

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO  
VEGETAL**

**Érika Manuela Gonçalves Lopes**

**Biomassa e diversidade microbiana em solo adubado  
com biocarvão e cultivado com cana-de-açúcar**

**Érika Manuela Gonçalves Lopes**

**Biomassa e diversidade microbiana em solo adubado com biocarvão e cultivado com cana-de-açúcar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

**Orientador:** Dr. Luiz Arnaldo Fernandes

Montes Claros  
Fevereiro de 2023

Lopes, Érika Manuela Gonçalves .

L864b            Biomassa e diversidade microbiana em solo adubado com biocarvão e cultivado  
2023            com cana-de-açúcar [manuscrito]/ Érika Manuela Gonçalves Lopes. Montes Claros,  
2023.  
59 f.: il.

Tese (doutorado) - Área de concentração em Produção Vegetal. Universidade  
Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Luiz Arnaldo Fernandes

Banca examinadora: Luiz Arnaldo Fernandes, Matheus Mendes Reis, Claudinéia  
Ferreira Nunes, Marinalva Martins dos Santos, Antônio dos Santos Junior..

Inclui referências: f. 18-23; f. 33-38; f. 52-58.

1. Solos -- Fertilidade -- Teses. 2. Sequestro de carbono -- Teses. 3. Solos --  
Bioquímica -- Teses. I. Fernandes, Luiz Arnaldo. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 631.4

### ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 13 dias do mês de fevereiro de 2023, às 18:30 horas, sob a Presidência do Professor Luiz Arnaldo Fernandes, D. Sc. (Orientador UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Claudinéia Ferreira Nunes, D. Sc. (UFMG/ICA), Marinalva Martins dos Santos, D. Sc. (UFVJM), Matheus Mendes Reis, D. Sc. (IFNMG) e Antônio dos Santos Junior, D. Sc. (UEMG), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de tese de **Erika Manuela Gonçalves Lopes**, aluna do Curso de Doutorado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de tese intitulada: “**Biomassa e diversidade microbiana em solo adubado com biocarvão e cultivado com cana-de-açúcar**”, sendo a aluna considerada **APROVADA**. E, para constar, eu, Professor Luiz Arnaldo Fernandes, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do **ARTIGO 65** do regulamento do Curso de Doutorado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

**Art. 65 Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.**

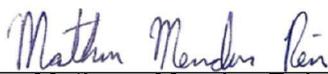
Montes Claros, 13 de fevereiro de 2023.



Claudinéia Ferreira Nunes  
 Membro



Marinalva Martins dos Santos  
 Membro



Matheus Mendes Reis  
 Membro



Antônio dos Santos Junior  
 Membro



Luiz Arnaldo Fernandes  
 Orientador

*À minha saudade diária e eterna de meu pai, Gilmar  
Barbosa Lopes, que sempre me amou, honrou e lutou  
para que eu pudesse alcançar todos os meus sonhos.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus que me concedeu a vida e sempre iluminou meus caminhos. Sem a Sua presença nada seria. Aos meus pais, Gilmar (*in memoriam*) e Antônia, que nunca me deixaram faltar nada, sempre zelosos, amorosos e batalhadores.

À minha irmã Gabriela que sempre esteve ao meu lado e pelo seu cuidado infindável.

Ao professor Luiz Arnaldo pela amizade, apoio, confiança e orientação na execução deste trabalho.

Ao meu noivo Matheus Mendes pelo apoio, carinho, amor, paciência, incentivo e compreensão durante esta etapa e pela colaboração ativa na realização deste trabalho.

Aos professores pelos ensinamentos fornecidos.

Aos meus amigos por tanta ajuda, carinho e amizade.

À minha família que sempre torceu por mim.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Instituto de Ciências Agrárias e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de realização de minha trajetória acadêmica.

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 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de recursos financeiros para a realização deste trabalho.

Às demais pessoas que, mesmo não citadas, contribuíram de alguma forma para a realização deste estudo.

Muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito”

(Charles Chaplin).

## **Biomassa e diversidade microbiana em solo adubado com biocarvão e cultivado com cana-de-açúcar**

### **RESUMO**

O biocarvão é um produto gerado a partir da pirólise de biomassa e vem sendo utilizado como corretivo de solos agrícolas. O interesse no biocarvão é por sua capacidade de sequestrar C do solo, além de promover benefícios em áreas agrícolas pelas alterações nas propriedades físicas e químicas do solo. No entanto informações da interação do biocarvão com as propriedades biológicas ainda são incipientes. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do biocarvão sobre a comunidade microbiana e atividade enzimática do solo ao longo do tempo. Durante dois anos consecutivos, foram coletadas amostras de solo, na linha de plantio de cana-de-açúcar adubada com biocarvão. O plantio da cana-de-açúcar foi realizado, no ano de 2017, em delineamento com blocos casualizados, esquema fatorial 5 x 2, com quatro repetições, sendo cinco doses de biocarvão (0, 10, 20, 30 e 40 Mg ha<sup>-1</sup>), com e sem correção da fertilidade do solo. Foram avaliadas as atividades das enzimas  $\beta$ -glicosidase, fosfatase ácida, arilsulfatase, urease e diacetato de fluoresceína (FDA), além dos teores de carbono da biomassa microbiana (MBC), respiração basal do solo (SBR), carbono orgânico total (SOC), quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>), quociente microbiano (qMIC) e índice de Shannon. Os efeitos de interação entre as doses de biocarvão e a adubação com NPK foram significativos ( $p \leq 0,05$ ) para os teores de MBC, SBR, qCO<sub>2</sub>, qMIC e índice de Shannon e para as enzimas  $\beta$ -glicosidase, arilsulfatase, fosfatase ácida e urease. Não se observou interação entre os fatores para o SOC e a enzima FDA. Quanto à atividade enzimática do solo, as doses de biocarvão promoveram aumento de todas as enzimas analisadas, com exceção apenas da arilsulfatase em solo com adição de NPK. Em geral, os tratamentos com fertilizante químico apresentaram maior atividade enzimática, com exceção da fosfatase ácida, independentemente da dose de biocarvão e da urease nos tratamentos com doses de biocarvão menores que 20 Mg ha<sup>-1</sup>. Quanto à atividade biológica do solo, o aumento das doses de biocarvão aumentaram a MBC, a SBR, o qCO<sub>2</sub>, o qMIC e o índice de Shannon, sendo observado os maiores valores nos solos que receberam doses intermediárias de biocarvão (10-30 Mg ha<sup>-1</sup>). As doses de biocarvão aumentaram linearmente o teor de SOC. Os tratamentos com fertilizante químico apresentaram, em geral, a maior atividade biológica do solo. Observaram-se maiores valores do índice de Shannon, de SBR e das enzimas  $\beta$ -glicosidase e urease no terceiro ano após a implantação do canavial nos tratamentos com adição de NPK. Concluiu-se que o uso de biocarvão pode aumentar a atividade enzimática e biológica e o sequestro de carbono no solo.

**Palavras-chave:** enzimas, fertilidade do solo, sequestro de carbono, atividade biológica.

## **Biomass and microbial diversity in soil fertilized with biochar and cultivated with sugar cane**

### **ABSTRACT**

Biochar is a product generated from the pyrolysis of biomass and it has been used as a corrective for agricultural soils. The interest in biochar is due to its ability to sequester C from the soil, in addition to promoting benefits in agricultural areas through changes in the physical and chemical properties of the soil. However, information of the interaction of biochar with biological properties are still incipient. In this sense, the present work aimed to investigate the effects of biochar on the microbial community and enzymatic activity of the soil over time. During two consecutive years, they were collected soil samples from the sugarcane planting line fertilized with biochar. The planting of sugarcane was carried out, in 2017, in a randomized block design, factorial 5 x 2, with four replications, with five doses of biochar (0, 10, 20, 30 and 40 Mg ha<sup>-1</sup>), with and without soil fertility correction. They were evaluated the activities of the enzymes  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase, arylsulfatase, urease and fluorescein diacetate (FDA), in addition to the carbon content of microbial biomass (MBC), soil basal respiration (SBR), total organic carbon (SOC), metabolic quotient (qCO<sub>2</sub>), microbial quotient (qMIC) and Shannon index. The interaction effects between biochar doses and NPK fertilization were significant ( $p \leq 0.05$ ) for contents of MBC, SBR, qCO<sub>2</sub>, qMIC and Shannon index and for the enzymes  $\beta$ -glucosidase, arylsulfatase, acid phosphatase and urease. It was not observed interaction between the factors for SOC and the ADF enzyme. As for the enzymatic activity of the soil, the doses of biochar promoted an increase in all the enzymes analyzed, with the exception of only arylsulfatase in soil with the addition of NPK. In general, treatments with chemical fertilizer showed higher enzymatic activity, with the exception of acid phosphatase, regardless of the dose of biochar and urease in treatments with doses of biochar lower than 20 Mg ha<sup>-1</sup>. As for the biological activity of the soil, the increase in biochar doses increased the MBC, SBR, qCO<sub>2</sub>, qMIC and the Shannon index, being observed the highest values in soils that received intermediate doses of biochar (10-30 Mg ha<sup>-1</sup>). The biochar doses linearly increased the SOC content. Treatments with chemical fertilizer showed, in general, the highest soil biological activity. They were observed higher values of the Shannon index, SBR and  $\beta$ -glucosidase and urease enzymes in the third year after the implantation of the sugarcane field in the treatments with the NPK addition. It was concluded that the use of biochar can increase enzymatic and biological activity and carbon sequestration in the soil.

**Keywords:** enzymes, soil fertility, carbon sequestration, biological activity.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Biocarvão	13
3.2 Efeito do biocarvão na comunidade microbiana	14
3.3 Indicadores da atividade biológica do solo	15
3.4 Atividade enzimáticas	17
3.5 Referências	18
4 ARTIGOS	24
4.1 Artigo 1- Biochar increases enzyme activity and total microbial quality of soil grown with sugarcane.	24
1. Introduction	26
3. Results	28
4. Discussion	30
5. Conclusions	33
6. References	33
4.2 Artigo 2- Biocarvão altera a atividade microbiana do solo cultivado com cana-de-açúcar ao longo do tempo	39
1. Introdução	42
2. Material e métodos	43
3. Resultados	45
4. Discussão	48
5. Conclusão	52
6. Referências	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

## 1 INTRODUÇÃO

O biochar ou biocarvão é um material carbonáceo produzido por meio da transformação térmica de resíduos florestais, agrícolas e ambientais (KUMAR *et al.*, 2023). Essa conversão térmica ocorre, em ambiente com baixa disponibilidade ou ausência de oxigênio (ABBOTT *et al.*, 2018), processo esse denominado de pirólise. Na literatura, há relatos do uso do biocarvão, na remoção de poluentes ambientais (AWASTHI *et al.*, 2022), correção do solo (BOLAN *et al.*, 2022), bem como aditivo no processo de compostagem, para melhorar o rendimento e a qualidade do composto, aumentando a atividade microbiana e, ao mesmo tempo, reduzindo a emissão de gases do efeito estufa (GEEs) (AWASTHI *et al.*, 2022; THANGARAJAN *et al.*, 2018). As diversas aplicações do biocarvão podem estar associadas as suas propriedades físicas e químicas, como alta área superficial, porosidade, capacidade de troca catiônica e capacidade de adsorção (CHI *et al.*, 2021; NGUYEN *et al.*, 2021).

O biocarvão, em geral, é alcalino e possui grande área de superfície com diferentes grupos funcionais ativos que podem adsorver muitos cátions (QIAO *et al.*, 2015), o que pode reduzir a disponibilidade de elementos potencialmente tóxicos no solo (BASHIR *et al.*, 2018). Por outro lado, a aplicação de biocarvão no solo pode elevar a disponibilidade de nutrientes, como o fósforo, potássio e nitrogênio, favorecendo assim o crescimento de plantas, particularmente, em solos pobres nesses elementos (AHMAD *et al.*, 2017; ALAZZAZ *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022; HONG *et al.*, 2018; PANDIT *et al.*, 2018).

A aplicação de biocarvão em cultivos agrícolas aumenta a disponibilidade de nutrientes no solo, o que está associada à maior produção, além disso, o biocarvão pode ser produzido, a partir de resíduos (lodo de esgoto, por exemplo), o que promove a mitigação de impactos ambientais e reduz a emissão de gases do efeito estufa por meio do armazenamento de carbono no solo (BOLAN *et al.*, 2022; KUMAR *et al.*, 2023). Apesar desses benefícios já relatados na literatura científica, pouco se sabe sobre a interação do biocarvão com a microbiota do solo e seu efeito nas propriedades físicas, químicas e biológicas em médio e longo prazo.

Além disso, a caracterização da comunidade microbiana presente no solo é de grande importância, visto que os microrganismos são indicadores sensíveis de alterações ambientais e, sobretudo, responsáveis pela manutenção da estabilidade do ecossistema e pelas transformações bioquímicas que acontecem no solo. O estudo da atividade microbiana do solo permite identificar alterações no solo, seja pela presença de poluentes, ou pelo uso incorreto dos solos agrícolas; além de possibilitar criar estratégias para a prevenção da degradação dos ecossistemas naturais (LAMBAL *et al.*, 2005).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Investigar o efeito do biocarvão sobre a comunidade microbiana do solo ao longo de dois anos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Examinar as atividades enzimáticas do solo.
- Analisar as atividades microbianas no solo.
- Estimar a diversidade microbiológica do solo.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Biocarvão

Em pesquisas realizadas no solo da Amazônia, encontraram-se manchas de solo de coloração escura com alta fertilidade e com altos teores de matéria orgânica. Essas manchas férteis, associados às antigas ocupações indígenas, foram denominadas de Terra Preta de Índio (TPI). Também verificou-se que o teor de carbono encontrado nessa área era superior, apresentando valores de até  $150 \text{ g kg}^{-1}$ , já que, em outras áreas adjacentes, eram de  $20$  e  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  (NOVOTNY *et al.*, 2009). Em virtude da alta fertilidade e da capacidade de retenção de carbono das TPI, pesquisadores realizaram estudos, a fim de produzir compostos orgânicos condicionadores de solos, que se assemelhassem às características da TPI. Esse produto obtido pelos pesquisadores foi nomeado de biocarvão e se tornou alternativa promissora às culturas agrícolas (PANDEY *et al.*, 2021).

O biocarvão, também conhecido como biochar, é um produto gerado, a partir da decomposição térmica de biomassa ou matéria orgânica, em condições restritas de oxigênio, processo esse denominado pirólise (quebra de moléculas pelo calor, entre temperaturas de  $300$  e  $900^\circ \text{C}$ ) (LEHMANN *et al.*, 2015). Fonte de carbono, o biocarvão possui grande quantidade de compostos aromáticos, o que permite a retenção do carbono, permanecendo por longos períodos no solo. Além disso, a manutenção de carbono no solo, por meio do uso do biocarvão na agricultura, favorece o crescimento e desenvolvimento das culturas e auxilia na redução de emissão de gases do efeito estufa (BATISTA e GOMES, 2021).

Diversos materiais podem ser utilizados, na produção do biocarvão, como, por exemplo, restos vegetais, animais, madeiras e resíduos industriais (PENG *et al.*, 2018). Além disso, a matéria-prima utilizada e a temperatura de pirólise influenciam na qualidade do biocarvão (YUAN *et al.*, 2011). De acordo Luo *et al.* (2018), biocarvões produzidos em temperaturas inferiores a  $550^\circ \text{C}$  apresentam maior teor de macronutriente lábeis e matéria orgânica, sendo indicados para a correção e aumento de nutrientes em solos de baixa fertilidade. Já os biocarvões produzidos acima de  $550^\circ \text{C}$  são considerados bons adsorventes, uma vez que possuem maior quantidade de estruturas poliaromáticas e maior pH.

No biocarvão, dependendo da temperatura de pirólise, o carbono está, em sua maior parte, em estruturas aromáticas policondensadas, por meio de ligações em forma de anel benzênico de átomos de carbono com oxigênio (C-O) e de carbono com hidrogênio (C-H) (Lehman & Joseph, 2015). As ligações C-O e C-H e as relações O/C e O/H determinam a estabilidade do carbono e o grau de aromaticidade dos compostos. Dessa forma, quanto menor as relações O/C e H/C mais elevado é o grau de aromaticidade (AL-WABEL *et al.*, 2013).

Biocarvões, com estruturas de carbono mais estáveis, ou seja, com menores relações O/C e H/C são obtidos em temperaturas de pirólise mais elevadas. Dessa forma, quanto maior a temperatura de pirólise menor o rendimento em biocarvão e maior o teor de carbono fixo e de índice termogravimétrico (Lehman & Joseph, 2015). Carbono fixo é aquele que não é eliminado, durante a pirólise, enquanto o índice termogravimétrico indica a variação de massa da amostra em função da variação de temperatura. Em função dos custos operacionais do processo de pirólise, para a produção de biocarvão, recomenda-se submeter as amostras a  $300 - 350^\circ \text{C}$ , uma vez que, nessa faixa de temperatura, já é possível atingir o teor máximo de carbono fixo e rendimento gravimétrico (RÓZ *et al.*, 2015).

Alho (2012), citando vários autores, descreve o processo de pirólise por fases (fases A, B e C), em função do grau de decomposição térmica. A Fase A inicia-se, a partir de  $150^\circ \text{C}$ , quando ocorre a formação

de ácido fórmico, ácido acético, glioxal e de gases efluentes, constituídos de vapor d'água e traços de dióxido de carbono e inicia-se a quebra das ligações éter da lignina. A fase B inicia-se entre 200 e 280 °C, quando são produzidos gases semelhantes aos da fase A e ocorre a quebra das hemiceluloses (componentes menos estáveis à degradação térmica, por sua natureza amorfa), a partir de 250 °C e a despolimerização da celulose, nas regiões amorfas e a ruptura da lignina em blocos complexos, a partir de 260 °C. Nessa fase, as reações químicas são endotérmicas, e os gases produzidos não são combustíveis.

A fase C inicia-se, a partir de 280°C, quando são produzidos monóxido de carbono, metano, formaldeído, ácido fórmico, ácido acético, metanol e hidrogênio, que evoluem no sistema, diluídos com os produtos da pirólise das fases A e B e alcatrões. Aos 325°C e 350°C, respectivamente, na prática, todas as hemiceluloses e celulosas são degradadas. Próximo aos 300°C, ocorre a quebra das ligações aromáticas da lignina, e as cadeias alifáticas destacam-se das cadeias aromáticas. A quebra das ligações carbono-carbono ocorre entre 370 e 400°C. A massa produzida nessa fase é o biocarvão, sendo a lignina o principal constituinte, representando 50% da sua própria massa inicial, a uma temperatura final de 450°C. A fase C representa a pirólise propriamente dita, as reações são exotérmicas e a decomposição térmica do material pode se manter apenas com a energia liberada da quebra das ligações das unidades básicas de celulose, hemiceluloses e lignina.

Quando incorporado, o biocarvão promove alterações nas propriedades físicas e químicas do solo, como elevação da capacidade de troca catiônica (CTC), melhoria da estrutura, aumento da capacidade de retenção de água e do pH do solo e reduz a lixiviação nutrientes, além de favorecer a fixação de carbono e a reciclagem de nutrientes (LEITE *et al.*, 2014; KÄTTERER *et al.*, 2019). A maior oxigenação e a disponibilidade de nutrientes, em solos adubados com biocarvão, podem favorecer o desenvolvimento e a reprodução de microrganismos que beneficiam o desenvolvimento das plantas (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010).

O biocarvão também se comporta como adsorvente de compostos poluentes orgânicos e inorgânicos, sendo indicado pela literatura como alternativa para evitar a contaminação de águas subterrâneas (FELLET *et al.*, 2014). Além disso, a utilização de resíduos agrícolas, como fonte de nutrientes, na forma de biocarvão, reduz a pressão sobre o meio ambiente (AHMAD *et al.* 2014).

Em estudo realizado em solos ácidos, verificou-se que o biocarvão foi capaz de aumentar o pH, bem como reduzir o teor de alumínio presente no solo (VAN ZWIETEN *et al.*, 2010). De acordo com os autores, a capacidade de neutralização dos fatores de acidez de solo do biocarvão foi em razão da presença de carbonatos de magnésio e de carbonato após pirólise da biomassa. Assim, pode-se inferir que o biocarvão apresenta potencial de corretivo do pH do solo, além de contribuir para a adsorção de elementos tóxicos. Além disso, a presença do biocarvão contribui significativamente para o rendimento das culturas em agroecossistemas tropicais (JEFFERY *et al.* 2017).

### **3.2 Efeito do biocarvão na comunidade microbiana**

A introdução do biocarvão promove transformações físicas e químicas no solo e, em consequência, também interfere nas propriedades microbianas (LEHMANN *et al.*, 2011). Assim, o estudo da influência do biocarvão sobre as atividades microbianas é de grande importância, uma vez que os microrganismos são sensíveis às mudanças ambientais, tornando-se bons indicadores da qualidade do solo (SOHI *et al.*, 2010).

Além de fornecer compostos orgânicos e nutrientes, o biocarvão promove vários outros benefícios para os microrganismos do solo. Os poros do biocarvão funcionam como microsítios, abrigos, que protegem os microrganismos (bactérias, actinomicetos e fungos, por exemplo) contra dessecação e predadores (STEWART *et al.*, 2013). Algumas substâncias tóxicas, como pesticidas e metais pesados, que causam efeitos antagônicos ao crescimento e desenvolvimento da comunidade microbiana, podem ser adsorvidas pelo biocarvão, diminuindo assim suas toxicidades (CHEN *et al.*, 2009).

O biocarvão contribui aos processos metabólicos dos microrganismos, como exemplo, para alguns fungos basidiomicetos, que são capazes de decompor a lignina pela presença da enzima manganês-peroxidase, cuja atividade é potencializada pelo carbono do biocarvão (LEHMANN *et al.*, 2003).

Outras relações planta-microrganismos que também se beneficiam do biocarvão são as micorrizas e a fixação biológica de nitrogênio. A adição de biocarvão favorece as micorrizas tanto pelo fornecimento de nutrientes quanto pelos microambientes, em que os poros são utilizados pelas hifas como habitat (WARNOCK *et al.*, 2007). Em relação à fixação biológica de nitrogênio, o biocarvão favorece o crescimento e multiplicação de bactérias diazotróficas (ATKINSON *et al.*, 2010; KHODADAD *et al.*, 2011; MIA *et al.* (2014).

Além do aumento da população de microrganismos, relatado por vários autores (OTSUKA *et al.*, 2008; GRABER *et al.*, 2010; EGAMBERDIEVA *et al.*, 2016), a diversidade microbiana pode se alterar com o tempo em solos adubados com biocarvão (SOLAIMAN *et al.*, 2010). Zimmermann *et al.* (2012) relatam que inicialmente, ao se introduzir o biocarvão no solo, são encontradas maiores populações bacterianas, entretanto, durante a decomposição do biocarvão, o pH do solo tende a diminuir, o que favorece o crescimento e desenvolvimento de fungos. Em cultivo de algodão, foi observado que houve um aumento do Índice de Shannon da população microbiana, um dos principais índices para mensurar a diversidade de espécies, pela presença do biocarvão (GU *et al.*, 2014). De acordo com Zhang *et al.* (2011), a interação da comunidade microbiana do solo com o biocarvão acarreta variáveis respostas metabólicas, em virtude da composição do solo, do biocarvão e dos microrganismos presentes.

### **3.3 Indicadores da atividade biológica do solo**

O solo é um ambiente complexo que apresenta diversas funções, como fornecimento de nutrientes e sustentação para as plantas, ciclagem de nutrientes, habitat para os macro e microrganismos, retenção de água, remediação de poluentes e imobilização de elementos potencialmente tóxicos. A qualidade do solo está intimamente relacionada com a sua microbiota, portanto a atividade microbiana é um indicador bastante sensível às mudanças ambientais (DE ARAUJO e MONTEIRO, 2007).

Entre os indicadores da atividade biológica do solo, destacam-se as atividades de enzimas, a taxa de respiração e a biomassa microbiana que podem ser utilizadas no monitoramento de alterações ambientais decorrentes do uso agrícola (FERREIRA *et al.*, 2017). A atividade biológica está diretamente relacionada à fertilidade, estrutura e retenção e transporte de água no solo (DORAN e PARKI, 1994).

Um dos principais indicadores empregados, para avaliar a qualidade do solo, é a biomassa microbiana, também conhecida como carbono da biomassa microbiana (CBM). O CBM representa a parte viva da matéria orgânica do solo, composta por todos os microrganismos (bactérias, fungos, actinomicetos, leveduras e representantes da microfauna, como os protozoários) e está associado à quantidade de carbono e nutrientes imobilizados pelos microrganismos, à formação e ciclagem da matéria orgânica e ao

fluxo de carbono e nutrientes do solo. Além disso, o CBM influencia diretamente na qualidade e produtividade das culturas (GAMA-RODRIGUES e GAMA-RODRIGUES, 2008).

Considerada como a parte viva da matéria orgânica (bactérias, fungos, actinomicetos), a biomassa microbiana constitui aproximadamente 5% do carbono orgânico do solo e de 1% a 5% do nitrogênio do solo (JENKINSON e LADD, 1981; SMITH e PAUL, 1990). Altamente influenciada pelas transformações no ecossistema, o CBM identifica precocemente alterações na matéria orgânica e diversidade microbiana (HOFFMANN *et al.*, 2018). Evidências experimentais mostram que a adição de biocarvão exerce um papel importante na biomassa microbiana do solo (DEMISEIE *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014). Segundo Warnock *et al.* (2007), a adição de biocarvão no solo promoveu aumento da biomassa microbiana, em virtude do fornecimento de compartimentos que contribuíram para o crescimento de bactérias e fungos, além da disponibilidade de carbono e outros nutrientes. Ali *et al.* (2020) verificaram que a dose de 60t ha<sup>-1</sup> de biocarvão ocasionou aumento de 87% do CBM quando comparado ao solo controle, sem adição de biocarvão.

Outro indicado bastante utilizado é o quociente microbiano (qMIC), que representa a eficiência do uso do carbono da biomassa e é expresso pela relação entre o CBM e o carbono orgânico total do solo. Segundo Lopes *et al.* (2011), os distintos valores de qMIC podem ser interpretados como resposta à eficiência da conversão de C microbiano, à estabilização do C orgânico da fração mineral do solo e às perdas de C do solo. Em situações, em que a biomassa se encontra sob algum estresse (baixo pH, déficit de nutrientes, salinidade etc.), tem sua capacidade de utilização do carbono reduzida, resultando em menor qMIC. Entretanto, em condições favoráveis ou na presença de matéria orgânica de boa qualidade, a biomassa microbiana eleva o valor do qMIC (WARDLE, 1994).

A respiração basal do solo indica a produção de carbono no solo resultante da atividade metabólica dos microrganismos presentes, ou seja, a soma total de todas as funções metabólicas nas quais o CO<sub>2</sub> é produzido. A respiração é também um indicador sensível e revela rapidamente alterações nas condições ambientais do solo (DE-POLLI e PIMENTEL, 2005), podendo ser medida pela quantificação de CO<sub>2</sub> liberado. A disponibilidade do substrato, umidade, temperatura e aeração são fatores que influenciam na quantificação da respiração sob diferentes sistemas de manejo do solo (ARAÚJO e MONTEIRO, 2006). Lehmann *et al.* (2011) relataram que o biocarvão não elevou a taxa respiratória do solo, demonstrando que houve maior eficiência do uso de carbono pela comunidade microbiana. De forma similar, Liu *et al.* (2016) observaram que diferentes biocarvões não alteraram a taxa respiratória do solo, todavia foram eficientes no aumento da população de microrganismos do solo.

Outro indicador das mudanças ambientais no solo é o quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>). Estimado pela razão entre SBR e MBC, o qCO<sub>2</sub> representa a quantidade de C-CO<sub>2</sub> produzido em determinado tempo por unidade de biomassa microbiana (SILVA *et al.*, 2012). Segundo Cunha *et al.* (2011), o CBM, sob condições de estresse, resulta em maior valor de RBS e qCO<sub>2</sub>, sendo o qCO<sub>2</sub> um indicador sensível da qualidade solo.

Além disso, o carbono orgânico total do solo (COT) se torna imprescindível à avaliação da qualidade do solo, uma vez que participa na formação e estabilidade dos agregados do solo e, conseqüentemente, da estrutura do solo (DEMISEIE; LIU; ZHANG, 2014). Estudos relatam que a presença do biocarvão contribuiu para maior valor de COT (FIGUEIREDO *et al.*, 2019; TIAN *et al.* 2016). Sun *et al.* (2021), em um experimento de campo durante seis anos, observaram que a presença do biocarvão contribuiu para

maior estabilidade dos agregados do solo, aumentando o COT nos macroagregados e maior CBM. Resultados semelhantes foram descritos por Dong *et al.* (2016), que observaram que a aplicação de biocarvão promoveu um aumento do COT e do nitrogênio total do solo.

### 3.4 Atividades enzimáticas

O metabolismo microbiano é um dos principais promotores da transformação de nutrientes no solo (ARNOSTI, 2011) e, nesse processo, os microrganismos produzem enzimas extracelulares para adquirir recursos e energia de biomoléculas complexas presentes no ambiente solo. Portanto a análise dessas enzimas permite inferir sobre a diversidade funcional da microbiota do solo e, por conseguinte, a qualidade desse solo (BAILEY *et al.*, 2011). A diversidade funcional revela a pluralidade de atividades exercidas pelos microrganismos dentro de um ecossistema (Kennedy, 1999).

O impacto da aplicação de biocarvão no solo, principalmente na ciclagem de nutrientes, pode ser mensurado pelas enzimas extracelulares que juntamente com os microrganismos participa dos processos do solo e estão envolvidas na decomposição da matéria orgânica (ELZOBAIR *et al.*, 2016).

A enzima  $\beta$ -glicosidase está relacionada com a distribuição e mineralização do carbono (GIL-SOTRES *et al.*, 2005). Além do mais, essa enzima é responsável pelo fornecimento de energia na forma de glicose que é utilizada por organismos heterotróficos do solo (KANDELER, 1988). Em pesquisa a campo, realizada durante sete anos, verificou-se que doses de biocarvão produzido, a partir de espécies do Cerrado, promoveram aumento na enzima  $\beta$ -glicosidase e urease em um Latossolo do Cerrado brasileiro (PETTER *et al.*, 2018). Wang *et al.* (2015) relataram que a presença do biocarvão de milho levou ao aumento significativo do carbono orgânico do solo, nitrogênio total e potássio trocável, entretanto, somente em doses baixas de biocarvão (0,5% em massa) houve aumento da  $\beta$ -glicosidase.

A enzima arilsulfatase é de grande importância, uma vez que está envolvida no ciclo do enxofre e é responsável pela disponibilização de até 70% do enxofre encontrado no solo. Além disso, o enxofre é um elemento que faz parte da matéria orgânica e é essencial para o desenvolvimento das plantas e microrganismos (CASIDA, *et al.*, 1964; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Outra enzima bastante estudada são as fosfatases, envolvidas no ciclo do fósforo (P), que tem como função a hidrólise de ésteres de fosfato. Assim, essas enzimas disponibilizam o fósforo, previamente, para os microrganismos e, em seguida, para as plantas (TURNER e HAYGARTH, 2005). Grande parte dos solos brasileiros são ácidos, dessa forma, as enzimas mais analisadas são as fosfatases ácidas (MENDES *et al.*, 2019). Diversos estudos relatam que a aplicação de biocarvão pode influenciar positivamente na disponibilidade do P no solo (CUI *et al.*, 2011, FRIŠTÁK e SOJA, 2015; SANTOS *et al.*, 2019). Zhao *et al.* (2014) relataram que a presença de biocarvão de palha de milho contribuiu para o aumento de P no solo na forma lábil. Entretanto, Petter *et al.* (2018) não observaram efeito significativo na atividade enzimática da fosfatase ácida na presença de biocarvão, além disso, os autores relataram que a presença de adubo químico contribuiu para menor atividade dessa enzima.

A urease juntamente com os microrganismos desempenha um papel importante no ciclo do nitrogênio e sua função é catalisar a hidrólise da ureia, resultando em dióxido de carbono e amônia (ABRANCHES *et al.*, 2018). Diversos estudos evidenciam que a atividade da urease aumenta na presença de biocarvão (SIGUA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2016). Entretanto a presença do biocarvão não apresentou efeito significativo na atividade da urease, mesmo a uma taxa de

30 t ha<sup>-1</sup> (ZHU *et al.*, 2017). Além disso, a atividade da urease é influenciada pelo pH, textura do solo, temperatura, biomassa microbiana, capacidade de troca catiônica e nitrogênio total (MAKOI e NDAKIDEMI, 2008; SUJOY e APARNA, 2013). De acordo com Gil-Sotres *et al.* (2005), impactos ocasionados pela aplicação de fertilizantes à base de ureia também podem ser avaliados pela enzima urease.

O diacetato de fluoresceína (FDA) hidrolisado por enzimas livres (proteases, lipases, esterases) tem como uma das principais funções avaliar a atividade microbiana total do solo. Diversos estudos anteriores evidenciaram que o biocarvão influenciou na atividade do FDA (BERA *et al.*, 2016; MARTINSFILHO *et al.*, 2020; PETTER *et al.*, 2018; SARMA *et al.*, 2017). Outros estudos relacionados, também, à biomassa microbiana e atividade enzimáticas vêm crescendo, nos últimos tempos, na justificativa de encontrar respostas e soluções para as mudanças ambientais e alterações nos ecossistemas (GREENet *et al.*, 2006).

Diante do exposto, tanto os indicadores das atividades biológicas do solo quanto as enzimas são de grande importância, uma vez que são capazes de revelar a eficiência da microbiota do solo, além de dar indicativos sobre a qualidade da matéria orgânica incorporada ao solo.

### 3.5 Referências

- ABBOTT, L. K. *et al.* Potential roles of biological amendments for profitable grain production—A review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 256, p. 34-50, 2018.
- ABRANCHES, J. L.; SORATTO, R. P.; PERDONÁ, M. J. Ureia revestida e o crescimento do cafeeiro arábica. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 14, n. 3, 2018.
- AHMAD, M. *et al.* Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. **Chemosphere**, v. 99, p. 19-33, 2014.
- AHMAD, M. *et al.* Biochar-induced changes in soil properties affected immobilization/mobilization of metals/metalloids in contaminated soils. **Journal of soils and sediments**, v. 17, n. 3, p. 717-730, 2017.
- ALAZZAZ, A. *et al.* Potential short-term negative versus positive effects of olive mill-derived biochar on nutrient availability in a calcareous loamy sand soil. **PloS one**, v. 15, n. 7, p. e0232811, 2020.
- ALHO, C. F. B. V. *et al.* **Efeito da temperatura final de pirólise na estabilidade de biocarvão produzido a partir de madeira de *Pinus sp.* e *Eucalyptus sp.*** 2012. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- ALI, I. *et al.* Combined application of biochar and nitrogen fertilizer improves rice yield, microbial activity, and N-metabolism in a pot experiment. **PeerJ**, v. 8, p. e10311, 2020.
- AL-WABEL, M. I. *et al.* Pyrolysis temperature induced changes in characteristics and chemical composition of biochar produced from conocarpus wastes. **Bioresource technology**, v. 131, p. 374- 379, 2013.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Microbial biomass and activity in a Brazilian soil amended with untreated and composted textile sludge. **Chemosphere**, v. 64, n. 6, p. 1043-1046, 2006.
- ARNOSTI, C. Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. **Annual review of marine science**, v. 3, p. 401-425, 2011.
- ATKINSON, C. J.; FITZGERALD, J. D.; HIPPS, N. A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. **Plant and soil**, v. 337, n. 1, p. 1-18, 2010.
- AWASTHI, S. K. *et al.* Multi-criteria research lines on livestock manure biorefinery development towards a circular economy: from the perspective of a life cycle assessment and business models strategies. **Journal of Cleaner Production**, v. 341, p. 130862, 2022.

- BAILEY, V. L. *et al.* Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. **Soil biology and biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 296-301, 2011.
- BASHIR, S. *et al.* Cadmium immobilization potential of rice straw-derived biochar, zeolite, and rock phosphate: extraction techniques and adsorption mechanism. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 100, n. 5, p. 727-732, 2018.
- BATISTA, R. R.; GOMES, M. M. Produção de biochar a partir da pirólise de biomassa: perspectivas e experiências brasileiras. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 12, n. 8, p. 321-339, 2021.
- BERA, T. *et al.* Biochar and manure effluent effects on soil biochemical properties under corn production. **Applied soil ecology**, v. 107, p. 360-367, 2016.
- BOLAN, N. *et al.* Multifunctional applications of biochar beyond carbon storage. **International Materials Reviews**, v. 67, n. 2, p. 150-200, 2022.
- CASIDA JR, L. E.; KLEIN, D. A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil science**, v. 98, n. 6, p. 371-376, 1964.
- CHEN, J. *et al.* 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.
- CHEN, L. *et al.* Effects of straw return and straw biochar on soil properties and crop growth: A review. **Frontiers in plant science**, v. 13, 2022.
- CHI, N. T. L. *et al.* A review on biochar production techniques and biochar based catalyst for biofuel production from algae. **Fuel**, v. 287, p. 119411, 2021.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.
- CUI, H. J. *et al.* Enhancing phosphorus availability in phosphorus-fertilized zones by reducing phosphate adsorbed on ferrihydrite using rice straw-derived biochar. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, n. 7, p. 1135-1141, 2011.
- CUNHA, E. Q. *et al.* Sistemas de preparo do solo e culturas de cobertura na produção orgânica de feijão e milho: II- atributos biológicos do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 603-611, 2011.
- DE ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, 2007.
- DEMISIE, W.; LIU, Z.; ZHANG, M. Effect of biochar on carbon fractions and enzyme activity of red soil. **Catena**, v. 121, p. 214-221, 2014.
- DE-POLLI, H.; PIMENTEL, M. S. Indicadores de qualidade do solo. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (eds.). **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: EMBRAPA, 2005. p. 17-28.
- DORAN, J. W.; PARKING, T. B. Defining and Assessing Soil Quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**, 1994. p 3-21.
- EGAMBERDIEVA, D. *et al.* Biochar treatment resulted in a combined effect on soybean growth promotion and a shift in plant growth promoting rhizobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 209, 2016.
- ELZOBAIR, K. A. *et al.* Contrasting effects of biochar versus manure on soil microbial communities and enzyme activities in an Aridisol. **Chemosphere**, v. 142, p. 145-152, 2016.
- FELLET, G.; MARMIROLI, M.; MARCHIOL, L. Elements uptake by metal accumulator species grown on

mine tailings amended with three types of biochar. **Science of the Total Environment**, v. 468, p. 598-608, 2014.

FERREIRA, E. P. B. *et al.* Population and microbial activity of the soil under an agro-ecological production system. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 1, p. 22-31, 2017.

FIGUEIREDO, C. C. *et al.* Labile and stable pools of organic matter in soil amended with sewage sludge biochar. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 65, n. 6, p. 770-781, 2019.

FRIŠTÁK, V.; SOJA, G. Effect of wood-based biochar and sewage sludge amendments for soil phosphorus availability. **Nova Biotechnologica et Chimica**, v. 14, n. 1, p. 104-115, 2015.

GAMA-RODRIGUES, E. F.; GAMA-RODRIGUES, A. C. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênese, p. 227-243, 1999.

GIL-SOTRES, F. *et al.* Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. **Soil biology and biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 877-887, 2005.

GRABER, E. R. *et al.* Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. **Plant and soil**, v. 337, n. 1, p. 481-496, 2010.

GREEN, V. S; STOTT, D. E; DIACK, M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 693-701, 2006.

GU, M. Y. *et al.* Impact of biochar application on soil nutrients and microbial diversities in continuous cultivated cotton fields in Xinjiang. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 20, p. 4128-4138, 2014.

HOFFMANN, R. B. *et al.* Efeito do manejo do solo no carbono da biomassa microbiana. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 1, n. 1, p. 168-178, 2018.

HONG, C.; SU, Y.; LU, S. Phosphorus availability changes in acidic soils amended with biochar, fly ash, and lime determined by diffusive gradients in thin films (DGT) technique. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 30547-30556, 2018.

JEFFERY, S. *et al.* Biochar boosts tropical but not temperate crop yields. **Environmental Research Letters**, v. 12, n. 5, p. 053001, 2017.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: **Soil biochemistry**. CRC Press, 2021. p. 415-472.

KANDELER, E.; 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.

KÄTTERER, T. *et al.* Biochar addition persistently increased soil fertility and yields in maize- soybean rotations over 10 years in sub-humid regions of Kenya. **Field Crops Research**, v. 235, p. 18- 26, 2019.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. In: **Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes**. Elsevier, 1999. p. 65-76.

KHODADAD, C. L. M. *et al.* Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 385-392, 2011.

KUMAR, M. *et al.* Mobilization of contaminants: Potential for soil remediation and unintended consequences. **Science of The Total Environment**, p. 156373, 2022.

LAMBAIS, M. R. *et al.* Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos em ciência do solo**, v. 4. Viçosa: SBCS, 2005. 470 p.

LEHMANN, J. *et al.* Biochars and the plant-soil interface. **Plant and Soil**, v. 395, p. 1–5, 2015.

- LEHMANN, J. *et al.* Biochar effects on soil biota—a review. **Soil biology and biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 1812-1836, 2011.
- LEHMANN, J. *et al.* Biochars and the plant-soil interface. **Plant and Soil**, v. 395, n. 1, p. 1-5, 2015.
- LEHMANN, J. *et al.* Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure, and charcoal amendments. **Plant and soil**, v.249, n. 2, p. 343-357, 2003.
- LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (Ed.). **Biochar for environmental management: science, technology, and implementation**. New York: Routledge, 2015.
- LEITE, D. C. A. *et al.* Comparison of DNA extraction protocols for microbial communities from soil treated with biochar. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 175-183, 2014.
- LIU, X. *et al.* Biochar has no effect on soil respiration across Chinese agricultural soils. **Science of the Total Environment**, v. 554, p. 259-265, 2016.
- LOPES, E. L. N. *et al.* Microbial biomass and soil chemical properties under different land use systems in northeastern Pará. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1127-1139, 2011.
- LUO, Y. *et al.* Pyrolysis temperature during biochar production alters its subsequent utilization by microorganisms in an acid arable soil. **Land Degradation & Development**, v. 29, n. 7, p. 2183-2188, 2018.
- MAKOI, J. H. J. R.; NDAKIDEMI, P. A. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 3, 2008.
- MARTINS FILHO, A. P. *et al.* Impact of coffee biochar on soil carbon, microbial biomass and enzymatic activities in semiarid sand soil cultivated with maize. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 13, n. 02, p. 903-914, 2020.
- MENDES, I. de C. *et al.* **Tecnologia BioAS: uma maneira simples e eficiente de avaliar a saúde do solo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2021. 50 p.
- MIA, S. *et al.* Biochar application rate affects biological nitrogen fixation in red clover conditional on potassium availability. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 191, p. 83-91, 2014.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.
- NGUYEN, D. L. T. *et al.* Metal salt-modified biochars derived from agro-waste for effective Congo red dye removal. **Environmental Research**, v. 200, p. 111492, 2021.
- NOVOTNY, E. H. *et al.* Lessons from the Terra Preta de Índios of the Amazon region for the utilisation of charcoal for soil amendment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1003-1010, 2009.
- OTSUKA, S. *et al.* Community structure of soil bacteria in a tropical rainforest several years after fire. **Microbes and Environments**, v. 23, n. 1, p. 49-56, 2008.
- PANDEY, S. D. *et al.* Structural and elemental analysis of biochars in the search of a synthetic path to mimize anthropic Amazon soils. **Journal of Environmental Management**, v. 279, p. 111685, 2021.
- PANDIT, N. R. *et al.* Biochar improves maize growth by alleviation of nutrient stress in a moderately acidic low-input Nepalese soil. **Science of the Total Environment**, v. 625, p. 1380-1389, 2018.
- PENG, X. *et al.* Effects of biochar addition on toxic element concentrations in plants: A meta-analysis. **Science of the Total Environment**, v. 616, p. 970-977, 2018.
- PETTER, F. A. *et al.* Effect of biochar on enzymatic activity in a Brazilian oxisol. **Ciencia del suelo**, v. 36, n. 2, p. 142-145, 2018.

QIAO, Y. *et al.* Effects of biochar and Arbuscular mycorrhizae on bioavailability of potentially toxic elements in an aged contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 206, p. 636-643, 2015.

RÓZ, A. L. *et al.* Maximização do teor de carbono fixo em biocarvão aplicado ao sequestro de carbono. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, p. 810-814, 2015.

SANTOS, S. R. *et al.* Biochar association with phosphate fertilizer and its influence on phosphorus use efficiency by maize. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, 2019.

SARMA, B. *et al.* Organic amendments: Effect on carbon mineralization and crop productivity in acidic soil. **Journal of Cleaner Production**, v. 152, p. 157-166, 2017.

SIGUA, G. C. *et al.* Urease activity and nitrogen dynamics in highly weathered soils with designer biochars under corn cultivation. **Biochar**, v. 2, n. 3, p. 343-356, 2020.

SILVA, C. F. *et al.* Carbono orgânico total, biomassa microbiana e atividade enzimática do solo de áreas agrícolas, florestais e pastagem no médio Vale do Paraíba do Sul (RJ). **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 36, p. 1680-1689, 2012.

SMITH, J. L.; PAUL, E. A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: **Soil biochemistry**. New York: Routledge, 2017. p. 357-398.

SOHI, S. P. *et al.* A review of biochar and its use and function in soil. **Advances in agronomy**, v. 105, p. 47-82, 2010.

SOLAIMAN, Z. M. *et al.* Direct and residual effect of biochar application on mycorrhizal root colonisation, growth and nutrition of wheat. **Soil Research**, v. 48, n. 7, p. 546-554, 2010.

STEWART, C. E. *et al.* Co-generated fast pyrolysis biochar mitigates green-house gas emissions and increases carbon sequestration in temperate soils. **Gcb Bioenergy**, v. 5, n. 2, p. 153- 164, 2013.

SUJOY, B.; APARNA, A. Potential clinical significance of urease enzyme. **European Scientific Journal**, v. 9, n. 21, 2013.

SUN, D.; MENG, J.; CHEN, W. Effects of abiotic components induced by biochar on microbial communities. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science**, v. 63, n. 7, p. 633-641, 2013.

THANGARAJAN, R. *et al.* The potential value of biochar in the mitigation of gaseous emission of nitrogen. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 257-268, 2018.

TIAN, J. *et al.* Biochar affects soil organic matter cycling and microbial functions but does not alter microbial community structure in a paddy soil. **Science of the Total Environment**, v. 556, p. 89-97, 2016.

TURNER, B. L.; HAYGARTH, P. M. Phosphatase activity in temperate pasture soils: Potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. **Science of the total environment**, v. 344, n. 1-3, p. 27-36, 2005.

VAN ZWIETEN, L. *et al.* Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. **Plant and soil**, v. 327, n. 1, p. 235-246, 2010.

WANG, X. *et al.* 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, Y. P. *et al.* Heavy metal availability and impact on activity of soil microorganisms along a Cu/Zn contamination gradient. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 7, p. 848-853, 2007.

WANG, Z. *et al.* Contrasting effects of bamboo leaf and its biochar on soil CO<sub>2</sub> efflux and labile organic carbon in an intensively managed Chinese chestnut plantation. **Biology and fertility of Soils**, v. 50, n. 7, p. 1109-1119, 2014.

WARDLE, D. A. Changes in the microbial biomass and metabolic quotient during leaf litter succession in

some New Zealand forest and scrubland ecosystems. **Functional Ecology**, p. 346-355, 1993.

WARNOCK, D. D. *et al.* Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. **Plant and soil**, v. 300, n. 1, p. 9-20, 2007.

WU, F. *et al.* 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, n. 5, p. 555-565, 2013.

YANG, X. *et al.* Effect of biochar on the extractability of heavy metals (Cd, Cu, Pb, and Zn) and enzyme activity in soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 2, p. 974-984, 2016.

YUAN, J. H. *et al.* Comparison of the ameliorating effects on an acidic ultisol between four crop straws and their biochars. **Journal of soils and sediments**, v. 11, n. 5, p. 741-750, 2011.

ZHANG, Y.; WANG, J.; FENG, Y. The effects of biochar addition on soil physicochemical properties: A review. **Catena**, v. 202, p. 105284, 2021.

ZHAO, B. *et al.* Soil microbial biomass and activity response to repeated drying–rewetting cycles along a soil fertility gradient modified by long-term fertilization management practices. **Geoderma**, v. 160, n. 2, p. 218-224, 2010.

ZHU, L. X. *et al.* 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.

ZIMMERMANN, M. *et al.* Rapid degradation of pyrogenic carbon. **Global Change Biology**, v. 18, n. 11, p. 3306-3316, 2012.

#### 4 ARTIGOS

##### 4.1 Artigo 1- Biochar increases enzyme activity and total microbial quality of soil grown with sugarcane.

Este artigo foi elaborado e publicado conforme as normas da revista **Environment Technology and Innovation**.

LOPES, Érika Manuela Gonçalves *et al.* Biochar increases enzyme activity and total microbial quality of soil grown with sugarcane. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 101270, 2021.

ORCID: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101270>.

## Biochar increases enzyme activity and total microbial quality of soil grown with sugarcane

**Abstract:** Biochar applied to the soil has contributed to the improvement of soil quality, the availability of nutrients for plants, and carbon retention. Besides, the presence of biochar can affect microbial activity. However, information about the action of biochar in the microbial community is scarce. Thus, we hypothesize that biochar, with or without previous addition of NPK fertilizer may alter the activity of some enzymes and total microbial quality of soil. The objective of this study was to evaluate the enzymatic activities and the total microbiological activity of soil amendments with different doses of biochar and grown with sugarcane over time. For two consecutive years, soil samples were collected in the sugarcane planted line amendment with biochar. Sugarcane was planted in 2017, in a randomized block design, a  $5 \times 2$  factorial scheme, with four replications: five doses of biochar (0, 10, 20, 30 and 40 Mg ha<sup>-1</sup> (megagram per hectare)), with and without correction of soil fertility. The activities of the enzymes  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase, arylsulfatase, urease, and total microbial quality of the soil were evaluated (fluorescein diacetate method). The application of biochar from eucalyptus residues up to the dose of 30 Mg ha<sup>-1</sup> increased the activity of the enzymes  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase, arylsulfatase, urease and the total microbial quality of the soil; however, higher doses reduced the activity of these enzymes and the total microbial quality of the soil over time. The application of mineral fertilizers, in combination with biochar, increased the enzymatic activity of  $\beta$ -glucosidase, arylsulfatase and urease and the total microbial quality of the soil in the soil over time. On the other hand, the addition of NPK fertilizer reduced the activities of the acid phosphatase.

**Keywords:** Microbiological activity,  $\beta$ -glucosidase, Acid phosphatase, Arylsulfatase Urease, Fluorescein diacetate.

## 1. Introduction

Biochar is produced from the thermal decomposition of biomass or organic wastes under restricted oxygen conditions (pyrolysis). As carbon source, biochar has a large number of aromatic compounds, which allows carbon retention, remaining for long periods in the soil (Amoah-Antwi *et al.*, 2020). Besides, the carbon maintenance in the soil, through the use of biochar in agriculture, favors the growth and development of crops and helps to reduce the greenhouse gases emission (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and N<sub>2</sub>O) (Igalavithana *et al.*, 2020).

Biochar promotes changes in the soil physical and chemical properties, such as increased cation exchange capacity (CEC) and water retention capacity, improves the structure, changes the pH, and reduces the leaching of nitrogen and other nutrients, in addition to favoring carbon fixation and nutrient recycling (Amoah-Antwi *et al.*, 2020).

The microbial activity is one of the main responsible for the mineralization of nutrients in the soil (Yadav *et al.*, 2019). In this process, extracellular enzymes allow microorganisms to acquire resources and energy from complex biomolecules present in the soil (Allison and Vitousek, 2005; Wu *et al.*, 2018). Thus, the determination of enzymes present in the soil is essential for analyzing the soil microbial functional diversity and, consequently, the quality of this soil (Bailey *et al.*, 2011).

The enzyme  $\beta$ -glucosidase is related to the organic matter transformation, as well as to the distribution and mineralization of carbon (Günel *et al.*, 2018). Phosphatases are a group of enzymes that can hydrolyze organic phosphate compounds, being essential in the mineralization and cycling of phosphorus in the environment (Jing *et al.*, 2020). Arylsulfatase has the function of hydrolyzing sulfate ester bonds, actively participating in the sulfur (S) cycle, and releasing sulfate ions in the soil (Jain *et al.*, 2016); (Van Loo *et al.*, 2019). The enzyme urease catalyzes the hydrolysis of urea (organic compound) to CO<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub> (Jain *et al.*, 2016). The analysis of this enzyme can be used to evaluate the management practices and the addition of fertilizers in the soil properties (Song *et al.*, 2020).

Due to the high sensitivity to changes in soil properties, enzyme activities can also be used as indicators of environmental quality (Mendes *et al.*, 2019). Besides, with different substrates, it is possible to ascertain the capacity of the total activity of soil microorganisms through the action of the hydrolysis of fluorescein diacetate, as described by Bandick and Dick (1999).

Studies related to the effect of biochar on soil microorganisms are still poorly understood, and much is due to the variability of the materials that compose the biochar and the amount of carbon present (Amoah-Antwi *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020). In this sense, the study of the influence of biochar on microbial activities is of great importance since microorganisms are sensitive to environmental changes making them good indicators of soil quality (Adetunji *et al.*, 2017).

Thus, we hypothesize that biochar, with or without previous addition of NPK fertilizer may alter the activity of some enzymes and total microbial quality of soil. The objective of this study was to evaluate the enzymatic activities and the total microbiological activity of soil amendments with different doses of biochar and grown with sugarcane over time.

## 2. Material and methods

The experiment was carried out in the experimental area of the Universidad Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, Brazil, whose geographical coordinates are 16° 41' 2.03" S and 43° 50' 19.28" W with 646 m altitude. The region's climate is classified, according to Köppen, as Aw, tropical with dry winter.

The statistical design of the trial was in randomized blocks, with four replications and arranged in a 5 × 2 factorial scheme. The treatments corresponded to five doses of biochar (0, 10, 20, 30 and 40 Mg ha<sup>-1</sup> (megagram per hectare)), with or without correction of soil fertility (previous addition of NPK fertilizer). In treatments with correction of soil fertility (CSF), when sugarcane was planted, 100 kg ha<sup>-1</sup> of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> were applied to the bottom of the planting furrow. On 90 days after planting, 80 kg ha<sup>-1</sup> of K<sub>2</sub>O and 100 kg ha<sup>-1</sup> of N were applied to the soil surface and then irrigation was carried out. The amount of fertilizer was determined as recommended by Korndörfer *et al.* (1999) and Otto *et al.* (2010) for sugarcane. In the following years, N and K were applied to the soil surface, according to the crop recommendations (Korndörfer *et al.*, 1999).

The biochar used was produced from eucalyptus wastes (branches) pyrolyzed at 350 °C and sieved in a 5 mm sieve. The biochar was applied to the planting furrow and homogenized to the soil.

In June 2017, 60 days after the application of biochar, sugarcane was planted, variety SP81- 3250, with spacing between lines of 1 m and 10 viable buds per linear meter (100,000 plants ha<sup>-1</sup>).

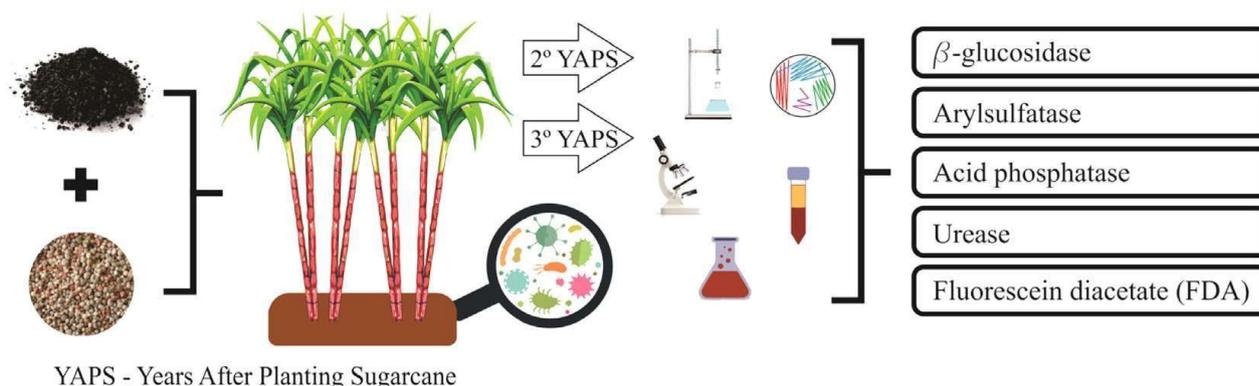
The experimental units were composed of four planting lines with 30 plants, totaling 120 plants per parcel. The useful area consisted of 48 plants in the central region of each parcel.

The soil samples were collected in the layer 0–20 cm deep, in the planting line and the second and third year after planting sugarcane (YAPS). Then, the samples were sieved (2.0 mm sieve) to remove roots and plant remains. The samples were taken to the laboratory, packed in plastic bags, and kept refrigerated at 4 °C until the moment of analysis (Fig. 1).

The activities of  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase and arylsulfatase were evaluated by the methodology proposed by Tabatabai (1994), which consists of incubating the soil sample with the colorless substrates specific to each enzyme together with p-nitrophenyl. Then, the amount of p-nitrophenol formed at the end of the incubation period is determined, expressed in mg of PNP 1 kg of soil<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> ( $\mu\text{g p-nitrophenol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ dry soil}^{-1}$ ).

The urease activity was evaluated by the methodology proposed by the method of Kandeler and Gerber (1988), which consists of the determination of the ammonia released after the incubation of the soil with a solution of urea.

The total microbial quality of the soil was estimated through the fluorescein diacetate (FDA) method. The FDA was quantified according to Bandick and Dick (1999), whose substrate is hydrolyzed by soil enzymes (proteases, lipases, and esterases), attributing this activity as a measure of the total microbial quality of the soil. 1 g of soil was mixed with 20 mL of 60 mol L<sup>-1</sup> sodium phosphate buffer solution and 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of FDA stock solution. The samples were shaken for 2 h on a shaker at 100 rpm, at 25 °C.



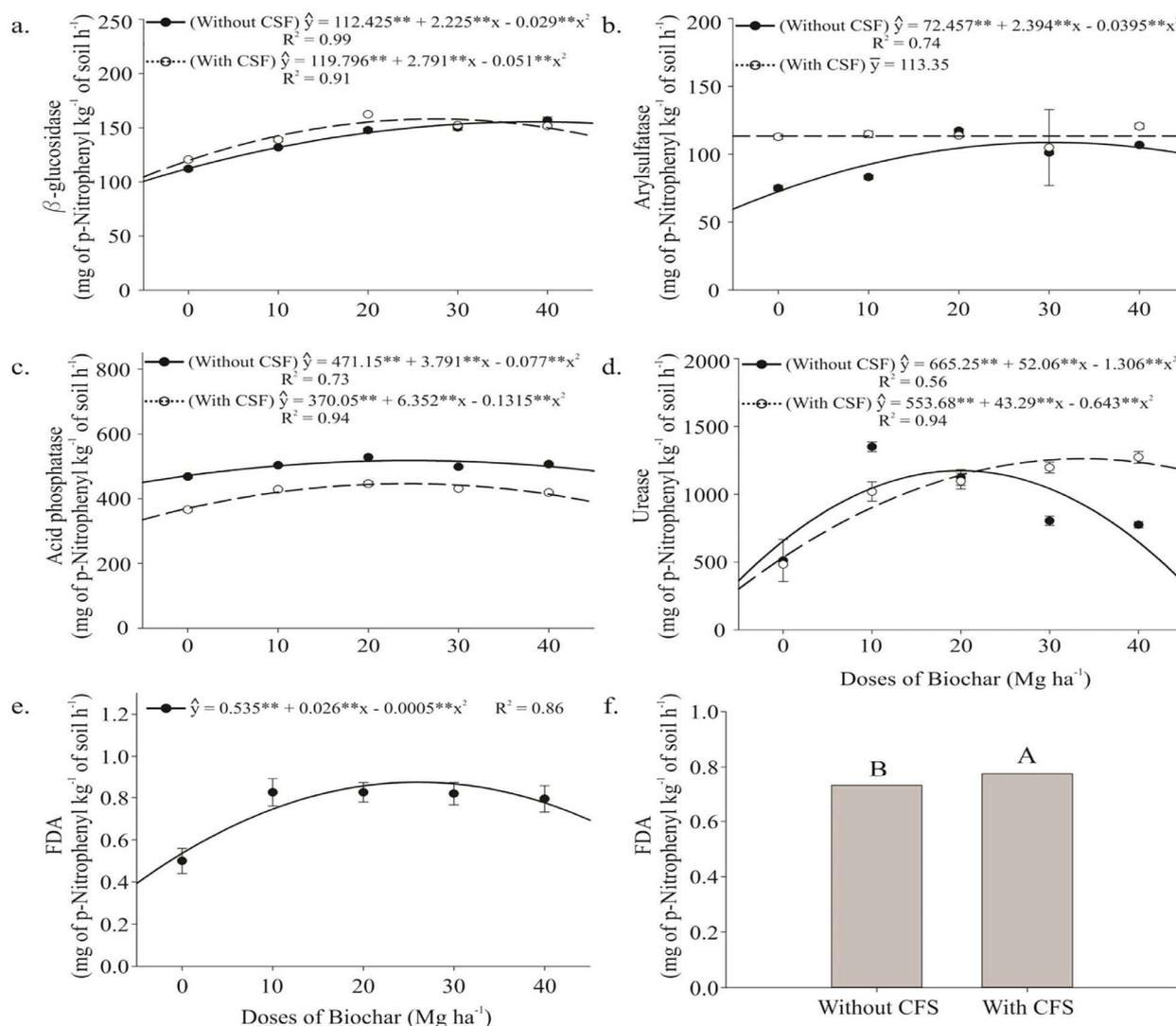
**Fig. 1.** Schematic representation of the methodology.

A control of each sample was made, in which the substrate was only added after 2 h of stirring. Then, 20 mL of acetone were added to complete the enzymatic reaction. In the controls,  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  of the FDA stock solution and immediately, 20 mL of acetone were added. The solutions were centrifuged for 5 min at 4032 g, filtered on Whatman no 4 filter paper, and then subjected to an absorbance reading at 490 nm on a spectrophotometer. With the obtained data, a standard curve was elaborated, and the amount of hydrolyzed fluorescein was calculated.

The data were subjected to analysis of variance by the F test, and in case of significance between the doses of biochar, regression analysis was performed. All statistical analyzes were performed using software R, version 3.4.2 (R Development Core Team, 2017).

### 3. Results

The interaction effects between biochar doses and NPK fertilization were significant ( $p \leq 0.05$ ) for  $\beta$ -glucosidase, arylsulfatase, acid phosphatase and urease enzymes. The increase in biochar doses promoted a quadratic behavior in soil enzymes, except arylsulfatase, which showed a constant value of  $113.35 \text{ mg of p-nitrophenol kg}^{-1} \text{ of soil h}^{-1}$  in treatments with chemical fertilization (Fig. 2).



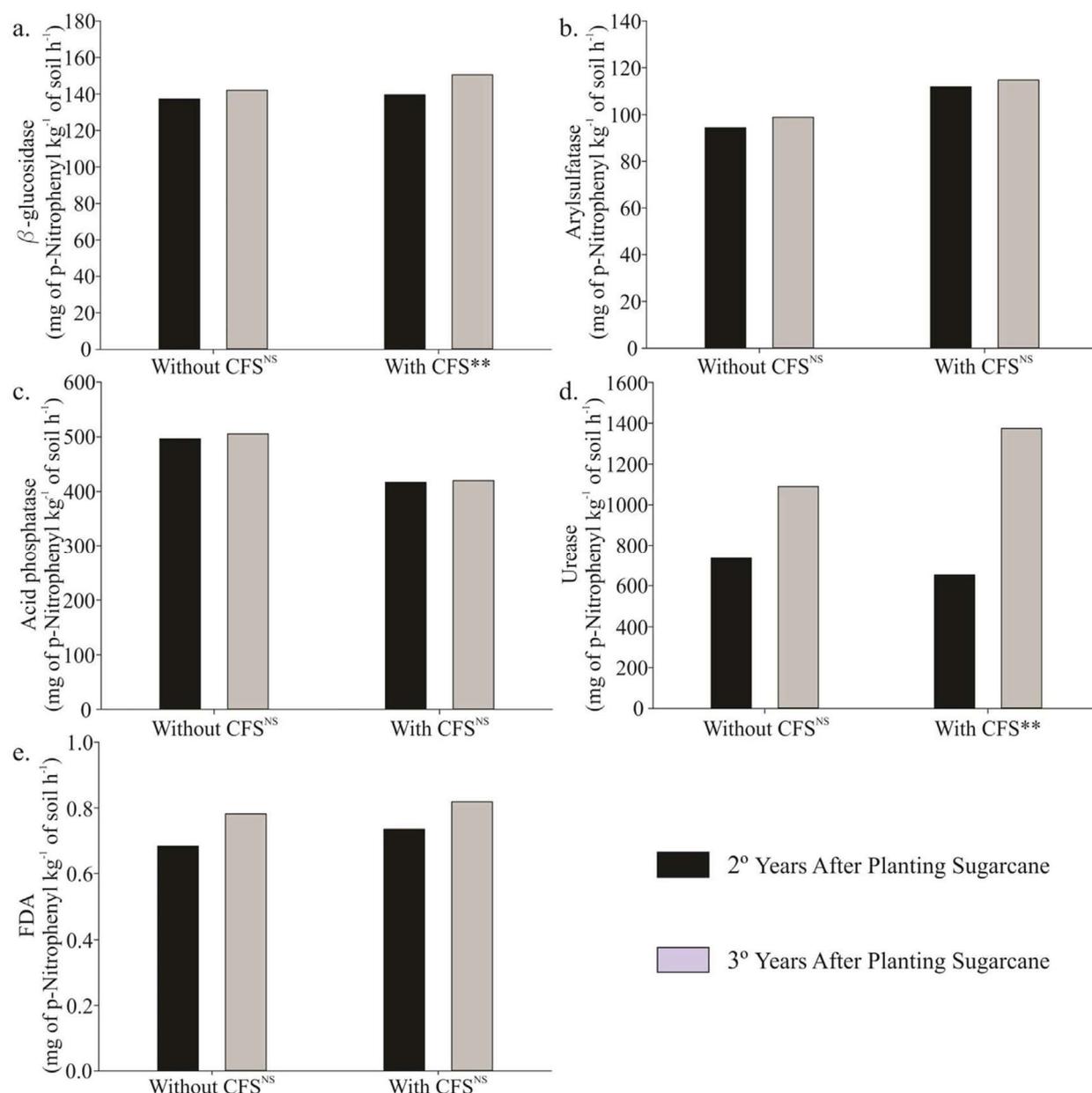
**Fig. 2.** Effect of increased doses of biochar and the presence (with CFS) and absence (without CFS) of NPK on the content of  $\beta$ -glucosidase (a), arylsulfatase (b), acid phosphatase (c), urease (d), and FDA (e and f) in soil. \* significant at 0.05; \*\* significant at 0.01 by t-test. Different uppercase letters above the columns indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the presence and absence of CFS.

In soil fertilized with mineral fertilizers, the highest values of  $\beta$ -glucosidase (158.04 mg of p-nitrophenol kg<sup>-1</sup> of soil h<sup>-1</sup>), acid phosphatase (446.75 mg of p-nitrophenol kg<sup>-1</sup> of soil h<sup>-1</sup>), and urease (1262.32 mg of p-nitrophenol kg<sup>-1</sup> of soil h<sup>-1</sup>) were observed at doses of 27, 24, and 34 Mg ha<sup>-1</sup> of biochar (Fig. 2a, c and d), respectively. In the soil without chemical fertilization, the highest values of  $\beta$ -glucosidase (155.00 mg of p-nitrophenol kg<sup>-1</sup> of soil h<sup>-1</sup>), arylsulfatase (108.72 mg of p-nitrophenol kg<sup>-1</sup> of soil h<sup>-1</sup>), acid phosphatase (517.87 mg of p-nitrophenol kg<sup>-1</sup> of soil h<sup>-1</sup>), and urease (1174.02 mg of p-nitrophenol kg<sup>-1</sup> of soil h<sup>-1</sup>) were observed in the doses of 39, 30, 25, and 20 Mg ha<sup>-1</sup> of biochar (Fig. 2a, b, c and d), respectively.

The increase in biochar doses in soil caused a significant increase in the levels of the FDA in soil, and the highest value of this enzyme (0.87 mg of PNF kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) was observed when applied 26 Mg ha<sup>-1</sup> of biochar (Fig. 2e). The treatments with mineral fertilization showed higher content of arylsulfatase and FDA in soil, regardless of the dose of biochar incorporated in soil (Fig. 2b and f) and  $\beta$ -glucosidase between the doses

of 0 and 38 Mg ha<sup>-1</sup> (Fig. 2a). However, in treatments without mineral fertilization, the highest values of acid phosphatase were observed regardless of the biochar dose incorporated in soil (Fig. 2c) and urease between the doses of 0 and 21 Mg ha<sup>-1</sup> (Fig. 2d).

Between the second and third year after planting sugarcane (YAPS), the enzymes  $\beta$  glucosidase, arylsulfatase, acid phosphatase, FDA, and urease did not present statistical differences ( $p > 0.05$ ) in the treatments without addition of NPK. About treatments with the addition of NPK, the enzymes  $\beta$ - glucosidase and urease stood out, showing higher values in the second YAPS (Fig. 3).



**Fig. 3.** Effect of the presence (with CFS) and absence (without CFS) of NPK over the years after the implantation of sugarcane on the content of  $\beta$ -glucosidase (a), arylsulfatase (b), acid phosphatase (c), urease (d), and FDA (e) in soil. \* significant at 0.05; \*\* significant at 0.01; and NS not significant by F-test.

#### 4. Discussion

In the present study, it was found that the doses of biochar influenced the activity rate of the enzyme

$\beta$ -glucosidase, which may be associated with the increase in carbon availability promoted by biochar.  $\beta$ -glucosidase actively participates in the carbon cycle and is involved in the hydrolysis of organic products (Khan *et al.*, 2019). Besides, the presence of volatile compounds in the biochar may have contributed to this enzyme's higher activity (Liao *et al.*, 2016). The increase in  $\beta$ -glucosidase activity observed in this study, due to the incorporation of biochar in the soil, corroborates previous studies (Ali *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2020). Biochar produced from plant remains rich in cellulose, such as wood, can increase  $\beta$ -glucosidase activity in soil, as observed in this study and by other authors (Ali *et al.*, 2019).  $\beta$ -glucosidase catalyzes cellulose hydrolysis to release glucose (Jain *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018).

The increased activity of  $\beta$ -glycosidase in the soil may have contributed to the increase in other enzymes' activity, since  $\beta$ -glycosidase releases low molecular weight sugars, which are an energy source for microorganisms in the soil (García *et al.*, 1994; Pathan *et al.*, 2017).

The combined application of NPK and biochar significantly increased the content of  $\beta$  glucosidase in soil over time compared to treatments with biochar application alone. According to Tian *et al.* (2016), the exclusive application of biochar can cause low carbon mineralization and nutrient cycling in soil, due to the increase in the C/N ratio. However, the use of mineral fertilizers can reduce the C/N ratio, which increases the mineralization rate of organic matter and nitrogen in the soil and increases the levels of carbon sequestration and, consequently, the activity of the enzyme  $\beta$ -glucosidase in the soil. In a six-year field experiment, these same authors observed that there was a better response of the enzyme  $\beta$ -glucosidase in the treatments that simultaneously applied biochar and mineral fertilizer.

The increase in the doses of biochar in the soil favored a higher acid phosphatase enzyme activity. Studies have shown that biochar in the soil alters the enzymatic activity, acting on the hydrolysis of organic phosphate compounds, with a consequent increase in the availability of soluble phosphates in soil and improved nutritional quality status of plants (Atkinson *et al.*, 2010; Jing *et al.*, 2020). Similar results were found by Biederman and Harpole (2013) and Du *et al.* (2014), in which the application of high doses of biochar increased the microbial activity, due to a higher enzymatic activity of acid phosphatase. However, biochar in soil can interfere with the pH and availability of nutrients in soil (Ali *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2020). Jin *et al.* (2016) reported a decline in acid phosphatase activity due to the application of biochar in soil; consequently, the availability of P in soil was altered. The addition of phosphorus by the biochar may have contributed to the reduction of acid phosphatase activity. Phosphatases are produced by plants and microorganisms present in the soil. There seems to be an increase in the activity of these enzymes with a decrease in the soil phosphorus availability (Reid and Bielecki, 1970).

The addition of biochar and mineral fertilizer significantly increased the urease enzyme activity in soil, over the second and third YAP. In addition to exercising its function of hydrolyzing organic compounds (urea) in ammonia and carbon dioxide (Jain *et al.*, 2016; Zaman *et al.*, 2013), the urease enzyme represents an indicator of the nutritional status of soil and the efficiency of nitrogen fertilization

(Mierzwa-Hersztek *et al.*, 2018). The association of biochar and mineral fertilizers influences the yield and growth of crops (Atkinson *et al.*, 2010; Steiner *et al.*, 2007) and increases the enzymatic activity of soil urease (Teutscherova *et al.*, 2018), showing that biochar can significantly benefit the hydrolysis of urea fertilizers. The results of this study corroborate with previous studies (Khan *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020), which also observed an increase in urease activity due to the increase in the doses of biochar applied to the soil. On the other hand, opposite results were found by Zhu *et al.* (2017), who did not observe an

increase in urease due to biochar use in soils cultivated with corn.

The N dynamics of the soil can be influenced by the application of biochar and the pH and texture of soil (Amoah-Antwi *et al.*, 2020; Makoi and Ndakidemi, 2008; Song *et al.*, 2020). Besides, with the increase in soil depth, there is a decrease in the concentration of organic matter and a smaller population of microorganisms and urease activity (Zhu *et al.*, 2017).

About the arylsulfatase enzyme, only treatments without NPK showed an increase in this enzyme activity due to the increase in biochar doses. However, the presence of mineral fertilizer in soil contributed to a higher activity of this enzyme, although the different biochar doses did not cause significant changes in the arylsulfatase values in soil. The positive effect of biochar on the arylsulfatase activity in soil observed in the present study corroborates with Paz-Ferreiro *et al.* (2012) and Khadem *et al.* (2019). They reported increased arylsulfatase activity in soils fertilized with biochar. Considered essential in the sulfur cycle, the enzyme arylsulfatase has the primary function of hydrolyzing sulfate esters to phenols and releasing sulfur to plants and microorganisms (Khadem *et al.*, 2019).

Long-term laboratory and field experiments indicated that the arylsulfatase activity of soil is not influenced by biochar (Jain *et al.*, 2016), which corroborates with the results found in this study. Similar results were found by Yoo and Kang (2012), where biochar from swine manure and from barley stover had no significant effects on enzyme activity. Sun *et al.* (2014) also did not find significant effects of arylsulfatase activity due to the application of biochar.

The microbial activity assessed by the FDA increased significantly with different doses of biochar. The highest values of this enzyme were found in treatments in which biochar doses with the NPK addition were applied, which also stood out during the second and third YAPS. Equivalent results were observed by van Zwieten *et al.* (2010), in which the addition of biochar, together with chemical fertilizer, provided an increase in microbial biomass and FDA activity in soils cultivated with soybeans. Bhaduri *et al.* (2016), using the peanut shell biochar, and Sarma *et al.* (2017), using wooden biochar, found that the presence of biochar induced an increase in FDA activity. Furthermore, these authors state that the presence of biochar increases organic matter in soil that is correlated with FDA activity.

FDA hydrolysis represents the activity of a group of enzymes, such as lipases, esterases, and proteases (Jiang *et al.*, 2016). Protease enzymes, for example, are responsible for the hydrolysis of proteins that release amino acids. These amino acids are discouraging and release nitrogen in the form of ammonia; thus, the FDA action makes up the first stage of nitrogen mineralization present in soil via organic fertilizers or by the microorganisms death (Geisseler and Horwath, 2009, 2008; Giagnoni *et al.*, 2016). Thus, higher FDA activity with the application of biochar and NPK may be due to the greater availability of substrate, which stimulates the metabolic activity of microorganisms in the soil (Saha *et al.*, 2019).

In this study, the application of biochar alone or with NPK contributes to increase the enzymatic activity in soil. However, corroborating with the results of other authors (Ali *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2020; Yadav *et al.*, 2019), the amount of biochar incorporated in soil can influence the enzyme activity. In treatments without NPK, the addition of doses higher than 40, 30, 25, and 20% promoted a reduction in the activity of the enzymes  $\beta$  glucosidase, arylsulfatase, acid phosphatase, and urease, respectively. In the treatments with NPK, the decrease in the activity of  $\beta$ -glucosidase enzymes, acid phosphatase, and urease was observed in doses above 27, 25, and 35%, respectively. This reduction can be attributed to the fact that biochar usually presents excessive porosity, a large reactive surface area, and negative charges on the

surface, which favors the sorption or blocking of enzymes or substrates (Ali *et al.*, 2019;Jing *et al.*, 2020).

According to Hammer *et al.* (2014), biochar presents a complex matrix for the growth of microorganisms and the source of nutrients. Thus, in the present study, the application of biochar to the soil may contribute to the maintenance of enzymatic activity in the soil over time or increase the activity of  $\beta$ -glucosidase and urease when the biochar was applied together with NPK.

Therefore, the potential use of eucalyptus wood waste biochar in sugarcane crops favors the biological activity of the soil and contributes to mitigating environmental impacts, due, for example, to the rational disposal of forest residues and the carbon fixation. Besides, the study demonstrates that the application of biochar, together with mineral fertilizer increases the potential for activity of soil enzymes. Thus, the general improvement in the biological properties of the soil due to the application of biochar can contribute to greater efficiency in the use of nutrients, which may reflect on the growth and yield of sugarcane more economically and sustainably. According to Mendes *et al.* (2019), in general, the higher the biological activity of the soil, the greater the productivity of crops.

## 5. Conclusions

1. The application of biochar from eucalyptus residues up to the dose of 30 Mg ha<sup>-1</sup> increased the activity of the enzymes  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase, arylsulfatase, urease, and the total microbial quality of the soil; however, higher doses reduced the activity of these enzymes and the total microbial quality of the soil over time.
2. The application of mineral fertilizers, in combination with biochar, increased the enzymatic activity of  $\beta$ -glucosidase, arylsulfatase and urease and the total microbial quality of the soil over time. On the other hand, the addition of NPK fertilizer reduced the activity of the enzyme acid phosphatase.

## 6. References

- Adetunji, A.T., Lewu, F.B., Mulidzi, R., Ncube, B., 2017. The biological activities of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase, and urease as soil quality indicators: A review. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 17, 794–807. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000300018>.
- Ali, A., Guo, D., Arockiam Jeyasundar, P.G.S., Li, Y., Xiao, R., Du, J., Li, R., Zhang, Z., 2019. Application of wood biochar in polluted soils stabilized the toxic metals and enhanced wheat (*triticum aestivum*) growth and soil enzymatic activity. *Ecotoxicol Environ. Safety* 184, 109635. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109635>.
- Allison, S.D., Vitousek, P.M., 2005. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biol. Biochem.* 37, 937–944. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.09.014>.
- Amoah-Antwi, C., Kwiatkowska-Malina, J., Thornton, S.F., Fenton, O., Malina, G., Szara, E., 2020. Restoration of soil quality using biochar and brown coal waste: A review. *Sci. Total Environ.* 722, 137852. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137852>.
- Atkinson, C.J., Fitzgerald, J.D., Hipps, N.A., 2010. Potential mechanisms for achieving agricultural

benefits from biochar application to temperate soils: A review. *Plant Soil* 337, 1–18. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-010-0464-5>.

Bailey, V.L., Fansler, S.J., Smith, J.L., Bolton, H., 2011. Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. *Soil Biol. Biochem.* 43, 296–301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.014>.

Bandick, A.K., Dick, R.P., 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1471–1479. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00051-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00051-6)

Bhaduri, D., Saha, A., Desai, D., Meena, H.N., 2016. Restoration of carbon and microbial activity in salt induced soil by application of peanut shell biochar during short-term incubation study. *Chemosphere* 148, 86–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.130>.

Biederman, L.A., Harpole, W.S., 2013. Biochar and its effects on plant productivity and nutrient cycling: A meta-analysis. *GCB Bioenerg.* 5, 202–214. <http://dx.doi.org/10.1111/gcbb.12037>.

Du, Z., Wang, Y., Huang, J., Lu, N., Liu, X., Lou, Y., Zhang, Q., 2014. Consecutive biochar application alters soil enzyme activities in the winter wheat-growing season. *Soil Sci.* 179, 75–83. <http://dx.doi.org/10.1097/SS.0000000000000050>.

García, C., Hernández, T., Costa, F., 1994. Microbial activity in soils under mediterranean environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1185–1191. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90142-2](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(94)90142-2).

Geisseler, D., Horwath, W.R., 2008. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biol. Biochem.* 40, 3040–3048. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.001>.

Geisseler, D., Horwath, W.R., 2009. Relationship between carbon and nitrogen availability and extracellular enzyme activities in soil. *Pedobiologia (Jena)* 53, 87–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedobi.2009.06.002>.

Giagnoni, L., Pastorelli, R., Mocali, S., Arenella, M., Nannipieri, P., Renella, G., 2016. Availability of different nitrogen forms changes the microbial communities and enzyme activities in the rhizosphere of maize lines with different nitrogen use efficiency. *Appl. Soil Ecol.* 98, 30–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.09.004>.

Günel, E., Erdem, H., Demirbaş, A., 2018. Effects of three biochar types on activity of  $\beta$ -glucosidase enzyme in two agricultural soils of different textures. *Arch. Agron. Soil Sci.* 64, 1963–1974. <http://dx.doi.org/10.1080/03650340.2018.1471205>.

Hammer, E.C., Balogh-Brunstad, Z., Jakobsen, I., Olsson, P.A., Stipp, S.L.S., Rillig, M.C., 2014. A mycorrhizal fungus grows on biochar and captures phosphorus from its surfaces. *Soil Biol. Biochem.* 77, 252–260.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.012>.

Igalavithana, A.D., Choi, S.W., Shang, J., Hanif, A., Dissanayake, P.D., Tsang, D.C.W., Kwon, J.H., Lee, K.B., Ok, Y.S., 2020. Carbon dioxide capture in biochar produced from pine sawdust and papermill sludge: Effect of porous structure and surface chemistry. *Sci. Total Environ.* 739, 139845. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139845>.

Jain, S., Mishra, D., Khare, P., Yadav, V., Deshmukh, Y., Meena, A., 2016. Impact of biocharamendment on enzymatic resilience properties of mine spoils. *Sci. Total Environ.* 544, 410–421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.011>.

Jiang, S., Huang, J., Lu, H., Liu, J.C., Yan, C., 2016. Optimisation for assay of fluorescein diacetate hydrolytic activity as a sensitive tool to evaluate impacts of pollutants and nutrients on microbial activity in coastal sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 110, 424–431. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.031>.

Jin, Y., Liang, X., He, M., Liu, Y., Tian, G., Shi, J., 2016. Manure biochar influence upon soil properties, phosphorus distribution and phosphatase activities: A microcosm incubation study. *Chemosphere* 142, 128–135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.015>.

Jing, Y., Zhang, Y., Han, I., Wang, P., Mei, Q., Huang, Y., 2020. Effects of different straw biochars on soil organic carbon, nitrogen, available phosphorus, and enzyme activity in paddy soil. *Sci. Rep.* 10, 1–12. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-65796-2>.

Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68–72. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00257924>.

Khadem, A., Besharati, H., Khalaj, M.A., 2019. Biochar application changed arylsulfatase activity, kinetic and thermodynamic aspects. *Eur. J. Soil Biol.* 95, 103134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2019.103134>.

Khan, M.N., Lan, Z., Sial, T.A., Zhao, Y., Haseeb, A., Jianguo, Z., Zhang, A., Hill, R.L., 2019. Straw and biochar effects on soil properties and tomato seedling growth under different moisture levels. *Arch. Agron. Soil Sci.* 65, 1704–1719. <http://dx.doi.org/10.1080/03650340.2019.1575510>.

Korndörfer, G.H., Ribeiro, A.C., Andrade, L.A.B., 1999. Cana-de-açúcar. In: *Recomendações Para O Uso de Corretivos E Fertilizantes Em Minas Gerais: 5 a Aproximação*. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, Viçosa-MG, pp. 143–166.

Liao, N., Li, Q., Zhang, W., Zhou, G., Ma, L., Min, W., Ye, J., Hou, Z., 2016. Effects of biochar on soil microbial community composition and activity in drip-irrigated desert soil. *Eur. J. Soil Biol.* 72, 27–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2015.12.008>.

- Makoi, J.H.J.R., Ndakidemi, P.A., 2008. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 181–191.
- Mendes, I.C., Souza, L.M., Sousa, D.M.G., Lopes, A.A.C., Reis-Junior, F.B., Lacerda, M.P.C., Malaquias, J.V., 2019. Critical limits for microbial indicators in tropical oxisols at post-harvest: The FERTBIO soil sample concept. *Appl. Soil Ecol.* 139, 85–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.025>.
- Mierzwa-Hersztek, M., Gondek, K., Klimkiewicz-Pawlas, A., Kopeć, M., Lošák, T., 2018. Effect of coapplication of poultry litter biochar and mineral fertilisers on soil quality and crop yield. *Zemdirbyste-Agriculture* 105, 203–210.  
<http://dx.doi.org/10.13080/z-a.2018.105.026>.
- Otto, R., Vitti, G.C., Luz, P.H. de C., 2010. Manejo da adubação potássica na cultura da cana-de-açúcar. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 34, 1137–1145.  
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832010000400013>.
- Pathan, S.I., Žifčáková, L., Ceccherini, M.T., Pantani, O.L., Větrovský, T., Baldrian, P., 2017. Seasonal variation and distribution of total and active microbial community of  $\beta$ -glucosidase encoding genes in coniferous forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 105, 71–80.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.003>.
- Paz-Ferreiro, J., Gascó, G., Gutiérrez, B., Méndez, A., 2012. Soil biochemical activities and the geometric mean of enzyme activities after application of sewage sludge and sewage sludge biochar to soil. *Biol. Fertil. Soils* 48, 511–517.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00374-011-0644-3>.
- R Development Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3.4.2.
- Reid, M.S., Bielecki, R.L., 1970. Changes in phosphatase activity in phosphorus-deficient spirodela. *Planta* 94, 273–281.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00385759>.
- Saha, A., Basak, B.B., Gajbhiye, N.A., Kalariya, K.A., Manivel, P., 2019. Sustainable fertilization through co-application of biochar and chemical fertilizers improves yield, quality of *Andropogon paniculata* and soil health. *Ind. Crops Prod.* 140, 111607.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111607>.
- Sarma, B., Borkotoki, B., Narzari, R., Kataki, R., Gogoi, N., 2017. Organic amendments: Effect on carbon mineralization and crop productivity in acidic soil. *J. Clean. Prod.* 152, 157–166.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.124>.
- Song, X., Razavi, B.S., Ludwig, B., Zamanian, K., Zang, H., Kuzyakov, Y., Dippold, M.A., Gunina, A., 2020. Combined biochar and nitrogen application stimulates enzyme activity and root plasticity. *Sci. Total Environ.* 735, 139393.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139393>.

Steiner, C., Teixeira, W.G., Lehmann, J., Nehls, T., De Macêdo, J.L.V., Blum, W.E.H., Zech, W., 2007. Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered central amazonian upland soil. *Plant Soil* 291, 275–290.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-007-9193-9>.

Sun, Z., Bruun, E.W., Arthur, E., de Jonge, P., Hauggaard-nielsen, H., Elsgaard, L., 2014. Effect of biochar on aerobic processes, enzyme activity, and crop yields in two sandy loam soils. *Biol. Fertil. soils* 50, 1087–1097.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00374-014-0928-5>.

Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Botttomley, P.S (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America, Madison (WI), pp. 775–833.

Teutscherova, N., Lojka, B., Houška, J., Masaguer, A., Benito, M., Vazquez, E., 2018. Application of holm oak biochar alters dynamics of enzymatic and microbial activity in two contrasting mediterranean soils. *Eur. J. Soil Biol.* 88, 15–26.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2018.06.002>.

Tian, J., Wang, J., Dippold, M., Gao, Y., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2016. Biochar affects soil organic matter cycling and microbial functions but does not alter microbial community structure in a paddy soil. *Sci. Total Environ.* 556, 89–97.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.010>.

Van Loo, B., Berry, R., Boonyuen, U., Mohamed, M.F., Golicnik, M., Hengge, A.V.C., Hollfelder, F., 2019. Transition-state interactions in a promiscuous enzyme: Sulfate and phosphate monoester hydrolysis by *pseudomonas aeruginosa* arylsulfatase. *Biochemistry* 58, 1363–1378.

<http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00996>.

Van Zwieten, L., Kimber, S., Morris, S., 2010. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. *Plant Soil* 327, 235–246.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0050-x>.

Wang, Y., Xu, Y.A., Li, D., Tang, B.C., Man, S.L., Jia, Y.F., Xu, H., 2018. Vermicompost and biochar as bio-conditioners to immobilize heavy metal and improve soil fertility on cadmium contaminated soil under acid rain stress. *Sci. Total Environ.* 621, 1057–1065.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.121>

Wu, D., Senbayram, M., Zang, H., Ugurlar, F., Aydemir, S., Brüggemann, N., Kuzyakov, Y., Bol, R., Blagodatskaya, E., 2018. Effect of biochar origin and soil pH on greenhouse gas emissions from sandy and clay soils. *Appl. Soil Ecol.* 129, 121–127.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.05.009>.

Wu, S., Zhang, Y., Tan, Q., Sun, X., Wei, W., Hu, C., 2020. Biochar is superior to lime in improving acidic soil properties and fruit quality of Satsuma mandarin. *Sci. Total Environ.* 714, 136722. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136722>.

Yadav, V., Jain, S., Mishra, P., Khare, P., Shukla, A.K., Karak, T., Singh, A.K., 2019. Amelioration in nutrient mineralization and microbial activities of sandy loam soil by short term field aged biochar. *Appl. Soil Ecol.* 138, 144–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.01.012>.

Yoo, G., Kang, H., 2012. Effects of biochar addition on greenhouse gas emissions and microbial responses in a short-term laboratory experiment. *J. Environ. Qual.* 41, 1193–1202. <http://dx.doi.org/10.2134/jeq2011.0157>.

Zaman, M., Zaman, S., Adhinarayanan, C., Nguyen, M.L., Nawaz, S., Dawar, K.M., 2013. Effects of urease and nitrification inhibitors on the efficient use of urea for pastoral systems. *Soil Sci. Plant Nutr.* 59, 649659. <http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2013.812940>.

Zhu, L. xia., Xiao, Q., Cheng, H. yan., Shi, B. jie., Shen, S. qing., 2017. Seasonal dynamics of soil microbial activity after biochar addition in a dryland maize field in North-Western China. *Ecol. Eng.* 104, 141–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.04.026>.

#### **4.2 Artigo 2- Biocarvão altera a atividade microbiana do solo cultivado com cana-de-açúcar ao longo do tempo**

Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista **European Journal os Soil Biology**.

## **Biocarvão altera a atividade microbiana do solo cultivado com cana-de-açúcar ao longo do tempo**

### **Resumo**

A aplicação de biocarvão no solo pode melhorar a estrutura física, a disponibilidade de nutrientes e a atividade biológica do solo, além de contribuir ambientalmente para o sequestro de carbono. No entanto há poucos estudos em longo prazo sobre os efeitos do biocarvão na atividade biológica de solos. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar o efeito das doses de biocarvão, ao longo do tempo, sobre a atividade e diversidade de microrganismos do solo em cana-de-açúcar irrigada. Os indicadores da atividade biológica do solo utilizados foram os teores de carbono da biomassa microbiana ( $C_{mic}$ ), respiração basal do solo (SBR), carbono orgânico total (COT), quociente metabólico ( $qCO_2$ ), quociente microbiano ( $qMIC$ ) e efluxo de  $CO_2$  no solo e índice de Shannon. Amostras de solo foram coletadas por dois anos consecutivos na linha de plantio de cana-de-açúcar adubada com biocarvão. O experimento foi conduzido, em delineamento com blocos ao acaso, esquema fatorial  $5 \times 2$ , com quatro repetições: cinco doses de biocarvão de madeira de eucalipto (0, 10, 20, 30 e  $40 \text{ Mg ha}^{-1}$ ) com e sem aplicação de fertilizante NPK. A interação entre as doses de biocarvão e a adubação com NPK foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) para  $C_{mic}$ , SBR,  $qCO_2$ ,  $qMIC$ , efluxo de  $CO_2$  e índice de Shannon. Independentemente da aplicação do fertilizante mineral NPK, doses de biocarvão entre 20 e  $30 \text{ Mg ha}^{-1}$  favorecem a atividade dos microrganismos do solo, enquanto doses acima desses valores contribuem para a redução das emissões de  $CO_2$  para a atmosfera.

**Palavras-chave:** Carbono da biomassa microbiana, Respiração basal do solo, Carbono orgânico total, Quociente metabólico, Quociente microbiano, Índice de Shannon.

## Biochar alters the microbial activity of soil cultivated with sugarcane over time

### Abstract

The application of biochar in the soil can improve the physical structure, nutrient availability and biological activity of the soil, in addition to contributing environmentally to carbon sequestration. However, there are few long-term studies on the effects of biochar on the biological activity of soils. Thus, this work aimed to identify the effect of biochar doses, over time, on the activity and diversity of soil microorganisms in irrigated sugarcane. The soil biological activity indicators used were the microbial biomass carbon content (Cmic), soil basal respiration (SBR), total organic carbon (TOC), metabolic quotient ( $qCO_2$ ), microbial quotient (qMIC) and  $CO_2$  efflux in soil and Shannon index. Soil samples were collected for two consecutive years in the sugarcane planting line fertilized with biochar. The experiment was conducted in a randomized block design, in a 5 x 2 factorial scheme, with four replications: five doses of eucalyptus wood biochar (0, 10, 20, 30 and 40 Mg ha<sup>-1</sup>) with and without application of NPK fertilizer. The interaction between biochar doses and NPK fertilization was significant ( $p \leq 0.05$ ) for Cmic, SBR,  $qCO_2$ , qMIC,  $CO_2$  efflux and Shannon index. Regardless of the application of NPK mineral fertilizer, doses of biochar between 20 and 30 Mg ha<sup>-1</sup> favor the activity of soil microorganisms, while doses above these values contribute to the reduction of  $CO_2$  emissions for the atmosphere.

**Keywords:** Microbial biomass carbon, Soil basal respiration, Total organic carbon, Metabolic quotient, Microbial quotient, Shannon index.

## 1. Introdução

O biocarvão, também conhecido como biochar, é um material carbonáceo sólido resultante da conversão termoquímica de biomassa em condições anóxicas, processo conhecido como pirólise [1]. Em virtude de sua estrutura porosa e da presença de compostos aromáticos, o biocarvão tem sido considerado uma estratégia promissora para a retenção em longo prazo de carbono no solo e a mitigação das emissões de gases de efeito estufa [2,3].

As propriedades físicas e químicas do biocarvão contribuem para a melhoria da qualidade do solo, pelo fato, por exemplo, do aumento da disponibilidade de nutrientes, maior capacidade de retenção de água, adsorção de contaminantes orgânicos e metais pesados, além de contribuir para maior eficiência dos fertilizantes [4,5].

Por sua natureza geralmente alcalina, o biocarvão atua como um corretivo da acidez do solo, com consequente aumento do pH e da capacidade de troca catiônica e redução da lixiviação de nutrientes, favorecendo o crescimento e desenvolvimento das culturas [1]. Além de alterar as propriedades do solo, o biocarvão pode modificar a estrutura da comunidade microbiana, envolvida em vários processos físicos e químicos do solo [6,7]. Além disso, como os microrganismos são considerados indicadores da qualidade do solo [8], a determinação da atividade biológica do solo é essencial para avaliar a diversidade funcional da microbiota [9].

O carbono da biomassa microbiana (Cmic), que representa a fração viva da matéria orgânica do solo (MOS), composta por actinomicetos, bactérias e fungos, é um dos indicadores biológicos mais sensíveis às mudanças ambientais [10]. Além do mais, Cmic está relacionado à dinâmica da MOS e ciclagem de nutrientes [11]. Outro indicador amplamente utilizado é a respiração basal do solo (SBR) que é sensível a distúrbios ambientais. A SBR representa o total de todas as funções metabólicas nas quais o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é produzido [12]. Adicionalmente, o quociente metabólico do solo (qCO<sub>2</sub>) é estimado pela razão entre SBR e Cmic e representa a capacidade de a microbiota utilizar o substrato presente no solo [13,14].

A mensuração do carbono orgânico total do solo (COT) também é um indicador da qualidade e está relacionado com a formação e estabilidade dos agregados e, conseqüentemente, com a estrutura do solo [11]. O quociente microbiano (qMIC) é outro indicador biológico, obtido pela razão entre o Cmic e o COT, associado à matéria orgânica presente no solo [15].

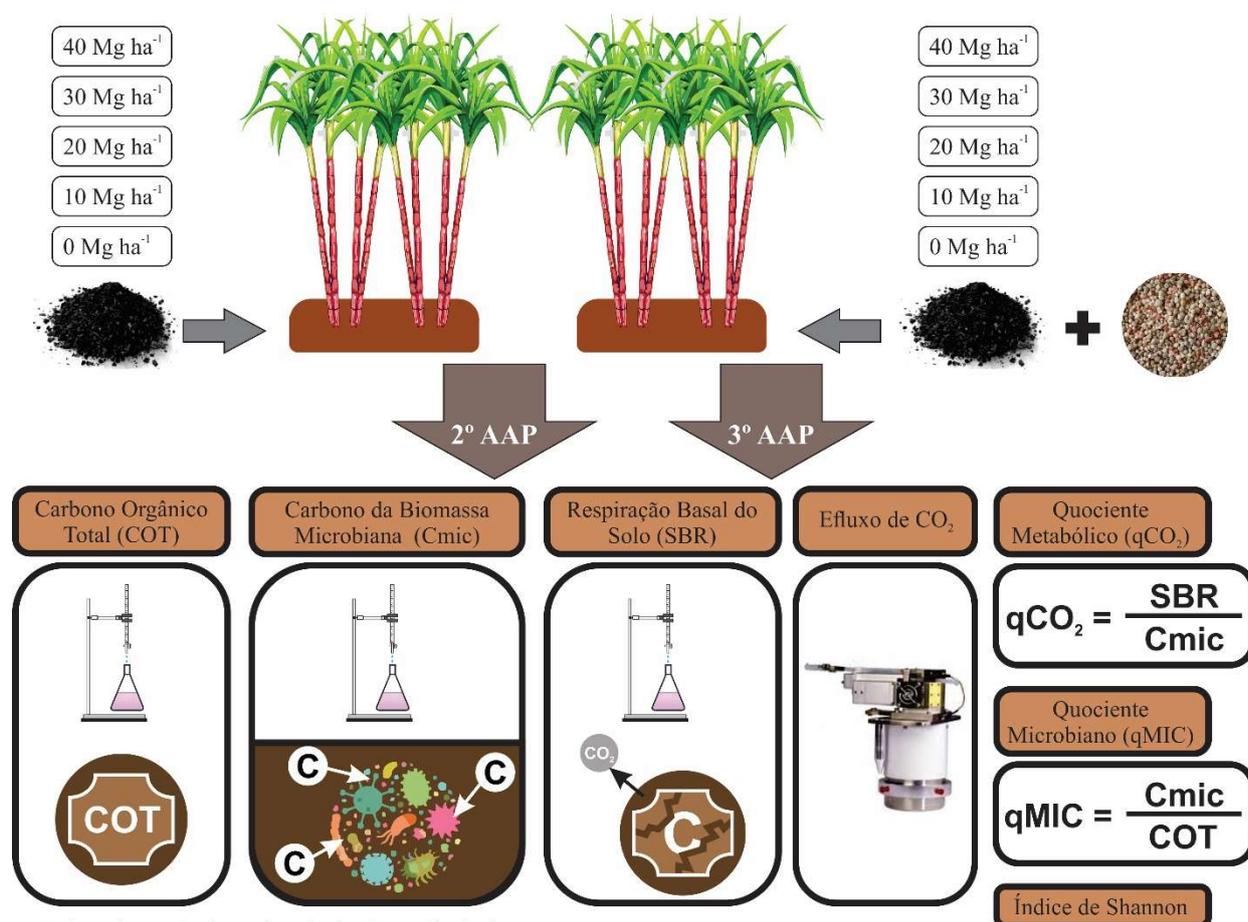
Nesse contexto de qualidade do solo, a aplicação de biocarvão contribui para o crescimento e reprodução da microbiota do solo, que, por sua vez, altera a diversidade microbiana. Assim, o estudo da diversidade funcional da microbiota do solo, por meio do índice de diversidade, pode servir como um indicador das mudanças ocorridas no solo, uma vez que a diversidade funcional revela a pluralidade de atividades exercidas pelos microrganismos dentro de um ecossistema [16]. Entre os índices, destaca-se o Índice de Shannon baseado na abundância proporcional das espécies [17].

Diante do exposto, estudos mais detalhados são necessários para entender melhor o impacto do biocarvão no ecossistema do solo. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar o efeito das doses de biocarvão, ao longo do tempo, sobre a atividade e diversidade de microrganismos do solo em canavial.

## 2. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil (16° 41' 2,03" S; 43° 50' 19,28" O; 646 m). Os atributos químicos e físicos do solo, na camada de 0-20 cm de profundidade, determinados de acordo com Teixeira *et al.* (2017), foram: pH (H<sub>2</sub>O) = 6,3; carbono orgânico total = 40,5 g kg<sup>-1</sup>; P = 3,10 mg dm<sup>-3</sup>; K = 66,00 mg dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup> = 6,5 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup> = 3,20 cmol dm<sup>-3</sup>; H+Al = 2,20 cmol dm<sup>-3</sup>; e textura média [18].

O delineamento estatístico foi em blocos casualizados em esquema fatorial (5 x 2) com quatro repetições. Os tratamentos corresponderam a cinco doses de biocarvão (0, 10, 20, 30 e 40 Mg ha<sup>-1</sup>) sem correção da fertilidade do solo (NFC) e com correção da fertilidade do solo (WFC). Nos tratamentos WFC, foram aplicados 13 kg ha<sup>-1</sup> de N, 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 33 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, na adubação de plantio e, 90 dias após o plantio, 100 kg de K<sub>2</sub>O e 80 kg de N em cobertura. As quantidades de fertilizantes foram determinadas conforme recomendado para o cultivo de cana-de-açúcar [19-21]. A cobertura foi repetida, nos anos restantes do experimento, após a colheita (Figura 1).



AAP - Anos Após o Plantio da Cana-de-Açúcar

**Figura 1.** Representação esquemática da metodologia.

O biocarvão foi obtido a partir da pirólise lenta de resíduos de madeira de eucalipto a 350°C. Após o resfriamento, o biocarvão foi triturado e passado em peneira de malha de 5 mm e, posteriormente, distribuído no sulco de plantio e homogeneizado na camada de 0 a 20 cm de profundidade. Amostras de biocarvão foram levadas ao laboratório para determinar suas propriedades químicas e físicas (Tabela

1).

Tabela 1. Propriedades químicas e físicas do biocarvão de resíduos de madeira de eucalipto.

	pH	H	O	C	N	P	Ca	Mg	S	
	%						mg.kg <sup>-1</sup>			
Médias	6,1	2,46	22,6	56,7	0,5	8	13,8	12,4	2,6	
IC	0,1	0,18	1,18	2,01	0,04	0,61	0,61	1,19	0,64	
	Cu	Zn	Fe	Mn	Si	Ni	Pb	Cd	Densidade	Cinzas
	mg.kg <sup>-1</sup>								g.cm <sup>-3</sup>	%
Médias	51,5	270	1,43	56,9	798,6	5,2	3,03	4,5	0,45	10
IC	3,8	18,1	0,37	6,16	19,6	0,53	0,45	0,53	0,03	1,02

Média (n=3) e intervalo de confiança (IC).

Para a implantação do canavial, sessenta dias antes do plantio, foram abertos sulcos de 20 cm de profundidade, com espaçamento entre linhas de 1 m, em que foi incorporado o biocarvão. Após a incorporação do biocarvão, a área experimental foi irrigada, mantendo a umidade do solo próxima à capacidade de campo. A cana-de-açúcar foi plantada em julho, variedade SP81-3250, com dez gemas viáveis por metro linear de sulco de plantio, totalizando 100.000 plantas ha<sup>-1</sup>. As unidades experimentais foram constituídas por quatro linhas de plantio com 30 plantas, totalizando 120 plantas por parcela. A área útil constou de 48 plantas na região central de cada unidade experimental. A irrigação do canavial foi por aspersão convencional, não havendo necessidade de aplicação de insumos para controle de pragas e doenças. Aos 30 dias após a colheita da cana-de-açúcar, no segundo e terceiro anos após o plantio, foram realizadas adubações com ureia e cloreto de potássio para a reposição de N e K, respectivamente.

Em agosto do segundo e terceiro anos após o plantio, avaliou-se a altura da planta e realizou-se a colheita, mantendo-se a palhada na superfície do solo. Dois dias antes da colheita, amostras de solo foram coletadas, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, na linha de plantio para as análises. As amostras de solo foram mantidas a 4°C até o momento de serem analisadas (Figura 1).

No 3º, 4º, 5º e 6º dias após a colheita, o efluxo de CO<sub>2</sub> do solo foi avaliado "in loco", por meio de um analisador de gás por absorção de infravermelho (IRGA) modelo LCpro-sd, acoplado a uma campânula modelo ADC Soil Hood (Analytical Development Company Bioscientific Ltd, Hoddesdon, Inglaterra). As medições foram realizadas por bloco, um bloco por dia e ocorreram entre 8h e 12h, para minimizar o efeito da temperatura.

O carbono da biomassa microbiana do solo (Cmic) foi avaliado de acordo com o método de fumigação-extração com clorofórmio descrito por Vance *et al.* (1987) [22]. O método de oxidação foi utilizado, para determinar o teor de carbono orgânico total no solo (COT), conforme Yeomans e Bremner (1988) [23].

A respiração basal do solo (SBR) foi determinada, de acordo com Anderson (1982) [24], que consiste em avaliar a quantidade de CO<sub>2</sub> produzida sob incubação aeróbica a 25 °C por sete dias. O coeficiente metabólico (qCO<sub>2</sub>) foi estimado pela relação entre RBS e Cmic [25], enquanto o quociente microbiano (qMIC) foi estimado pela relação entre Cmic e COT [26].

O índice de diversidade de Shannon (H) foi determinado, de acordo com a metodologia proposta por Bloem *et al.* (2006) [27], utilizando microplacas Biolog Ecoplate (Biolog Inc., Hayward, CA, EUA). Cada

microplaca foi composta por três grupos de 31 diferentes substratos de carbono (ácidos carboxílicos, carboidratos, polímeros, aminoácidos e amidos), além do controle (sem substrato). Cada amostra foi inserida em uma microplaca e incubada a 28°C por 48 horas. O crescimento microbiano foi determinado por espectrofotometria a 590 nm. A capacidade de usar uma fonte de carbono foi determinada pela (Equação 1) [28]:

$$WE = 100 (WA - W0) / W0 \quad (1)$$

em que: WE é o índice de desenvolvimento de cor, WA é a absorbância de cada cavidade e W0 é a absorbância do branco. A condição para que a reação seja positiva é que o WE seja maior que 100.

O Índice de Shannon compreende a riqueza de substratos e a intensidade com que a microbiota os utilizou (Equação 2) [29, 30]:

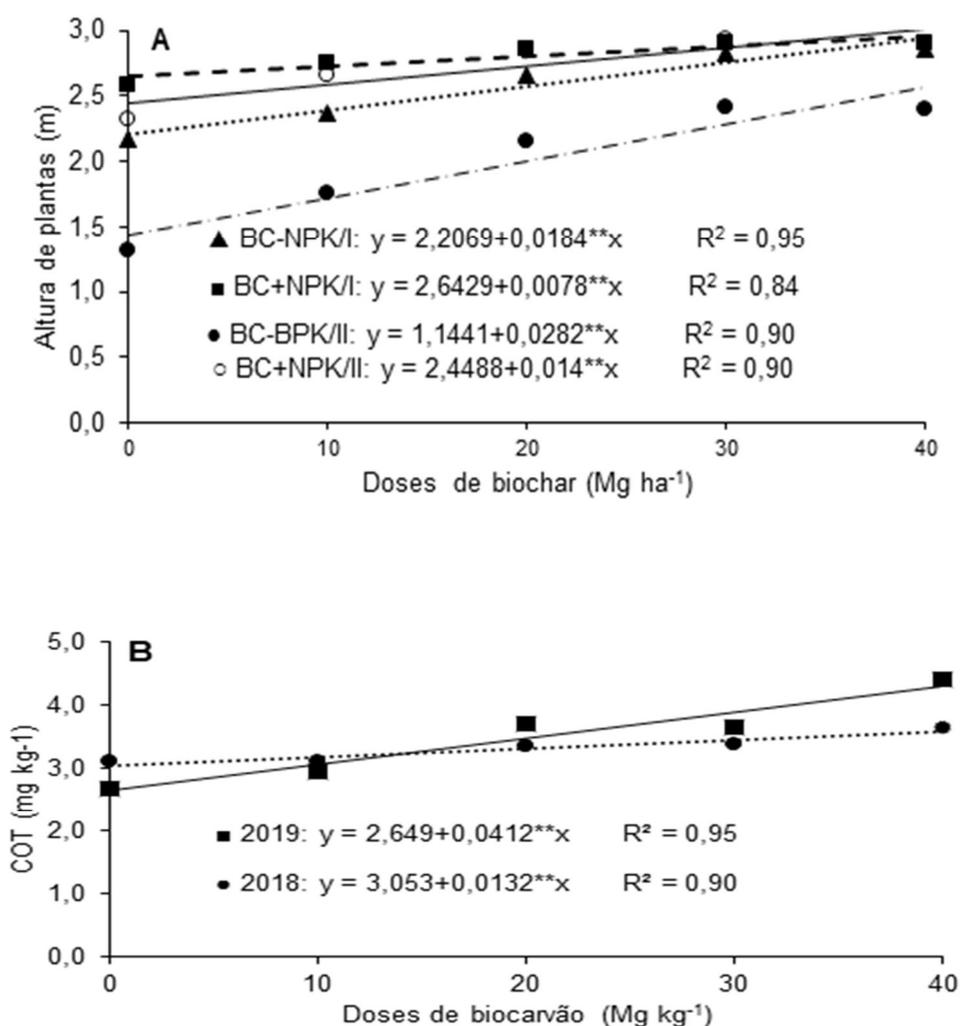
$$H = - \sum p_i (\ln p_i) \quad (2)$$

em que: H é o índice de diversidade de Shannon e  $p_i$  é a razão entre a atividade de utilização de um determinado substrato e a atividade de utilização de todos os substratos.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e a análise de regressão foi realizada em caso de significância entre as doses de biocarvão. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R, versão 3.4.2 [31].

### 3. Resultados

O crescimento em altura das plantas de cana-de-açúcar aumentou linearmente com as doses de biocarvão (Figura 2A). Na ausência de biocarvão, as diferenças entre os tratamentos sem correção da fertilidade do solo (NFC) e com correção da fertilidade do solo (WFC) foram mais significativas que nas doses mais altas de biocarvão. De acordo com as equações de regressão realizadas, para crescimento em altura, em função das doses de biocarvão (Figura 2A), na primeira safra de cana-de-açúcar, a altura das plantas foi de 2,21 e 2,64 m, nos tratamentos NFC e WFC, respectivamente, na dose zero de biocarvão. Na dose de 40 Mg ha<sup>-1</sup> de biocarvão, as alturas foram de 2,94 e 2,95 m, respectivamente, nos tratamentos NFC e WFC. Na segunda safra de cana-de-açúcar, a altura das plantas foi de 1,14 e 2,45, na dose zero e 1,72 e 3,01 m na dose 40 Mg ha<sup>-1</sup>, nos tratamentos NFC e WFC, respectivamente (Figura 2A).



**Figura 2.** Crescimento em altura da cana-de-açúcar (A) e teor de carbono orgânico total do solo (B) em função das doses de biocarvão

Para carbono orgânico total (COT), nos dois anos de avaliação, não houve diferença significativa entre os tratamentos NFC e WFC (Figura 2B). Por outro lado, os teores de COT aumentaram linearmente com as doses de biocarvão. No primeiro ano, os teores de COT, nas doses zero e 40 Mg ha<sup>-1</sup> de biocarvão, foram de 30,5 e 35,8 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. No segundo ano, os teores de COT foram de 26,5 e 43,0 g kg<sup>-1</sup>, nas doses zero e 40 Mg ha<sup>-1</sup> de biocarvão, respectivamente (Figura 2B).

Para as variáveis carbono da biomassa microbiana do solo (Cmic), respiração basal do solo (SBR), efluxo de CO<sub>2</sub>, quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>), quociente microbiano (qMIC) e índice de Shannon, houve efeito significativo da interação entre as doses de biocarvão e correção da fertilidade do solo (NFC e WFC), nos dois anos de avaliação (Tabela 2).

**Tabela 2.** Carbono da biomassa do solo (Cmic), respiração basal do solo (SBR), efluxo de CO<sub>2</sub>, quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>), quociente microbiano (qMIC) e índice de Shannon em função das doses de biocarvão, nos tratamentos sem e com NPK, em dois anos de avaliação

Variáveis	Ano	NPK	Equação	R <sup>2</sup>	Xmax	Ymax
Cmic mg C microbial kg <sup>-1</sup>	I	sem	$y = 250,32 + 10,363^{**}x - 0,2384^{**}x^2$	0,87	21,73	389,51
		com	$y = 261,55 + 11,81^{**}x - 0,2725^{**}x^2$	0,97	21,67	362,94
	II	sem	$y = 267,70 + 8,995^{**}x - 0,205^{**}x^2$	0,82	21,94	366,37
		com	$y = 288,01 + 9,4621^{**}x - 0,1864^{**}x^2$	0,91	25,38	408,09
SBR mg C-CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> solo h <sup>-1</sup>	I	sem	$y = 0,0689 + 0,0057^{**}x - 0,0001^{**}x^2$	0,79	28,50	0,15
		com	$y = 0,0788 + 0,0094^{**}x - 0,0002^{**}x^2$	0,93	23,50	0,19
	II	sem	$y = 0,0813 + 0,0059^{**}x - 0,0001^{**}x^2$	0,80	29,50	0,17
		com	$y = 0,1002 + 0,0091^{**}x - 0,0002^{**}x^2$	0,93	22,75	0,20
Efluxo CO <sub>2</sub> μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	I	sem	$y = 3,345 - 0,094^{**}x + 0,002^{**}x^2$	0,78	0,00	3,35
		com	$y = 3,425 - 0,13^{**}x + 0,0023x^2$	0,91	0,00	3,43
	II	sem	$y = 3,5986 - 0,072^{**}x + 0,0014^{**}x^2$	0,92	0,00	3,60
		com	$y = 3,7493 - 0,1396^{**}x + 0,0024x^2$	0,88	0,00	3,75
qCO <sub>2</sub> mg C-CO <sub>2</sub> ,g <sup>-1</sup> Cmic h <sup>-1</sup>	I	sem	$y = 0,2782 + 0,0069^{**}x - 0,0001^{**}x^2$	0,62	34,50	0,39
		com	$y = 0,3001 + 0,0154^{**}x - 0,0003^{**}x^2$	0,69	25,67	0,47
	II	sem	$y = 0,3115 + 0,0081^{**}x - 0,0002^{**}x^2$	0,60	20,25	0,39
		com	$y = 0,3483 + 0,0154^{**}x - 0,0004^{**}x^2$	0,62	19,25	0,50
qMIC %	I	sem	$y = 0,8612 + 0,0214^{**}x - 0,0006^{**}x^2$	0,82	17,83	1,05
		com	$y = 0,8232 + 0,0426^{**}x - 0,0011^{**}x^2$	0,94	19,36	1,24
	II	sem	$y = 1,1288 - 0,0095^{**}x$	0,90	0,00	1,13
		com	$y = 1,0449 + 0,0286^{**}x - 0,0008^{**}x^2$	0,90	17,88	1,30
Índice de Shannon	I	sem	$y = 1,1257 + 0,0994^{**}x - 0,0021^{**}x^2$	0,91	23,67	2,30
		com	$y = 1,7036 + 0,0598^{**}x - 0,0014^{**}x^2$	0,75	21,35	2,34
	II	sem	$y = 1,3621 + 0,0826^{**}x - 0,0012^{**}x^2$	0,99	34,42	2,78
		com	$y = 2,535 + 0,0213^{**}x$	0,82	40,00	3,39

Xmax é a dose de biocarvão correspondente ao máximo valor da variável (Ymax).

Os valores de Cmic, SBR e qCO<sub>2</sub> foram ajustados a um modelo quadrático, independentemente do ano de avaliação e aplicação do NPK (Tabela 2). Os maiores valores de Cmic foram observados, nos tratamentos NFC, 389,50 e 408,09 mg C microbiano kg<sup>-1</sup>, no primeiro e segundo anos, respectivamente (Tabela 2). Independentemente da aplicação de NPK, durante os dois anos de avaliação, os maiores valores de Cmic foram obtidos entre as doses de 21,77 a 25,38 Mg ha<sup>-1</sup> de biocarvão (Tabela 2).

Para SBR, os maiores valores foram obtidos, nos tratamentos WFC, no primeiro ano (0,19 mg C CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> solo hora<sup>-1</sup>) e nos tratamentos NFC, no segundo ano (0,20 mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> solo hora<sup>-1</sup>). As doses

de biocarvão, para obter os maiores valores de SBR, variaram de 22,75 a 29,50 Mg ha<sup>-1</sup> (Tabela 2). Da mesma forma, os maiores valores de qCO<sub>2</sub> foram obtidos, nos tratamentos WFC no primeiro ano (0,47 mg C-CO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> Cmic h<sup>-1</sup>) e, nos tratamentos NFC, no segundo ano (0,50 mg C-CO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> Cmic h<sup>-1</sup>) (Tabela 2). As doses, para a obtenção dos maiores valores de qCO<sub>2</sub> variaram de 25,67 a 34,50 Mg ha<sup>-1</sup> no primeiro ano, enquanto, no segundo ano de avaliação, as doses variaram de 19,25 a 20,25 Mg ha<sup>-1</sup> (Tabela 2).

Os valores de efluxo de CO<sub>2</sub> foram ajustados a um modelo quadrático, nos dois anos avaliados, independentemente da aplicação do NPK (Tabela 2). De acordo com as equações ajustadas, os maiores valores de efluxo de CO<sub>2</sub> foram obtidos em doses zero de biocarvão e variaram de 3,35 a 3,75 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Os menores valores, 2,24 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (sem NPK) e 1,59 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (com NPK), foram obtidos nas doses correspondentes de biocarvão 23,50 e 28,26 Mg ha<sup>-1</sup>, respectivamente, no primeiro ano de avaliação. Os menores valores foram obtidos, no segundo ano nas doses de 25,71 e 29,08 Mg ha<sup>-1</sup> e corresponderam a 2,67 e 1,72 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente, para os tratamentos NFC e WFC (Tabela 2).

No primeiro ano de avaliação, tanto nos tratamentos NFC quanto WFC, os valores de qMIC foram ajustados a um modelo quadrático em função das doses de biocarvão (Tabela 2). Os maiores valores, nos tratamentos NFC e WFC, 1,05% e 1,24%, foram obtidos nas doses de 17,83 e 19,36 Mg ha<sup>-1</sup>, respectivamente. No segundo ano, nos tratamentos NFC, os valores de qMIC diminuíram linearmente com as doses de biocarvão, enquanto, nos tratamentos WFC, os valores foram ajustados a um modelo quadrático. Nos tratamentos NFC, o maior valor de qMIC foi de 1,30%, na dose correspondente a 17,88Mg ha<sup>-1</sup> de biocarvão. Por outro lado, nos tratamentos WFC, o maior valor, 1,13%, foi obtido na dose zero de biocarvão (Tabela 2).

Os valores do índice de Shannon ajustaram-se a um modelo quadrático, exceto para os tratamentos NFC, no segundo ano de avaliação (Tabela 2). No primeiro ano, os valores foram de 2,30 e 2,34, nas doses de 26,67 e 21,35 Mg ha<sup>-1</sup>, respectivamente, nos tratamentos NFC e WFC. No segundo ano, nos tratamentos NFC, o maior valor, 3,39, foi obtido na dose de 40 Mg ha<sup>-1</sup> de biocarvão, enquanto, nos tratamentos WFC, o maior valor, 2,78, foi obtido na dose de 34,42 Mg ha<sup>-1</sup> de biocarvão (Tabela 2).

Cmic correlacionou-se positivamente com SBR, qCO<sub>2</sub>, qMIC e Índice de Shannon e negativamente com efluxo de CO<sub>2</sub> (Tabela 3). A SBR foi positivamente correlacionada com o qCO<sub>2</sub> e negativamente correlacionada com o efluxo de CO<sub>2</sub>; qCO<sub>2</sub> correlacionou-se positivamente com qMIC (Tabela 3).

**Tabela 3.** Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis carbono na biomassa microbiana (Cmic), respiração basal do solo (SBR), carbono orgânico total (COT), efluxo de CO<sub>2</sub>, quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>), quociente microbiano (qMIC) e Índice de Shannon

Variáveis	Cmic	SBR	COT	Efluxo de CO <sub>2</sub>	qCO <sub>2</sub>	qMIC
SBR	0,85**	-	-	-	-	-
COT	0,34 <sup>NS</sup>	0,27 <sup>NS</sup>	-	-	-	-
Efluxo de CO <sub>2</sub>	-0,76**	-0,68*	-0,70*	-	-	-
qCO <sub>2</sub>	0,61*	0,93**	0,21 <sup>NS</sup>	-0,51*	-	-
qMIC	0,63*	0,70**	-0,26 <sup>NS</sup>	-0,30 <sup>NS</sup>	0,61*	-
Índice de Shannon	0,68*	0,61*	0,38 <sup>NS</sup>	-0,46 <sup>NS</sup>	0,47 <sup>NS</sup>	0,20 <sup>NS</sup>

\*\* , \* e NS, significativo a 1%, 5% e não significativo, respectivamente.

#### 4. Discussão

O crescimento em altura das plantas de cana-de-açúcar com o aumento das doses de biocarvão (Figura 2A) pode ser atribuído à melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. O biocarvão é uma fonte de nutrientes (Tabela 1) e contribui para aumentar a capacidade de troca catiônica dos solos [32]. Pela grande porosidade das partículas e superfície específica, favorece a capacidade de retenção de água e promove um ambiente propício ao desenvolvimento de microrganismos, como fungos micorrízicos [33].

No segundo ano de avaliação, o menor crescimento em altura, no tratamento sem NPK (NFC), principalmente nas menores doses de biocarvão (Figura 2A), pode ser atribuído aos nutrientes exportados pelos colmos de cana-de-açúcar na primeira colheita, conseqüentemente, houve diminuição da capacidade do solo em fornecer esses elementos para as plantas.

Os teores de COT aumentaram linearmente com a quantidade de biocarvão incorporado ao solo (Figura 2B). Além de ser uma fonte de carbono (Tabela 1), a estrutura aromática do biocarvão é desfavorável à sua biodegradação [34,35], o que contribui para a manutenção do estoque de carbono do solo ao longo do tempo. Outros autores também encontraram aumento nos teores de COT com a aplicação de biocarvão no solo [36-38].

Certamente manter a palha de cana (resíduo da colheita), na superfície do solo, também, contribui para o aumento dos teores de COT [39, 40]. Em 2012, pesquisadores relataram que os maiores teores de COT, resultantes da aplicação de biocarvão e fertilizantes, podem estar associados, além do biocarvão ser uma fonte de carbono, ao maior crescimento das plantas (raiz e parte aérea), maior índice de área foliar para a produção de fotossintatos e rizodeposição e respiração das raízes, proporcionada pela maior disponibilidade de nutrientes [3]. Neste estudo verificou-se que o crescimento em altura das plantas aumentou linearmente com as doses de biocarvão, sendo os maiores valores obtidos nos tratamentos com biocarvão e adubação mineral (Figura 2A).

A manutenção dos estoques de COT, ao longo do tempo, em solos que receberam aplicação de biocarvão, tem sido atribuída à estabilidade do carbono pirogênico [41]. Segundo esses autores, o carbono dos biocarvões derivados da madeira é altamente recalcitrante nos solos, com tempos de residência entre 100 e 1000 anos, 10-1000 vezes mais residente que a matéria orgânica não pirolisada. Assim, a aplicação de biocarvão pode aumentar os estoques de carbono do solo e é uma técnica promissora para mitigar as emissões de gases de efeito estufa [42].

Os valores de  $C_{mic}$ , de acordo com o modelo de equação ajustada, aumentaram até as doses de 20 a 25 Mg ha<sup>-1</sup> (Tabela 2).  $C_{mic}$  representa o reservatório mais ativo e dinâmico de C orgânico e nutrientes do solo e corresponde, em média, 2 a 5% do COT [43]. Assim, a  $C_{mic}$  está diretamente relacionada à quantidade e qualidade da matéria orgânica do solo [44], sendo muito mais sensível às práticas de manejo do solo que a COT [45]. No presente estudo, a temperatura final de pirólise foi de 350 °C. Nessa temperatura, ainda, há material orgânico não totalmente pirolisado, como a lignina [46].

Além do biocarvão, as diferentes quantidades de resíduos, principalmente folhas, depositadas na superfície do solo, durante o crescimento das plantas até a colheita, podem ter influenciado a  $C_{mic}$ . Nos tratamentos com maiores doses de biocarvão, houve maior crescimento das plantas em altura (Figura 2A) e, conseqüentemente, maior quantidade de folhas depositadas na superfície do solo. Além disso, doses maiores de biocarvão incorporaram carbono ao solo em formas mais recalcitrantes. Embora não esteja muito claro quais fatores influenciaram o  $C_{mic}$ , pode-se inferir que a quantidade de resíduos da cana-de-

açúcar e do biocarvão alterou a qualidade e a relação carbono/nutriente da matéria orgânica do solo.

A redução da atividade dos microrganismos associados ao  $C_{mic}$  (Figura 2A), em doses acima de 20 a 25  $Mg\ kg^{-1}$  de biocarvão, é reforçada pelos valores de SBR e  $qCO_2$  (Tabela 2). Como observado para  $C_{mic}$ , os maiores SBR e  $qCO_2$  foram obtidos em doses intermediárias de biocarvão (Tabela 2). Os fatores que influenciaram os valores  $C_{mic}$  discutidos anteriormente podem ter afetado o SBR e o  $qCO_2$ . Corroborando com essa hipótese, houve correlação positiva de  $C_{mic}$  com COT, SBR e  $qCO_2$  (Tabela 3), independentemente do ano de avaliação, da dose de biocarvão e da aplicação de NPK. Já o SBR e o  $qCO_2$  estão relacionados com a eficiência da biomassa microbiana, pois a redução nos valores de SBR e  $qCO_2$  indica que menos carbono na forma de  $CO_2$  está sendo perdido pela respiração e, conseqüentemente, mais carbono é incorporado aos tecidos microbianos [47]. Zhou et al. (2017) verificaram que a incorporação de biocarvão ao solo reduz as emissões de  $CO_2$  em até 21% em relação à incorporação de matéria-prima não pirolisada [48]. Assim, menores valores de  $qCO_2$ , verificados em maiores doses de biocarvão (Tabela 2), podem indicar menor estresse ambiental e favorecimento da população microbiana do solo com melhor habitat e otimização do uso do carbono [49].

A incorporação de biocarvão ao solo aumentou o  $qMIC$  até as doses de 17 e 19  $Mg\ ha^{-1}$  (Tabela 2). A redução do  $qMIC$ , em doses maiores de biocarvão, pode estar associada ao fato do biocarvão ser um material rico em carbono (Tabela 1), uma vez que o  $qMIC$  foi estimado pela relação entre  $C_{mic}$  e COT. Assim, doses maiores de biocarvão aumentaram o teor de COT (Figura 2A) e, em consequência, reduziram os valores de  $qMIC$  (Tabela 2). O  $qMIC$  é usado como um indicador do potencial de mineralização da matéria orgânica. Quanto menores os valores de  $qMIC$  no solo, menor a tendência de mineralização da matéria orgânica [50,51] e, com isso, menor a emissão de  $CO_2$  para a atmosfera.

Para o efluxo de  $CO_2$  do solo determinado "in loco", nos dois anos de avaliação, foram encontrados valores menores com o aumento das doses de biocarvão, independentemente da aplicação de NPK (Tabela 2). Os valores de Efluxo de  $CO_2$  foram negativamente correlacionados com  $C_{mic}$ , SBR e COT, indicando que, independentemente dos fatores ambientais que afetam a difusividade do dióxido de carbono no solo, quanto maiores os valores dessas variáveis, menor o Efluxo de  $CO_2$  do solo. O efluxo de  $CO_2$  do solo ou da respiração do solo está relacionado ao carbono emitido pelas raízes das plantas, pela atividade de microrganismos e pela oxidação da matéria orgânica e está relacionado a fatores ambientais, como temperatura e umidade, manejo do solo, que afetam a difusividade do dióxido de carbono no solo [52].

Em relação à diversidade microbiana, a adição de biocarvão ao solo aumentou significativamente o Índice de Shannon (Tabela 2). Os maiores valores do Índice de Shannon estão relacionados à maior diversidade da comunidade microbiana do solo, o que favorece a sobrevivência dos microrganismos, em situações de estresse, promovidas, por exemplo, pelas atividades agrícolas [53,54]. Outros estudos também observaram aumento no índice de Shannon após a adição de biocarvão ao solo [55-57]. Segundo esses autores, as melhorias nas propriedades químicas e físicas do solo pelo biocarvão favorecem tanto os microrganismos do solo quanto as plantas, que contribuem com carbono para o solo via biomassa e rizodeposição. Além disso, as partículas de biocarvão têm uma alta superfície específica e porosidade, que fornecem um habitat favorável para microrganismos. Assim, a complexidade da matriz e a composição dos biocarvões, em função da matéria-prima e condições de pirólise, afetam os microrganismos do solo diferentemente dos resíduos orgânicos não pirolisados.

Os valores do índice de Shannon foram positivamente correlacionados com o  $C_{mic}$ , uma vez que é constituído por fungos, bactérias, actinomicetos, protozoários, algas e microfauna do solo [22]. O índice de Shannon indica que, ao longo do tempo, houve aumento na diversidade da comunidade microbiana do solo com biocarvão, principalmente quando combinado com NPK (Tabela 2), Zhang *et al.* (2021) [3], favorece o aumento da SBR (Figura 3B). Além disso, a composição química e a estrutura física dos biocarvões alteram as propriedades do solo, afetando diretamente a população microbiana [54]. Independentemente das doses de biocarvão, de maneira geral, os tratamentos adubados com fertilizantes minerais NPK apresentaram maiores valores de  $C_{mic}$ , SBR,  $qCO_2$ ,  $qMIC$  e índice de Shannon e menores valores de efluxo de  $CO_2$  (Tabela 2) quando comparados aos tratamentos sem adição de NPK. Esses resultados podem ser atribuídos às mudanças, nas proporções de carbono/nutrientes, que alteraram a atividade dos microrganismos do solo [58-60]. Embora os resíduos da cana-de-açúcar sejam ricos em compostos recalcitrantes, como lignina, celulose e hemicelulose e o biocarvão em carbono mais estável [61], as maiores relações carbono/nutrientes, decorrentes da adição de NPK, podem ter favorecido a oxidação mais rápida do biocarvão e da palha da cana-de-açúcar depositados na superfície do solo.

De maneira geral, os valores das variáveis  $C_{mic}$ , SBR,  $qCO_2$ ,  $qMIC$  e índice de Shannon, nos dois anos de avaliação, independentemente da aplicação de NPK, aumentaram até as doses intermediárias de biocarvão, estabilizando ou apresentando uma leve redução a partir das doses 20 a 30  $Mg\ ha^{-1}$  (Tabela 2). Por outro lado, o efluxo de  $CO_2$  foi mais significativo, em doses mais baixas de biocarvão, enquanto o COT aumentou linearmente (Tabela 2). Uma possível hipótese, para explicar esses resultados, é o efeito *priming* decorrente da adição de biocarvão ao solo. O efeito *priming* é entendido como intensas mudanças, em curto prazo, na reciclagem da matéria orgânica do solo, causadas, por exemplo, pela adição de matéria orgânica ao solo [62]. O efeito *priming* positivo refere-se à aceleração da mineralização da matéria orgânica do solo quando materiais orgânicos são adicionados ao solo. Em contraste, o atraso na mineralização da matéria orgânica do solo refere-se ao efeito de *priming* negativo. No presente estudo, a aceleração da mineralização da matéria orgânica, para doses intermediárias, pode ser entendida como um efeito *priming* positivo, uma vez que o biocarvão adiciona compostos orgânicos solúveis ao solo e favorece a mineralização do COT [63,64]. Por outro lado, em doses mais altas de biocarvão, quantidades de carbono mais estáveis e razões carbono/nutrientes mais elevadas podem ter contribuído para menor taxa de mineralização do COT, ou seja, efeito de *priming* negativo. Além do biocarvão, a palha da cana-de-açúcar pode ter contribuído para o efeito *priming* negativo, em doses mais altas de biocarvão, ao longo do tempo.

É importante ressaltar que a aplicação de biocarvão ao solo pode contribuir, para a manutenção do COT, reduzindo as perdas de carbono na forma de  $CO_2$  e alterando a atividade e diversidade microbiana do solo. Doses maiores de biocarvão podem ter contribuído para menores emissões de carbono na forma de dióxido de carbono, conforme sugerido pelos maiores teores de COT (Figura 2A) e menores valores de efluxo de  $CO_2$  (Tabela 2), favorecendo, assim, o sequestro de carbono no solo. Considerando essa hipótese, pode-se inferir que, logo após a incorporação do biocarvão ao solo, ocorreu a mineralização de compostos orgânicos mais solúveis, incluindo o COT nativo do solo (efeito *priming* positivo). Na primeira avaliação, um ano após a incorporação do biocarvão ao solo (primeiro ano), pode ter ocorrido o predomínio de formas mais estáveis de carbono pirolisado. Uma tendência semelhante foi observada no segundo ano de avaliação. Além disso, os maiores valores de  $C_{mic}$  (Tabela 2) indicam maior eficiência de assimilação de carbono pelos microrganismos, em doses maiores de biocarvão, uma vez que

Cmic representa a proporção mais significativa de biomassa formada por unidade de carbono e menor quantidade de carbono mineralizado de CO<sub>2</sub> [65].

Outra hipótese está relacionada à complexidade da matriz do biocarvão, com alta porosidade e superfície específica, que contribui para o crescimento e diversidade da população de microrganismos [66] e protege a matéria orgânica de microrganismos e enzimas extracelulares. Segundo essa hipótese, os complexos orgânicos se formariam, por exemplo, pela ligação de compostos orgânicos às superfícies das partículas de biocarvão por pontes catiônicas, protegendo esses compostos dos microrganismos heterotróficos do solo. Pelo mesmo mecanismo, enzimas extracelulares também podem ser adsorvidas às partículas de biocarvão, inibindo a mineralização de COT. Essas reações também podem ter um efeito físico na formação de agregados, protegendo o COT da ação de microrganismos e enzimas extracelulares. Mecanismos semelhantes foram propostos por Doumer *et al.* (2011), ao estudarem o efeito da aplicação de doses de xisto betuminoso retornado, na evolução de CO<sub>2</sub>, Cmic e atividade enzimática do solo [65]. Corroborando com os resultados do presente estudo, Lopes *et al.* (2021) verificaram, em estudo nessa mesma área, um aumento na atividade das enzimas β-glicosidase, fosfatase ácida e urease até as doses de 27, 24 e 34 Mg ha<sup>-1</sup> de biocarvão incorporado ao solo, respectivamente. A partir dessas doses, houve estabilização ou redução da atividade dessas enzimas, o que está de acordo com as hipóteses propostas para explicar os resultados do efluxo de CO<sub>2</sub> [67].

## 5. Conclusão

1. A incorporação de biocarvão e fertilizante mineral NPK ao solo contribui para aumentar o crescimento das plantas de cana-de-açúcar e o teor de carbono orgânico total e carbono da biomassa microbiana do solo.
2. Independentemente da aplicação de fertilizante mineral NPK, doses de biocarvão entre 20 e 30 Mg ha<sup>-1</sup> favorecem a atividade de microrganismos relacionados à mineralização da matéria orgânica do solo. Doses de biocarvão acima desses valores contribuem para a menor perda de carbono na forma de CO<sub>2</sub> para a atmosfera.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsas e apoio financeiro.

## 6. Referências

- [1] W. Chen, J. Meng, X. Han, Y. Lan, W. Zhang, Past, present, and future of biochar, *Biochar*. 1(2019) 75–87. <https://doi.org/10.1007/s42773-019-00008-3>.
- [2] E.S. Penido, G.C. Martins, T.B.M. Mendes, L.C.A. Melo, I. do Rosário Guimarães, L.R.G. Guilherme, Combining biochar and sewage sludge for immobilization of heavy metals in mining soils, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172 (2019) 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.110>.
- [3] S. Zhang, Y. Li, B.P. Singh, H. Wang, X. Cai, J. Chen, H. Qin, Y. Li, S.X. Chang, Contrasting short-term

responses of soil heterotrophic and autotrophic respiration to biochar-based and chemical fertilizers in a subtropical Moso bamboo plantation, *Appl. Soil Ecol.* 157 (2021) 103758. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103758>.

[4] J. Cheng, X. Lee, W. Gao, Y. Chen, W. Pan, Y. Tang, Effect of biochar on the bioavailability of difenoconazole and microbial community composition in a pesticide-contaminated soil, *Appl. Soil Ecol.* 121 (2017) 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.009>.

[5] D. Li, R. Zhao, X. Peng, Z. Ma, Y. Zhao, T. Gong, M. Sun, Y. Jiao, T. Yang, B. Xi, Biochar-related studies from 1999 to 2018: a bibliometrics-based review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (2020) 2898–2908. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06870-9>.

[6] S. Fan, J. Zuo, H. Dong, Changes in soil properties and bacterial community composition with biochar amendment after six years, *Agronomy.* 10 (2020) 746. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050746>.

[7] X. Zhu, B. Chen, L. Zhu, B. Xing, Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review, *Environ. Pollut.* 227 (2017) 98–115. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.032>.

[8] M. Schloter, P. Nannipieri, S.J. Sørensen, J.D. Van Elsas, Microbial indicators for soil quality Michael, *Biol. Fertil. Soils.* 54 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1248-3>.

[9] I.C. Mendes, L.M. Souza, D.M.G. Sousa, A.A.C. Lopes, F.B. Reis-Junior, M.P.C. Lacerda, J.V. Malaquias, Critical limits for microbial indicators in tropical Oxisols at post-harvest: The FERTBIO soil sample concept, *Appl. Soil Ecol.* 139 (2019) 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.025>.

[10] K.A.P. Lacerda, M.A.S. Cordeiro, A. Verginassi, F.H.M. Salgado, H.B. Paulino, M.A.C. Carneiro, Organic carbon, biomass and microbial activity in an Oxisol under different management systems, *Rev. Ciências Agrar. - Amaz. J. Agric. Environ. Sci.* 56 (2013) 249–254. <https://doi.org/10.4322/rca.2013.036>.

[11] W. Demisie, Z. Liu, M. Zhang, Effect of biochar on carbon fractions and enzyme activity of red soil, *Catena.* 121 (2014) 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.05.020>.

[12] V.A. Gonçalves, C.A.D. Melo, I.R. de Assis, L.R. Ferreira, D.T. Saraiva, Biomassa e atividade microbiana de solo sob diferentes sistemas de plantio e sucessões de culturas, *Rev. Ciências Agrárias.* 62 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.22491/rca.2019.2611>.

[13] S. Goenster, C. Gründler, A. Buerkert, R.G. Joergensen, Soil microbial indicators across land use types in the river oasis Bulgan sum center, Western Mongolia, *Ecol. Indic.* 76 (2017) 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.01.002>.

[14] L. Paetsch, C.W. Mueller, I. Kögel-Knabner, M. Von Lützow, C. Girardin, C. Rumpel, Effect of in-situ aged and fresh biochar on soil hydraulic conditions and microbial C use under drought conditions, *Sci. Rep.* 8 (2018) 6852. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25039-x>.

- [15] S. Kaur, G.S. Dheri, D.K. Benbi, Effect of long-term fertilization in maize-wheat cropping system on carbon mineralization in soil, *Carbon Manag.* 10 (2019) 523–532. <https://doi.org/10.1080/17583004.2019.1667700>.
- [16] KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. In: *Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes*. Elsevier, 1999. p. 65-76.
- [17] L. li He, Z. ke Zhong, H. min Yang, Effects on soil quality of biochar and straw amendment in conjunction with chemical fertilizers, *J. Integr. Agric.* 16 (2017) 704–712. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61420-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61420-X).
- [18] P.C. Teixeira, G.K. Donagemma, A. Fontana, W.G. Teixeira, *Manual de métodos de análise de solo*, Embrapa, Brasília, 2017.
- [19] M.S. Benedini, C.P. Penatti, Recomendação de adubação da cana-de-açúcar pela estimativa de produtividade, *Rev. Coplana.* 26 (2008) 3.
- [20] G.H.. Korndörfer, A.C.. Ribeiro, L.A.B. Andrade, Cana-de-açúcar, in: *Recom. Para o Uso Corretivos e Fertil. Em Minas Gerais 5ª Aproximação*, Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, Viçosa-MG, 1999: pp. 143–166.
- [21] R. Otto, G.C. Vitti, P.H. de C. Luz, Manejo da adubação potássica na cultura da cana-de-açúcar, *Rev. Bras. Cienc. Do Solo.* 34 (2010) 1137–1145. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832010000400013>.
- [22] E.D. Vance, P.C. Brookes, D.S. Jenkinson, An extraction method for measuring soil microbial biomass C An extraction method for measuring soil microbial biomass C, *Soil Biol. Biochem.* 19 (1987) 703–707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6).
- [23] J.C. Yeomans, J.M. Bremner, A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19 (1988) 1467–1476. <https://doi.org/10.1080/00103628809368027>.
- [24] J.P.E. Anderson, Soil Respiration, in: A.L. Page (Ed.), *Methods Soil Anal. Part 2. Chem. Microbiol. Prop.*, American Society of Agronomy, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA, 1982: pp. 831–871. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c41>.
- [25] T.H. Anderson, K.H. Domsch, The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as ph, on the microbial biomass of forest soils, *Soil Biol. Biochem.* 25 (1993) 393–395. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90140-7).
- [26] G.P. Sparling, Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter, *Aust. J. Soil Res.* 30 (1992) 195–207. <https://doi.org/10.1071/SR9920195>.
- [27] J. Bloem, D.W. Hopkins, A. Benedetti, *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*, CABI

Publishing, Cambridge, USA, 2006. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2007.00943\\_3.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2007.00943_3.x).

[28] A.M. Ibekwe, A.C. Kennedy, Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions, *FEMS Microbiol. Ecol.* 26 (1998) 151–163. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00032-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00032-4).

[29] L. Wasilewska, Differences in development of soil nematode communities in single- and multi-species grass experimental treatments, *Appl. Soil Ecol.* 2 (1995) 53–64. [https://doi.org/10.1016/0929-1393\(94\)00037-8](https://doi.org/10.1016/0929-1393(94)00037-8).

[30] J.C. Zak, M.R. Willig, D.L. Moorhead, H.G. Wildman, Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach, *Soil Biol. Biochem.* 26 (1994) 1101–1108. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90131-7).

[31] R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3.4.2., (2017).

[32] K.C. Bernardes, M. de L.P. Ruivo, A.J.S. Pedroso, P.G. Rodrigues, R.S. Okumura, Chemical attributes of archaeological black earth soils in Brazilian Amazon, *Aust. J. Crop Sci.* 11 (2017) 1334–1338. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.10.pne611>.

[33] P.C.N. Mary, R. Murugaragavan, J. Ramachandran, R. Shanmugasundaram, S. Karpagam, Biochar – A Valuable Soil Amendment, *Biot. Res. Today.* 2 (2020) 1058–1060.

[34] S. Shi, Q. Zhang, Y. Lou, Z. Du, Q. Wang, N. Hu, Y. Wang, A. Gunina, J. Song, Soil organic and inorganic carbon sequestration by consecutive biochar application: Results from a decade field experiment, *Soil Use Manag.* 37 (2021) 95–103. <https://doi.org/10.1111/sum.12655>.

[35] Y. Zhao, S. Lin, Y. Liu, G. Li, J. Wang, K. Butterbach-Bahl, Application of mixed straw and biochar meets plant demand of carbon dioxide and increases soil carbon storage in sunken solar greenhouse vegetable production, *Soil Use Manag.* 36 (2020) 439–448. <https://doi.org/10.1111/sum.12579>.

[36] C.C. de Figueiredo, W.M. Farias, B.A. de Melo, J.K.M. Chagas, A.T. Vale, T.R. Coser, Labile and stable pools of organic matter in soil amended with sewage sludge biochar, *Arch. Agron. Soil Sci.* 65 (2019) 770–781. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1524577>.

[37] Q. Sun, J. Meng, Y. Lan, G. Shi, X. Yang, D. Cao, W. Chen, X. Han, Long-term effects of biochar amendment on soil aggregate stability and biological binding agents in brown earth, *Catena.* 205(2021) 105460. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2021.105460>.

[38] P. Wu, S.T. Ata-Ul-Karim, B.P. Singh, H. Wang, T. Wu, C. Liu, G. Fang, D. Zhou, Y. Wang, W. Chen, A scientometric review of biochar research in the past 20 years (1998–2018), *Biochar.* 1 (2019) 23–43. <https://doi.org/10.1007/s42773-019-00002-9>.

[39] M.R. Cherubin, R.O. Bordonal, G.A. Castioni, E.M. Guimarães, I.P. Lisboa, L.A.A. Moraes, L.M.S.

Menandro, S. Tenelli, C.E.P. Cerri, D.L. Karlen, J.L.N. Carvalho, Soil health response to sugarcane straw removal in Brazil, *Ind. Crops Prod.* 163 (2021) 113315. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113315>.

[40] J.L.N. Carvalho, R.C. Nogueirol, L.M.S. Menandro, R. de O. Bordonal, C.D. Borges, H. Cantarella, H.C.J. Franco, Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review, *GCB Bioenergy*. 9 (2017) 1181–1195. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12410>.

[41] B.A. Oni, O. Oziegbe, O.O. Olawole, Significance of biochar application to the environment and economy, *Ann. Agric. Sci.* 64 (2019) 222–236. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2019.12.006>.

[42] C. Zhang, G. Zeng, D. Huang, C. Lai, M. Chen, M. Cheng, W. Tang, L. Tang, H. Dong, B. Huang, X. Tan, R. Wang, Biochar for environmental management: Mitigating greenhouse gas emissions, contaminant treatment, and potential negative impacts, *Chem. Eng. J.* 373 (2019) 902–922. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.139>.

[43] D.S. Jenkinson, J.N. Ladd, Microbial biomass in soil: measurement and turnover, in: E.A. Paul, J.N. Ladd (Eds.), *Soil Biochem.*, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1981: pp. 415–471.

[44] M. Azeem, R. Hayat, Q. Hussain, M.I. Tahir, M. Imran, Z. Abbas, M. Sajid, A. Latif, M. Irfan, Effects of biochar and NPK on soil microbial biomass and enzyme activity during 2 years of application in the arid region, *Arab. J. Geosci.* 12 (2019) 311. <https://doi.org/10.1007/s12517-019-4482-1>.

[45] E.F. da Gama-Rodrigues, N.F. de Barros, A.C. da Gama-Rodrigues, G. de Araújo Santos, Carbon, nitrogen and activity of microbial biomass in soil under eucalypt plantations, *Rev. Bras. Cienc. Do Solo*. 29 (2005) 893–901. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832005000600007>.

[46] Alho, C. F. B. V. "Efeito da temperatura final de pirólise na estabilidade de biocarvão produzido a partir de madeira de *Pinus sp* e *Eucalyptus sp*." (2012).

[47] M. de F.M. Pires, J.C. Medeiros, H.A. de Souza, J.D. Rosa, C.L. Boechat, Á.L. Mafra, K.C. Nolêto, A.G. da Rocha, Conservation system improves soil microbial quality and increases soybean yield in the northeastern cerrado, *Bragantia*. 79 (2020) 599–611. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200117>.

[48] H. Zhou, D. Zhang, P. Wang, X. Liu, K. Cheng, L. Li, J. Zheng, X. Zhang, J. Zheng, D. Crowley, L. van Zwieten, G. Pan, Changes in microbial biomass and the metabolic quotient with biochar addition to agricultural soils: A Meta-analysis, *Agric. Ecosyst. Environ.* 239 (2017) 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.01.006>.

[49] S. Li, Q. Ma, C. Zhou, W. Yu, Z. Shangguan, Applying biochar under topsoil facilitates soil carbon sequestration: A case study in a dryland agricultural system on the Loess Plateau, *Geoderma*. 403 (2021) 115186. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115186>.

[50] L.R.M.C. Liyanage, M.F. Sulaiman, R. Ismail, G.P. Gunaratne, R.S. Dharmakeerthi, M.G.N. Rupasinghe, A.P. Mayakaduwa, M.M. Hanafi, Carbon mineralization dynamics of organic materials and their usage in the restoration of degraded tropical tea-growing soil, *Agronomy*. 11 (2021) 1191.

<https://doi.org/10.3390/agronomy11061191>.

[51] J.A. Pascual, C. García, T. Hernandez, M. Ayuso, Changes in the microbial activity of an arid soil amended with urban organic wastes, *Biol. Fertil. Soils*. 24 (1997) 429–434. <https://doi.org/10.1007/s003740050268>.

[52] E.A. Davidson, K. Savage, L. V. Verchot, R. Navarro, Minimizing artifacts and biases in chamber-based measurements of soil respiration, *Agric. For. Meteorol.* 113 (2002) 21–37. [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(02\)00100-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(02)00100-4).

[53] F. Colombo, C.A. Macdonald, T.C. Jeffries, J.R. Powell, B.K. Singh, Impact of forest management practices on soil bacterial diversity and consequences for soil processes, *Soil Biol. Biochem.* 94 (2016) 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.11.029>.

[54] V. Tardy, O. Mathieu, J. Lévêque, S. Terrat, A. Chabbi, P. Lemanceau, L. Ranjard, P.A. Maron, Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity, *Environ. Microbiol. Rep.* 6 (2014) 173–183. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12126>.

[55] M. Gao, J. Yang, C. Liu, B. Gu, M. Han, J. Li, N. Li, N. Liu, N. An, J. Dai, X. Liu, X. Han, Effects of long-term biochar and biochar-based fertilizer application on brown earth soil bacterial communities, *Agric. Ecosyst. Environ.* 309 (2021) 107285. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107285>.

[56] S. Yan, J. Zhao, T. Ren, G. Liu, Correlation between soil microbial communities and tobacco aroma in the presence of different fertilizers, *Ind. Crops Prod.* 151 (2020) 112454. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112454>.

[57] Z. Zhou, T. Gao, L. Van Zwieten, Q. Zhu, T. Yan, J. Xue, Y. Wu, Soil Microbial Community Structure Shifts Induced by Biochar and Biochar-Based Fertilizer Amendment to Karst Calcareous Soil, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 83 (2019) 398–408. <https://doi.org/10.2136/sssaj2018.08.0297>.

[58] X. Liang, J. Yuan, E. Yang, J. Meng, Responses of soil organic carbon decomposition and microbial community to the addition of plant residues with different C:N ratio, *Eur. J. Soil Biol.* 82 (2017) 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.08.005>.

[59] M. Spohn, Microbial respiration per unit microbial biomass depends on litter layer carbon-to-nitrogen ratio, *Biogeosciences*. 12 (2015) 817–823. <https://doi.org/10.5194/bg-12-817-2015>.

[60] L. Shi, Z. Liu, Stoichiometric characteristics of microbial biomass in oil-contaminated soil in the loess hilly region, *Ann. Microbiol.* 71 (2021) 29. <https://doi.org/10.1186/s13213-021-01637-5>.

[61] F.A. Santos, J.H. De Queiróz, J.L. Colodette, S.A. Fernandes, V.M. Guimarães, Potencial de palha de cana-de-açúcar para produção de etanol, *Quim. Nova*. 35 (2012) 1004–1010.

[62] Y. Kuzyakov, J.K. Friedel, K. Stahr, Review of mechanisms and quantification of priming effects, *Soil Biol. Biochem.* 32 (2000) 1485–1498. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00084-5).

- [63] C. Fang, J.B. Moncrieff, H.L. Gholz, K.L. Clark, Soil CO<sub>2</sub> efflux and its spatial variation in a Florida slash pine plantation, *Plant Soil*. 205 (1998) 135–146. <https://doi.org/10.1023/A:1004304309827>.
- [64] X. Wang, Z. Gong, Assessment and analysis of soil quality changes after eleven years of reclamation in subtropical China, *Geoderma*. 81 (1998) 339–355. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(97\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(97)00109-2).
- [65] M.E. Doumer, S.J. Giacomini, C.A.P. Silveira, D.A. Weiler, L.M. Bastos, L.L. de Freitas, Atividade microbiana e enzimática em solo após a aplicação de xisto retornado, *Pesqui. Agropecu. Bras.* 46 (2011) 1538–1546. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011001100016>.
- [66] J. Chen, X. Sun, J. Zheng, X. Zhang, X. Liu, R. Bian, L. Li, K. Cheng, J. Zheng, G. Pan, Biochar amendment changes temperature sensitivity of soil respiration and composition of microbial communities 3 years after incorporation in an organic carbon-poor dry cropland soil, *Biol. Fertil. Soils*. 54 (2018) 175–188. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1253-6>.
- [67] É.M.G. Lopes, M.M. Reis, L.A. Frazão, L.E. da Mata Terra, E.F. Lopes, M.M. dos Santos, L.A. Fernandes, Biochar increases enzyme activity and total microbial quality of soil grown with sugarcane, *Environ. Technol. Innov.* 21 (2021) 101270. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101270>.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com base nos resultados apresentados, é notório que houve mudanças, nos teores de nutrientes, atividade enzimáticas e composição da comunidade microbiana, em respostas a quantidades variáveis da adição de biocarvão. Entretanto as interações entre biocarvão, solo e comunidade microbiana são complexas, em razão das diferentes características químicas e físicas que os compõem. Assim, trabalhos adicionais, especialmente usando incubações, em longo prazo, são necessários para compreender a estabilidade biocarvão e sua influência na comunidade microbiana e no ciclo do carbono.

Além disso, a utilização do biocarvão torna-se promissora, para a redução de fertilizantes químicos, contribuindo para alcançar maior sustentabilidade aos solos brasileiros.