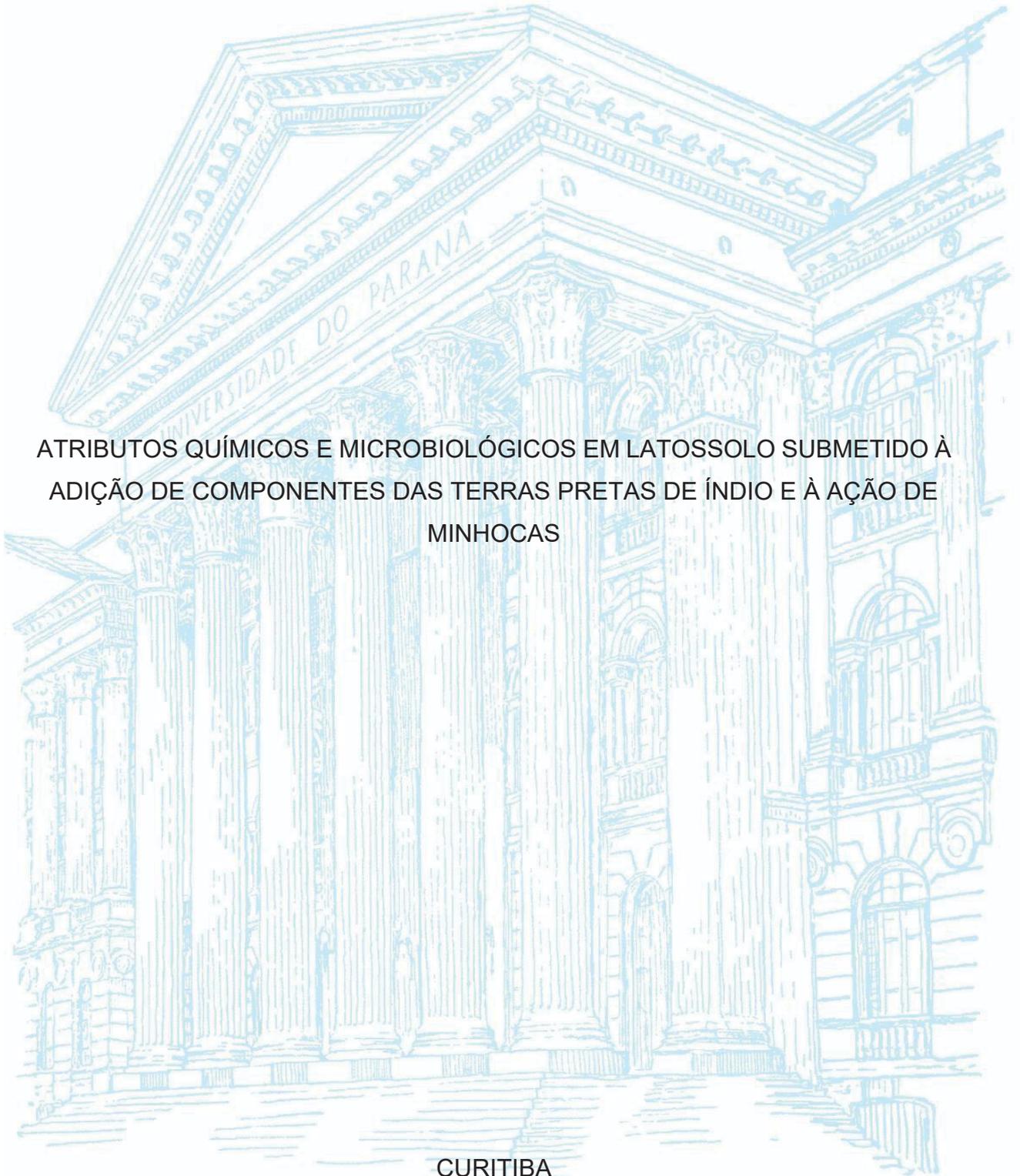


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANADIA CATTARIN

ATRIBUTOS QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS EM LATOSSOLO SUBMETIDO À  
ADIÇÃO DE COMPONENTES DAS TERRAS PRETAS DE ÍNDIO E À AÇÃO DE  
MINHOCAS

CURITIBA  
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANADIA CATTARIN

ATRIBUTOS QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS EM LATOSSOLO SUBMETIDO À  
ADIÇÃO DE COMPONENTES DAS TERRAS PRETAS DE ÍNDIO E À AÇÃO DE  
MINHOCAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Conservação da Natureza, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Renato Marques.

CURITIBA  
2022

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Cattarin, Anadia

Atributos químicos e microbiológicos em latossolo submetido à  
adição de componentes das terras pretas de índio e à ação de  
minhocas / Anadia Cattarin . - Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Prof. Dr. Renato Marques.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal.  
Defesa: Curitiba, 07/10/2022.

1. Terra preta. 2. Latossolos. 3. Minhocas. 4. Solos - Amazônia. 5.  
Solos - Análise. 6. Solos - Microbiologia. 7. Fertilidade do solo. 8.  
Química do solo. I. Marques, Renato. II. Universidade Federal do Paraná,  
Setor de Ciências Agrárias. III. Título.

CDD - 631.4

CDU - 631.4

634.0.114

Bibliotecária: Marilene do Rocio Veiga - CRB9/424

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANADIA CATTARIN** intitulada: **Atributos químicos e microbiológicos em Latossolo submetido à adição de componentes das Terras Pretas de Índio e à ação de minhocas**, sob orientação do Prof. Dr. RENATO MARQUES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 07 de Outubro de 2022.



RENATO MARQUES

Presidente da Banca Examinadora



GEORGE GARDNER BROWN

Avaliador Externo (EMBRAPA FLORESTAS)



EVERALDO DOS SANTOS

Avaliador Externo (INSTITUTO FEDERAL DE EDUC., CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PARANÁ)

## RESUMO

As Terras Pretas de Índio (TPI) amazônicas são solos antropogênicos que têm sido objeto de estudo por serem altamente férteis em uma área formada por solos majoritariamente pobres e ácidos. A compreensão dos mecanismos físicos, químicos e biológicos envolvidos na formação deste tipo de solo permitiria a criação de práticas de manejo que levem à formação de Terras Pretas Novas (TPN). O presente trabalho teve por objetivo compreender como os atributos químicos e microbiológicos de um Latossolo Amarelo respondem à adição de componentes frequentemente associados às TPI. Os componentes adicionados ao latossolo foram esterco equino, minhocas da espécie *Pontoscolex corethrurus*, biochar e farinha de espinha de peixe. Foram analisados os teores de carbono (CT) e nitrogênio (NT) totais e os atributos de fertilidade química do solo. Foi realizado ensaio para a obtenção da mineralização do nitrogênio no solo, e foram avaliados os atributos Carbono (CBM) e Nitrogênio (NBM) da Biomassa Microbiana. A mineralização do N foi obtida em ensaio de incubação anaeróbia, com subsequente extração do N mineral produzido, enquanto a CBM e o NBM foram analisados pelo método de irradiação-extração. Os tratamentos mostraram pouco efeito nos teores de CT e NT. A adição do esterco equino no solo contribuiu para a neutralização de parte do Al, independentemente dos demais componentes adicionados ao solo, resultando em menor saturação por Al, que favoreceu a elevação dos teores de Ca, Mg e K na CTC do solo e a atividade microbiológica no solo. Diferente do biochar, as minhocas (*P. corethrurus*) influenciam a microbiota edáfica independentemente dos demais componentes. As análises de correlação permitiram evidenciar a importância do pH e dos cátions básicos na mineralização do N e nos valores de NBM no solo; e, também, a interação entre estes atributos microbiológicos. Não foi identificada influência destas variáveis no CBM do solo.

**Palavras-chave:** Terra Preta Nova, carbono da biomassa microbiana, nitrogênio da biomassa microbiana, mineralização do N.

## ABSTRACT

The Amazonian Dark Earth (ADEs) soils are anthropogenic soils that have been studied because they are highly fertile and occur in an area with mostly poor and acid soils. The understanding of the physical, chemical and biological mechanisms of ADEs formation would allow the creation of practices that lead to New Dark Earth (NDE) soils. The present work aims to understand how the microbiological attributes of a yellow Latossol respond to the addition of components usually associated with ADEs. The components added to the Latossol were horse manure, worms of the *Pontoscolex corethrurus* species, biochar and fishbone. Total carbon (TC) and nitrogen (TN) contents and soil chemical fertility attributes were analyzed. An assay was carried out to obtain nitrogen mineralization, Microbial Biomass Carbon (MBC) and Microbial Biomass Nitrogen (MBN) in the soil. N mineralization was performed in an anaerobic incubation assay, with subsequent mineral N extraction, while MBC and MBN were analyzed by the irradiation-extraction method. The treatments showed little effect on TC and TN levels. The addition of horse manure contributed to the neutralization of part of the Al, independently of the other components added to the soil, resulting in lower Al saturation, which favored the increase of available Ca, Mg and K contents, the cation exchange capacity (CEC) and the soil microbial activity. Unlike biochar, worms (*P. corethrurus*) influence the soil microbiota regardless of the other components. Correlation analyzes showed the importance of the pH and basic cations for N mineralization and NBM values in the soil; and also the interaction between these microbiological attributes. No variable influence on soil CBM was identified.

**Key words:** New Dark Earth, microbial biomass carbon, microbial biomass nitrogen, N mineralization.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	10
2.1. As Terras Pretas de Índio e seus componentes .....	10
2.2. Ação das minhocas <i>Pontoscolex corethrurus</i> nos solos .....	15
2.3. Atividade microbiológica no solo .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1. Informações sobre o experimento .....	22
3.2. Tratamentos experimentais.....	23
3.3. Teores de carbono, nitrogênio e atributos químicos do solo nos tratamentos .....	23
3.4. Variáveis microbiológicas analisadas .....	24
3.4.1. C e N da Biomassa Microbiana .....	24
3.4.2. Ensaio de mineralização de nitrogênio .....	25
3.5. Análises estatísticas.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1. Teores de carbono, nitrogênio e demais atributos químicos do solo nos tratamentos .....	27
4.2. Mineralização do nitrogênio no solo.....	32
4.3. N mineralizado total acumulado, C e N da biomassa microbiana .....	39
4.4. Relações entre os atributos químicos e os atributos microbiológicos do solo .....	44
5. CONCLUSÕES.....	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
ANEXO I.....	61

## 1. INTRODUÇÃO

As Terras Pretas de Índio (TPI), objeto de investigação deste trabalho, têm recebido destaque como tema de várias pesquisas pela sua elevada fertilidade e por serem um tipo de solo gerado a partir de um manejo específico. Sabe-se, hoje, que estes solos são formados a partir da ação antrópica de povos indígenas que habitaram a região amazônica há centenas de anos (Kern, 1996). Contudo, as ações que possibilitaram a formação desse solo ainda não foram satisfatoriamente desvendadas, bem como os mecanismos químicos, físicos e biológicos envolvidos neste processo. A melhor compreensão dos processos que levam à formação das TPI possibilitaria reproduzir o manejo ou práticas semelhantes às usadas pelos indígenas, para que se possa produzir Terras Pretas Novas (TPNs) (Amarante, 2010). Estas poderiam ser usadas na produção agrícola e florestal (Ferreira, 2020), além de trazer diversas outras contribuições mais específicas sobre os diversos processos que ocorrem no solo.

Contudo, algumas ações dos antigos habitantes das regiões amazônicas que levaram à formação das TPI já são conhecidas. Entre elas estão a deposição ao acaso de resíduos orgânicos, como restos de alimentos ricos em fósforo (P) e cálcio (Ca), e de materiais usados para fazer suas casas, e queima incompleta de matéria orgânica (MO) sob baixa disponibilidade de oxigênio (Kern, 1996; Santana, 2012, Griffith, 1980; Kämpf e Kern, 2005; Glaser et al., 2000). Este processo de queima incompleta forma estoques de carbono pirogênico microbiologicamente estável no solo (Adderley, s.d; Kämpf e Kern, 2005). Outro traço do estilo de vida indígena que possivelmente contribuiu com a formação das TPI é o plantio em modelos muito semelhantes às agroflorestas, que geram serapilheira bastante diversificada (Devide, 2012). A deposição de resíduos tão variados, junto com sua queima lenta estimulou a formação de biochar (Glaser, 2007) e uma microbiota diversa (Amarante, 2010), responsável pela mineralização da MO ali presente e a formação de húmus muito mais estável do que o encontrado na maioria dos solos, sejam eles naturais ou alterados, contribuindo assim para a elevada fertilidade das TPI (Glaser e Birk, 2012).

A atividade da microbiota do solo é muito sensível às alterações produzidas no meio e ela pode ser formada por comunidades mais ou menos diversificadas em função das características do solo, disponibilidade de nutrientes e diversidade de materiais ali depositados (Correia, 1983; Amarante, 2010; Cunha, 2007). A ação dessa mesma microbiota, se estimulada adequadamente, pode melhorar em grande medida as condições de que o solo dispõe para cultivo (Correia, 1983). Daí a grande importância de que esses organismos e seu

comportamento sejam estudados, pois eles têm grande influência sobre as condições do solo e, em contrapartida, são muito sensíveis a elas.

A presença de macro organismos tolerantes às condições adversas dos solos amazônicos inalterados antropicamente também é um aspecto frequentemente estudado, pois a ação desses organismos pode beneficiar o solo. Um desses macro organismos frequentemente associados à formação das TPI é a espécie de minhoca *Pontoscolex corethrurus* (Zech et al., 1997; Ponge et al., 2007). Essa espécie pode elevar o pH do solo e estimular a atividade microbiológica através da ingestão de partículas minerais junto à MO presente no solo (Barois e Lavelle, 1986). Processos químicos e biológicos que ocorrem ao longo do trato digestivo das minhocas (que serão discutidos mais detalhadamente adiante) são capazes de complementar a degradação microbiológica da MOS e de despertar microrganismos em estado latente até então (Lavelle et al., 1995; Brown et al., 2000).

Assim, o presente trabalho buscou compreender como os atributos químicos e microbiológicos de um LATOSSOLO AMARELO respondem à adição de componentes frequentemente associados às TPI (matéria orgânica fresca - esterco equino, espinha de peixe e biochar) e à ação das minhocas *Pontoscolex corethrurus*. Estes são componentes usualmente associados às TPI e que poderiam ser usados para produzir as Terras Pretas Novas. Adicionalmente, busca-se identificar as relações entre os atributos químicos do solo, resultantes ou não dos tratamentos aplicados, com os atributos microbiológicos avaliados.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. As Terras Pretas de Índio e seus componentes**

As Terras Pretas de Índio são solos antropogênicos encontrados na região amazônica que se destacam e despertam o interesse de pesquisadores por sua elevada fertilidade, contrastando com os solos tipicamente pobres da região (Glaser, 2007). Os solos amazônicos são, em geral, ácidos, pouco férteis e altamente intemperizados. Esta intemperização é favorecida e acelerada pelas condições climáticas tropicais na região, como elevada pluviosidade e temperatura, que são somadas à elevada atividade biológica no solo (Luchese, et al., 2002; Ferreira, 2020). Assim, são solos com baixa retenção de nutrientes, baixos valores de pH e baixa saturação por bases (Marques et. al., 2004; Cravo et. al., 2012). As TPIs, por sua vez, formam manchas de solo muito férteis nessas mesmas regiões. Elas frequentemente têm coloração mais escura, o que se deve à grande concentração de MO,

carbono, fósforo, magnésio, cálcio, manganês e zinco, caracterizando uma elevada fertilidade (Glaser e Birk, 2012).

Atualmente, as evidências indicam que este solo tem origem antropogênica. Uma das principais evidências está nos componentes presentes no solo, os quais faziam parte do cotidiano de povos indígenas na região, como folhas que serviam para a cobertura de casas, sementes, cipós, fragmentos de cerâmica e outros restos animais e humanos como ossos, carapaças, conchas, fezes e urina (Kern, 1996; Santana, 2012). Os elevados teores de Ca e Mg encontrados nas TPI, por exemplo, são associados à deposição de resíduos de ossos de aves e peixes, carnes, alimentos que faziam parte da dieta desses povos (Kern, 1996). Exemplos como este correlacionam hábitos das populações indígenas que habitavam a região e a formação das TPI (Griffith, 1980).

Traços da composição química do solo ou alterações químicas nele também podem, por si só, indicar a prévia ocupação humana de um sítio. Isso porque algumas alterações só ocorrem quando há ocupação humana. Segundo Griffith (1980), alguns dos parâmetros que podem ser analisados no processo de diferenciação e caracterização de sítios alterados e não alterados são modificações químicas do solo, taxa de lixiviação e material original. Assentamentos humanos, usualmente aumentam teores de P no solo. Portanto, concentrações de P significativamente mais elevadas do que as do solo no entorno podem ser indicativos de assentamentos humanos (Griffith, 1980). No caso das TPI, observam-se diferenças nas concentrações de Ca, Mg, P, entre outros nutrientes, em relação ao entorno (Glaser e Birk, 2012).

Esses níveis mais elevados de P nas TPI são considerados por diversos autores uma característica marcante de diferenciação deste solo em relação aos latossolos locais (Sombroek et al., 2002; Da Costa et al., 1999). Algumas análises de TPIs amazônicas mostram teores elevados de P ligado a Ca (P-Ca) em comparação aos solos adjacentes nos horizontes superficiais onde os resíduos foram depositados (Lima et al., 2010). Já nos horizontes subsuperficiais, o P aparece ligado a íons de ferro (P-Fe) ou de alumínio (P-Al) remontando ao solo natural e inalterado antropicamente da região (Lima et al., 2010). Teores mais baixos de  $Al^{3+}$  e teores mais elevados de pH e de nutrientes como Ca, K, e Mg também são traços que distinguem as TPI dos solos no entorno (Sombroek et al., 2002; Lima et al., 2010).

Possíveis explicações para isso são a deposição de resíduos de ossos e espinhas de peixe no solo pelos povos indígenas que habitaram a região. As partículas de espinha de peixe podem ser observadas em conjunto, aleatoriamente distribuídas e dentro de agregados granulares ricos em matéria orgânica e bem individualizados. Na composição da espinha de

peixe destacam-se os teores de  $K_2O$  (35,97%),  $SiO_2$  (19,2%),  $MgO$  (3,97%),  $MnO$  (2,22%) e de  $Ca$  (0,4%), além de ela ter, em geral, teores mais elevados de  $Al$  e  $Zn$  e teores de  $P$  mais baixos do que fragmentos de outros tipos de ossos analisados (Lima et al., 2010).

A presença das minhocas *P. corethrurus* (inoculadas ao solo usado neste estudo) também tem influência sobre a disponibilidade de  $P$  e  $Ca$  (como será abordado mais adiante), dois dos nutrientes mais importantes nas TPI, pois elas aceleram o processo de mineralização.

Segundo Kern (1996), a riqueza nutricional das TPI e do húmus formado, que a diferenciam do solo no entorno, vem da variedade de resíduos orgânicos que eram abandonados sobre o solo ao acaso, como cascas de coco, resíduos de mandioca, açaí, bacaba e carapaças de animais como o jabuti, caranguejo, etc. O clima tropical no bioma amazônico contribui para a aceleração da degradação da serapilheira e dos outros resíduos depositados no solo, aumentando o *turnover* de nutrientes. Essa variedade de resíduos somada às condições climáticas formam um mecanismo que contribui muito com a fertilidade do solo e a formação de húmus. A fertilidade das TPIs está associada a estas substâncias húmicas resultantes da mineralização da MOS (Devide, 2012). Outro exemplo de manejo adotado pelos indígenas é o cultivo em modelos semelhantes às agroflorestas (Devide, 2012), que estão frequentemente associadas à produção de serapilheira diversificada, quanto aos teores de nutrientes e ao nível de recalitrância, e à formação de uma biota edáfica diversa (Amarante, 2010; Kämpf e Kern, 2005).

Segundo Amarante (2010), a deposição de resíduos variados e ao acaso no solo favoreceu a formação de uma comunidade microbiana mais diversa e maior do que na maior parte dos solos naturais ou alterados. Esses organismos exsudam substâncias que contribuem, por exemplo, para a humificação ou estabilização da MO fresca, processo de grande importância para a qualidade do solo. Adderley (s.d) e Kämpf e Kern (2005) também apontam a estabilização da matéria orgânica do solo (MOS) como diferencial positivo na qualidade das TPI em relação ao solo do entorno; e afirmam que ela foi favorecida por métodos de manejo adotados não intencionalmente pelos indígenas que colonizaram essas regiões.

Mesmo considerando todas as dinâmicas químicas desencadeadas pela presença da MO no solo, um dos atributos que torna as TPI mais férteis é a grande quantidade de MO e suas propriedades físico-químicas, como a elevada reatividade das frações húmicas (Cunha, 2007). Esse meio químico, físico e biológico típico das TPI é propício para a ocorrência de diversas interações entre argila (partículas minerais), húmus e microbiota

edáfica que podem contribuir para maior estruturação do solo, maior retenção de nutrientes e para elevação do pH. Um primeiro exemplo é a formação de complexos argila-húmus muito estáveis, que se dá por pontes catiônicas entre grupos carboxílicos dos ácidos húmicos e sesquióxidos do solo carregados positivamente. A diversidade da biota edáfica, por sua vez, pode contribuir através produção de alguns polissacarídeos que podem ser adsorvidos por moléculas minerais, funcionando como agentes de ligação entre elas, melhorando a estrutura do solo (Correia, 1983). Esses são exemplos de mecanismos envolvendo húmus, partículas minerais e biota edáfica que contribuem para maior estruturação do solo, retenção de nutrientes e elevação do pH (Correia, 1983).

A importância do estudo da composição e processos de formação das TPI, vem da possibilidade de aplicações promissoras deste conhecimento, na reprodução de TPIs em TPNs. Com a aplicação dos conceitos e métodos de formação, pode-se desenvolver um sistema de manejo semelhante visando produzir um solo com características e propriedades semelhantes às TPI já conhecidas, ou seja as conhecidas.TPNs (Amarante, 2010).

Entre as práticas dos povos indígenas que habitavam as regiões onde estão as manchas de TPI, está a queima incompleta de MO, provavelmente em fogueiras caseiras de baixa intensidade (Glaser et al., 2000). Essa prática levou à formação de biochar (carbono pirogênico), que é encontrado em teores elevados nas TPI e é considerado um dos componentes responsáveis pela elevada fertilidade desses solos (Glaser et al., 2000). Em torno de 35% da matéria orgânica das TPI em horizontes A profundos, típicos de solos antrópicos, é composta por biochar, enquanto nos Latossolos no entorno, esse percentual cai para 14% e o biochar aparece nas camadas mais superficiais (Glaser et al., 2000). O carbono pirogênico é microbiologicamente estável e persiste no ambiente por séculos (Adderley, s.d; Kämpf e Kern, 2005).

O elevado tempo de residência do biochar no solo deve-se à estrutura química aromática com caráter recalcitrante, que é gerada no processo de pirólise e que torna mais lenta a mineralização deste carbono. Glaser et al. (1999) apud Glaser et al. (2000) corroboram com esta constatação usando datações com  $^{14}\text{C}$  que mostraram que o biochar encontrado nas TPI amazônicas têm idade entre 1000 e 1500 anos, o que sugere elevada estabilidade deste material (Glaser et al., 2002). Bruun e El-Zehery (2012) também observaram enorme estabilidade do biochar, uma vez que após 451 dias de incubação, entre 41 e 47% do carbono da palha de aveia foi mineralizado, enquanto apenas 1,8 a 1,9% do carbono do biochar foi mineralizado no mesmo período. Esse resultado evidenciou a grande estabilidade do biochar e sua resistência à degradação microbiana.

Os elevados teores de carbono encontrados no biochar, contudo, podem comprometer a disponibilidade de N pela elevação da relação C/N, o que não é unânime nos estudos já realizados. Lehmann et al. (2003) adicionaram biochar e nutrientes a alguns de seus tratamentos e observaram que a adição de biochar diminuiu a disponibilidade de N devido ao aumento da relação C/N, reduzindo assim a velocidade de degradação da MO. Mizuta et al. (2004) também consideram possível a imobilização do N no solo modificado com biochar devido aos seus elevados teores de carbono, porém, defendem que isso dificilmente ocorrerá devido à resistência do biochar à degradação microbiana. Bruun e EL-Zehery (2012) também testaram a influência do biochar sobre a velocidade de mineralização da palha de aveia, concluindo que a velocidade da mineralização não foi alterada ou teve uma queda discreta com a adição do biochar.

Mesmo com caráter recalcitrante, o carbono do biochar não deixa de ser suscetível à mineralização, e enquanto permanece no solo ele é oxidado lentamente, produzindo grupos carboxílicos nas arestas dos anéis aromáticos que aumentam a CTC e a reatividade do C no solo (Adderley, s.d; Kämpf e Kern, 2005). Glaser et al. (2002) também trazem a ideia de que, por tratar-se de um material orgânico que passou por queima parcial, em geral em ambiente parcial ou totalmente anóxico, o biochar pode aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo. Pode-se aqui fazer um paralelo com cinzas provenientes da queima completa de material orgânico. Elas podem aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo, pois estes não estarão mais retidos em ligações químicas no solo como antes da queima e da eliminação da MO. Neste estado, então, os nutrientes estarão prontamente disponíveis para absorção pelas plantas. Contudo, a adição de cinzas não aumenta a retenção de nutrientes no solo, como pode ocorrer com o biochar (Glaser et al., 2002).

Aliado ao aumento na retenção de nutrientes e à formação de complexos organominerais, o biochar apresenta ainda a capacidade de elevar o pH e a reduzir os teores de Al disponível, efeitos muito relevantes em solos tropicais, pois eles possuem pH baixo, em sua maioria. A elevação do pH pela presença de biochar no solo pode ser observada mesmo 3 anos após sua aplicação, além de desencadear outros benefícios como o aumento da saturação de bases. Dessa forma, o biochar não funciona apenas como um condicionador de solos, mas também como um fertilizante, devido aos efeitos indiretos de sua adição ao solo (Lehmann et al., 2006; Glaser et. al, 2002).

## 2.2. Ação das minhocas *Pontoscolex corethrurus* nos solos

Sabe-se que as minhocas têm um papel muito importante no que diz respeito à degradação da matéria orgânica e estruturação do solo, mas também que elas têm grande capacidade de alterar a atividade microbológica no solo (Brown et al., 2000). A ação das minhocas no solo favorece a degradação da matéria orgânica pela microbiota. Um dos mecanismos pelo qual isso ocorre é a ingestão de solo e MO fresca, levando à fragmentação e homogeneização desse material pelo processo digestivo, aumentando a área de superfície para ação microbiana e adicionando enzimas ao material ingerido (Lavelle et al., 1995). Na passagem desse material pelo trato digestivo das minhocas, o material ingerido é rápida e completamente desestruturado, de forma que os coprólitos (produto final da digestão) têm características muito diferentes do material original (Barois et al., 1999). As alterações ao material mineral e orgânico pela digestão das minhocas serão mais ou menos significativas a depender da espécie de minhoca (Brown et al., 2000; Barois et al., 1993).

A interação positiva entre as minhocas e a microbiota do solo não se limita às transformações físicas geradas no solo, mas alguns processos químicos e biológicos muito importantes ocorrem também no intestino das minhocas (Lavelle et al., 1995). Os microrganismos do solo têm capacidade de digerir praticamente todos os tipos de resíduos vegetais e animais presentes no solo. Contudo, há um fator limitante sobre sua atividade, que é a incapacidade de mover-se no solo para buscar mais fontes de carbono assimilável, o que os conduz a um estado latente (Lavelle et al., 1995). Entretanto, quando ingeridos pelas minhocas, esses microrganismos têm acesso a grandes quantidades de carbono solúvel em água (muco) que é secretado na parte superior do intestino das minhocas (Brown et al., 2000), e também a nitrogênio lábil (Bernard et al., 2012), além de o material em digestão receber um grande aporte de água (Barois e Lavelle, 1986). Esse ambiente favorece a atividade microbológica, tirando os organismos do estado latente anterior (Lavelle et al., 1995; Brown et al., 2000).

As minhocas também se beneficiam da presença desses microrganismos em seu intestino (Brown e Doube, 2004). Elas secretam diversas enzimas em seu intestino que as habilita a digerir bactérias, fungos e protozoários parcialmente decompostos (Brown, 1995). Outros materiais, como a lignina presente na serapilheira e em resíduos animais, não são digeridos com facilidade por algumas espécies de minhocas, ação que a microbiota do solo pode desempenhar quando passa pelo trato intestinal dessas minhocas. Outro efeito produzido durante a digestão das minhocas é a neutralização do pH, e sua conservação até que os coprólitos sejam expelidos no ambiente.

Devido a essa colaboração mútua, o solo ingerido pelas minhocas *P. corethrus* sofre profundas transformações estruturais, como estudou Barois et al. (1993). Os autores identificaram que as partículas ingeridas pelas minhocas são misturadas ao muco intestinal e água, formando agregados organominerais em seguida. Dessa forma, ao longo do trato digestivo desses indivíduos ocorre a destruição de microagregados antigos e a formação de novos, o que leva a um efeito de rejuvenescimento ou regeneração do solo. Essa restauração do solo está fortemente associada à atividade da microbiota do trato intestinal das minhocas. A atividade microbiológica observada no intestino posterior das minhocas chega a ser 6x maior do que em solo sem inoculação de minhocas (Barois e Lavelle, 1986).

Bernard et al., (2012) buscaram identificar qual o impacto produzido pelas minhocas *P. corethrus* sobre a microbiota consumidora da MOS. Primeiramente, os autores identificaram que há dois grupos funcionais de microrganismos envolvidos no processo de mineralização da MOS. Um deles é especializado na degradação da MO fresca e outro na MO que já se encontra em processo de degradação no solo. Os autores verificaram que as minhocas são responsáveis por estimular o crescimento de algumas dessas populações microbianas. Lavelle et al. (1995) chamam esse fenômeno de “paradoxo da Bela Adormecida”, pelo qual o contato dos microrganismos com o muco intestinal das minhocas os despertaria por ser um meio rico em matéria orgânica lábil, principalmente nitrogênio. Esse contato dos microrganismos com o muco intestinal das minhocas se dá pela ingestão de solo e MO por elas. Apesar de serem despertados pela presença de MO de fácil degradação, os organismos presentes são capazes de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e matéria orgânica de estrutura complexa (Ferreira et al., 2021), além de serem capazes de disponibilizar o fósforo (Bodour et. al, 2003, Bernard et. al, 2012). Chapuis-Lardy et al., (1998), compararam a concentração de fósforo total, orgânico e inorgânico nos coprólitos das minhocas *P. corethrus* e no solo controle. Não foram observadas variações consideráveis entre a quantidade de fósforo total nos dois meios, contudo os coprólitos apresentaram maior concentração de fósforo inorgânico e menor concentração de fósforo orgânico do que no solo, evidenciando alto nível de mineralização.

Bernard et al. (2012) verificaram, ainda, que as minhocas estimulam o crescimento especialmente das bactérias de crescimento médio a rápido, que são mais adaptadas à degradação da MO lábil (Fontaine et al., 2003), mais abundante na MO fresca. Esse efeito favorece a ocorrência do “priming effect”, que se caracteriza pela aceleração da degradação da MOS pela adição de material fresco no meio (Lavelle et al., 1995).

Os coprólitos, produto da digestão das minhocas, que são liberados no ambiente são constituídos por novos microagregados de solo e são considerados estoques de carbono

(Bernard et al., 2012). O estudo realizado por Chapuis-Lardy et al., (1998) identificou que os coprólitos das *P. corethrus* são mais ricos em carbono e nitrogênio do que o solo controle usado no estudo, pois elas realizam ingestão seletiva do material do meio, além de serem um importante micro-sítio de transformação de nutrientes. Assim, a ação das *P. corethrus* adiciona grande quantidade de muco cutâneo, água e MO lábil ao meio, o que estimula a atividade microbiana.

Bernard et al. (2012) e de Lavelle et al. (1992) também observaram que as minhocas estimulam o crescimento da biomassa microbiana. Lavelle et al. (1992) identificaram que o NBM e o N mineralizado apresentaram o mesmo padrão de variação de suas concentrações nos coprólitos das minhocas ao longo da incubação aeróbia. Inicialmente, os coprólitos apresentaram concentrações elevadas de amônio que decaíam progressivamente dando lugar a concentrações crescentes de nitrato (dinâmica própria da mineralização aeróbia de N).

### **2.3. Atividade microbiológica no solo**

Todos os processos associados à mineralização da matéria orgânica, disponibilização de nutrientes e humificação passam pela ação da biota edáfica. O processo de mineralização ou humificação da MOS é gradativo, e caracterizado pela crescente necessidade de energia para a quebra das estruturas químicas pelos organismos que vivem no solo. No mesmo processo, o carbono presente na MO é mineralizado para a forma de CO<sub>2</sub>. Portanto, a MOS é formada por compostos intermediários do processo de transformação da MO fresca em material biologicamente inativo e quimicamente estável (Bernard et al., 2012).

A mineralização biológica da MO a é o principal meio de disponibilização de nutrientes no solo (Silva, 2011), tendo grande importância na ciclagem de nutrientes e no fluxo de energia dos ecossistemas. Pelo fato de os microrganismos serem também muito sensíveis a alterações microclimáticas do solo, eles são considerados indicadores da qualidade do solo (Groffman et al., 2001; Cunha e Mendes, 2015).

A mineralização tem um papel muito importante na disponibilização de N e dos demais nutrientes, juntamente com o carbono, são as principais fontes de energia para a microbiota. A entrada de N no ciclo biológico ocorre via deposição atmosférica de compostos nitrogenados, principalmente o amônio, pela mineralização da MO e pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Schlesinger, 1997 apud Parron et al., 2003). Uma vez metabolizados pela

microbiota, o N e os demais nutrientes poderão estar biodisponíveis para absorção pela vegetação. Essa biodisponibilização, contudo, depende principalmente da relação C/N do meio, como será abordado adiante. A taxa de produção de N mineralizado que esteja disponível às plantas é chamada “taxa de mineralização líquida do nitrogênio”. Ela é usada como indicador de qualidade do solo pois pode refletir o potencial de perda de N por lixiviação ou pela emissão de gases (Vitousek e Matson, 1985).

Há que se ponderar, ainda, que a maior parte do N do solo encontra-se em frações de mineralização bastante lenta (mineralização de 2 a 3% do N total por ano); e essa fração mineralizável está sujeita a perdas (Fernandes et al., 2006 apud Silva, 2011). Sendo assim, é de grande importância que sejam avaliadas diferentes condições de cultivo e de manejo que tenham influência sobre a mineralização biológica de nutrientes, bem como diferentes atributos do solo que interfiram nesse processo.

O processo de conversão do N orgânico para a forma inorgânica é realizado pelas bactérias nitrossomonas e nitrobacter que transformam o N orgânico para as formas de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e depois nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Gonçalves et al., 1991). Este processo está condicionado a alguns atributos do solo como pH, teor de umidade, de  $\text{O}_2$  e de carbono no solo, estrutura do solo e a interação solo-planta (Gonçalves et al., 1991). Ele envolve dois processos opostos: a mineralização e a imobilização, que são afetados de maneira oposta pela relação C/N (Silva et al., 2011). Caso a relação C/N no solo seja muito elevada (>30), os microrganismos do solo irão imobilizá-lo, retirando-o do solo e empregando-o em suas atividades metabólicas, de forma que não sobrar N para as plantas por algum período (Correia, 1986). Uma relação C/N~15 indica que há nitrogênio suficiente para que este seja assimilado pela microbiota e também pelas plantas, pois nessas condições as quantidades de C e N estão mais equilibradas e a demanda relativa por N pelos microrganismos decai (Correia, 1986). O N que se encontra no solo e na forma inorgânica, ou seja, disponível para as plantas, é chamado N mineralizado líquido (Silva et al., 2011; Yagi et al., 2009).

Segundo Oriens et al. (1996) apud Parron et al. (2003), a umidade do solo também é um fator de grande influência sobre a atividade microbiana. Os autores afirmam que em períodos chuvosos ocorre um crescimento da população microbiana do solo, o que leva a um aumento na liberação e assimilação de nutrientes limitantes pelas plantas. Parron et al. (2003) observaram baixas concentrações de nitrato no solo durante a estação chuvosa, o que foi relacionado com a maior demanda por N pela microbiota e pelas plantas, ou baixa produção de N na forma de nitrato, em função da umidade mais elevada. Já na estação seca, houve tendência de acumulação de amônio. Os autores observaram, também, que houve produção

líquida de N nos meses mais quentes e chuvosos, enquanto nas estações mais secas houve imobilização.

Além dos atributos já mencionados, sabe-se que o pH do solo é decisivo quanto à disponibilidade de nutrientes no solo (Correia, 1986). No caso do N, ele pode condicionar a maior ou menor produção de nitrato. Gonçalves et al. (1991) observaram que valores de pH e saturação por bases mais elevados no solo tendem a favorecer uma nitrificação mais expressiva. Solos com pH muito baixo (menor que 5 em água) geralmente apresentam deficiência de P, baixos teores de Ca e Mg, toxidez por alumínio, maior disponibilidade dos micronutrientes Fe, Cu, Mn e Zn, elevada lixiviação de cátions e baixa saturação de bases. Essas condições podem limitar a degradação da MO (Tomé Jr, 1997).

Gonçalves et al. (1991) também observaram uma correlação positiva entre o teor de N total e a capacidade de produção de biomassa no solo. Eles teorizaram que quanto maior a quantidade de N total no solo, maior a biomassa. O crescimento da biomassa, por sua vez, aumenta o aporte de N do solo, e conseqüentemente a mineralização de nitrogênio e a disponibilidade de nitrogênio assimilável para as plantas.

Essa constatação foi ratificada por Yagi et al. (2009), que afirmam que mineralização líquida de N pode ser melhor prevista a partir do teor de N orgânico total, e que este é um índice mais confiável do que a MOS. Os autores obtiveram coeficientes de correlação mais elevados entre o N mineralizado líquido e o N total do que entre o N mineralizado líquido e a MOS. Essas relações, contudo, aumentaram ao longo do período de incubação, aumentando a correlação entre o N total do solo e a MOS com o N mineralizado acumulado ao longo do tempo. Eles consideraram que esses dois fatores, MOS e N total do solo, explicaram entre 62 e 86% da variação das quantidades de N mineralizado acumulado, respectivamente.

Alguns pesquisadores têm aplicado recursos biológicos, usando da própria fauna edáfica para favorecer a disponibilidade de N no solo. Por exemplo, Vergara e Maria (2000) realizaram um estudo sobre as alterações geradas por duas espécies de minhocas (*P. corethrurus* e *Rhinodrilus contortus*) nos parâmetros bioquímicos de um Latossolo amazônico durante 97 dias de incubação aeróbia. Além da inoculação de minhocas, os solos receberam adição de folhas de 4 espécies diferentes. Eles verificaram que os solos que foram inoculados com minhocas tiveram teores significativamente mais elevados de nitrato e amônio do que os controles sem minhocas. Os autores também identificaram que, após o período de incubação, os tratamentos com minhocas apresentaram teores de nitrato e amônio maiores do que os

controles, sendo os valores de nitrato maiores do que os de amônio devido à incubação aeróbia.

Já no estudo realizado por Silva et al. (2011), os autores usaram diferentes materiais como adubo verde em um Latossolo amarelo distrófico e observaram que o tratamento que recebeu folhas de glicíndia (uma árvore fixadora de Nitrogênio), além de um composto orgânico comum a todos os tratamentos, teve um pico na produção de nitrato que não se verificou nos demais tratamentos, o que foi atribuído às folhas de glicíndia adicionadas. Em outras palavras, a maior riqueza da adubação desse tratamento em termos de diversidade de recursos, gerou um padrão diferente na atividade biológica no solo com maior produção de nitrato. O mesmo tratamento teve um pico na produção de N mineral 30 dias antes dos demais.

A biomassa microbiana é um compartimento da MOS diretamente influenciado por fatores bióticos e abióticos, sendo, portanto, sensível às mudanças ocorridas no sistema (Gama-Rodrigues et al., 2005). Ela constitui uma parcela proporcionalmente pequena do carbono orgânico do solo e uma parte significativa do N potencialmente mineralizável (Gama-Rodrigues et al., 2005). Ela também é a principal mediadora dos processos de transformação da MOS, da qual ela obtém energia, o que faz com que a Biomassa Microbiana do Solo (BMS) possa ser considerada uma fonte ou um dreno da MOS (Cunha e Mendes, 2015).

Gama-Rodrigues et al. (2005) argumentam que estudar as alterações na MOS considerando apenas as alterações no carbono orgânico, sem analisar as alterações no carbono e no nitrogênio da biomassa microbiana pode não ser suficiente nem representativo da real condição do solo. Isso porque o CBM e o NBM são atributos que respondem mais rapidamente e mais intensamente a alterações no meio, desde a adição de fertilizantes até a alteração da cobertura vegetal. Sendo assim, a análise da dinâmica das frações biológicas da MOS pode dar respostas muito importantes e concentram-se num indicador mais preciso do que simplesmente a verificação dos teores de C ou N totais do solo, como observaram os autores.

As variações de umidade e temperatura entre as estações podem ter grande influência sobre a atividade da biomassa microbiana, sem produzir grandes alterações sobre os teores de carbono e nitrogênio do solo. A umidade em especial, aumenta consideravelmente a atividade microbiana e a eficiência microbiana em imobilizar C e N (Araújo, 2003; Gama-Rodrigues et al., 2005). Segundo Eaton (2001), O aumento da umidade do solo causado pelo aumento das chuvas tende a lixiviar nutrientes e o próprio material orgânico das camadas mais superficiais do solo para as inferiores. Isso resulta em aumento

do carbono orgânico nas camadas subsuperficiais, além dos nutrientes, o que estimula a atividade microbiana e o crescimento das plantas. Por fim, a concentração de nitrato no solo pode decair, o que, neste caso, não indica más condições do meio. Estes efeitos sobre a atividade microbiana no solo podem ser potencializados pela capacidade da argila de adsorver a MO em decomposição, tornando-a disponível para a biomassa microbiana por longos períodos de tempo (Eaton, 2001).

Eaton (2001) afirma que a umidade do ambiente nas estações chuvosas aumenta a disponibilidade de nutrientes para microrganismos e plantas. Esta condição aumenta a respiração basal do solo, a decomposição, a mineralização e a nitrificação. Estes estímulos resultam no aumento do carbono da biomassa microbiana no solo. Portanto, valores elevados de CBM são um indicador de qualidade do solo.

Moreira e Malavolta (2004) também abordam a questão da sensibilidade da microbiota às condições ambientais. Analisando uma área de floresta primária da região amazônica que fora desmatada e queimada para plantio de cupuaçu, os autores identificaram que houveram alterações no solo decorrentes da mudança da cobertura vegetal e do manejo adotado. Em especial, as reduções significativas nos teores de N tiveram impacto sobre a atividade microbiológica no solo. Já nas áreas em que a floresta primária foi substituída pelo plantio de cupuaçu, passou a haver maior presença de leguminosas, o que elevou a relação C/N e diminuiu a capacidade de nitrificação pela biomassa microbiana.

Incluída nesse mecanismo, há uma questão importante sobre a correlação entre o CBM, o NBM e os teores de N e C no solo. Quando se trata de assegurar a disponibilidade de N no solo para uma cultura, esta não deve ser analisada apenas pela relação C/N, mas pela relação entre esta proporção e o NBM. Gama-Rodrigues et al. (2005) observaram, no solo sob uma cultura de eucalipto, que o aumento do C orgânico e do N total levaram ao aumento dos teores de  $\text{N-NO}_3^-$ . Porém, com o aumento do NBM, o  $\text{N-NO}_3^-$  no solo diminuiu. Mediante essa constatação, os autores acreditam que o NBM constitui uma reserva de N orgânico que irá contribuir com o cálculo da relação C/N, para que esta nova correlação,  $((\text{C/N})/\text{NBM})$  indique se haverá imobilização ou não do N.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Informações sobre o experimento

O presente trabalho dá continuidade ao trabalho de pesquisa de Doutorado de Talita Ferreira (Ferreira, 2020), que buscou identificar a relação entre as minhocas *P. corethrurus* e a fertilidade do solo e o efeito no crescimento e nutrição de plantas de milho.

O solo utilizado no experimento foi classificado como LATOSSOLO AMARELO e foi coletado no município de Paraopeba - MG. Apresenta textura argilo-siltosa, acidez elevada, baixo teor de C, N e nutrientes disponíveis (Tabela 1).

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E TEOR DE ARGILA DO LATOSSOLO AMARELO USADO NO EXPERIMENTO.

pH	C <sub>org</sub>	N <sub>tot</sub>	P	Ca	Mg	K	Al	Cu	Zn	Mn	Argila
CaCl <sub>2</sub>	g.dm <sup>3</sup>		mg.dm <sup>3</sup>	cmol.dm <sup>3</sup>				mg.dm <sup>3</sup>			g.dm <sup>3</sup>
4,18	18,4	1,78	0,00	0,60	0,50	0,023	1,98	1,36	0,78	2,94	509,6

Fonte: Ferreira, 2020.

As adições dos componentes da TPI, ou seja, de MO fresca, biochar, minhocas e espinha de peixe feitas ao solo para compor a TPN, seguiram um planejamento fatorial 2<sup>k</sup>, cujos níveis pré estabelecidos foram: a) presença ou ausência de 5 indivíduos de **minhocas *P. corethrurus*** no solo, identificado pela letra **P**; b) presença ou ausência de 10% (m/m) de **biochar** de ouriço de castanha do Pará (previamente peneirada a 4 mm), identificado por **B**; c) presença e ausência de **MO fresca**, ou seja, esterco de cavalo, na dose equivalente a 2,6% de C no solo, identificado por **M**; d) presença ou ausência de **espinha de peixe moída** (previamente peneirada a 2 mm) no solo, na dose equivalente a 500 mg/dm<sup>3</sup> de P, identificado por **E** (Ferreira, 2020). Os tratamentos com adição de fragmentos de cerâmica, aplicados no experimento fatorial de Ferreira (2020) não foram incluídos para as avaliações realizadas nesse trabalho, por não terem apresentado alterações significativas sobre a qualidade do solo..

As minhocas inoculadas no solo foram coletadas em plantio de *Pinus elliottii*, na Embrapa Florestas, Colombo, PR. O biochar de ouriço da castanha do Pará foi obtido por pirólise lenta (4h) a 350° na Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA. O esterco usado foi de cavalos sem uso recente de antibióticos e anti-helmínticos, da Cavalaria da Polícia Militar de Curitiba, e mantido ao abrigo de luz e em temperatura ambiente por 30 dias antes de seu uso. As espinhas de peixe foram obtidas de uma peixaria do mercado municipal de Curitiba, secas em forno a 180° e moídas (Ferreira, 2020).

### 3.2. Tratamentos experimentais

Os tratamentos analisados no presente trabalho foram preparados de forma a representar a adição de apenas um dos componentes da TPN, ou combinações fatoriais de 2, 3 e 4 dos componentes adicionados ao Latossolo amarelo (Tabela 2), resultando em 16 tratamentos.

TABELA 2. TRATAMENTOS REPRESENTANDO OS COMPONENTES *Pontoscolex corethrurus* (P), BIOCHAR (B), MATÉRIA ORGÂNICA (M) E ESPINHA DE PEIXE (E), EM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE MATERIAL ADICIONADO AO SOLO.

Sem adições	1 adição	2 adições	3 adições	4 adições
Testemunha	P	PB	PBM	PBME
	B	PM	PME	
	M	PE	PBE	
	E	BM	BME	
		BE		
		ME		

### 3.3. Teores de carbono, nitrogênio e atributos químicos do solo nos tratamentos

Dentre as amostras de solo utilizadas neste trabalho, oriundas do trabalho de Ferreira (2020), havia algumas repetições em falta, de forma que não foram usadas a mesma quantidade de repetições para todos os tratamentos. A quantidade de repetições disponíveis por tratamentos está listada no Anexo I e varia entre 2 e 5. Assim, os resultados médios dos atributos químicos do solo usados nas análises de correlação são resultantes da média obtida com as amostras ainda existentes, as mesmas que foram usadas para as determinações analíticas de C e N, e das variáveis microbiológicas do solo.

Para análise do carbono e nitrogênio totais das amostras, inicialmente as amostras foram peneiradas em uma malha de 0,02 mm. Em seguida, foram pesados cerca de 30 mg de solo de cada repetição de cada tratamento em balança analítica com precisão de mg em 3 casas decimais. O solo foi pesado em lâminas de estanho, sendo em seguida encapsulado

para a determinação analítica de C e N, por combustão no equipamento Vario EL III, da marca Elementar.

Os atributos químicos do solo analisados foram pH em  $\text{CaCl}_2$  (relação solo:solução de 1:2,5); H + Al estimado pelo pH SMP;  $\text{Al}^{3+}$  (titulometria),  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (espectrofotometria absorção atômica) extraídos com  $\text{KCl}$   $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ; P (colorimetria) e K (fotometria de chama) extraídos com Mehlich-1. Foram calculados os valores de SB = Soma de bases, T= Capacidade de troca de cátions a pH 7,0, V% = saturação por bases, e m%= Saturação por Al, conforme Marques e Motta (2003). As análises feitas por Ferreira (2020) e dados reunidos com os gerados neste trabalho se encontram nas tabelas e gráficos seguintes.

### **3.4. Variáveis microbiológicas analisadas**

#### **3.4.1. C e N da Biomassa Microbiana**

Para análise do carbono e do nitrogênio da biomassa microbiana foi seguida a metodologia de Ferreira et al. (1999). O solo de cada tratamento, já previamente seco e peneirado a 2 mm, foi pesado em anéis de metal em alíquotas de 20 g em triplicata, pois uma delas seria irradiada, uma segunda não seria irradiada e uma terceira seria usada para se obter o teor de umidade na amostra de solo equivalente à capacidade de retenção de água do solo.. Todas as amostras foram, então, saturadas com água deionizada e drenadas até que parassem de gotejar. Essas amostras úmidas foram pesadas novamente e transferidas para tubos falcon. Uma das porções de solo de cada repetição foi irradiada por 2 minutos em micro-ondas (Potência = 12,7 W) para matar os microrganismos presentes sem degradar o carbono orgânico do solo. A outra porção de solo não foi irradiada, e a terceira alíquota foi seca em estufa, para obtenção do teor de umidade no solo.

A cada tubo (irradiado e não irradiado), foram adicionados 25 mL de solução extratora de sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  (Vance et al., 1987); os tubos foram agitados em mesa agitadora por 30 min, sendo em seguida centrifugados por 7 minutos a 3000 rpm para obtenção do líquido sobrenadante. Este foi transferido para recipientes plásticos passando por filtro de papel de filtragem lenta. Os extratos foram então mantidos sob refrigeração a  $-4^\circ\text{C}$  por 5 dias até que fosse feita a leitura dos valores de carbono e nitrogênio em equipamento ISO TOC Cube da marca Elementar. Quando necessário, foi realizada a diluição do extrato para a obtenção dos resultados dentro da faixa de valores da curva de calibração. Neste equipamento os elementos C e N são obtidos por combustão das amostras líquidas.

Os valores obtidos no ISO TOC Cube foram usados para cálculo final do carbono da biomassa microbiana do solo pela fórmula abaixo:

$$CBM = \frac{C_{AM. IRR.} - C_{AM. NÃO IRR.}}{Kc}$$

onde,  $C_{am. irr.} = \frac{C_{lido\ am. irr.} \cdot \text{fator de diluição} \cdot \text{volume de solução extratora}}{\text{Peso seco da amostra irradiada}}$

$$C_{am. não irr.} = \frac{C_{lido\ am. irr.} \cdot \text{fator de diluição} \cdot \text{volume de solução extratora}}{\text{Peso seco da amostra não irradiada}}$$

A mesma relação foi usada para cálculo dos valores de nitrogênio, fazendo-se apenas as substituições dos valores de carbono pelos de nitrogênio. Os fatores de correção usados para CBM e NBM foram  $Kc = 0,33$  (Sparling e West, 1996) e  $Kc = 0,54$  (De-Polli e Guerra, 1996), respectivamente.

### 3.4.2. Ensaio de mineralização de nitrogênio

Para o ensaio de mineralização de nitrogênio também foram usadas amostras de solo com umidade equivalente à capacidade de campo, e os valores da massa de solo foram depois corrigidos para massa seca.

As amostras de solo (cerca de 20 g) foram inseridas em anéis metálicos com tecido de nylon no fundo, colocadas para saturar em bandeja com água deionizada e depois drenadas, sendo na sequência transferidas para tubos Falcon. Para extração do nitrogênio presente inicialmente na amostra, foram adicionados 25 mL de solução de KCl 2 mol.L<sup>-1</sup> em cada tubo. Estas foram submetidas a agitação em mesa de agitação circular por 45 minutos; e posteriormente centrifugadas por 7 minutos a 3000 rpm. O extrato sobrenadante foi filtrado usando papel filtro previamente imerso em água deionizada e em seguida em solução de KCL 2 mol.L<sup>-1</sup>. Ao solo, que permaneceu nos tubos Falcon, foram adicionados 25 mL de solução nutritiva, com concentração de 0,005 mol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,002 mol.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> e 0,005 mol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>. Feito isso, as amostras foram incubadas por 14 dias em incubadora a 30°C, no escuro. Este procedimento foi repetido por mais 3 vezes, totalizando 8 semanas desde a primeira extração. Conforme apontado por Gonçalves et al. (1991), este é um período suficiente para obtenção da curva de mineralização do nitrogênio. Contudo, nas 3 extrações seguintes, em vez da adição de solução extratora de KCl a 2 mol/L, foram adicionados 5,2 g

de KCl P.A. às amostras nos tubos Falcon contendo a solução nutritiva, a qual foi renovada a cada extração do N.

Os extratos obtidos em cada extração foram usados para determinação das concentrações de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no solo. A determinação de amônio foi realizada por colorimetria com leitura em espectrofotômetro, conforme descrito por Apha et al. (1995). Este método considera o princípio de que o amônio, uma vez em contato com fenol, hipoclorito sódico e o catalizador nitroprussiato de sódio, forma o azul de indofenol. Neste estado, ele pode ser lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 640 nm. Para leitura foram adicionados 0,25 mL de extrato, 0,2 mL de solução alcoólica de fenol, 0,2 mL de solução de nitroprussiato de sódio e 0,5 mL de solução oxidante composta de citrato alcalino e hipoclorito de sódio e completado o volume de 5 mL com água deionizada. Aguardou-se aproximadamente 1 hora para o desenvolvimento da cor azul. Em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 640 nm.

A determinação das concentrações de nitrato nos extratos foi realizada por espectrofotometria por radiação UV a 210 nm, com redução química do nitrato a amônio pela adição de zinco metálico (Heinzmann et al., 1984). As soluções de leitura foram preparadas em duplicata. Uma recebeu adição de zinco e outra não. Os demais reagentes usados, bem como o volume de extrato foram iguais, sendo eles 0,25 mL de alíquota das amostras e adicionados 0,2 mL de ácido sulfúrico 10% e 4,55 mL de água deionizada.

A redução do nitrato tem por objetivo fazer a leitura apenas dos compostos interferentes, que são lidos a 210 nm. A leitura da solução que não recebeu zinco, fornece a concentração de nitrato e interferentes. A concentração do nitrato então, é dada pela diferença entre as duas, eliminando-se os interferentes. Os principais interferentes são:  $\text{NO}_2^-$ , Fe, Pb, Cu, Cl,  $\text{SO}_4^{2-}$  e substâncias orgânicas (Norman e Stucki, 1981).

### **3.5. Análises estatísticas**

Os padrões de mineralização de cada tratamento ao longo do período de incubação foram analisados graficamente. A normalidade dos dados de CBM, NBM e N mineralizado acumulado para cada tratamento foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. A comparação entre as médias de CBM, NBM e N mineralizado acumulado de cada tratamento foi feita pelo Teste de Tukey, com  $\alpha = 5\%$ , no software Sisvar.

Buscando compreender como as variações entre os atributos físicos, químicos e microbiológicos do solo se relacionam, foram feitas correlações de Pearson entre as variações do nitrogênio mineralizado acumulado, CBM e NBM e as variações dos atributos físicos, químicos e biológicos do solo. Foram consideradas correlações significativas ( $\alpha \geq 5\%$ ) aquelas com valor de  $r > 0,497$ , para um valor de  $n = 16$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Teores de carbono, nitrogênio e demais atributos químicos do solo nos tratamentos

Os teores de carbono total (Gráfico 1) ficaram entre 23,1 e 29,3 g C.kg solo<sup>-1</sup>. Os tratamentos que apresentaram maiores teores de CT foram PE (29,25 g C.kg solo<sup>-1</sup>), PM h1(28,24 g C.kg solo<sup>-1</sup>) e BME (28,14 g C.kg solo<sup>-1</sup>). Os tratamentos com os menores teores de CT foram PBME (23,28 g C.kg solo<sup>-1</sup>), B (23,21 g C.kg solo<sup>-1</sup>) e BE (23,13 g C.kg solo<sup>-1</sup>). A Testemunha ficou em valores intermediários (25,85 g C.kg solo<sup>-1</sup>).

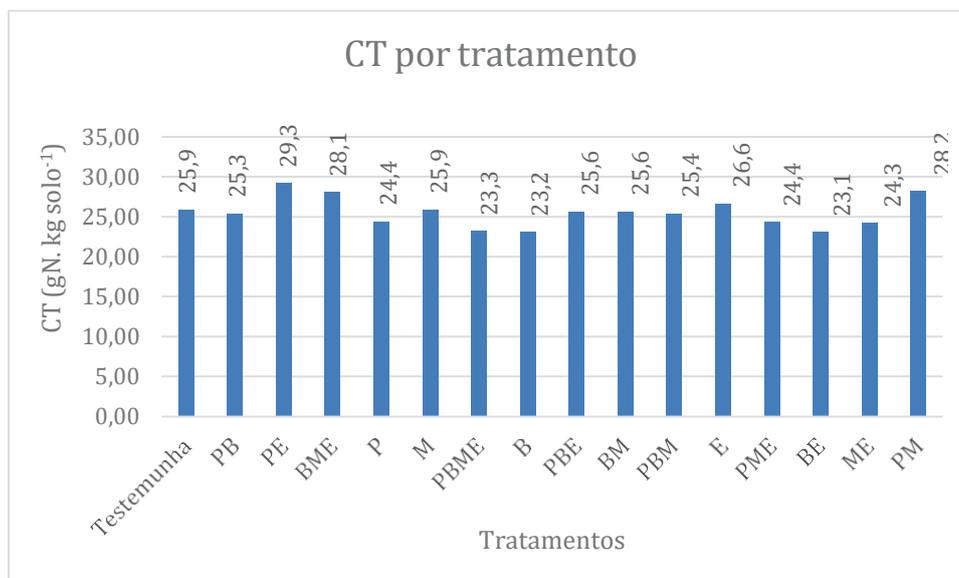


Gráfico 1: Concentração de carbono total no solo (Testemunha e tratamentos).

Observa-se que a presença das minhocas *P. corethrus* e do esterco equino contribuíram para a elevação do CT, enquanto o biochar não teve a mesma expressividade. Contudo, os teores de CT variaram minimamente entre os tratamentos, de forma que não foi possível observar um padrão de variação ou alguma adição específica ao solo que tenha aumentado expressivamente os teores de CT. Esperava-se que, principalmente, o biochar elevasse significativamente os teores de CT, pelo grande aporte de C que ele pode fornecer,

e pela alta quantidade adicionada (10% em massa do peso do solo seco). No entanto, isso não foi observado.

Quanto aos teores de nitrogênio total (Gráfico 2), a Testemunha destacou-se em relação aos solos que foram alterados, com o teor de NT igual a 2,06 g N.kg solo<sup>-1</sup>, seguida por E (2,05 g N.kg solo<sup>-1</sup>), PBM (2,02 g N.kg solo<sup>-1</sup>) e BME (1,99 g N.kg solo<sup>-1</sup>). Os tratamentos com menores teores de NT foram PBE (1,76 g N.kg solo<sup>-1</sup>), PME (1,75 g N.kg solo<sup>-1</sup>) e B (1,72 g N.kg solo<sup>-1</sup>).

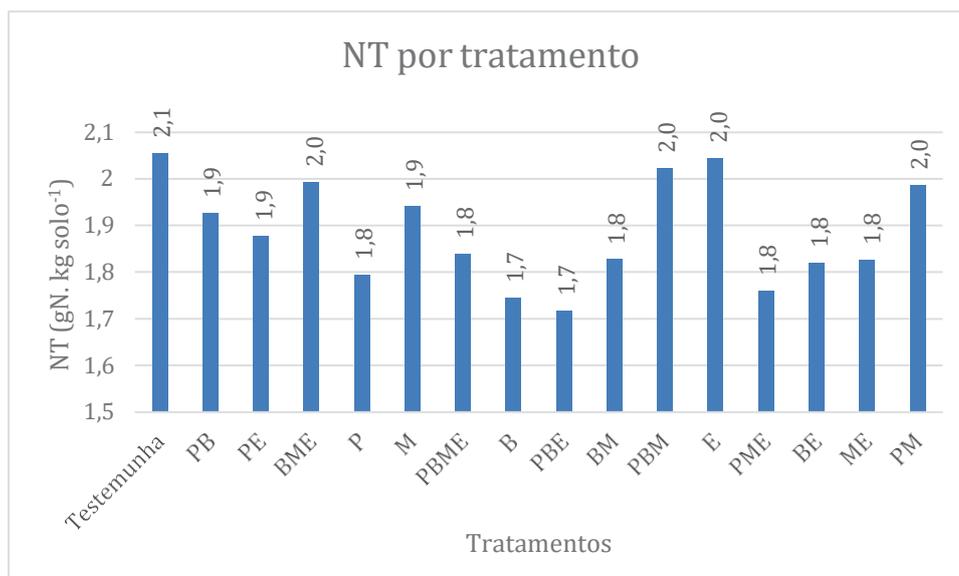


Gráfico 2: Concentração de nitrogênio total no solo (Testemunha e tratamentos).

As faixas de pH CaCl<sub>2</sub> entre os tratamentos variaram muito pouco, entre 4 e 4,5 (Tabela 3). O pH SMP foi um pouco mais elevado, ficando entre 5,2 e 5,8. Alguns trabalhos mencionam a capacidade do biochar de elevar o pH do solo (Paz-Ferreiro et al., 2000; Topoliansz e Ponge, 2003). No entanto, este efeito não foi observado neste trabalho. Também era esperado que a adição das minhocas elevasse o pH do solo, visto que elas excretam carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) nas glândulas calcíferas modificando o pH do solo ingerido, especialmente no esôfago e porção anterior do intestino (Barois e Lavelle, 1986). A elevação do pH poderia aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo (Kale e Krishnamoorthy, 1980 apud Bartz et al., 2007). Este efeito, contudo, também não foi observado neste estudo.

Os dados de saturação por bases e por alumínio mostram que o esterco foi um componente fundamental para adequar esses atributos do solo, visto que ele esteve presente em todos os tratamentos que têm as saturações de alumínio mais baixas, incluindo o tratamento que recebeu apenas o esterco (m: BME – 11,72%; ME – 14,18%; M - 19,15%; BM - 20,03). Ele também foi um componente em comum entre os tratamentos com as saturações

por bases mais elevadas (V: BME - 37,14%; ME - 36,88%; M – 29,37%; PBME – 28,10%). Em consonância com estes dados, Devidé (2012) afirma que a MOS é considerada a principal componente para a manutenção da CTC, devido à sua capacidade de reter os cátions do solo no sítio de troca, contribuindo assim para o aumento da soma de bases. Essa retenção é afetada, entre outros fatores, pelo pH do solo. Quando o pH é baixo, as cargas negativas são ocupadas por íons como  $Al^{3+}$  e  $Fe^{2+}$ , e não por íons básicos, como  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  e  $Mg^{2+}$ . Há a ressalva de que a própria mineralização da MO pode prejudicar a retenção de bases pelo solo, pois a oxidação de resíduos orgânicos gera ácidos carboxílicos e fenólicos (Devidé, 2012). Entretanto, como mencionado acima, no presente estudo, a variação da saturação por Al não acompanhou a do pH e foi mais afetada pela presença ou ausência do esterco equino. Sendo assim, é mais provável que os maiores teores de matéria orgânica tenham sido responsáveis pela redução da saturação por Al, atuando na complexação dos vários grupos funcionais que formam a MO. Já a elevação do pH é capaz de reduzir tanto as formas trocáveis quanto as não trocáveis de Al, não influenciando especificamente os teores de alumínio trocável, tampouco a saturação por alumínio (Zambrosi, et al., 2007; Mancin, et al., 2010).

Para os demais atributos químicos do solo, observa-se que o esterco equino é uma das principais fontes de nutrientes, com destaque para Ca, P, K e Mg (Tabela 4). As concentrações do P, especificamente, são maiores quando se adicionou o esterco aliado à espinha de peixe. Contudo, a inoculação de minhocas reduziu os teores de P em relação aos solos que não foram inoculados com minhocas, mesmo que houvesse adição de M e E. Essas concentrações elevadas nos tratamentos com M e E, contudo, não se repetiram para o potássio. Esta constatação contradiz Lima et al. (2005), que apontaram o K como o nutriente mais abundante na espinha de peixe, em detrimento do P, diferente dos fragmentos de ossos, que constituem fontes muito importantes de P e Ca. Ainda, segundo esses autores, as relações Ca/P são parecidas para espinhas de peixe e ossos. Lima et al., (2010) identificaram também valores de Ca/P bem próximos para esses dois componentes, sendo que a espinha de peixe mostrou maiores teores de Al e Zn. Essas diferenças foram atribuídas a diferenças biogênicas da própria espinha de peixe. Este resultado corrobora com os dados obtidos neste trabalho, pois os tratamentos com espinha de peixe, em geral apresentaram maiores valores de saturação por alumínio. Essas saturações elevadas foram observadas especialmente quando a espinha de peixe não foi associada à presença da matéria orgânica (tratamento M), que melhorou a saturação por bases.

TABELA 3: VALORES MÉDIOS DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS pH CaCl<sub>2</sub>, pH SMP, Al, H+Al, E SATURAÇÃO POR ALUMÍNIO (m%)

Tratamento	pH (CaCl <sub>2</sub> ) *	pH SMP*	Al* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	H+Al* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	m (%)
Testemunha	4,09	5,43	1,52	8,10	65,29
PB	4,06	5,27	1,70	8,88	61,18
PE	4,18	5,39	1,32	8,10	45,31
BME	4,54	5,78	0,46	6,10	11,72
P	4,09	5,24	1,60	9,05	55,05
M	4,47	5,60	0,66	6,95	19,15
PBME	4,34	5,60	0,81	6,83	23,54
B	4,08	5,31	1,53	8,70	58,16
PBE	4,10	5,39	1,55	8,00	50,14
BM	4,46	5,72	0,63	6,45	20,03
PBM	4,26	5,58	0,95	7,17	27,43
E	4,15	5,35	1,39	8,40	46,12
PME	4,35	5,51	0,84	7,38	23,45
BE	4,09	5,27	1,50	8,90	46,65
ME	4,47	5,78	0,57	5,93	14,18
PM	4,37	5,63	0,69	6,70	20,92

Fonte: Adaptado de Ferreira (2020).

TABELA 4: VALORES MÉDIOS DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS Ca, Mg, K, P E SOMA DE BASES (SB).

Tratamento	Ca* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	Mg* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	K* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	P* (mg/dm <sup>3</sup> )	SB* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )
Testemunha	0,53	0,31	0,035	3,94	0,91
PB	0,76	0,27	0,032	3,55	1,09
PE	1,20	0,38	0,014	33,97	1,64
BME	2,05	1,29	0,045	111,73	3,61
P	0,96	0,30	0,029	4,23	1,31
M	1,79	0,97	0,063	22,08	2,94
PBME	1,57	0,72	0,046	91,07	2,67
B	0,78	0,26	0,025	3,88	1,10
PBE	1,22	0,27	0,015	17,88	1,56
BM	1,52	0,97	0,056	31,35	2,63
PBM	1,57	0,75	0,050	33,25	2,61
E	1,20	0,42	0,014	30,85	1,68
PME	1,60	0,96	0,038	78,68	2,78
BE	1,28	0,32	0,017	26,89	1,70
ME	2,02	1,09	0,059	121,95	3,47
PM	1,52	0,86	0,078	29,84	2,61

Fonte: Adaptado de Ferreira (2020).

TABELA 5: MÉDIAS DOS VALORES DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS CTC EFETIVA, CTC pH=7, SATURAÇÃO POR BASES (V%), Cu E Mn

Tratamento	CTC efetiva* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	CTC pH=7* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	V (%) *	Cu* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	Mn* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )
Testemunh					
a	2,43	9,01	9,66	2,15	0,95
PB	2,79	9,96	10,97	1,23	0,58
PE	2,97	9,74	16,76	1,83	0,70
BME	4,06	9,71	37,14	1,53	0,53
P	2,91	10,36	12,74	1,68	0,40
M	3,59	9,89	29,37	2,65	0,90
PBME	3,47	9,49	28,10	1,48	0,45
B	2,62	9,80	11,22	1,30	0,95
PBE	3,11	9,56	16,27	1,43	0,43
BM	3,26	9,08	28,37	2,35	0,55
PBM	3,56	9,78	26,52	1,40	0,60
E	3,07	10,08	16,48	1,48	0,80
PME	3,62	10,16	27,36	2,15	0,73
BE	3,26	10,60	15,95	1,05	0,20
ME	4,04	9,41	36,88	1,37	0,70
PM	3,30	9,31	28,05	1,40	0,73

Fonte: Adaptado de Ferreira (2020).

TABELA 6: MÉDIAS DOS VALORES DOS ATRIBUTOS QUÍMICOS Fe, CARBONO TOTAL, NITROGÊNIO TOTAL E RELAÇÃO C/N

Tratamento	Fe* (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	NT (g N/ kg solo)	CT (g C/ kg solo)	C/N
Testemunha	6,55	2,06	25,85	12,59
PB	6,35	1,93	25,32	13,15
PE	4,58	1,88	29,25	15,58
BME	3,67	1,99	28,14	14,10
P	5,45	1,80	24,36	13,65
M	5,08	1,94	25,85	13,33
PBME	4,08	1,84	23,28	12,64
B	6,85	1,75	23,21	13,28
PBE	7,07	1,72	25,61	14,94
BM	4,68	1,83	25,63	14,03
PBM	6,10	2,02	25,38	12,55
E	4,93	2,05	26,63	13,04
PME	5,18	1,76	24,37	13,83
BE	3,80	1,82	23,13	12,72
ME	5,20	1,83	24,32	13,32
PM	4,70	1,99	28,24	14,22

Fonte: Adaptado de Ferreira (2020).

#### 4.2. Mineralização do nitrogênio no solo

A dinâmica da mineralização é apresentada separadamente em função dos diferentes componentes adicionados como tratamentos (Gráficos 3 a 10), buscando uma melhor visualização comparativa entre diferentes tratamentos.

Os tratamentos que foram inoculados com as minhocas *P. corethrurus* apresentaram padrões de mineralização parecidos, porém com algumas diferenças quanto ao pico de mineralização (Gráfico 3). Em geral, os teores de N mineralizado cresceram após os primeiros 15 dias, atingindo um pico entre 30 e 45 dias de incubação e decaindo novamente. Este perfil corrobora com as observações de Gonçalves et al. (2001), segundo as quais o período compreendido entre o início da incubação e o fim das primeiras 8 a 15 semanas é quando ocorre a mineralização do N lábil do solo. Ao fim deste período, a mineralização tende a estabilizar. Os autores obtiveram este resultado realizando incubação à 20°C. No presente estudo, foi adotada temperatura de 30°C, buscando aceleração do processo de estabilização. Considerando que aqui todos os tratamentos mostraram tendência de queda dos níveis de N mineralizado ao fim dos 60 dias de incubação, é possível que boa parte do N lábil tenha sido mineralizado nesse estágio do ensaio.

Os tratamentos P, PM, PE e PBME tiveram picos coincidentes com o fim do terceiro período de incubação (45 dias), enquanto o tratamento PB atingiu o pico ao fim do segundo período de incubação (30 dias). O tratamento PM teve o perfil mais atípico, tendo uma queda brusca na concentração de N mineralizado aos 15 dias, quando acabou a primeira incubação. O perfil PE também apresentou uma queda na mineralização de N até o dia 30, porém muito mais discreta. O tratamento Testemunha foi o único com pico de mineralização ao final de 15 dias de incubação, padrão que tem sido observado em muitos trabalhos de pesquisa (Gráfico 3) (Carvalho, 2011; Müller, 2012).

A Testemunha foi o tratamento que teve os maiores valores totais de N mineralizado ao fim das incubações, seguida pelo PBME, PE, PB, PM e P. Como o solo usado neste experimento é o mesmo já usado para o cultivo de milho no trabalho de Ferreira (2020), a maior mineralização no tratamento testemunha, comparativamente aos demais tratamentos, parece estar relacionada com a manutenção no solo de um maior estoque de material com potencial de mineralização do N, pois foi neste tratamento que as plantas cresceram menos e, portanto, exportaram menos N do solo. Isto é corroborado, em parte, pelos maiores valores de NT no solo do tratamento Testemunha (Tabela 6).

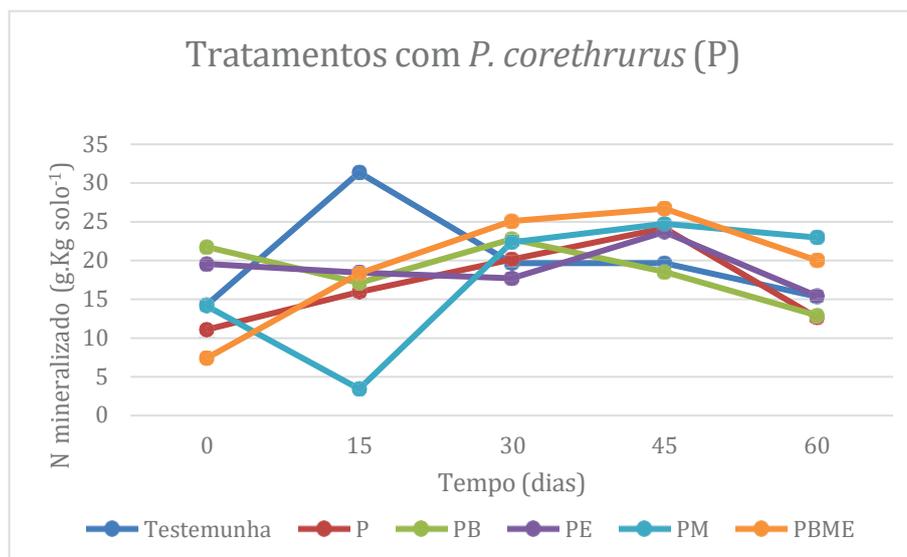


Gráfico 3: Perfil de mineralização dos tratamentos que foram inoculados com minhocas *P. corethrusus*, variações de 2 e 4 componentes e Testemunha (apenas solos): P: *P. corethrusus*; PB: *P. corethrusus* e biochar; PE: *P. corethrusus* e espinha de peixe; PM: *P. corethrusus* e esterco; PBME: *P. corethrusus*, biochar, esterco e espinha de peixe.

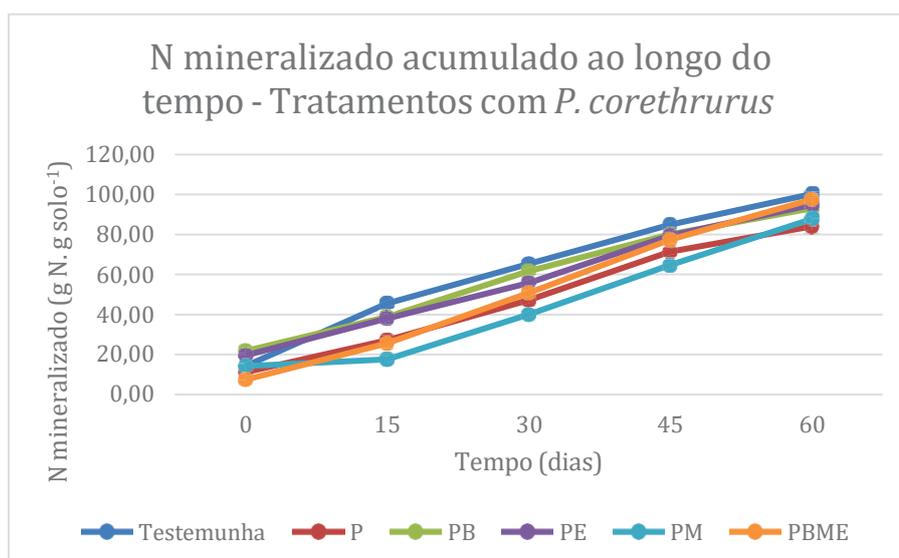


Gráfico 4: Nitrogênio mineralizado acumulado para tratamentos que foram inoculados com minhocas *P. corethrusus*, variações de 2 e 4 componentes e Testemunha (apenas solos): P: *P. corethrusus*; PB: *P. corethrusus* e biochar; PE: *P. corethrusus* e espinha de peixe; PM: *P. corethrusus* e esterco; PBME: *P. corethrusus*, biochar, esterco e espinha de peixe.

Para os tratamentos que receberam esterco equino (M), foram observados dois padrões principais de mineralização. O primeiro foi observado nos tratamentos PM, ME e BM, em que os níveis iniciais de N mineralizado foram mais elevados e, ao atingir 15 dias de incubação, eles tiveram uma queda acentuada; e em seguida voltaram a subir acentuadamente também. O segundo padrão verificou-se nos tratamentos M e PBME, onde os valores iniciais (tempo 0) foram mais baixos e muito próximos entre os dois tratamentos; aumentam até atingirem seu máximo aos 45 dias e, com posteriores quedas suaves,

finalizando em valores muito próximos entre si aos 60 dias de incubação. Dentre estes tratamentos, nenhum teve o mesmo padrão de mineralização da testemunha, com pico aos 15 dias e subsequente decaimento.

Assim, como nos tratamentos com minhocas, os tratamentos que receberam esterco também apresentaram tendência de queda em suas produções de N mineralizado ao fim dos 60 dias. Apenas o tratamento PM fugiu um pouco deste padrão, indicando ainda certa tendência à estabilidade. Isto talvez se deva à queda elevada nos teores de N mineralizado neste tratamento aos 15 dias de incubação, que pode ter retardado a ocorrência de mineralização mais expressiva.

Nos tratamentos com esterco, os valores mais elevados de N mineralizado ao fim dos 60 dias foram observados para o tratamento BM, que também foi o único tratamento com valor final acumulado de N mineralizado maior do que a testemunha, porém sem diferença significativa (Gráfico 5; Tabela 7). Após o tratamento BM, a sequência de tratamentos com valores de N mineralizado acumulado em ordem decrescente foram: M, testemunha, PBME, ME e PM (Gráfico 6). Novamente, o tratamento PM apareceu com o menor teor acumulado de N mineralizado, agora entre os tratamentos com M. Também é interessante notar que, diferente dos tratamentos com *P. corethrus*, o tratamento que recebeu apenas esterco foi o segundo maior entre os que receberam este mesmo componente associado a outros, ficando atrás apenas do BM e da testemunha. Apesar dos teores elevados de N e C disponíveis nos coprólitos das minhocas (Fontaine et al., 2003; Chapuis-Lardy et al., 1998), a presença do esterco foi mais eficaz em gerar maiores taxas de mineralização do que as minhocas.

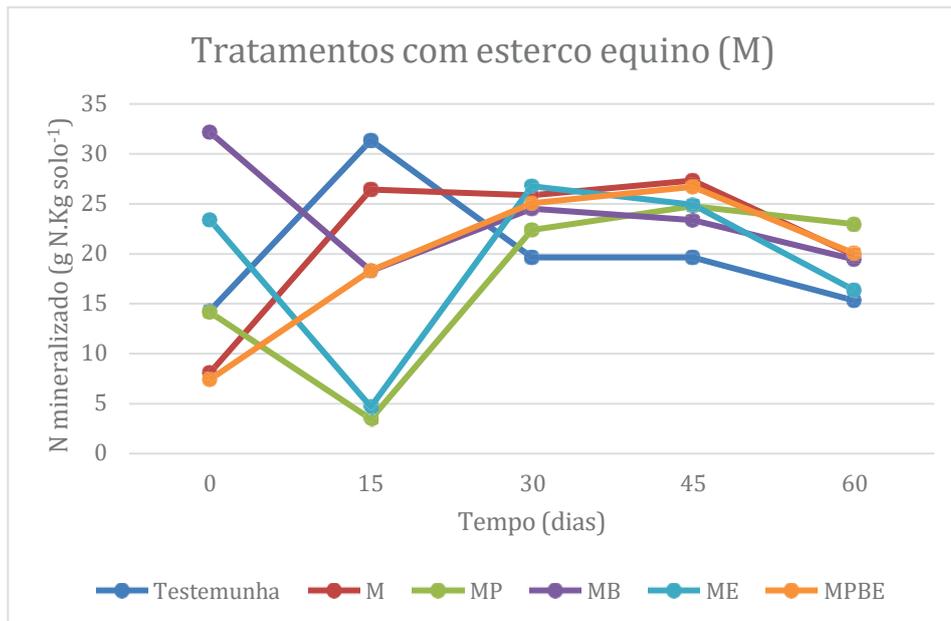


Gráfico 5: Tratamentos que receberam esterco equino, variações com 2 e 4 componentes e Testemunha (apenas solo). M: esterco equino; MP: esterco equino e *Pontoscolex corethrurus*; MB: esterco equino e biochar; ME: esterco equino e espinha de peixe; MPBE: esterco equino, *Pontoscolex corethrurus*, biochar e espinha de peixe.

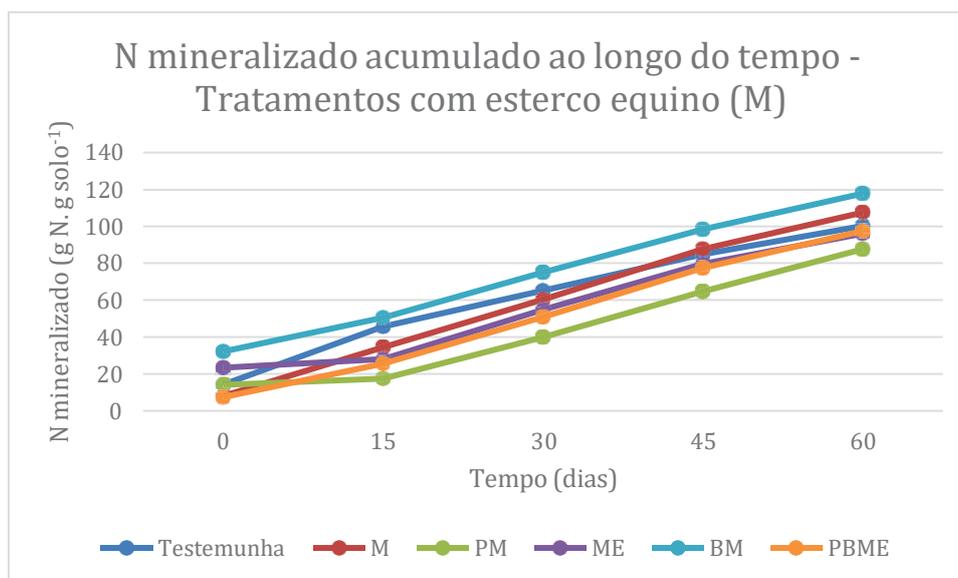


Gráfico 6: Nitrogênio mineralizado acumulado ao longo do tempo para tratamentos que receberam esterco equino, variações com 2 e 4 componentes e Testemunha (apenas solo). M: esterco equino; MP: esterco equino e *Pontoscolex corethrurus*; MB: esterco equino e biochar; ME: esterco equino e espinha de peixe; MPBE: esterco equino, *Pontoscolex corethrurus*, biochar e espinha de peixe.

Os tratamentos que receberam biochar mostraram padrões de mineralização bem variados. O tratamento B teve produção decrescente de nitrogênio mineralizado, sendo este o perfil mais semelhante ao da testemunha, contudo ainda inferior em produção de N mineralizado. Nenhum dos demais tratamentos alterados com B mostraram perfil de

mineralização semelhante ao da testemunha. O tratamento BE mostrou um crescimento maior dos teores de N mineralizado, atingindo um pico aos 45 dias de incubação. Os tratamentos PB e BM apresentaram perfis parecidos, começando com teores de N mineralizado mais elevados e que decaíram do tempo 0 até os 15 dias, mostrando um pequeno pico aos 30 dias e, aos 60 dias, atingiram níveis mais baixos do que os iniciais (Gráfico 7).

O tratamento BM foi um dos dois únicos que superaram a Testemunha em quantidade de nitrogênio mineralizado total, apesar de não haver diferença significativa entre eles (Tabela 7). Contudo, sua concentração de N mineralizado inicial é a mais alta dentre todos os tratamentos, com o valor de 32,18 g N.kg solo<sup>-1</sup>, enquanto a média dos tratamentos no tempo 0 foi de 13,74 g N.kg solo<sup>-1</sup>. Já ao fim dos 60 dias de incubação, a concentração média de N mineralizado do tratamento BM foi de 19,43 g N.kg solo<sup>-1</sup>; portanto, aproximando-se da média dos demais tratamentos que receberam biochar, que foi igual a 16,41 g N.kg solo<sup>-1</sup>. O elevado valor acumulado de N mineralizado em BM foi resultante do elevado teor inicial de nitrogênio mineralizado mais do que devido a uma atividade de mineralização expressiva. Isso pode ser observado na curva de mineralização do tratamento BM que foi bem suave desde o início da segunda incubação até o fim da última. Estes valores mais elevados de N mineral no tempo 0, para os tratamentos BM e PB, sugerem que a presença do biochar, em combinação com a ação das minhocas e adição de esterco, promoveram alguma mineralização no período de condução do trabalho anterior (Ferreira, 2020) a este aqui. A autora explica que a digestão das partículas do biochar pelas minhocas produz alterações químicas e físicas no biochar. Alterações estas que fazem com que ele passe a ser colonizado por bactérias, que podem acelerar seu processo de decomposição, interferir na atividade microbiológica e na disponibilização de nutrientes advindos da composição química do biochar. Contudo, uma das observações feitas por Ferreira (2020) foi a maior concentração de lignina nos coprólitos, composto que já foi identificado por Mafongoya et al. (2000) como responsável pela redução da taxa de liberação de nutrientes do biochar no solo. Considerando essas informações, pode-se afirmar que as alterações produzidas no biochar pelas minhocas não geram impactos consideráveis sobre a microbiota do solo. Ou ainda, colocado de outra forma, não geram impactos significativos em relação ao tratamento que recebeu apenas biochar (B) ou apenas as minhocas (P). Esta afirmação sustenta-se nos dados apresentados nos gráficos 3 e 4, em que o tratamento PB aparece com valores medianos de N mineralizado em relação aos demais tratamentos com minhocas. O valor de N mineralizado do tratamento PB de fato foi maior do que nos tratamentos B e P, porém sem diferença significativa (Tabela 7).

Paz-Ferreiro et al. (2000) estudaram a interação entre minhocas da espécie *P. corethrus* e o biochar no solo, porém também não identificaram efeitos significativos da interação entre eles sobre a qualidade do solo. Contudo, os autores identificaram incrementos na atividade enzimática no solo quando as minhocas e o biochar estavam presentes no tratamento. É importante mencionar que os benefícios da adição do biochar para a atividade microbiana e para a qualidade do solo estão atrelados a variáveis bem específicas que dependem do tipo do biochar e do tipo de solo (Paz-Ferreiro et al., 2000).

Observando os valores de N mineralizado acumulado total ao longo do período da incubação dos solos alterados com biochar e outros componentes, o tratamento BM mostrou os maiores valores acumulados em todos os tempos de incubação. Os maiores valores seguintes foram Testemunha, BPME, BP, B e BE. Fica clara a importância de o biochar estar associado a outros componentes que agreguem nutrientes e matéria orgânica ao solo, como mencionado por Lehmann et al. (2003), visto que o tratamento B foi o segundo menor em valores de N mineralizado acumulado além de apresentar perfil de mineralização muito semelhante ao da testemunha.

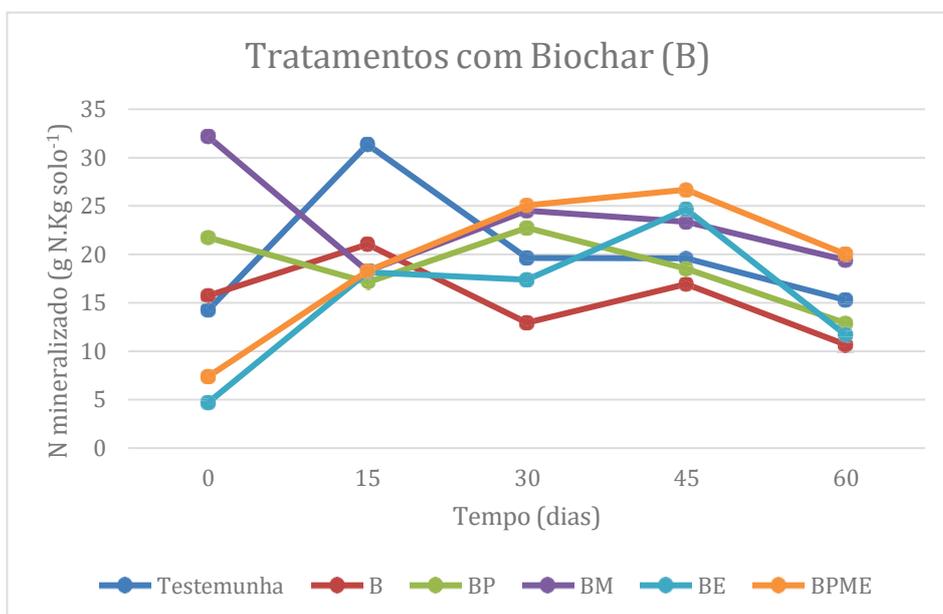


Gráfico 7: Tratamentos que receberam biochar, variações com 2 e 4 componentes e Testemunha (apenas solo). B: biochar; BP: biochar e *Pontoscolex corethrus*; BM: biochar e esterco equino; BE: biochar e espinha de peixe; BPME: biochar, *Pontoscolex corethrus*, esterco equino e espinha de peixe.

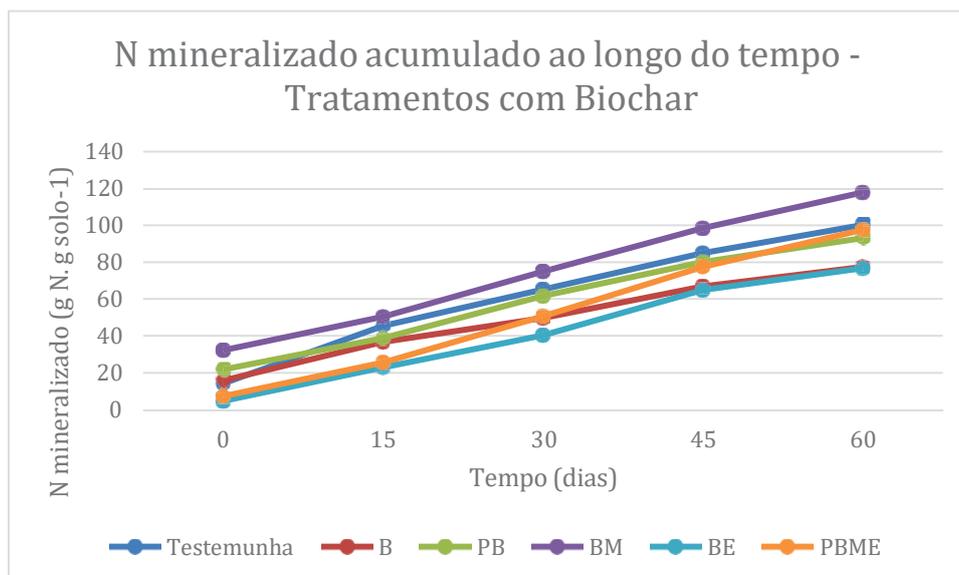


Gráfico 8: Nitrogênio mineralizado acumulado para tratamentos que receberam biochar, variações com 2 e 4 componentes e Testemunha (apenas solo). B: biochar; BP: biochar e *Pontoscolex corethrurus*; BM: biochar e esterco equino; BE: biochar e espinha de peixe; PBME: biochar, *Pontoscolex corethrurus*, esterco equino e espinha de peixe.

Os tratamentos representados nos gráficos 9 e 10 já apareceram nos gráficos anteriores, com exceção do E. Observa-se, no gráfico 9 o decaimento acentuado e brusco no tratamento EM, já discutido acima. Este foi o único tratamento que recebeu E que apresentou este perfil. Os demais tiveram concentrações crescentes de N inorgânico, atingiram o pico aos 45 dias (exceto E, cujo pico ocorreu aos 30 dias) e, em seguida, mostraram tendência ao decaimento. Com exceção do tratamento ME, todos chegaram aos 60 dias com teores de N superiores aos teores iniciais. Todos eles apresentaram perfis bem diferentes da testemunha.

O tratamento PE mostrou valores intermediários de N mineralizado acumulado, entre os tratamentos incluindo espinha de peixe. Também não houve correlação significativa entre as variáveis microbiológicas e o P no solo (ver tópico 4.4). Isso indica que os efeitos da associação entre a espinha de peixe e as minhocas, observados por Lima et al. (2010), não se repetiram neste estudo.

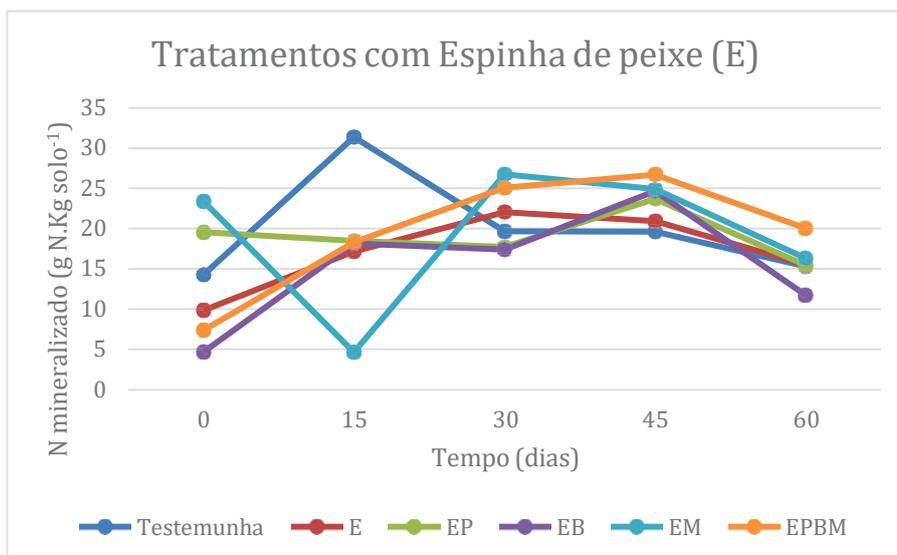


Gráfico 9: Tratamentos que receberam espinha de peixe, variações com 2 e 4 componentes e Testemunha (apenas solo). E: espinha de peixe; EP: espinha de peixe e *Pontoscolex corethrurus*; EB: espinha de peixe e biochar; EM: espinha de peixe e esterco equino; EPBM: espinha de peixe, biochar, *Pontoscolex corethrurus*, esterco equino.

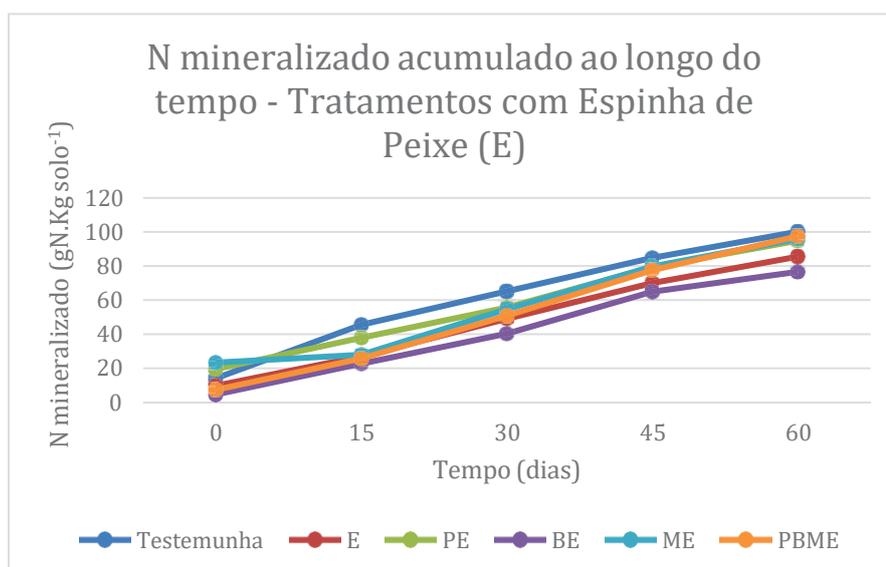


Gráfico 10: Nitrogênio acumulado ao longo do tempo para tratamentos que receberam espinha de peixe, variações com 2 e 4 componentes e Testemunha (apenas solo). E: espinha de peixe; EP: espinha de peixe e *Pontoscolex corethrurus*; EB: espinha de peixe e biochar; EM: espinha de peixe e esterco equino; EPBM: espinha de peixe, biochar, *Pontoscolex corethrurus*, esterco equino.

#### 4.3. N mineralizado total acumulado, C e N da biomassa microbiana

O resultado menos esperado, dentre os obtidos, foi que a Testemunha apresentou valores mais altos de N mineralizado, NBM e CBM do que os demais tratamentos. Os tratamentos, diferente da Testemunha, receberam fontes de nutrientes e condicionadores de solo que costumam contribuir com a mineralização biológica e a disponibilização de nutrientes no solo (Bernard et al., 2012; Brow et al., 2020; Barois e Lavelle, 1986; Lima et al., 2010; Amarante 2010; Glaser et al., 2002), mas os resultados não foram nesta direção. Vale

mencionar, entretanto que não houve diferença significativa entre a Testemunha e a maior parte dos demais tratamentos, ao menos no caso do N mineralizado e do NBM. Como já mencionado anteriormente, a menor produção de biomassa vegetal (Ferreira, 2020) no tratamento testemunha, no período anterior ao deste experimento, pode, em parte, explicar este comportamento.

Os maiores valores de N mineralizado acumulado foram, em ordem decrescente, o do tratamento BM (117,82 g N.kg solo<sup>-1</sup>), M (107,54 g N.kg solo<sup>-1</sup>) e a Testemunha (100,25 g N.kg solo<sup>-1</sup>), sendo que nenhum dos dois diferenciou-se significativamente da Testemunha assim como todos os demais tratamentos (Tabela 7).

Segundo Gonçalves et al. (1991), a quantidade de NT é um dos fatores de maior influência sobre a mineralização do N. Quanto maior o reservatório de N no solo, maior o potencial para a produção de biomassa que, por sua vez, estimula a mineralização de nitrogênio e aumenta a disponibilidade deste nutriente para as plantas. Os autores ponderam, ainda, que quanto maior o aporte de C, maior a demanda por N pelos organismos heterotróficos. Considerando que a Testemunha mostrou o maior teor de NT (Tabela 6) e o maior NBM (Tabela 7), não é surpreendente que ela tenha apresentado também o terceiro maior valor de N mineralizado ao fim do período de incubação (Tabela 7). Este resultado corrobora com a afirmação de Gama-Rorigues et al. (2005), que dizem que a biomassa microbiana constitui uma parcela proporcionalmente pequena do carbono orgânico do solo e uma parte significativa do N potencialmente mineralizável. Logo, se os valores de NT e de NBM da testemunha são elevados, então parcela significativa do NT é potencialmente mineralizável. A testemunha apresentou, também, uma relação C/N baixa (Tabela 6), o que favoreceu a mineralização e disponibilização do N.

Os teores de CBM foram todos inferiores ao valor da Testemunha. A sequência decrescente dos teores de CBM foi: Testemunha (1355,28 g C.kg solo<sup>-1</sup>), BE (1076,59 g C.kg solo<sup>-1</sup>), PM (772,19 g C.kg solo<sup>-1</sup>), P (769,8 g C.kg solo<sup>-1</sup>), e ME (763,79 g C.kg solo<sup>-1</sup>). Os teores de CBM correspondem aos teores presentes originalmente no solo, no início deste trabalho. Os maiores valores de CBM nos tratamentos com biochar podem ser associados, entre outros fatores, a este material funcionar como substrato para as bactérias (Pietikäinen et al., 2000). Contudo, neste trabalho o biochar não produziu aumentos expressivos nos teores de NBM, como ocorreu no trabalho realizado por Paz-Ferreiro et al. (2000).

Os benefícios da presença do biochar dependem muito de quais outras adições são feitas ao solo, visto que o valor de N mineralizado variou muito de acordo com o componente ao qual o biochar foi associado. Diversos autores falam sobre a capacidade do biochar de

agir como um sítio de adsorção iônica, contribuindo para a retenção e disponibilidade de nutrientes (Adderley, s.d; Kämpf e Kern, 2005), contudo que ele não é uma fonte de nutrientes na forma lábil (Smith et al., 2010). Sendo assim, apesar de seu elevado teor de carbono (Kaal et al., 2011), este encontra-se na forma de cadeias orgânicas aromáticas complexas e de caráter recalcitrante no tocante à atividade biológica no solo (Mizuta et al., 2004; Bruun e EL-Zehery, 2012).

O fato de os tratamentos inoculados com as minhocas mostrarem as segundas maiores médias de CBM e de NBM (Tabela 7), corrobora com observações feitas por diversos autores (Bernard et al., 2012; Brow et al., 2020; Barois e Lavelle, 1986) que enfatizam a capacidade das minhocas em estimular o crescimento da biomassa microbiana, bem como sua atividade. Elas despertam a microbiota fornecendo elevada disponibilidade de nitrogênio lábil no muco de seu trato digestivo além de “transportarem” os microrganismos para outras partes do meio aumentando seu acesso a recursos para metabolização (Brown et al., 2000; Lavelle et al., 1995). Elas também liberam nutrientes na forma lábil em seus coprólitos (Bernard et al., 2012), e tendem a estimular especialmente o crescimento de microrganismos especializados na degradação de compostos orgânicos lábeis (Bernard et al., 2012; Chapuis-Lardy et al., 1998; Fontaine et al., 2003).

Alguns estudos trazem embasamento para melhor compreensão da interação entre as minhocas *P. corethrurus* e o biochar. No estudo realizado por Paz-Ferreiro et al. (2000), solos pobres em nutrientes foram alterados com biochar e minhocas *P. corethrurus*. Os autores observaram que os tratamentos com biochar tiveram aumentos de carbono orgânico total e NBM. Estes podem ser importantes substratos para a produção de enzimas relacionadas à ciclagem do N pelos microrganismos. O estudo de Bartz et al. (2007) traz um complemento a esta constatação, pois os autores verificaram que a inoculação do solo com minhocas *P. corethrurus* elevou os teores de COT em 10 a 15%. Isso, segundo os autores, confirma a ingestão seletiva de partículas mais ricas em C pelas minhocas. Ainda segundo os autores, os coprólitos são excretados com grandes quantidades e diversidade de microrganismos, além de proporções variáveis de restos vegetais.

No presente estudo, o tratamento PB teve o maior valor de N mineralizado entre os tratamentos com minhocas e o segundo maior entre os tratamentos com biochar, apesar de não haver diferença significativa entre eles. Quanto aos valores de NBM, não se observou valores expressivamente maiores no tratamento PB. O que ocorreu nos dois casos, foi que tanto o tratamento P quanto o B apresentaram os maiores valores de NBM entre os que receberam P ou B, respectivamente. Estes foram valores mais próximos do tratamento PBME, porém ainda assim menores do que o NBM da testemunha (Tabela 7).

A sequência decrescente dos valores de NBM, entre todos os tratamentos, foi: Testemunha (75,7 g N.kg solo<sup>-1</sup>), ME (70,35 g N.kg solo<sup>-1</sup>), PME (65,31 g N.kg solo<sup>-1</sup>). Para esta variável, não houve diferença significativa entre os tratamentos, incluindo a testemunha. Os tratamentos que apresentaram os valores mais elevados de N mineralizado acumulado e de NBM foram os que tiveram em comum a adição de esterco. Estes, contudo, tiveram a menor média de CBM. Aqui pode-se inferir que o esterco não gerou aumento do CBM, sendo mais eficaz no incremento do NBM (Tabela 7).

TABELA 7: RESULTADO DO TESTE DE TUKEY (COMPARAÇÃO DE MÉDIAS) PARA N MINERALIZADO ACUMULADO (AO FIM DE 60 DIAS DE INCUBAÇÃO), CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA E NITROGÊNIO DA BIOMASSA MICROBIANA.

Tratamento	N mineralizado acumulado (g N/kg solo)	CBM (g C/kg solo)	NBM (g N/kg solo)
Testemunha	100,25 ab	1355,28 a	75,7 a
M	107,54 b	549,32 bc	55,38 a
B	77,45 ab	625,72 bc	59,57 a
P	84 ab	769,8 bc	56,63 a
E	85,55 ab	387,73 c	38,2 a
BE	76,7 ab	1076,59 ab	28,29 a
PM	87,67 ab	772,19 bc	58,36 a
PB	93,07 ab	749,87 bc	36,97 a
PE	94,87 ab	713,26 bc	46,09 a
ME	96,1 ab	763,79 bc	70,35 a
BM	117,82 a	589,33 bc	60,05 a
PBE	75,23 ab	421,47 bc	35,34 a
PBM	78,13 ab	637,39 bc	50,42 a
PME	89,42 ab	645,51 bc	65,31 a
BME	93,6 ab	1031,53 ab	63,18 a
PBME	97,52 ab	700,04 bc	59,77 a

Valores acompanhados das mesmas letras não têm diferença significativa entre si, pelo teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ).

Os tratamentos com espinha de peixe apresentaram as menores médias para o N mineralizado acumulado e o NBM, e a terceira maior para CBM. O tratamento com maior

produção de N mineralizado, dentre os que tiveram adição de espinha de peixe, foi o tratamento EM, com valores muito próximos de PE (96,1 g N.kg solo<sup>-1</sup> e 94,87 g N.kg solo<sup>-1</sup>, respectivamente). O tratamento EB apresentou o menor valor de N mineralizado e de NBM entre os tratamentos com espinha de peixe, mas simultaneamente com o maior valor entre eles de CBM (1076 g C.kg solo<sup>-1</sup>). Este valor de CBM foi significativamente diferente do valor do tratamento E (387,73 g C.kg solo<sup>-1</sup>) (Tabela 7).

O agrupamento feito nos resultados de N mineralizado, por componente adicionado ao solo (Gráficos 3 a 10), foi também feito para os valores de N mineralizado acumulado, CBM e NBM (Tabela 8). Foram calculadas as médias dos atributos biológicos mencionados e o coeficiente de variação, para melhor visualização de como esses atributos foram afetados pela adição de cada um dos componentes em cada tratamento.

Os tratamentos com adição de biochar tiveram o maior coeficiente de variação, chegando a 29,16%. Tiveram também os maiores coeficientes de variação de N mineralizado e de NBM e o segundo maior de CBM, o que pode indicar a dependência intrínseca dele das demais fontes de nutrientes adicionadas ou não ao solo, para que contribua com a atividade da microbiota. Isto já foi verificado no trabalho de Lehmann et al. (2003). A elevada variação também confirma a suposição anterior (ver 4.1), de que o teor de carbono lábil remanescente no biochar é muito baixo ou inexistente, em consonância com os estudos de Smith et al. (2010).

Os tratamentos com esterco equino (M) mostraram coeficientes de variação baixos, indicando a importância desta adição à atividade microbiológica do solo. Contudo, os CVs destes para CBM e NBM foram maiores nos tratamentos com esterco do que naqueles com *P. corethrus*.

O menor coeficiente de variação para N mineralizado e para CBM foi obtido nos tratamentos inoculados com minhocas. Aparentemente, as minhocas *P. corethrus* promoveram uma homogeneização nos solos que receberam os diferentes tratamentos de adição dos componentes das TPIs. Este papel de bioturbação promovido pelas minhocas é bastante conhecido.

Os tratamentos que receberam espinha de peixe tiveram um coeficiente de variação baixo para N mineralizado, porém tiveram CVs elevados para CBM (33,21%) e NBM (33,99%). Dado que o CBM e o NBM são parâmetros muito sensíveis a alterações no solo, pode-se inferir, a partir dos valores expostos na Tabela 8, que quando a espinha de peixe é adicionada isoladamente, ela não fornece insumos que estimulem consideravelmente o

desenvolvimento da biomassa microbiana, especificamente do CBM. Por outro lado, quando associada ao biochar, mostrou um incremento no CBM. Neste atributo, os tratamentos E e EB diferenciaram-se significativamente (Tabela 7).

TABELA 8: VALORES DE N MINERALIZADO ACUMULADO, CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA E NITROGÊNIO DA BIOMASSA MICROBIANA PARA TESTEMUNHA, PBME E TRATAMENTOS COM 1 E 2 ADIÇÕES, MÉDIAS E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO.

Tratamento	N mineralizado acumulado (g N/Kg solo)	CBM (g C/kg solo)	NBM (g N/kg solo)
Testemunha	100,25	1355,28	75,7
PBME	97,52	700,04	59,77
B	77,45	625,72	59,57
BE	76,7	1076,59	28,29
BM	117,82	589,33	60,05
BP	93,07	749,87	36,97
<i>Média</i>	<i>91,26</i>	<i>760,37</i>	<i>46,22</i>
<b>CV (%)</b>	<b>21,09</b>	<b>29,16</b>	<b>34,81</b>
M	107,54	549,32	55,38
MP	87,67	772,19	58,36
MB	117,82	589,33	60,05
ME	96,1	763,79	70,35
<i>Média</i>	<i>102,28</i>	<i>668,65</i>	<i>61,03</i>
<b>CV (%)</b>	<b>11,156</b>	<b>15,012</b>	<b>9,227</b>
P	84	769,8	56,63
PB	93,07	749,87	36,97
PM	87,67	772,19	58,36
PE	94,87	713,26	46,09
<i>Média</i>	<i>89,90</i>	<i>751,28</i>	<i>49,51</i>
<b>CV (%)</b>	<b>4,80</b>	<b>3,14</b>	<b>17,43</b>
E	85,55	387,73	38,22
EM	96,1	763,79	70,35
EB	76,7	1076,59	28,29
EP	94,87	713,26	46,09
<i>Média</i>	<i>88,30</i>	<i>735,34</i>	<i>45,73</i>
<b>CV (%)</b>	<b>8,88</b>	<b>33,21</b>	<b>33,99</b>

#### 4.4. Relações entre os atributos químicos e os atributos microbiológicos do solo

Na busca pela melhor compreensão das relações entre os atributos químicos do solo e os atributos microbiológicos, foram feitas análises de correlação entre estas variáveis. Não houve correlação significativa entre qualquer um dos atributos químicos e o carbono da

biomassa microbiana (CBM) e por isso esta variável não aparece na Tabela 9. As correlações significativas observadas (n=16, p=0,05,  $r \geq 0,497$ ) são apresentadas graficamente.

TABELA 9: CORRELAÇÃO ENTRE ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO E O N MINERALIZADO ACUMULADO E ENTRE ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO E NBM. OS VALORES SIGNIFICATIVOS (COM  $r > 0,497$ ) ESTÃO SINALIZADOS EM NEGRITO).

Correlações com N mineralizado acumulado		Correlações com NBM	
Atributo do solo	Valor de $r^*$	Atributo do solo	Valor de $r^*$
pH CaCl <sub>2</sub>	-0,0582	pH CaCl <sub>2</sub>	<b>0,5037</b>
pH SMP	<b>0,5359</b>	pH SMP	<b>0,5765</b>
Al <sup>3+</sup>	<b>-0,5195</b>	Al <sup>3+</sup>	<b>- 0,5237</b>
(H+Al)	<b>-0,5180</b>	(H+Al)	<b>- 0,555</b>
m	0,398	m	- 0,3614
SB	0,355	SB	0,3813
V	0,383	V	0,4120
Ca <sup>2+</sup>	0,254	Ca <sup>2+</sup>	0,2136
Mg <sup>2+</sup>	0,488	Mg <sup>2+</sup>	<b>0,5219</b>
K	<b>0,499</b>	K	<b>0,5662</b>
Na <sup>+</sup>	0,169	Na	0,4452
P	0,2	P	0,4001
Cu	<b>0,731</b>	Cu	0,4592
Mn	0,266	Mn	<b>0,5034</b>
Fe	-0,306	Fe	0,0032
CTC efetiva	0,161	CTC efetiva	<b>0,5154</b>
T	<b>-0,533</b>	T	<b>- 0,5702</b>
CT	0,225	CT	-0,0014
NT	0,207	NT	0,105
C/N	0,051	C/N	- 0,1126
CBM	0,089	CBM	0,3403
NBM	0,479	N <sub>min</sub>	0,479

As correlações são consideradas significativas quando o valor de  $r \geq 0,497$ .

O pH CaCl<sub>2</sub> não apresentou correlação com os teores de N mineralizado acumulado, mas se correlacionou positivamente com o NBM (Tabela 9, Gráfico 11). Já o pH SMP correlacionou-se positivamente com a mineralização de nitrogênio (Gráfico 12) e com o NBM (Gráfico 13), o que está em concordância com as correlações negativas do N mineralizado acumulado e do NBM com os teores de alumínio (Gráficos 14 e 15) e com a acidez potencial (H+Al) (Gráficos 16 e 17). Como a maior parte da CTC do solo estava sendo ocupada por H+Al (Tabela 5), as correlações entre o N mineralizado e o NBM com a CTC também foram negativas (Tabela 9 e Gráfico 22). Estes dados indicam um efeito positivo da diminuição dos teores de Al e da acidez potencial, e da elevação do pH, na mineralização do N do solo. A diminuição do Al ocupando a CTC do solo, favoreceu a elevação dos teores de Ca, Mg e K no complexo de trocas do solo (Tabela 4), com reflexos positivos sobre a mineralização do nitrogênio, como comprovam as correlações positivas entre N mineralizado e NBM e os teores de Ca (não significativas), Mg e K (Tabela 9 e Gráficos 18 a 21). O NBM também se correlacionou positivamente com o P, mas sem significância estatística ao nível de 5% (Tabela 9 e Gráfico 23). O N mineralizado acumulado e o NBM mostraram, também, correlações positivas com os teores de Cu e Mn (Tabela 9 e Gráficos 24 e 25). O Cu, por apresentar teores superiores aos de Al no solo (Tabela 3 e 5), parece também ter ocupado parte da CTC, em detrimento ao Al.

Os teores de CT e NT no solo mostraram correlação positiva, mas não significativa, com os valores de N mineral acumulado e com o NBM (Tabela 9). Estas duas variáveis têm sido correlacionadas com a mineralização do N no solo, em áreas agrícolas (Biesek, 2012) e, também, em plantações de pinus no Paraná e em Santa Catarina (Zanon, dados não publicados).

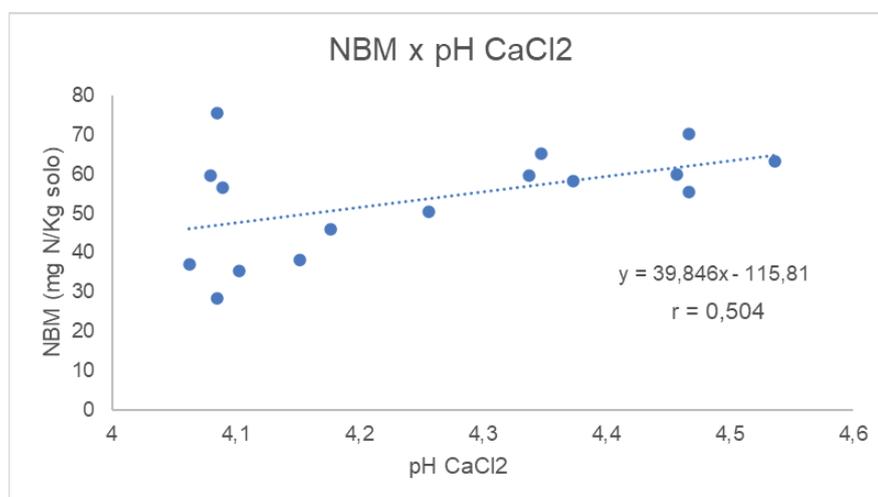


Gráfico 11: Correlação entre o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e o pH CaCl<sub>2</sub> do solo.

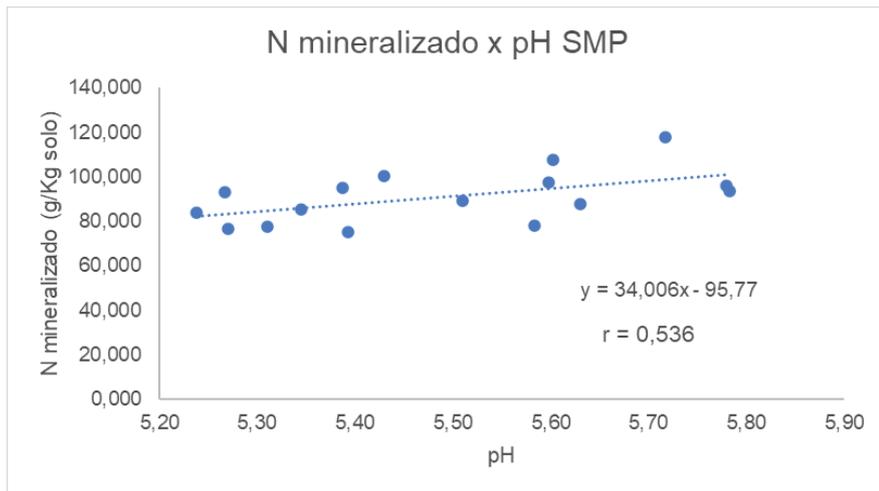


Gráfico 12: Correlação entre a mineralização de nitrogênio e a pH SMP no solo.

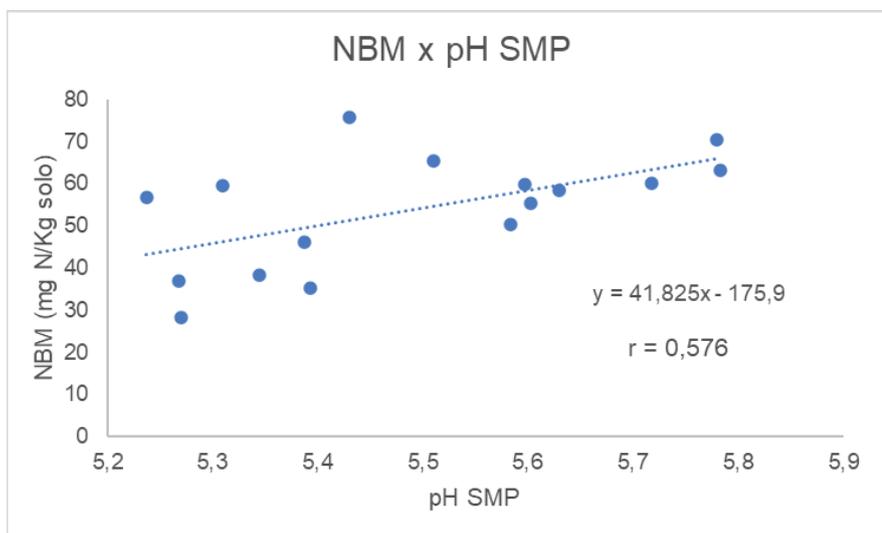


Gráfico 13: Correlação entre o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e o pH SMP do solo.

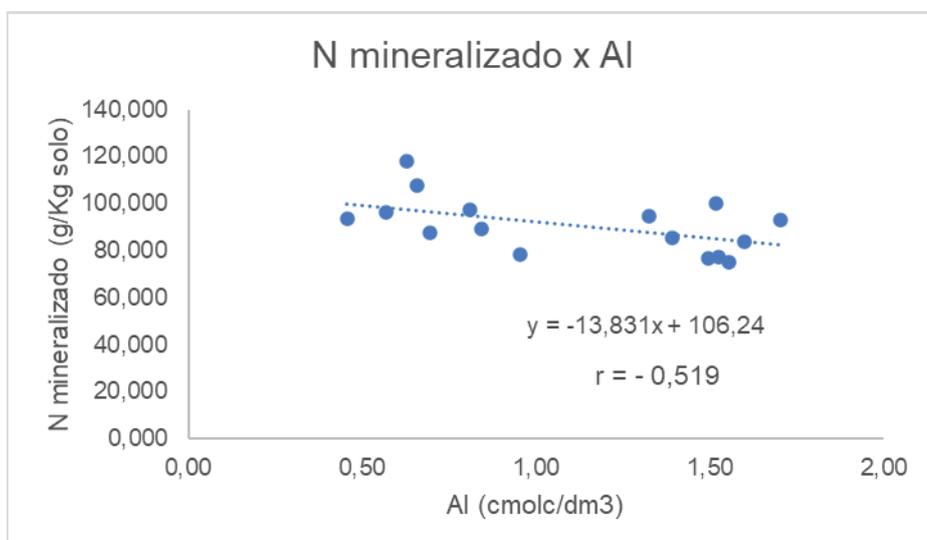


Gráfico 14: Correlação entre a mineralização de nitrogênio e a concentração de magnésio no alumínio.

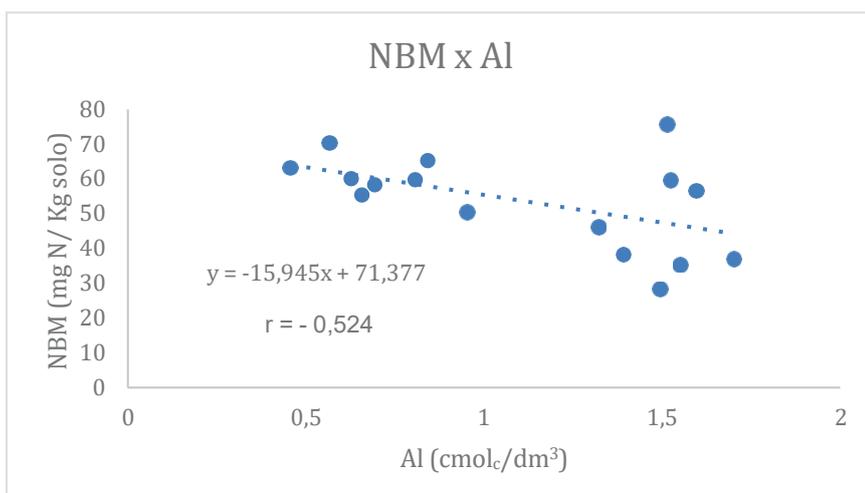


Gráfico 15: Correlação entre o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e a concentração de alumínio no solo

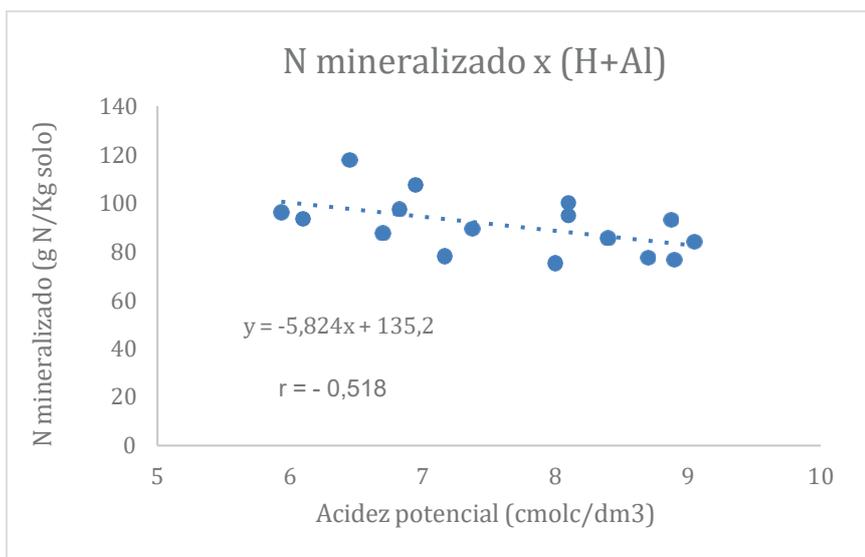


Gráfico 16: Correlação entre a mineralização de nitrogênio e a acidez potencial no solo.

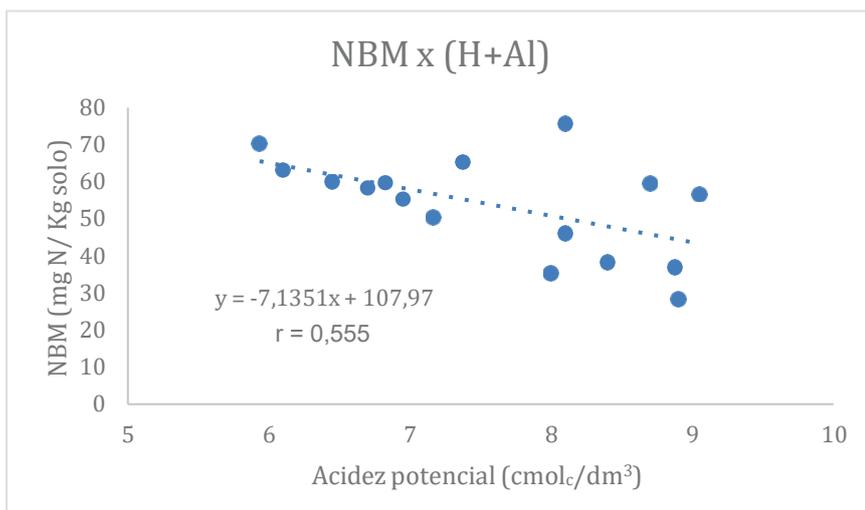


Gráfico 17: Correlação entre o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e a acidez potencial do solo.

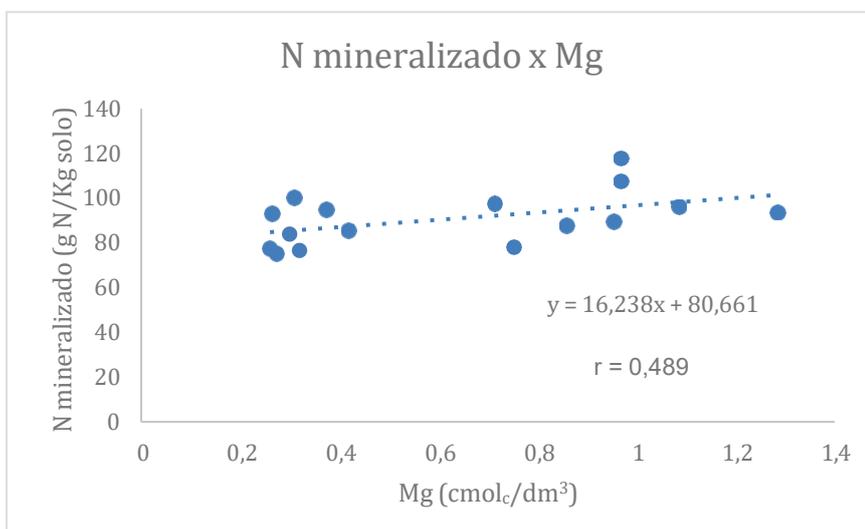


Gráfico 18: Correlação entre a mineralização de nitrogênio e a concentração de magnésio no solo.

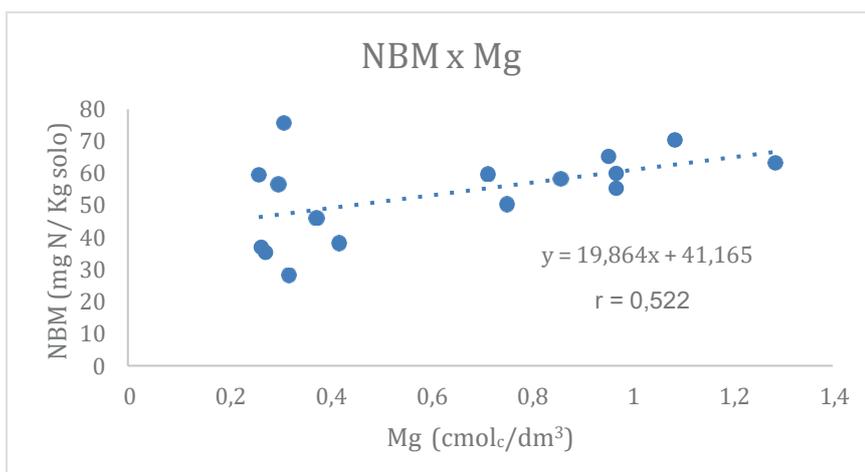


Gráfico 19: Correlação entre o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e a concentração de magnésio no solo.

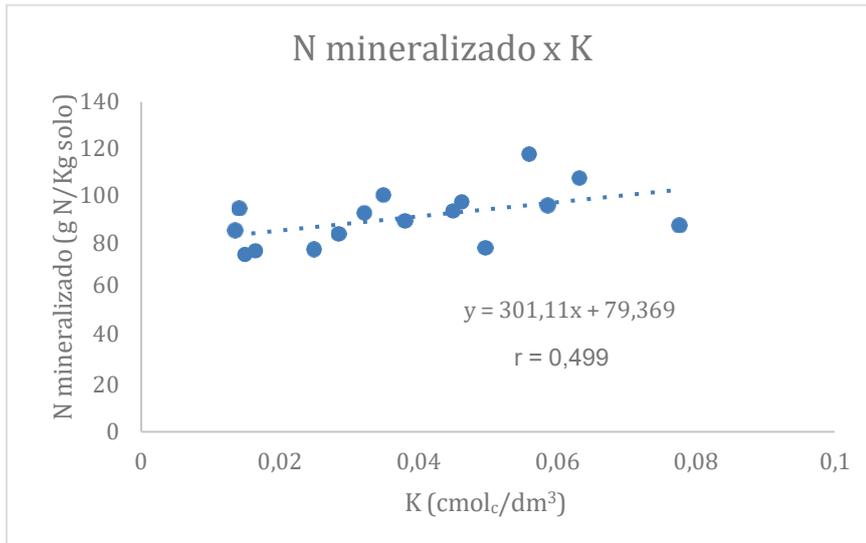


Gráfico 20: Correlação entre a mineralização de nitrogênio e a concentração de potássio no solo.

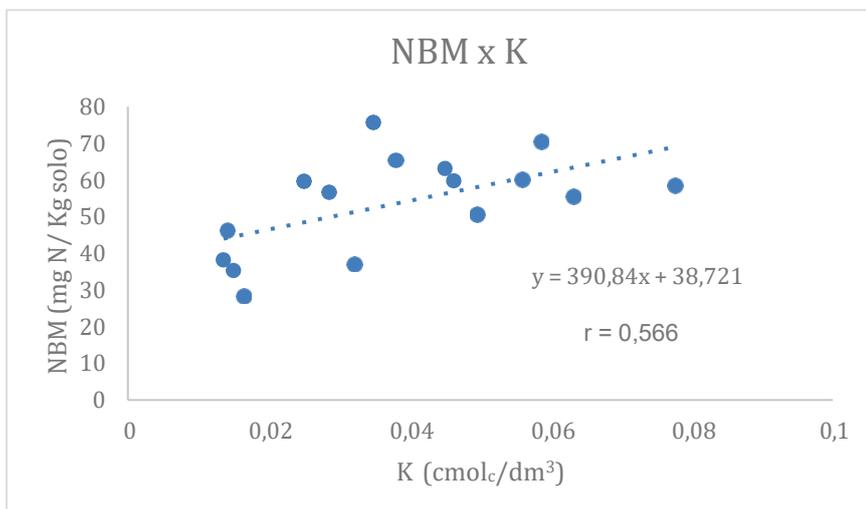


Gráfico 21: Correlação entre o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e a concentração de potássio do solo.

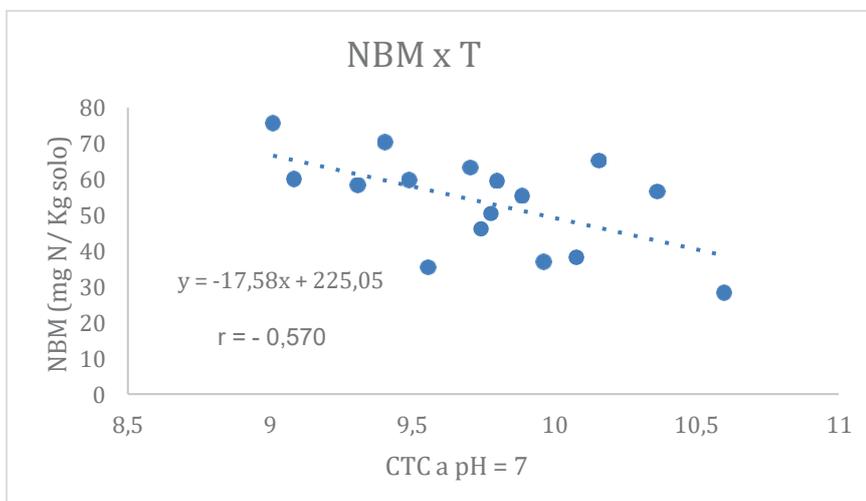


Gráfico 22: Correlação entre o nitrogênio da biomassa microbiana e a CTC a pH = 7 do solo.

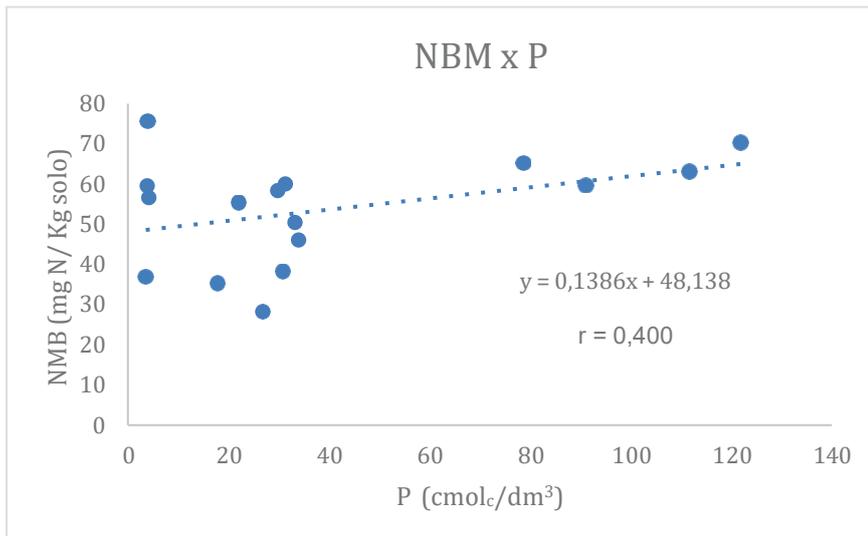


Gráfico 23: Correlação entre o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e a concentração de fósforo do solo.

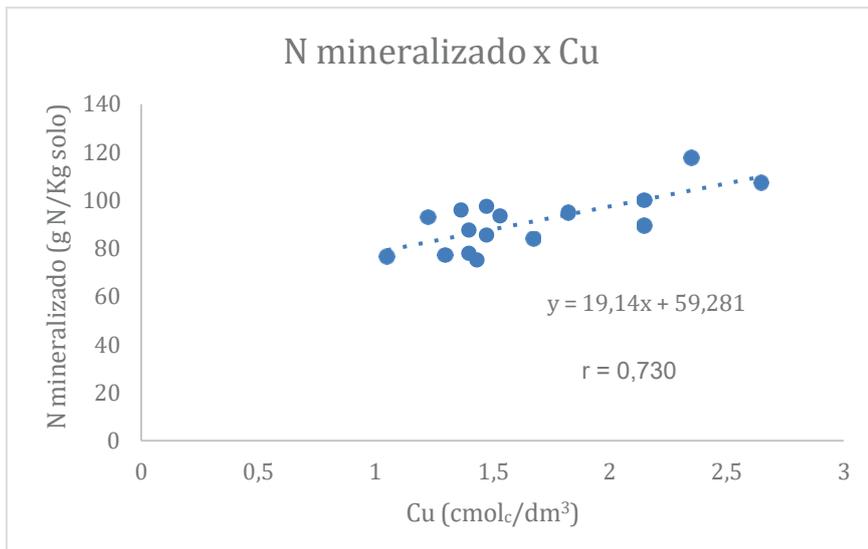


Gráfico 24: Correlação entre a mineralização de nitrogênio e a concentração de cobre no solo.

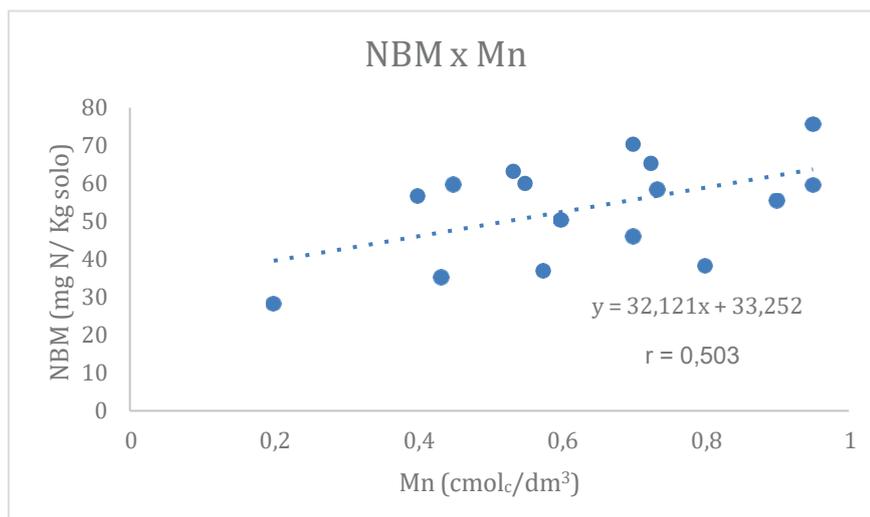


Gráfico 25: Correlação entre o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e a concentração de manganês no solo.

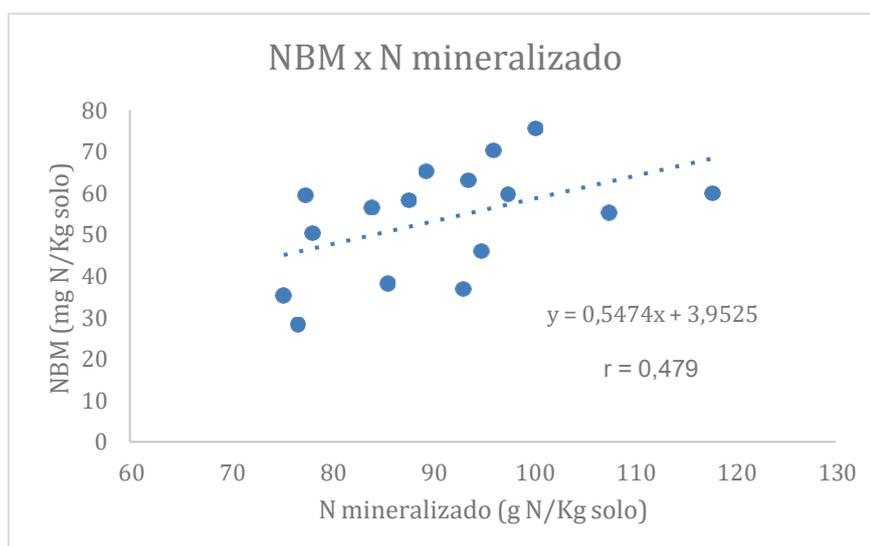


Gráfico 25: Correlação entre o nitrogênio mineralizado acumulado e nitrogênio da biomassa microbiana (NBM).

O carbono (CT) e o nitrogênio (NT) totais do solo são atributos de grande importância para a atividade microbiológica pois são as principais fontes de energia e nutrientes para os microrganismos. Maiores teores de MOS estão associados com níveis mais elevados da atividade microbiana no solo devido ao aumento nos teores de C (Moreira e Malavolta, 2004). Eles podem também ser parâmetros para a previsão da variação do CBM e do NBM ao longo do processo de mineralização de nutrientes (Gama-Rodrigues et al., 2005). Yagi et al. (2009) especificam que o teor de N orgânico total é um índice mais confiável para prever a mineralização líquida de N do que a MOS, pois apresenta coeficiente de correlação mais elevado do que a MOS. Esses autores também afirmam que os coeficientes de correlação tendem a aumentar ao longo da mineralização. Dada a baixa interferência das adições feitas

ao Latossolo original sobre o CT e o NT, não foi possível verificar essas tendências nos tratamentos deste estudo.

Foi observada correlação com valor pouco abaixo do significativo entre o NBM e o N mineralizado (Tabela 9 e Gráfico 25). Paz-Ferreiro et al. (2000) também observaram esta correlação positiva e afirmam que o carbono orgânico total e o NBM podem ser importantes substratos para a produção de enzimas relacionadas à ciclagem do N pelos microrganismos. Segundo Gama-Rodrigues et al. (2005), as variações observadas nos teores de CBM e NBM são mais pertinentes para análise do solo do que alterações observadas nos teores de C orgânico ou C total, devido à maior sensibilidade do CBM e do NBM às alterações do solo. Eles constituem parcelas de ciclagem rápida, refletindo alterações no solo decorrentes de mudanças de manejo ou dos fatores abióticos, antes mesmo que ocorram mudanças nos teores de MOS. Os autores também identificaram crescimento da comunidade microbiana ocasionada pela degradação mais rápida da MOS mediante o aumento da umidade do meio. Neste estudo, o NBM mostrou correlações significativas com maior número de atributos físicos e químicos do que o N mineralizado, refletindo sua sensibilidade às variações nas condições edáficas. Mas sempre que algum atributo mostrou correlação significativa com o NBM, o mostrou também com o N mineralizado, evidenciando a estreita relação entre a mineralização do N do teor de NBM.

O estudo de Gama-Rodrigues et al. (2005), assim como este, não apresentou correlações significativas entre o CBM e os atributos químicos do solo. Apenas o NBM foi significativamente alterado pelos atributos químicos do solo.

Paz-Ferreiro et al. (2000) trazem informações sobre a importância de um pH adequado no solo para que a degradação da MOS ocorra de forma mais eficiente. O pH em valores adequados pode estimular a atividade microbiana e a ciclagem de nutrientes, além de influenciar a disponibilidade de nutrientes no solo (Bartz et al., 2007). O aumento das bases no solo também é capaz de aumentar o pH do solo que, por sua vez, eleva a disponibilidade de nutrientes (Blair et al., 1995), podendo ter impacto sobre a atividade microbiana. Neste estudo, apenas algumas bases ( $Mg^{2+}$  e  $K^+$ ) mostraram correlação significativa com a mineralização de N (Tabela 9).

É interessante notar também que praticamente não houve variação do pH entre os tratamentos estudados, mesmo com adição de componentes que podem contribuir com a redução da acidez, como o biochar (Paz-Ferreiro et al., 2000; Topoliansz e Ponge, 2003) ou as minhocas, pela secreção e excreção de  $CaCO_3$  (Kale e Krishnamoorthy, 1980 apud Bartz et al., 2007).

O trabalho de Bartz et al. (2007) teve um resultado interessante sobre a capacidade das minhocas *P. corethrus* de alterarem o pH do solo pela excreção de  $\text{CaCO}_3$ . Os autores inocularam minhocas em amostras de solos de diferentes usos, sendo eles mata nativa, pastagem, plantio direto e plantio direto com subsolagem a cada 6 anos. Apenas os coprólitos das minhocas inoculadas em solos de mata nativa e pastagem tiveram pH mais alto do que o coprólitos produzidos no controle, não sendo observadas alterações nos coprólitos dos solos com plantio direto. Este resultado sugere que diferentes usos do solo podem ter influência sobre o pH dos coprólitos das minhocas e, por conseguinte, sobre o pH do solo alterado por elas.

Gonçalves et al. (2001) observaram que em situações em que a saturação por bases e o pH no meio são mais elevados, a nitrificação passa a ser mais expressiva. Neste estudo, o pH  $\text{CaCl}_2$  dos tratamentos foi baixo e teve variações muito pequenas, ficando entre 4,09 e 4,54. A saturação por bases, contudo, mostrou variações bem mais altas, e seus valores mais elevados ocorreram nos mesmos tratamentos que tiveram teores de N mineralizado mais elevados, corroborando com a afirmação de Gonçalves et al. (2001). Entre estes tratamentos estão BME, ME e M (Tabelas 3 e 7).

## 5. CONCLUSÕES

Entre os componentes adicionados ao solo, o esterco equino ajudou a reduzir a acidez no solo, com impacto positivo na disponibilidade de nutrientes; e contribuindo também para melhor desempenho da microbiota do solo.

Quanto à ação das minhocas *P. corethrus*, o estímulo gerado por elas à mineralização do N foi potencializado quando associado a outras adições. Apesar disso, os benefícios que as minhocas *P. corethrus* podem trazer à qualidade do solo e à atividade microbiana podem ser percebidos mesmo sem a associação com outros condicionadores de solo ou fontes nutricionais.

A atividade microbiológica sofreu influência negativa da acidez e influência positiva dos cátions básicos no solo.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, o comportamento menos esperado eram os valores elevados dos parâmetros microbiológicos (N mineralizado, CBM, NBM) no tratamento Testemunha, que não recebeu nenhum componente das TPIs, nem a ação das minhocas. Isto parece estar relacionado com uma menor exportação de nutrientes neste tratamento, no experimento anterior (Ferreira, 2020), quando plantas de milho foram cultivadas no mesmo solo do atual trabalho.

É necessário reforçar que os componentes adicionados ao solo no presente estudo são usualmente encontrados nas TPIs, mas a formação de uma TPI é um processo de longa duração, enquanto que o estudo aqui teve duração de alguns meses apenas. Assim, os resultados aqui obtidos não traduzem o que aconteceria nas TPIs. Seria interessante, entretanto, um estudo em paralelo com amostras de solo coletadas em áreas de TPI, de modo a melhor compreender as relações entre os componentes presentes nas TPIs e a atividade microbiológica nestes solos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amarante, C. et al., Diversidade microbiana em solos de Terra Preta Arqueológica. **Enciclopédia biosfera**, v. 6, n. 11, 2010.

Apha, A. E. G.; Awwa, A. D. E.; Wef, L. S. C. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington D. C.; **American Public Health Association**, 19 ed., 1995.

Araújo, S.P. Atributos biológicos do solo sob diferentes coberturas vegetais amostrados em duas estações do ano numa topossequência no Noroeste Fluminense – RJ. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003. 51p. (Tese de Mestrado)

Barois I., Lavelle P. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (G~OSSOSCO- lecidae, Oligochaeta), **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 18, 1986, p. 539-541.

Barois I., Villemin G., Lavelle P., Toutain F., Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract, **Geoderma**, vol. 56 (1993) 57–66.

Barois, I. et al. Ecology of earthworm species with large environmental tolerance and/or extended distributions. **Earthworm management in tropical agroecosystems**, p. 57-86, 1999.

Barois, I. et al., Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrus* (Oligochaeta) intestinal. In: **Soil Structure/Soil Biota Interrelationships: International Workshop on Methods of Research on Soil Structure/Soil Biota Interrelationships, Held at the International Agricultural Centre, Wageningen, The Netherlands, 24-28 November 1991**. Elsevier, 2013. p. 57.

Barois, I.; Lavelle, P. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 18, n. 5, p. 539-541, 1986.

BERNARD, L. et al., Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil. **The ISME journal**, v. 6, n. 1, p. 213-222, 2012.

Bodour A.A., Wang J.M., Brusseu M.L., Maier R.M., (2003). Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. **Environmental Microbiology**, vol. 5; p. 888–895.

Brown, G. G.; Barois, I.; Lavelle, P., Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. **European Journal of Soil Biology**, v. 36, n. 3-4, p. 177-198, 2000.

Brown, G. G.; Doube, B. M.; Edwards, C. A. Functional interactions between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants. **Earthworm ecology**, v. 2, p. 213-239, 2004.

Brown, G.G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity?. **Plant and soil**, v. 170, n. 1, p. 209-231, 1995.

Calgaro, H. F., et al., Resíduos orgânicos como recondicionante de subsolo degradado e efeitos na atividade microbiana e fertilidade em cultivo de barbatimão. **Revista Árvore**, v. 32, p. 1069-1079, 2008.

Campos, M. C. C., et al., Caracterização física e química de terras pretas arqueológicas e de solos não antropogênicos na região de Manicoré, Amazonas. **Revista agro ambiente on-line**, v. 6, n. 2, p. 102-109, 2012.

Chapuis-Lardy L., Brossard M., Lavelle P., Schouller E. (1998). Phosphorus transformations in a Ferralsol through ingestion by *Pontoscolex corethrus*, a geophagous earthworm. **European Journal of Soil Biol**, v. 34: p. 61–67.

Correia, A.A.D. **Bioquímica nos solos, nas pastagens e forragens**, Livro, Editora Calouste Gulbenkian, 1986.

Cravo, M.S.; SMYTH, T. J.; BRASIL, E. Calagem em Latossolo amarelo distrófico da Amazônia e sua influência em atributos químicos do solo e na produtividade de culturas anuais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 895-908, 2012.

Cunha, T. J. F.; Mendes, A. M. S.; GIONGO, V. Matéria orgânica do solo. **Embrapa Semiárido-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2015.

DA COSTA, Marcondes Lima; KERN, Dirse Clara. Geochemical signatures of tropical soils with archaeological black earth in the Amazon, Brazil. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 66, n. 1-2, p. 369-385, 1999.

De-Polli, H. Guerra, J.G.M. Biomassa microbiana: perspectivas para o uso e manejo do solo. In: ALVAREZ V., H.V. FONTES, L.E.F. & FONTES, M.P. O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996. p.552-564.

Devide, A. C.P., Terra preta de índio (TPI) Anthropogenic Dark Earth. 2012. do solo: o caso das terras pretas de índio e seus componentes. 2020. 133 p. Tese de doutorado em Ciência do Solo - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2020

Doran, John Walsh et al., Defining soil quality for sustainable environment. Wisconsin, US: **Soil Science Society of America**, 1994, pg 1-21.

Duxbury, J.M., Smith, M.S., Doran, J.W., 1989. Soil organic matter as a source and a sink of plant nutrients. In: Coleman, D.C., Oades, J.M., Uehara, G. (Eds.), **Dynamics of Soil Organic Matter in Tropical Ecosystems. NifTAL Project**, University of Hawaii Press, Honolulu, HI, pp. 33-67.

Ferreira, A.S. Camargo, F.A. & Vidor, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 23, p. 991-996, 1999.

Ferreira, T. Hansel, F.A., Maia, C.M.B.F. Guiotoku, M. Cunha, L., Brown, G.G. Earthworm-biochar interactions: A laboratory trial using *Pontoscolex corethrurus*. **Science of the Total Environment**, v. 777, p. 146147, 2021.

Ferreira, T. Relação entre as minhocas *Pontoscolex corethrurus* e a fertilidade do solo: o caso das terras pretas de índio e seus componentes (Biochar, matéria orgânica, cerâmica, Ca e P), Universidade Federal do Paraná – Ciência do Solo; Tese de Doutorado, Curitiba, 2020, 133 p.

Gama-Rodrigues, E.F. et al., Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 893-901, 2005.

Glaser B, Lehmann J, Steiner C, Nehls T, Yousaf M, Zech W (2002a) Potential of pyrolyzed organic matter in soil amelioration. In: People's Republic of China Ministry of Water Resources (ed) 12th International Soil Conservation Organization Conference, Beijing, China. Ministry of Water Resources, Beijing (in press)

Glaser, B. et al., Black carbon in density fractions of anthropogenic soils of the Brazilian Amazon region. **Organic Geochemistry**, v. 31, n. 7-8, p. 669-678, 2000.

Glaser, B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1478, p. 187-196, 2007.

Glaser, B., 1999. Eigenschaften und Stabilität des Humuskörperpers der Indianerschwarzerden Amazoniens. Bayreuther Bodenkundliche Berichte, v. 68.

Glaser, B; Birk, J. J. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de Índio). **Geochimica et Cosmochimica acta**, v. 82, p. 39-51, 2012.

Glaser, B; Lehmann, J; Zech, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal—a review. **Biology and fertility of soils**, v. 35, n. 4, p. 219-230, 2002b.

Gonçalves, J. L. M.; Mendes, K. C. F. S.; Sasaki, C. M. Mineralização de nitrogênio em ecossistemas florestais naturais e implantados do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 601-616, 2001.

Griffith, M. A. A pedological investigation of an archaeological site in Ontario, Canada, I. An examination of the soils in and adjacent to a former village. **Geoderma**, v. 24, n. 4, p. 327-336, 1980.

Heinzmann, F.X.; Miyazava, M.; Pavan, M.A. Determinação de nitrato por espectrofotometria de absorção ultravioleta. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.8, p.159-163, 1984.

Kämpf, N; Kern, D. C. O solo como registro da ocupação humana pré-histórica na Amazônia. **Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 4, p. 277-320, 2005.

Kern, D. C. Geoquímica e pedogeoquímica de sítios arqueológicos com terra preta na floresta nacional de Caxiuanã (Portel-PA). 1996. 124p. Tese de Doutorado. Centro de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém.

Lavelle P, Lattaud C, Trigo D, Barois I. (1994). Mutualism and biodiversity in soil. *Plant Soil* 170: 23–33.

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.

Lima, H. N. et al., Características químicas e mineralógicas e a distribuição de fontes de fósforo em Terras Pretas de Índio da Amazônia Ocidental. TEIXEIRA, Wenceslau G.; KERN, Dirse C.; MADARI, Beáta E, 2010.

Luchese, E.B.; Favero, L.O.B.; Lenzi, E.; Fundamentos da química do solo: teoria e prática. 2ª edição. Rio de Janeiro. Editora Freitas Bastos. 2002.

Mafongoya, P. L.; Barak, P.; Reed, J. D. Carbon, nitrogen and phosphorus mineralization of tree leaves and manure. **Biology and Fertility of soils**, v. 30, n. 4, p. 298-305, 2000.

Mancin, C. R. et al., Matéria orgânica e formas de alumínio em um Latossolo vermelho distroférico sob sistema plantio direto consolidado. 2010.

Marques, Jean Dalmo de Oliveira et al., Estudo de parâmetros físicos, químicos e hídricos de um Latossolo Amarelo, na região Amazônica. **Acta amazônica**, v. 34, p. 145-154, 2004.

Marques, R.; Motta, A.C.V. Análise química do solo para fins de fertilidade. In: LIMA, R.M. (Org.). **Manual de diagnóstico da fertilidade e manejo dos solos agrícolas**. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, p.81-102. 2003.

Menezes, R.S.C; Salcedo, I. H. Mineralização de N após incorporação de adubos orgânicos em um Neossolo Regolítico cultivado com milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 361-367, 2007.

Mioranza, M. Efeito da aplicação do biocarvão nos atributos microbiológicos do solo, cultivado com teca, no bioma Amazônia. 2016.

Mizuta, K.; Matsumoto, T.; Hatate, Y.; Nishihara, K.; Nakanishi, T. Removal of nitrate-nitrogen from drinking water using bamboo powder charcoal. **Bioresource Technology**, v.95, p.255-257, 2004

Norman, R. J. & Stucki, J. W. The determination of nitrate and nitrite in soil extracts ultraviolet spectrophotometry. *Soil Science Society of America Journal*. n. 45, p. 347-353, 1981.

Palansooriya, K. N. et al., Response of microbial communities to biochar-amended soils: a critical review. **Biochar**, v. 1, n. 1, p. 3-22, 2019.

Santana, G. Terra preta de índio na região Amazônica. **Scientia Amazonia**, v. 1, p. 1-8, 2012.

Santos, E. Carbono, nitrogênio e relação C/N em gleissolo e cambissolo sob diferentes tipologias vegetais na área de ocorrência da floresta ombrófila densa, Antonina-PR. 2007.

Shafizadeh F, Sekiguchi Y (1983) Development of aromaticity in cellulosic chars. *Carbon* 21:511–516

Silva, N.G. Mineralização do Nitrogênio e Disponibilidade de Nutrientes Após Incorporação de Adubos Orgânicos em Latossolo Amarelo Cultivado Com Cupuaçu. **XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA–CNPq/FAPEAM**, 2011.

Smith, J. L.; Collins, H. P.; Bailey, V. L. The effect of young biochar on soil respiration. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2345-2347, 2010.

Sparling, G.P. & West, A.W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial respiration and <sup>14</sup>C labelled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 337-343, 1988.

Tomé Júnior, J. B. Manual para interpretação de análise de solo. **Guaíba: agropecuária**, v. 247, 1997.

Vance, E. D. Brookes, P. C. Jenkinson, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.703-707, 1987.

Vergara, A. Maria, Y. Oligoquetos sob adição de liteira e sua relação com a disponibilidade de nitrogênio em solos de capoeira na Amazonia Central, **Repositório do Inpa**, Dissertação de Mestrado- Ecologia, Universidade do Amazonas, 104 p., Abril, 2000.

Vieira, R. F. Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas; **Embrapa: Brasília**, Brazil, 2017.

Yagi, R. et al., Mineralização potencial e líquida de nitrogênio em solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 385-394, 2009.

Zambrosi, F. C. B.; Alleoni, L. R. F.; CAIRES, E. F. Teores de alumínio trocável e não trocável após calagem e gessagem em Latossolo sob plantio direto. **Bragantia**, v. 66, p. 487-495, 2007.

Zaroni, M. J.; dos Santos, H. G. Formação do solo tropical. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. S.d. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/solos\\_tropicais/arvore/CONT000gn362j9v02wx5ok0liq1mqy0jc9b7.html#:~:text=O%20processo%20de%20forma%C3%A7%C3%A3o%20do,a%20vegeta%C3%A7%C3%A3o%20de%20uma%20regi%C3%A3o](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/solos_tropicais/arvore/CONT000gn362j9v02wx5ok0liq1mqy0jc9b7.html#:~:text=O%20processo%20de%20forma%C3%A7%C3%A3o%20do,a%20vegeta%C3%A7%C3%A3o%20de%20uma%20regi%C3%A3o)>. Acesso em: 11/03/2022.

ZECH, W. et al., Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, v. 79, n. 1-4, p. 117-161, 1997.

## ANEXO I

Número de repetições de cada tratamento que se encontravam disponíveis para a realização do presente estudo:

Tratamento	Número de repetições
Testemunha	2
M	4
B	2
E	4
P	4
PB	4
PE	4
BM	4
BE	2
ME	3
PM	3
PBE	3
PBM	3
PME	4
BME	3
PBME	4