing season. **Soil Science** v. 179 n.2, p.75–83, 2014.

DUCEY, T.F., IPPOLITO, J.A., CANTRELL, K.B., NOVAK, J.M., LENTZ, R.D. Addition of activated switchgrass biochar to an aridic subsoil increases microbial nitrogen cycling gene abundances. **Appl. Soil Ecol.** v.65, p.65–72, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.01.006>.

EGAMBERDIEVA, D.; RENELLA, G.; WIRTH, S.; ISLAM, R. Secondary salinity effects on soil microbial biomass. **Biology and Fertility of Soils**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 445-449, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0452-1>.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 5, p. 601-606, 1988.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. **Biological nitrogen fixation**, New York: Chapman and Hall, p. 1-42, 1992.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; JONES, C. A. **Growth and mineral nutrition of field crops**. CRC Press, 2011.

FAGERIA, N. K. **Nitrogen management in crop production**. CRC Press, 2014.

FAHMI, R. et al. The effect of lignin and inorganic species in biomass on pyrolysis oil yields, quality and stability. **Fuel**, v. 87, n. 7, p. 1230-1240, 2008.

FEKETE, I.; KOTROCZÓ, Z.; VARGA, CSABA; P. TAMÁSNAGY; GÁBORVÁRBÍRÓ; RICHARD D.BOWDEN; JÁNOS ATTILATÓTH; KATELAJTHA. Alterations in forest detritus inputs influence soil carbon concentration and soil respiration in a Central-European deciduous forest. **Soil Biol. Biochem.** v.74, p. 106–114, 2014.

FOSTER, E. J., HANSEN, N., WALLENSTEIN, M., COTRUFO, M. F. Biochar and manure amendments impact soil nutrients and microbial enzymatic activities in asemi-arid irrigated maize cropping system. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 233, p. 404-414, 2016.

GAMA-RODRIGUES EF, BARROS NF, RODRIGUES ACG, SANTOS GA. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, p. 29, n.6,p. 893-901, 2016.

GLEESON DB, MÜLLER C, BANERJEE S, MA W, SICILIANO SD, MURPHY DV. Response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to changing water filled pore space. **Soil Biol Biochem**, v.42, p.1888–1891, 2010.

HAIDER, G., STEFFENS, D., MOSER, G., MULLER, C., KAMMANN, C.I. Biochar reduced nitrate leaching and improved soil moisture content without yield improvements in a four-year field study. **Agric. Ecosyst. Environ.** v. 237, p. 80–94, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.019>.

HUANG M, YANG L, QIN H, JIANG L, ZOU Y. Fertilizer nitrogen uptake by rice increased by biochar application. **Biol Fertil Soils**, v.50, p.997–1000, 2017.

HUNGRIA, MARIANAGELA; ARAUJO, RICARDO S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-Serviço de Produção e Informação, 1994.

INNEREBNER, G.; KNAPP, B.; VASARA, T.; ROMANTSCHUK, M.; INSAM, H. Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost-treated soils. **Soil Biol. Biochem.** v.38 n.5, p.1092-1100, 2006.

INSAM H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. **Geoderma**, v.100, p.389–402, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(01\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(01)00029-5)

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (Brasil). **Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor agrossilvopastoril e agroindústrias associadas**: relatório de pesquisa. Brasília, DF: IPEA, 2012. Disponível em:http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120917_relatorio_residuos_organicos.pdf. Acesso em: 28 out. 2019.

JAKELAITIS, A.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B.; VIVIAN, R. Qualidade da camada superficial de solo sob mata, pastagem e áreas cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n.2, 2008.

JAIN, S., MISHRA, D., KHARE, P., YADAV, V., DESHMUKH, Y., MEENA, A. Impact of biochar amendment on enzymatic resilience properties of mine spoils. **Science of The Total Environment**, v. 544, p. 410-421, 2016.

JÚNIOR, DALTON LONGUE; COLODETTE, JORGE LUIZ. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 429-438, 2013.

KANDELER, ELLEN; GERBER, H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. **Biology and fertility of Soils**, v. 6, n. 1, p. 68-72, 1988.

IBÁ. **Sumário executivo da indústria brasileira de árvores**: relatório 2019. Brasília, DF: IBA, 2019. 80 p. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>.

KARLEN, D. L.; MAUSBACH, M. J.; DORAN, J. W.; CLINE, R. G.; HARRIS, R. F.; SCHUMAN, G. E. Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation (aguest editorial). **Soil Science Society of America Journal**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 4-10, jan. 1997. DOI: doi:10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x.

KASCHUK, G; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 1-13, jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.08.020>.

KHADEM, ALLAHYAR; RAIESI, FAYEZ. Responses of microbial performance and community to corn biochar in calcareous sandy and clayey soils. **Applied Soil Ecology**, v. 114, p. 16-27, 2017.

KUZYAKOV, Y. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 425-448, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.08.020>.

LAGHARI, M., NAIDU, R., XIAO, B., HU, Z., MIRJAT, M.S., HU, M., KANDHRO, M.N., CHEN, Z., GUO, D., JOGI, Q., ABUDI, Z.N. Recent developments in biochar as an effective tool for agricultural soil management: a review. **J. Sci. Food Agric.** v.96, p. 4840-4849, 2016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7753>.

LAIRD, D., FLEMING, P., WANG, B., HORTON, R., KARLEN, D. Biochar impact on nutrient leaching from a Midwestern agricultural soil. **Geoderma**, v.158, p. 436-442, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.05.012>.

LANNA, A. C.; SILVEIRA, P. M.; SILVA, M. B.; FERRARESI, T.M.; KLIEMANN, H. J. Atividade de urease no solo com feijoeiro influenciada pela cobertura vegetal e sistemas de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1933-1939, 2010.

- LEI, O.; ZHANG, R. Effects of biochar derived from different feedstocks and pyrolysis temperature on soil physical and hydraulic properties. **Journal of Soil and Sediments**, v. 13, n. 9, p. 1561 – 1572, 2013.
- LEHMANN, J., RILLIG, M. C., THIES, J., MASIELLO, C. A., HOCKADAY, W. C., CROWLEY, D. Biochar effects on soil biota—a review. **Soil biology and biochemistry**, v. 43, p. 1812-1836, 2011.
- LI, H., DONG, X., SILVA, E. B., OLIVEIRA, L. M., CHEN, Y., MA, L. Q. Mechanisms of metal sorption by biochar: Biochar characteristics and modifications. **Chemosphere**, v. 178, p. 466-478, 2017.
- LIANG, B., LEHMANN, J., SOLOMON, D., KINYANGI, J., GROSSMAN, J., O'NEILL, B., SKJEMSTAD, J.O., THIES, J., LUIZAO, F.J., PETERSEN, J., NEVES, E.G. Black carbon increases cation exchange capacity. **Soil Sci. Soc. Am. J.** v.70, p. 1719–1730, 2008.
- LIMA SL, TAMIOZZO S, PALOMINO EC, PETTER FA, MARIMON-JUNIOR BH. Interactions of biochar and organic compound for seedlings production of *Magonia pubescens* A. St.-Hil. **Revista Árvore**. v.39, p.655-661, 2015.
- LISBOA, B. B.; VARGAS, L. K.; SILVEIRA, A. O.; MARTINS, A. F.; SELBACH, P. A. Indicadores microbianos de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Porto Alegre, 2012.
- LIU, Z., ZHANG, F., WU, J. Characterization and application of chars produced from pinewood pyrolysis and hydrothermal treatment. **Fuel**. v.89, n.2, p.510–514, 2010.
- LUO, L., GU, J. D. Alteration of extracellular enzyme activity and microbial abundance by biochar addition: Implication for carbon sequestration in subtropical mangrove sediment. **Journal of environmental management**. v. 182, p. 29-36, 2016.
- LYCHUK, T. E., IZAURRALDE, R. C., HILL, R. L., MCGILL, W. B., & WILLIAMS, J. R. Biochar as a global change adaptation: predicting biochar impacts on crop productivity and soil quality for a tropical soil with the Environmental Policy Integrated Climate (EPIC) model. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v.20 n.8, p.1437-1458, 2014.
- LIU, X.; RASHTI, M. R.; DOUGALL, A.; ESFANDBOD, M.; VAN ZWIETEN, L.; CHEN, C. Subsoil application of compost improved sugarcane yield through enhanced supply and cycling of soil labile organic carbon and nitrogen in an acidic soil at tropical Australia. **Soil and Tillage Research**, [s. l.], v. 180, p. 73-81, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.02.013>.
- LONE AH, NAJAR GR, GANIE MA, SOFI JA, ALI T. Biochar for sustainable soil health: a review of prospects and concerns. **Pedosphere**, v.25, p.639–653, 2015.
- MAIA, CLAUDIA MARIA BF; MADARI, BEATA E.; NOVOTNY, ETELVINO H. Advances in biochar research in Brazil. **Embrapa Solos-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2011.

MANYA, J. J. Pyrolysis for Biochar Purposes: A Review to Establish Current Knowledge Gaps and Research Needs. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 46, n. 15, p.7939-7954, 7,2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es301029g>.

MECHRI, B., ATTIA, F., TEKAYA, M., CHEHEB, H., HAMMAMIA, M. Agronomic application of olive mill wastewaters with rock phosphate increase the 10Me18:0 fatty acid marker of actinomycetes and change rhizosphere microbial functional groups under long-term field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 70, p. 62-65, 2014.

MELO, C., FIALHO, C., FARIA, A., NETO, M., SARAIVA, D., COSTA, M., FERREIRA, L., FERREIRA, F. A. Microbial activity of soil cultivated with corn in association with weeds under different fertility management systems. **Chilean Journal of agricultural research**, v. 74, p.477- 484, 2014.

MENDES IC, SOUZA LM, SOUSA DMG, LOPES AAC, REIS JÚNIOR FB, LACERDA MPC, MALAQUIAS JV. Critical limits for microbial indicators in tropical Oxisols at post-harvest: the FERTBIO soil sample concept. **Appl Soil Ecol**. 139:85-93, 2019.

MIN, W.; GUO, H.; ZHANG, W.; ZHOU, G.; MA, L.; YE, J.; LIANG Y.; HOU, Z. Response of soil microbial community and diversity to increasing water salinity and nitrogen fertilization rate in an arid soil. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 117-126, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/09064710.2015.1078838>.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. 2 Ed. **Transformações bioquímicas e ciclo dos elementos no solo**. Lavras, MG: UFLA, p. 313-404, 2006.

MORO, E.; CRUSCIOL, C. A. C.; NASCENTE, A. S.; CANTARELLA, H.; LAMBAIS, M. R. Bactérias amonificantes e nitrificantes e teores de amônio e nitrato afetados por plantas de cobertura e fertilizantes nitrogenados. **Agrarian**, v. 9, n. 33, p. 210-218, 2016.

NAVARRETE, A. A., CANNAVAN, F. S., TAKETANI, R. G., TSAI, S. M. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. **Diversity**, v. 2, p. 787-809, 2010.

NEVES, E. G.; PETERSEN, J. B.; BARTONE, R. N.; HECKENBERGER, M. J. The timing of terra preta formation in the Central Amazon: archaeological data from three sites. In: GLASER, B.; WOODS, W. I. (Eds.). **Amazonian Dark Earths: explorations in space and time**. New York: Springer, p. 125 -134. 2004.

NICHOLS, K. A.; WRIGHT, S. F. Comparison of glomalin and humic acid in eight native US soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 170, p. 985-997, 2005.

NOBRE, C. P. et al. Agregação, Glomalina e Carbono Orgânico na Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. **Revista Caatinga**, v. 28, n.1, p. 138-147, 2014. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, Brasil.

NOGUEIRA, M. A.; ALBINO, U. B.; BRANDÃO-JÚNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M. F.; DIAS, B. A.; DUARTE, R. T. D.; GIOPPO, N. M. R.; MENNA, P.; ORLANDI, J. M.; RAIMAM, M. P.; RAMPAZO, L. G. L.; SANTOS, M. A.; SILVA, M. E. Z.; VIEIRA, F. P.; TOREZAN, J. M. D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, M. Promising indicators for

assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, ecosystems & environment**, [s .l.], v. 115, n. 1-4, p. 237-247, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.01.008>.

NOVOTNY, E. H. et al. Solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance characterization of humic acids extracted from Amazonian dark earths (Terra Preta de Índio). In: Woods, W. I. et al. Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision, **Springer Science**, p. 373-391. 2009.

OCHOA, S. A.; DE LA VEGA, E. G.; MOORILLÓN, G. V. N. Amonio-oxidasas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. **Terra Latinoamericana**, v. 33, n. 3, p. 233-245, 2015.

OCDE, O. Understanding the digital divide. **Paris: OCDE**, 2001.

OLESZCZUK, P., JOŚKO, I., FUTA, B., PASIECZNA-PATKOWSKA, S., PAŁYS, E., KRASKA, P. Effect of pesticides on microorganisms, enzymatic activity and plant in biochar-amended soil. **Geoderma**. v. 214, p. 10–18, 2014.

PAUL, E. A. **Soil microbiology, ecology and biochemistry**. Academic press, ed. 4, p. 205-223, 2014.

PAN F, LI Y, CHAPMAN SJ, KHAN S, YAO H. Microbial utilization of rice straw and its derived biochar in a paddy soil. **Science of the Total Environment**. v.559, p.15-23, 2016.

PETTER, F.A. Biomassa carbonizada como condicionador de solo: aspectos agronômicos do seu uso em solos de cerrado, Tese de Doutorado, UFGO, Ano de Obtenção :2010. O. Pyrolysischemistly.

PRADE, C. A.; MATSUMURA, A. T.; OTT, A. P.; PORTO, M. L. Diversidade de fungos do solo em sistemas agroflorestais de Citrus com diferentes tipos de manejo no município de Roca Sales, Rio Grande do Sul. **Biociências**, v. 15, n. 1, p. 73-81, 2007.

QIAN M, KUMAR A, ZHANG H, BELLMER D, HUHNE R. Recent advances in utilization of biochar. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p.1055-1064, 2015.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e manejo dos nutrientes**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Fixação biológica de nitrogênio-estado da arte. Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, v. 28, p. 350-68, 2005.

RILLIG, M. C.; WRIGHT, S. F.; ALLEN, M. F.; FIELD, C. B. Rise in carbon dioxide changes soil structure. **Nature**, v. 400, p. 628, 1999.

RILLING, M. C.; AGUILAR-TRIGUEROS, C. A.; BERGMANN, J.; VERBRUGGEN, E.; VERESOGLOU, S. D.; LEHMANN, A. Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. **New Phytologist**, v.205, p.1385-1388, 2003.

RITTL, T. F., ARTS, B., & KUYPER, T. W. Biochar: An emerging policy arrangement in Brazil?. **Environmental Science & Policy**, v.51, p.45-55, 2015.

Roscoe R, Machado PLOA. **Fracionamento físico do solo em estudos da matéria orgânica**. Dourados, Embrapa Agropecuária Oeste, 86p.,2002.

SANTOS, J. L. S. Biocarvão como condicionador da fertilidade e da microbiota de solo de Cerrado cultivado com soja. 102 f. Tese (Doutorado em Agronomia) -Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

SANTOS, M. V.; SILVA, D. V.; FONSECA, D. M. da; REIS, M. R. DOS; FERREIRA, L. R.; OLIVEIRA NETO, S. N. de; OLIVEIRA, F. L. R. de. Componentes produtivos do milho sob diferentes manejos de plantas daninhas e arranjos de plantio em sistema agrossilvipastoril. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.9, p.1545-1550, 2014.

SAUERSTEIN J, REUTER G. Nachweis und Charakterisierung einer konstitutiven Lävansucrase und einer epigenetisch regulierten Saccharase in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. **J Basic Microbiol**, v.28, p. 667–672, 1988. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620280927>

SARANYA, K., KUMUTHA, K. Standardization of the substrate material for large scale production of arbuscular mycorrhizal inoculum. **Int. J. Agric. Sci.** v.3, p.71–77, 2011.

SARATHCHANDRA, U. Nitrification activities and changes in the populations of nitrifying bacteria in soil perfused at two different H-ion concentrations. **Plant and Soil**, v.50, n.1, p.99-111, 1978.

SCHMIDT, E. L.; BELSER, L. W. Nitrifying bacteria. In: PAGE, A. L. ed. **Methods of Soil Analysis**; part 2. Chemical and microbiological properties. Madison: American Society of Agronomy, 2 ed., p.1027-1042, 1982.

SCHOENHOLTZ, STEPHEN H.; VAN MIEGROET, HELGA; BURGER, J. A. A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. **Forest ecology and management**, v. 138, n. 1-3, p. 335-356, 2000.

SILVA, A. C.; COSTA, A. S. V. Decomposição de partes vegetativas de eucalipto (*eucalyptus grandis*) submetidas a extratos de diferentes solos. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**. v. 2, n.2, 2004.

SILVA, EDMILSON EVANGELISTA; DE AZEVEDO, PEDRO HENRIQUE SABADIN; DE-POLLI, HELVÉCIO. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂). **Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

SILVEIRA, A. de O. Avaliação de metodologias para o monitoramento da qualidade do solo. 2011. 87 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Departamento de Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2011.

SINGH, R., BABU, J.N., KUMAR, R., SRIVASTAVA, P., SINGH, P., RAGHUBANSHI, A.S. Multifaceted application of crop residue biochar as a tool for sustainable agriculture: an ecological perspective. **Ecol. Eng.** v.77, p. 324–347, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.01.011>.

SIQUEIRA, JOSÉ OSWALDO et al. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. 1994.

SOLAIMAN, Z.M., BLACKWELL, P., ABBOTT, L.K., STORER, P. Direct and residual effect of biochar application on mycorrhizal root colonisation, growth and nutrition of wheat. *Aust. J. Soil Res.* v.48, p. 546–554, 2010.

SOLAIMAN, Z.M., ANAWAR, H.M. Application of biochars for soil constraints: challenges and solutions. *Pedosphere*, v. 25, p. 631–638, 2015. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)30044-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)30044-8).

SOUZA, FRANCISCO ADRIANO DE.; STURMER, SIDNEY LUIZ.; CARRELHO, ROSILAINE.; TRUFEM, SANDRA FARTO BOTELHO. Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas degradadas. In: Siqueira et al. **Micorrizas 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras, UFLA, p. 15-74, 2012.

SULEIMAN, A.K.A.; LUPATINI, M.; BOLDO, J.T.; PEREIRA, M.G. E ROESCH, L.F.W. Shifts in soil bacterial community after eight years of land-use change. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 36, n. 2, p. 137- 144, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.10.007>

SUN, Z., BRUUN, E. W., ARTHUR, E., DE JONGE, L. W., MOLDRUP, P., HAUGGAARD-NIELSEN, H., ELSGAARD, L. Effect of biochar on aerobic processes, enzyme activity, and crop yields in two sandy loam soils. **Biology and fertility of soils**, v. 50, p. 1087-1097, 2014.

SWAINE, M., OBRIDGE, R., CLARK, J. M., SHAW, L. J. Biochar alteration of the sorption of substrates and products in soil enzyme assays. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

TABATABAI, M.A. and BREMNER, J.M. Assay of urease activity in soils. **Soil Biology Biochemistry**. v.4 p.479-487, 1972.

TABATABAI, M. A. SULFUR 1. **Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties**, n. methods of soil analysis 2, p. 501-538, 1982.

TABATABAI MA. Soil enzymes. In: Weaver RW, Scott A, Bottomley PJ, editors. **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties. Madison: Soil Science Society of America**; v.2. p. 778-833, 1994.

TALBERG, ANITA. The basics of biochar. Australia: Parliamentary Library, p.9, 2009.

TEAM, R. CORE. R CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing. **R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria**. URL <http://www.R-project.org/>, page R Foundation for Statistical Computing, 2017.

TRIVELIN, P.C.O.; OLIVEIRA, M.W.; CESAR, V. A.; GAVA, G.J.C.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas do nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 193-201, 2002.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C. E JENKINSON, D.S. - An extraction method for measuring soil microbial biomass. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)

VAN DIEPENINGEN, A.; DE VOS, O.; KORTHALS, G.; VAN BRUGGEN, A. Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. **Appl. Soil Ecol.** v.31, n.1-2, p.120-35, 2006.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina, Embrapa Cerrados, p.524, 1997.

VECHI, ANDERSON; JÚNIOR, CARLOS ALBERTO DE OLIVEIRA MAGALHÃES. Aspectos positivos e negativos da cultura do eucalipto e os efeitos ambientais do seu cultivo. **Revista Valore**, v. 3, n. 1, p. 495-507, 2018.

VERHAMME, D. T.; PROSSER, J. I.; NICOL, G. W. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. **The ISME journal**, v. 5, n. 6, p. 1067, 2011.

VICTORIA, L. R.; PICCOLO, C. M.; VARGAS, T. A. A. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, N. B. J. E. (Ed). **Microbiologia do solo**. 2 ed. Campinas, SP:Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 105-120, 1992.

WANG, X., SONG, D., LIANG, G., ZHANG, Q., AI, C., ZHOU, W. Maize biochar addition rate influences soil enzyme activity and microbial community composition in a fluvo-aquic soil. **Applied soil ecology**, v. 96, p. 265-272, 2015.

WANG, B., GAO, B., FANG, J. Recent advances in engineered biochar productions and applications. **Crit. Environ. Sci. Technol.** v.47, n.22, p.2158–2207, 2017.

WINK, C.; REINERT, D. J.; MÜLLER, I.; REICHERT, J. M.; JACOMET, L. A idade das plantações de *Eucalyptus* sp. influenciando os estoques de carbono. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 333-343, 2013.

WRIGHT, SARAH F.; UPADHYAYA, AM. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and soil**, v. 198, n. 1, p. 97-107, 1998.

WU, F.; JIA, Z.; WANG, S.; CHANG, S. X.; STARTSEV, A. Contrasting effects of wheat straw and its biochar on greenhouse gas emissions and enzyme activities in a Chernozemic soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 555-565, 2012. DOI: 10.1007/s00374-012-0745-7.

YAN, J. H, WANG, Y. P., ZHOU, G. Y. & ZHANG, D. Q. Estimates of soil respiration and net primary production of three forests at different succession stages in South China. **Global Change Biol.** 12, 810–821, 2006.

YANG, Y.; MA, Z.; JIANG, Y.; LIAN, X.; XI, B.; PEI, Y. A nitrogen transformation model for multi-layer enhanced groundwater remediation technology. **Environmental technology**, v. 39, n. 22, p. 2873-2881, 2018.

ZHANG, R., ZHANG, Y., SONG, L., SONG, X., HANNINEN, H., WU, J. Biochar enhances nut quality of *Torreya grandis* and soil fertility under simulated nitrogen deposition. **For. Ecol. Manag.** v.391, p.321–329, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.02.036>.

ZHU, L. X., XIAO, Q., CHENG, H. Y., SHI, B. J., SHEN, Y. F., LI, S. Q. Seasonal dynamics of soil microbial activity after biochar addition in a dryland maize field in North-Western China. **Ecological Engineering**, v. 104, p. 141-149, 2017.